

**INTERNATIONAL  
JOURNAL**

Institute of Knowledge Management

**KNOWLEDGE**



Scientific Papers  
Vol. 15.3.

**KNOWLEDGE IN PRACTICE**



<http://globalimpactfactor.com/knowledge-international-journal>  
Global Impact and Quality Factor 1.023 (2015)

Eleventh International Scientific Conference  
KNOWLEDGE IN PRACTICE  
16-18 December, 2016 Bansko, Bulgaria

---

**KNOWLEDGE**



***INTERNATIONAL JOURNAL***  
***SCIENTIFIC PAPERS***  
***VOL 15.3***

*16-18 December, 2016*

*Bansko, BULGARIA*

INSTITUTE OF KNOWLEDGE MANAGEMENT

SKOPJE, MACEDONIA



## KNOWLEDGE

International Journal Scientific papers Vol. 15.3

### EDITORIAL BOARD

Vlado Kambovski PhD, Robert Dimitrovski PhD, Sinita Zarić PhD, Maria Kavdanska PhD, Veselin Terziev PhD, Mirjana Borota – Popovska PhD, Predrag Trajković PhD, Jovica Kekenovski PhD, Svetlana Trajković PhD, Zivota Radosavljević PhD, Margarita Koleva PhD, Mile Matijević PhD, Nonka Mateva PhD, Rosita Chobanova PhD, Aleksandar Nikolovski PhD, Marija Knezević PhD, Snežana Miličević PhD, Irina Singavskaya PhD, Dzulijana Tomovska PhD, Oliver Dimitrijević PhD, Nedžad Korajlić PhD, Nebojška Pavlović PhD, Nikolina Ognenska PhD, Dimitrija Popovski PhD, Lisen Bashkurti PhD, Tome Naumov PhD, Trajce Dojcinovski PhD, Jana Merdzanova PhD, Zoran Srzentić PhD, Nikolai Sashkov Cankov PhD

Preparing and correction: Lijana Pushova

Print: GRAFOPROM – Bitola

Editor: IKM – Skopje

For editor

Robert Dimitrovski, PhD

KNOWLEDGE

International Journal Scientific Papers Vol. 15.3

ISSN 1857-92

SCIENTIFIC COMMITTEE

President: Academic, Prof. Vlado Kambovski PhD

- Prof. Robert Dimitrovski PhD, Faculty of Management, MIT University, Skopje (Macedonia)
- Prof. Zivota Radosavljević PhD, Dean, Faculty FORCUP, Union University, Belgrade (Serbia)
- Prof. Venelin Terziev PhD, University of Rousse (Bulgaria)
- Prof. Paul Sergius Koku PhD, Florida Atlantic University (USA)
- Prof. Cesar Birzea PhD, University of Bucharest (Romania)
- Prof. Rosica Cobanova PhD, Bulgarian Academy of Sciences (Bulgaria)
- Prof. Aleksandar Nikolovski PhD, FON University, Skopje (Macedonia)
- Prof. Anita Trajkovska PhD, Rochester University (USA)
- Prof. Sima Zarić, PhD, Faculty of Economics, University of Belgrade (Serbia)
- Prof. Milan Radosavljević PhD, Dean, Faculty of strategic and operational management, Union University, Belgrade (Serbia)
- Prof. Anka Trajkovska-Pedkoska PhD, UKLO, Faculty of technology and technical sciences, Bitola (Macedonia)
- Prof. Predrag Trajković PhD, JMPNT, (Serbia)
- Prof. Lidija Tozi PhD, Faculty of Pharmacy, Ss. Cyril and Methodius University, Skopje (Macedonia)
- Prof. Bistra Angelovska, Faculty of Medicine, University "Goce Delčev", Štip (Macedonia)
- Prof. Miško Hristovski PhD, Faculty of Veterinary Medicine, Ss. Cyril and Methodius University, Skopje (Macedonia)
- Prof. Jova Kekelovski PhD, Faculty of Tourism, UKLO, Bitola (Macedonia)
- Prof. Sasho Korunoski, Dean, Faculty of Tourism, UKLO, Bitola (Macedonia)
- Prof. Cvetko Andreovski, Vice rector, Faculty of Tourism, UKLO, Bitola (Macedonia)
- Prof. Margarita Koleva PhD, Dean, Faculty of Pedagogy, University Neofit Rilski, Blagoevgrad (Bulgaria)
- Prof. Aleksandar Donchev, MIT University, Faculty of Law, Skopje (Macedonia)
- Prof. Maria Kavdanska PhD, Faculty of Pedagogy, University Neofit Rilski, Blagoevgrad (Bulgaria)
- Prof. Mirjana Borota-Popovska, PhD, Centre for Management and Human Resource Development, Institute for Sociological, Political and Juridical Research, Skopje (Macedonia)
- Prof. Marija Topuzovska-Latkovic, PhD, Centre for Management and Human Resource Development, Institute for Sociological, Political and Juridical Research, Skopje (Macedonia)
- Prof. Marija Knezevic PhD, Academic, Banja Luka, (Bosnia and Herzegovina)
- Ljupco Neumovski PhD, Forum for Mobility and Research, Bitola (Macedonia)
- Prof. Oliver Iliev PhD, Faculty of Communication and IT, FON University, Skopje (Macedonia)
- Prof. Dimitrija Popovski PhD, Faculty of Sport, Ss. Cyril and Methodius University, Skopje (Macedonia)
- Prof. Yuri Doroshenko PhD, Dean, Faculty of Economics and Management, Belgorod (Russian Federation)
- Prof. Ilija Nasov PhD, Research and Development center PLASMA, Skopje (Macedonia)
- Prof. Sashko Plachikov PhD, Faculty of Pedagogy, University Neofit Rilski, Blagoevgrad (Bulgaria)
- Prof. Ivan Pedkov PhD, Rector, European Polytechnic University, Pernik (Bulgaria)
- Prof. Vladimir Lazarov PhD, European Polytechnic University, Pernik (Bulgaria)
- Prof. Tosko Krstev PhD, European Polytechnic University, Pernik (Bulgaria)
- Prof. Antoanela Hristova PhD, European Polytechnic University, Pernik (Bulgaria)
- Prof. Azra Adžajlić – Đedović PhD, Faculty of criminology and security, Sarajevo (Bosnia & Herzegovina)

Eleventh International Scientific Conference  
KNOWLEDGE IN PRACTICE  
16-18 December, 2016 Bansko, Bulgaria

---

- Prof. Aleksandar Korablev, PhD, Dean, Faculty for economy and management, Saint Petersburg State Forest Technical University, Saint Petersburg (Russian Federation)
- Prof. Primoz Dolenc, PhD, Faculty of Management, Primorska University, Koper (Slovenia)
- Doc. Igor Strubelj, PhD, PhD, Faculty of Management, Primorska University, Koper (Slovenia)
- Prof. Hristo Beloev PhD, Bulgarian Academy of Science, Rector of the University of Rousse (Bulgaria)
- Prof. Branko Sotirov PhD, University of Rousse (Bulgaria)
- Prof. Karl Schopf, PhD, Akademie für wissenschaftliche forschung und studium, Wien (Austria)
- Prof. Isa Spahija PhD, International Balkan University (Macedonia)
- Prof. Volodymyr Denyryuk, PhD, Dobrov Center for Scientific and Technological Potential and History studies at the National Academy of Sciences of Ukraine (Ukraine)
- Prof. Laste Spasovski PhD, Vocational and educational centre, Skopje (Macedonia)
- Prof. Branislav Simonovic PhD, Faculty of law, Kragujevac (Serbia)
- Prof. Dragan Kokovic PhD, University of Novi Sad, Novi Sad (Serbia)
- Prof. Saska Kicoshev PhD, University of Novi Sad, Novi Sad (Serbia)
- Prof. Pere Tumbas PhD, Faculty of Economics, University of Novi Sad, Subotica (Serbia)
- Prof. Natalija Kirjenko PhD, Faculty For economic and Business, Institute of Entrepreneurial Activity, Minsk (Belarus)
- Prof. Zoya Katru PhD, Prorector, Euro College, Istanbul (Turkey)
- Prof. Mustafa Kacar PhD, Euro College, Istanbul (Turkey)
- Prof. Evgenia Penkova-Pantaleeva PhD, UNWE -Sofia (Bulgaria)
- Prof. Nikolina Ognenska PhD, Faculty of Music, SEU - Blagoevgrad (Bulgaria)
- Prof. Tihomir Domazet PhD, President of the Croatian Institute for Finance and Accounting
- Prof. Stojan Ivanov Ivanov PhD, Faculty of Public Health and Sport, SWU Neofit Rilski, Blagoevgrad (Bulgaria)
- Maja Lubenova Cholakovska PhD, Faculty of Public Health and Sport, SWU Neofit Rilski, Blagoevgrad (Bulgaria)
- Daniela Ivanova Popova PhD, Faculty of Public Health and Sport, SWU Neofit Rilski, Blagoevgrad (Bulgaria)
- Prof. Branimir Kampa PhD, Institute SANO, Zagreb (Croatia)
- Prof. Marina Simin PhD, College of professional studies in Management and Business Communication, Sremski Karlovci (Serbia)
- Prof. Miladin Kalinic, College of professional studies in Management and Business Communication, Sremski Karlovci (Serbia)
- Prof. Helmut Stranske PhD, former Head of the University of Vienna Reform Group (Austria)
- Prof. Ahmad Zakari PhD, University of Wolver Hampton, (United Kingdom)
- Prof. Izako Pantaleev PhD, NBUniversity, Sofia (Bulgaria)
- Prof. Liven Bashkurti PhD, Global Vice President of Sun Moon University (Albania)
- Prof. Baki Koleci PhD, University Hadzi Zeka, (Kosovo)
- Prof. Ivana Jelik PhD, University of Podgorica, Faculty of Law, (MNE)
- Prof. Islam Hasani PhD, Kingston University (Bahrain)
- Prof. Rumien Valcovski PhD, Immunolab Sofia (Bulgaria)
- Prof. Jenko Kunchev PhD, University „Cemeterisec Hrabar“ - Varna (Bulgaria)
- Prof. Nedjad Korajlic PhD, Faculty of criminology and security, Sarajevo (Bosnia & Herzegovina)
- Prof. Alisabri Sabani PhD, Faculty of criminology and security, Sarajevo (Bosnia & Herzegovina)
- Prof. Jova Ataljevic PhD, Faculty of Economy, University of Banja Luka, (Bosnia & Herzegovina)
- Prof. Branislav Simonovic PhD, Faculty of law University of Kragujevac (Serbia)
- Doc. Taryana Sobolieva PhD, State Higher Education Establishment Vadiym Getman Kiyev National Economic University, Kiyev (Ukraine)

- Prof. Svetlana Trajkovic PhD, High School of applied professional studies, Vranje (Serbia)
- Prof. Suzana Pavlovic PhD, High health – sanitary school for professional studies, Belgrade (Serbia)
- Prof. Zorka Jugovic PhD, High health – sanitary school for professional studies, Belgrade (Serbia)
- Prof. Dragan Mariakovic PhD, High health – sanitary school for professional studies, Belgrade (Serbia)
- Prof. Dusan Ristic, PhD Emeritus – Faculty of Management, Sremski Karlovci (Serbia)
- Prof. Rumena Stefanov, PhD, Dean, Faculty of public health, Medical University of Plovdiv (Bulgaria)
- Prof. Stojana Ristevska PhD, Dean, High Medicine School, Bitola, (Macedonia)
- Prof. Snezana Stoulova, PhD, High Medicine School, Bitola, (Macedonia)
- Prof. Lence Mircevska PhD, High Medicine School, Bitola, (Macedonia)
- Prof. Danijana Tomovska, PhD, Dean, Faculty of Biotechnical sciences, Bitola (Macedonia)
- Prof. Mitre Stojanovski PhD, Faculty of Biotechnical sciences, Bitola (Macedonia)
- Prof. Ljupce Kocovski PhD, Faculty of Biotechnical sciences, Bitola (Macedonia)
- Prof. Vasil Zecov PhD, College of tourism, Blagoevgrad (Bulgaria)
- Prof. Nikola Bozkov PhD, College of tourism, Blagoevgrad (Bulgaria)
- Prof. Vasil Pehlivanov PhD, College of tourism, Blagoevgrad (Bulgaria)
- Prof. Oliver Dimitrijevic PhD, High medicine school for professional studies "Hipokrat", Bujanovac (Serbia)
- Prof. Ernika Antic PhD, High medicine school for professional studies "Hipokrat", Bujanovac (Serbia)
- Prof. Jelena Stojanovic PhD, High medicine school for professional studies "Hipokrat", Bujanovac (Serbia)
- Prof. Georgi Georgiev PhD, National Military University "Vasil Levski", Veliko Trnovo (Bulgaria)
- Prof. Miodrag Smelcarovic PhD, High medicine school for professional studies "Hipokrat", Bujanovac (Serbia)
- Doc. Ana Dzumalievca PhD, South-West University "Neofit Rilski", Blagoevgrad (Bulgaria)
- Doc. Marija Kostic PhD, Faculty of Hotel Management and Tourism, Vrnjaska Banja (Serbia)
- Doc. Sandra Živanovic PhD, Faculty of Hotel Management and Tourism, Vrnjaska Banja (Serbia)
- Doc. Snežana Milicevic PhD, Faculty of Hotel Management and Tourism, Vrnjaska Banja (Serbia)
- Doc. Nebojsa Pavlovic PhD, Faculty of Hotel Management and Tourism, Vrnjaska Banja (Serbia)
- Prof. Kamal Al-Nakib PhD, College of Business Administration Department, Kingdom University (Bahrain)
- Prof. Venus Del Rosario PhD, Arab Open University (Philippines)
- Prof. Nishad M. Navaz PhD, Kingdom University (India)

## AFLATOXINS AND OCHRATOXINS, HARMFUL MYCOTOXINS FOR HUMAN AND ANIMAL HEALTH

Vaso Talecki  
Marija Bojkovska  
Biljana Gjorgjeska  
Liljana Simjanovska  
Faculty of Medical Sciences, University „Goce Delchev“ - Shtip, Republic of Macedonia  
[vaso.talecki@ugd.edu.mk](mailto:vaso.talecki@ugd.edu.mk)

**Abstract:** Aflatoxins and ochratoxins are toxic and carcinogenic mycotoxins produced as secondary metabolites by several moulds species.

Aflatoxins are produced by *Aspergillus flavus* and *Aspergillus parasiticus* in dry conditions and high temperatures. Food and feed may be contaminated during harvest, transport, and storage and processing.

Contaminated food, imported in human body may cause harmful effects including liver cancer.

The aflatoxins consist of about 20 similar compounds but only four (B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>, G<sub>1</sub> and G<sub>2</sub>) are naturally found in foods.

Aflatoxin B<sub>1</sub> is the most commonly found in food and also the most toxic. If lactating animals ingest aflatoxins by contaminated feed, toxic metabolites may be present in milk. Aflatoxin M<sub>1</sub> and M<sub>2</sub> are important contaminants in dairy products. Cereals, nuts, figs, tobacco and many other food products may be contaminated by aflatoxins.

The EU sets limits for aflatoxin B<sub>1</sub> and for total aflatoxins (B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>, G<sub>1</sub> and G<sub>2</sub>) in nuts, dried fruits, cereals and spices range from 2-12 µg/kg for B<sub>1</sub>, from 4-15 µg/kg for total aflatoxins and 0.050 µg/kg for aflatoxin M<sub>1</sub> in milk and milk products. Limits of 0.10 µg/kg for B<sub>1</sub> and 0.025 µg/kg for M<sub>1</sub> have been set for infant foods.

US food safety regulations include a limit of 20 µg/kg for total aflatoxins (B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>, G<sub>1</sub> and G<sub>2</sub>) in all foods and 0.5 µg/kg for M<sub>1</sub> in milk. Higher limits apply in animal feeds.

Ochratoxins are secondary metabolites produced by *Aspergillus ochraceus*, *Aspergillus niger* and *Penicillium verrucosum*.

Ochratoxins include: ochratoxin A (OTA), B, C, α and β. The most important and most toxic, found naturally in food, is ochratoxin A (OTA). The ochratoxin B, is rare and much less toxic, also may be found in food. Ochratoxins may be detected on various types of food and feed, in conditions of higher moisture and high temperatures, during harvest transport, storage and processing. Ochratoxins are toxic for kidneys and liver.

Because of toxic harmful actions for human and animal health, food and feed protection aflatoxins and ochratoxins is very important. Separation of contaminated from non-contaminated food and feed is essential for prevention of human and animal health and high economy savings.

Real situation with contamination of food and toxic effects of aflatoxins and ochratoxins on human and animal health are unknown.

**Keywords:** aflatoxin, *Aspergillus*, ochratoxin, secondary metabolites.

## АФЛАТОКСИНИ И ОХРАТОКСИНИ, ШИТНИ МИКОТОКСИНИ ЗА ЗДРАВЈЕТО НА ЛУЃЕТО И ЖИВОТНИТЕ

Vaso Talecki  
Marija Bojkovska  
Biljana Gjorgjeska  
Liljana Simjanovska  
Факултет за медицински науки, Универзитет „Гоце Делчев“ Штип,  
Република Македонија [vaso.talecki@ugd.edu.mk](mailto:vaso.talecki@ugd.edu.mk)

**Резиме:** Афлатоксините и охратоксините се токсични и канцерогени микотоксини продуцирани како секундарни метаболити на некои врсти на гинџи.

Афлатоксините ги продуцираат *Aspergillus flavus* и *Aspergillus parasiticus* во услови на сушина и високи температури. Храната и храната може да се контаминираат за време на жетва, транспорт, складирање и процесирање.

Контаминирањата преку влезот во човечкото тело може да приттишт штетни ефекти вклучувајќи и рак на црниот дроб.

Афлатоксините се состојат од околу 20 слични компоненти но само четири (B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>, G<sub>1</sub> и G<sub>2</sub>) може да се најдат природно во храната. Афлатоксинот B<sub>1</sub> најчесто се вклопа и е најтоксичен. Ако животни во лактација влезат афлатоксини со контаминирани храна, токсичните метаболити може да ги влезат во

млечното. Афлатоксини  $M_1$  и  $M_2$ , се важни контаминанти на млечното и млечните производи. Житнираци, оревци, смокви, тутун и многу други видови храна можат да бидат контаминирани со афлатоксини.

ЕУ лимити за афлатоксин  $B_1$  и за вкупни афлатоксини ( $B_1, B_2, G_1$  и  $G_2$ ) во оревци, суво овошје, житарици и зехтин е во граница од 2-12  $\mu\text{g/kg}$  за  $B_1$ , од +15  $\mu\text{g/kg}$  за вкупни афлатоксини и 0.050  $\mu\text{g/kg}$  за афлатоксини во млеко и млечни продукти. Лимити од 0.10  $\mu\text{g/kg}$  за  $B_1$  и 0.025  $\mu\text{g/kg}$  за  $M_1$  се одредени за храна за бебџа.

US процените за безбедност на храна вклучуваат лимити од 20  $\mu\text{g/kg}$  за вкупни афлатоксини ( $B_1, B_2, G_1$  и  $G_2$ ) за секоја храна и 0.5  $\mu\text{g/kg}$  за  $M_1$  во млеко. За храна лимитите се повисоки.

Ократоксините се секундарни метаболити произведени од *Aspergillus ochraceus*, *Aspergillus niger* и *Penicillium verticillium*. Ократоксините вклучуваат ократоксини А, Б, Ц, и анд  $\beta$ . Најважни и најтоксички, природно најдени во храна, е ократоксин А (ОТА). Ократоксин Б, е реток и многу помалку токсички, исто така може да се најде во храна.

Ократоксините може да се детектираат на разни видови храна, во услови на висока влажност и високи температури, за време на жетва, транспорт, складирање и процесирање. Ократоксините се токсични за бубрезите и преносот дроб.

Заради штетните токсични ефекти врз здрајето на луѓето и животните, амплитата на храната и храната од афлатоксини и ократоксини е многу важна. Осигурањето на контаминирање од контаминирање храна и храна е неопходно за превенција на здрајето на луѓето и животните и за големи економски штети.

Вистинската состојба со контаминација на храната и токсичните ефекти на афлатоксините и ократоксините врз здрајето на луѓето и животните не е позната.

Клучни зборови: афлатоксини, *Aspergillus*, ократоксини, секундарни метаболити

## 1. ВОВЕД

Микотоксините се секундарни метаболити на некои видови фунги, способни да предизвикаат болести и смрт кај луѓето и кај животните. Постојат повеќе видови на микотоксини: афлатоксини, ократоксини, зитриксини, аргот алакокси, фузариолини, патулин, зеараленон. Постојат најмалку 14 различни видови на афлатоксини. Примерно се делат во две групи: 1. дифурокумаролизолоксони (Афлатоксини  $B_1$  и  $B_2$ ) и 2. дифурокумаролизони (Афлатоксини  $G_1$  и  $G_2$ ). Други видови се  $M_1$  и  $M_2$ , кои претставуваат оксидирани форми на афлатоксинот  $B_1$ , а се изолирани од млеко, урина и фекаси. Најнајчисти и најраспространети производени на афлатоксини се *Aspergillus flavus* и *Aspergillus parasiticus*. *A. flavus* произведува  $B_1$  и  $B_2$ , *A. parasiticus* произведува афлатоксини  $B_1, B_2, G_1, G_2$ . Најважна биосинтеза вклучува најмалку 18 сепаратни реакции и 25 гени. Афлатоксинот  $B_1$  е најважниот природен канцероген токсин, кој го кацата мисирот.

Во 1965 година е откриен ократоксинот како секундарен метаболит на *Aspergillus ochraceus*, *Aspergillus niger* и мушката *Penicillium verticillium*. Постојат неколку метаболити на ократоксинот (А, Б, С, ократоксини алфа и ократоксин бета). Најважниот е ократоксин А (ОТА).

## 2. ПРОДУКЦИЈА НА МИКОТОКСИНИ

### 2.1. Продукција на афлатоксини

Честа појава е житни култури, смокви, оревци, тутун и многу други житарици, да бидат природно контаминирани пред берба или при чување во услови поволиви за растење на мушките. *A. flavus* е почесто присутен на твезна и житни култури а *A. parasiticus* на грашок и житарки. Контаминацијата на културите пред берба е најчесто придружена со појава на сува и високи температури (Dismar, 1987). Други важни фактори се присутни нивоори на азот (Nair, 1970), и некои земни киселини: пролин, метионин, триптофан. Аспарагин е неопходен при растење и продуцирање на токсини на *A. parasiticus*. Дури и некавалоснаста храна и некавалоснаста суровина може да содржат афлатоксини. Спорите на фунгите може да се превозат со животни (мува, оси или твеза) или со птици. Спорите на 'ртат, на продуцираат митаксум, а на крај продуцираат афлатоксини. Семењата може да бидат контаминирани преку животни. Спорите на *A. flavus* и *A. parasiticus*, може да 'ртат на површината промишлените и во процесот на осушување (Hill, 1983).

### 2.2. Продукција на ократоксини

Ократоксините се секундарни метаболити на *A. ochraceus*, *A. carbonarius*, *A. nidulans*, *A. niger*, *A. terreus*, *A. utahensis*, *A. retraktii*, *A. sclerotiorum*, *A. sulfuratus* и *Penicillium verticillium*. Зарадуваат житните зрна, леќа, млекото, искумените овошја, кафеото, пшето и виното. Ократоксин А (ОТА) е пронајден и во товалното млеко и кра. ОТА е нефротоксички и за животните и за луѓето (Stoer, 1999). Во студии со животни, ОТА покажал иммуносупресивно дејство, тератоген, канцероген и нефротоксички ефекти.

*A. ochraceus* и слични фунги растат на места со многу мала количина на вода и умерена температура. Оваа видова фунги најчесто се поврзуваат со сува храна, најчесто житарици. *A. carbonarius* расте на високи температури и продуцира спорите и кифи кои се присутни на УВ светлина. Најчесто се внога на грозје и слични овошја (Pin, 1987).



млечното. Афлатоксини M<sub>1</sub> и M<sub>2</sub> се важни контаминанти на млечното и млечните производи. Житарни, оревни, слезови, тутун и многу други видови храна можат да бидат контаминирани со афлатоксини. ЕУ лимити за афлатоксини B<sub>1</sub> и за вкупни афлатоксини (B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>, G<sub>1</sub> и G<sub>2</sub>) во оревни, суво овошје, житарни и млеко и во гренаш од 2-12 µg/kg за B<sub>1</sub>, од 4-15 µg/kg за вкупни афлатоксини и 0.050 µg/kg за афлатоксини во млеко и млечни производи. Лимити од 0.10 µg/kg за B<sub>1</sub> и 0.025 µg/kg за M<sub>1</sub> се одредени за храна за бевбања.

US прописите за безбедност на храна вклучуваат лимити од 20 µg/kg за вкупни афлатоксини (B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>, G<sub>1</sub> и G<sub>2</sub>) за секоја храна и 0.5 µg/kg за M<sub>1</sub> во млеко. За храна лимитите се повисоки.

Ократоксините се секундарни метаболити продуцирани од *Aspergillus ochraceus*, *Aspergillus niger* и *Penicillium verrucosum*. Ократоксините вклучуваат ократоксини A, B, C, а кај β. Најважни и најтоксични, природно најчесто во храна, е ократоксин A (OTA). Ократоксин B, е редок и многу помалку токсичен, исто така може да се најде во храна.

Ократоксините може да се детектираат на разни видови храна, во услови на висока влажност и високи температури, за време на жетва, транспорт, складирање и преработка. Ократоксините се токсични за бубрегот и црниот дроб.

Заради штетните токсични ефекти врз здравјето на луѓето и животните, заштитата на храната и храната од афлатоксини и ократоксини е многу важна. Освојувањето на контаминација од контаминирани храна и храна е неопходно за превенција на здравјето на луѓето и животните и за голем економски штетни.

Вистинската состојба со контаминација на храната и токсичните ефекти на афлатоксините и ократоксините врз здравјето на луѓето и животните не е позната.

Клучни зборови: афлатоксини, *Aspergillus*, ократоксини, секундарни метаболити

## 1. ВОВЕД

Микотоксините се секундарни метаболити на некои видови фунги, способни да предизвикаат болести и смрт кај луѓето и кај животните. Постојат повеќе видови на микотоксини: афлатоксини, ократоксини, патурици, другот алкалоиди, фузариеници, патуници, аспергилени. Постојат вкупно 14 различни видови на афлатоксини. Првпат се делат во две групи: 1. дифурокумаролинони (Афлатоксини B<sub>1</sub> и B<sub>2</sub>) и 2. дифурокумаролинони (Афлатоксини G<sub>1</sub> и G<sub>2</sub>). Други видови се M<sub>1</sub> и M<sub>2</sub>, кои претставуваат оксидирани форми на афлатоксинот B<sub>1</sub>, а се изолирани од млеко, урина и фекаси. Најважни и најраспространети продуценти на афлатоксини се *Aspergillus flavus* и *Aspergillus parasiticus*. *A. flavus* продуцира B<sub>1</sub> и B<sub>2</sub>, *A. parasiticus* продуцира афлатоксини B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>, G<sub>1</sub>, G<sub>2</sub>. Нивната биосинтеза вклучува најмалку 18 ензимски реакции и 25 гени. Афлатоксинот B<sub>1</sub> е најсилниот природен канцероген токсин, кој го имаат кинрот.

Во 1965 година е откриен ократоксинот како секундарен метаболит на *Aspergillus ochraceus*, *Aspergillus niger* и муцлата *Penicillium verrucosum*. Постојат неколку метаболити на ократоксинот (A, B, C, ократоксини алфа и ократоксин бета). Најважниот е ократоксин A (OTA).

## 2. ПРОДУКЦИЈА НА МИКОТОКСИНИ

### 2.1. Продукција на афлатоксини

Честа појава е житарни култури, слезови, оревни, тутун и многу други земјоделски, да бидат природно контаминирани пред берба или при чување во услови поволи за растење на муцлата. *A. flavus* е почесто присутен на пшеница и житарни култури а *A. parasiticus* на гренок и кинкратки. Контаминацијата на културите пред берба е најчесто придружена со појава на суша и високи температури (Dijkze, 1987). Други важни фактори се присутни извори на леот (Nair 1970), и некои млеко киселини: пропион, метилонин, глутамат. Аспергил е неопходен при растење и продуцирање на токсини на *A. parasiticus*.

Дури и микотоксините храна и микотоксините сувилен може да содржат афлатоксини. Спорите на фунгите може да се пренесат со животни (мува, оса или штетци) или со птици. Спорите на 'рѓат, на продуцираат микотоксини, а на крај продуцираат афлатоксини. Семењата може да бидат контаминирани преку животни. Спорите на *A. flavus* и *A. parasiticus*, може да 'рѓат на површината приминаните и во процесот на освојување (Hill, 1983).

### 2.2. Продукција на ократоксини

Ократоксините се секундарни метаболити на *A. ochraceus*, *A. carbonarius*, *A. niger*, *A. versicolor*, *A. nidulans*, *A. terreus*, *A. sclerotiorum*, *A. nidulans* и *Penicillium verrucosum*. Зарадуваат житните зрна, пакувањата, муцуните, овозите, кафеото, пшеницата и жито. Ократоксин A (OTA) е присутен и во човековото млеко и крв. OTA е нефротоксичен и за животните и за луѓето (Stearu, 1999). Во студии со животни, OTA покажал мултиосупресивно дејство, тератоген, канцероген и нефротоксичен ефекти. *A. ochraceus* и слични фунги растат на места со многу мала количина на вода и умерен температура. Овие видови фунги најчесто се поврзуваат со сува храна, најчесто житарни. *A. carbonarius* расте на високи температури и продуцира спорите и кифи кои се резистентни на UV светлина. Најчесто се застава на грозје и слични овошја (Pit, 1987).

*Penicillium notatum* се појвува на житарици (гвездицата, пченица, соја, кикирички) кои растеле на ниска температура, во Северна и Централна Европа, Кина (Pitt, 2002).

### 3. МЕХАНИЗМ НА ДЕЈСТВО ВРЗ ЗДРАВЈЕТО НА ЛУТЕТО

#### 3.1. Афлатоксини

Афлатоксинот В<sub>1</sub> (AFB<sub>1</sub>), е најканцероген од сите афлатоксини. При метаболизмот на AFB<sub>1</sub> се формираат метаболити: AFQ<sub>1</sub>, AFM<sub>1</sub> (оксидирани форми) и AFP<sub>1</sub> (метилирани форми). Овие метаболити се користат како биомаркери кај луѓето и истите се пронајдени во урината на човекот. Главен ензим за метаболизмот се: CYP3A4 и CYP1A2. Следната фаза на метаболизмот е управувана од ензимот глутатион-S-трансфераза (GST), кој е познат како главен антиоксиданс, а содржи три цинк-киселини пептиди, глицини и глутамат. Глутатионот делува како антиоксиданс и го ималувува оксидативниот стрес на клетката. Доколку има осиромаштување на глутатион, во организмот се појвуваат големи количини на реактивен кислород кој вклучува со метаболизмот на липидната пероксидација. Покрај природниот метаболизам на афлатоксините, метаболизам постои и во црвото, каде ензимите на тешките метали содржат одредени количини на CYP3A4, кои може да го катализираат AFB<sub>1</sub> во канцероген форми (Kolga, 1994).

#### 3.1.1. Механизам на мутации кај луѓе

Кај човекот, AFB<sub>1</sub> може да предизвика мутација во *Pas* гените, кои од протоонкогени се трансформирани во онкогени (Riley, 1997).

Повеќето студии покажале врска помеѓу изложеност на популацијата на афлатоксини и хистологички карцином (HCC) со 249<sup>ти</sup> мутација. Во Кина во регион со висока изложеност на афлатоксин, 249<sup>ти</sup> мутацијата во HCC е поголема од 50%, споредно со места каде има ниска изложеност на афлатоксини, што резултира со помалку од 10% со оваа мутација. Во Јапонија, Европа и Северна Америка, оваа мутација е застапена помалку од 1%. Хронична инфекција со Хепатит Б вирус (HBV), е ризик фактор за вклучување на HCC.

#### 3.1.2. P53 мутации и тумори кај животните

HCC или преддиспозитивни лезии кај некои видови животни биле вклучувани за афлатоксинска изложеност и p53 мутацијата. Доцна кај животните е неколку пати поголема од оваа кај човекот. Во земјите каде постои висок степен на HCC, инфекциите кои се вклучени од HBV, се секогаш придружени со афлатоксинска изложеност и ризикот секогаш е поголем кога постои изложеност на овие фактори за HCC.

#### 3.1.3. Дејство врз синтеза на протеините

#### 3.1.4. Ефектни на оксидативната фосфорилација на јалтенохидративите

#### 3.2. Ократоксини

Откако на се вкисе во организмот, ократоксинот А (OTA) во црвото се вклуча за албумините кои имаат висок афинитет за него, се вклучат 99.8% (Studer-Rohr, 2000). Таргет орган се за OTA бубреците и црниот дроб, мускулото ткиво, скелетните мускули, во некои случаи овие токсични додевалат и до мозочното ткиво (Waldman, 1998). Ократоксините вклучуваат во овие органи некронозити.

Во модели *in vitro* и *in vivo*, докажано е дека OTA ја инхибира активноста на функционалните t-RNA синтетазата со што се инхибира протеинската синтеза (Difbalnik, 1991). OTA делува инхибитивно и на ATP продукцијата (Majum, 1974). OTA може да се вкисе ковалентно за DNA структурата, формирајќи комплекс кој делува мутативно и канцерогено. Постојат податоци дека делува и на интеркалуларниот Zn<sup>2+</sup>. Сигурно е дека предизвикува апноста и некроза во клетките на црниот дроб и бубреците.

OTA делува и на имуниот одговор на организмот и на одредени имуноглобулини, IgG, IgM и IgA, на места што го вклучува живото количество.

### 4. КЛИНИЧНИ МАНИФЕСТАЦИИ

Луѓето вклучуваат афлатоксини и ократоксини преку конзумирање на контаминирани храни. Ефектите врз здравјето, зависат од дозата и времетраењето на изложеноста.

#### 4.1. Дејство на афлатоксините

##### 4.1.1. Акутно заболување

Акутната изложеност на афлатоксини (афлатоксикоза), се манифестира како тешка, акутно општеување на црниот дроб. Смртната стапка на ова заболување е до 25% (Cullen, 1994). Ризикот симптомите се манифестираат како апорексија, малаксалност, болка настанка. Акутна изложеност на големи количини на афлатоксини предизвикува летален исход, со повреќање, абдоминална болка, жолтица и смрт.

Акутна афлатоксикоза е прв пат забележана во држави како што се Тајланд, Индија. Симптомите биле повреќање, болка во стомакот, едем на белите дробови, коњунизи, кома и смрт како последни на поробрани едем и присуство на масти во срцето, црниот дроб и бубреците.

#### 4.1.2. Хронично заболување

HCC е последица на хронично дејство на афлатоксини, особено доколку е во комбинација со хроничен B. Присуство е интосуфресија и недостигот на нутриентите во крвта (Cullen, 1994).

#### 4.2. Дејство на Охратоксини

ОТА предизвикува оксидативна која се манифестира со нефроцитија. ОТА делува како имуносупресор, клипероген и тератоген. Се верува дека е причинител за појавата на Балканска ендемска нефроцитија (БЕН), која била прогресивна и фатална болест на бубреците која го зафатил Балканскиот полуостров (Clark, 2006). Главните нефротоксични ефекти се случуват во проксималните тубули (Gekle, 1994). Симптомите се во вид на жолтца, анемија, хиперкалција (губење на апетит), потежување на бојата на кожата, замор, апетитен неуспех, изолена концентрација на минералите, гломерулна, гломерулна, гломерулна и леукоцитна, нефроцитија, оксидативни радикали, жолти делови, тумори на уринарниот тракт (WHO). ОТА може да ја предизвика хиперкалција. Во студии во Норвешка е пронајден во 21% во млекото на дојки со концентрација од 10-182 ng/L. Во Анкара, Турција кај 75 жми во млекото им бил пронајден ОТА со концентрација од 620-11130 ng/L, во феталниот серум две жми повеќе отколку во серумот на мајката, што укажува на активен транспорт на хиперкалција (Gibby, 2010).

### 5. ИНЦИДЕНЦА НА МИНОТОКСИКОЗИ ВО СВЕТОТ, ЕВРОПА И МАКЕДОНИЈА

#### 5.1. Афлатоксини

На глобално ниво, секоја година има по 550.000 - 600.000 нови заболени од HCC, од кои околу 25.500 - 155.000 како последица на изложеност на афлатоксини (WHO 2008), а најчестите се во: Африка (40%), Југоисточна Азија (27%), Западна Пацифика (20%), Источна Медитеран (10%).

Во Западна Африка, во нутриентите и нутриентите прашања има изложеност на комбинација на храната со афлатоксини во големи размери. Во Етиопија, AFB1 е детектиран во повеќе изложени, како јетрени, панкреасни ризи, глиневи. Малите производни и отворените пазари се најголеми ризи.

Во Кина ова трупче има големи размери, со тесни сиртни пазари. Таму во 2004 година од јетурни до јуки, имало 375 заболени со 125 смртни случаи. Анализите на крвта покажале присуство на афлатоксини на 440 жми поголемо од дозволеното, односно 4,400 ppb (WHO).

Во Гамбија, како последица на HBV и HCV и изложеност на афлатоксини инцидентите на заболени од HCC на 100.000 луѓе е 35,7 за мажи и 11,2 за жми (Bah, 2001).

Во Кина од акутниот бројот на заболени од HCC е 15-20% (Wang, 2001).

Во Холандија и Шкотска, се идентифицирани случаи на заболени од карцини, кои користеле карени комбинации со афлатоксини. HIV замало со афлатоксинот делува синергистички во супресијата на имуниот систем.

Личниот на изнесување на афлатоксини преку храната е различен во секоја држава или регион (WHO).

Табела 1. Лични на афлатоксини во храна

Европска Унија	4 ppb
САД	20ppb; 0.5 ppb во млеко
Кина	15-20 ppb
Азија	20 ppb
Африка	10-20 ppb

#### 5.2. Охратоксини

Во 1996 година првпат е опишан Балканска ендемска нефроцитија (БЕН). Прво се појавила во Бугарија, подоцна во Србија, Босна и Херцеговина, Хрватска и Романија. Свој вид на ендемија се шперува со ОТА, бидејќи бил пронајден прво во храната, а подоцна и кај примерците на крв земени од заболенима. Околу 100.000 луѓе имале симптоми, а 25.000 биле болни (Stefanovic, 2011).

Од Интернационалната Агенција за Истражување на Канцерот (IARC), ОТА е прогласен за клипероген состојка, со ризици во повеќе држави во Европа, Северна Америка, Северна Африка и Азија.

Во Либанон, Западна Азија, ОТА бил пронајден во 33% од 250 испитаници. Во студии во Чешка во периодот 2011-2013 година утврдено било дека најчестите популации биле деца од 4-6 години.

Глобално, за ова популација, горните грешки на изложеност е од 3.3 ng/kg телесна тежина/дневно. Главен извор на ОТА за деца се месни производи, жолти производи, овошни сокови. Кај мажи главен извор на ОТА е млекото, а кај жми млекото и кафеото (Malić, 2013).

Во Кина, за храна на трогодишна анализа на заматук во млекот, од 156 примероци, во 30% бил пронајден ОТА.

Во светски ризици е прифатено ниво на дозволената количина на ОТА во храната изнесува од 1-50 µg/kg, а за храна за животните од 100-1000 µg/kg.

Во Македонија, според Промислиениот заштитен берање за безбедност на храната во член 30, дозволените концентрации на афлатоксини и OTA во храната се однесува на житарки, житарички, јаткасто овошје, Афлатоксин М во млеко и дозволен во границите до 0,05 µg/kg, а за доцетината 0,025 µg/kg. Официјално, во Македонија, нема регистрирано случаи со афлатоксикоза или охратоксикоза.

#### 6. МОЖНОСТИ ЗА ДИЈАГНОЗА

Афлатоксините се докажуваат во урина, крвната плазма, серум, млеко, фекал со ELISA и PCR. Биомаркерите на охратоксините се вложат во серумот, плазмата, урина и млеко и се докажуваат со помош на Течна хроматографија (TLC), високо-ефикасна течна хроматографија (HPLC), ELISA. Во развој е нова специфична метода која користи *оптичери* кои се алто-верижни DNA или RNA молекули кои имаат висок афинитет за специфично врзување за OTA. Оваа метода може да се користи и за детекција на OTA во храна.

#### 7. МОЖНОСТИ ЗА ПРЕВЕНЦИЈА

##### 7.1. *Превенција од афлатоксини*

Пронајдени се 32 супстанции од 28 фамилии на растенија кои делуваат како инхибитори на афлатоксините. Најважни се :

**Фенолни соединенија** Ф' стапите содржат фенолни компоненти (алфаил киселини, катехини киселини, хлорогенска киселина) (Moussier, 2007).

**Флавоноиди** Миродијата содржи компонента која се нарекува диканол и се вложат во листот и инхибитор на растот на фунгите и ситектата AFB1. Активните компоненти на мандоносот, антол и миродијата, делуваат инхибиторно на ситектата на AFG1.

**Феноли и флавоноиди** Какариците се богати со ферулна киселина, капаицинска киселина, p-кумаронска киселина, ериодиколол кои го инхибират афлатоксинот во медури составен од киселин и шеќероза.

**Алкалоиди** Биберот содржи пиперин, пиперонгелани, пипероници, пиперониталеканици, кои учествуваат во инхибиција на афлатоксинската ситекта со инхибирање на ситектот CYP3A4.

**Феноли** Бадењето содржи капаицинска киселина, катехин, протокатехинска киселина 4-хидрокси-бензоена киселина, која инхибират ситектата на афлатоксин (Moussier, 2007).

**Германискии камаитини** содржи спироетер кој инхибира афлатоксинската ситекта (Yoshinari, 2006).

За превенција на појава на НСС покрај ваквиштацијата против HBV треба да се змалчи вложноста на афлатоксини. Препорачаната превенција софрла промена на садението на култури како што е орнат, со што би се змалчила вложноста на зараза на културите со *A. flavus*, а со самото тоа и змалчиле е развојот на афлатоксини. Меѓутоа, во многу држави во развој, таа промена не е вложлива, па затоа се опи на други превентивни мерки кои ги опфаќаат пред собирањето и по собирањето на културите или во текот на огледувањето. Пред бербата, најбитно е да се змалчи оксидативниот стрес на културата со пел да се змалчи и можноста за засадување на овој вид на фунги. Неопходно е подобрување на ситектот за владување, употреба на фунгициди, поставила и вентилација, употреба на жатни култури кои се модифицирани на начин да бидат отпорни на овие инфекции.

Афлатоксините може да се акумулираат во храната и при најдобро тување што змалчи вложу од температурата, влагата и временскиот период на тување.

##### 7.2. *Превенција од охратоксини*

OTA предизвикува општување на бубреците и на црниот дроб. Лак од пре избор е холестеролниот. Тој делува на колената киселина, како врзувачки агенс кој не дозволува OTA да премине во циркулацијата. Со тоа го змалчува владувањето преку бубреците, а го змалчува преку фекалот. OTA во змалчување колената се владува преку потта заради што се препорачуваат и третани во слани, со пел змалчување на владувањето (Gentil, 2011). Фемилитениот ја змалчува апсорпцијата и токсичноста на OTA.

Некои муши и киселин гоби (*Issatchenkia orientalis*, *Metchnikowia pulcherrima*, *Issatchenkia terricola* и *Candida inconspicua*) ги инхибират *A. Carbonarius* и *A. Niger* на храна од грозјето (Blone, 2006).

Опредени растителни супстанции како есенцијалните масла од тевјан, анисол, цимет, зма, го инхибират растот на *A. ochraceus*. Екстракт од пук исто така го инхибира растот на *A. ochraceus* (Reddy, 2007).

#### 8. ЗАКЛУЧОК

Афлатоксините се отровни и канцерогени супстанции кои се продуцираат најчесто од *Aspergillus flavus* и *Aspergillus parasiticus* како секундарни метаболити.

Појавата на афлатоксини зависи од еколошките фактори, различни микроболошки практики, вложноста на фунгална контаминација на храната пред собирање, во текот на собирањето, тувањето и во текот на преработката.

Важноста вложна целосно да се заштити храната од афлатоксини, регулаторните органи на вложу држави одредиле граници на дозволено ниво на афлатоксините во храна и добиточна храна.

Охратоксините се мала група на секундарни токсични метаболити кои се продуцираат од две групи на фунги *Aspergillus* и *Penicillium*, и растат во широк спектар на храна и животини. Најчестите токсини од оваа група е охратоксин А (ОТА), кој е гепатоксичен и нефротоксичен. Во сакота држава во светот, како и кај нас, постојат регулативни норми за превенција од афлатоксините и охратоксините. Дозволени концентрации на афлатоксини во храна според Европска комисија се 4 ppm, додека за охратоксин, одржливиот внес изнесува 120 mg/kg телесна тежина. Дугото не се доволно информирани за последиците од токсичните дејства на овие микотоксини. Развива се методи за дијагноза на афлатоксини и охратоксини.

#### ЛИТЕРАТУРА

- [1] Balh, E., Parkin, D. M., Hall, A. J., Jack, A. D., Wirtle, H. *Cancer in The Genoa* 2001
- [2] Belmadani A., Trauz G., Belbedar A.M., Steyn P.S., Creppy E.E. Regional selectivity to Ochratoxin A, distribution and cytotoxicity in rat brain. *Arch. Toxicol.* 1998
- [3] Bleva G., Graso F., Cozzi G., Logrieco A., Visconti A. Isolation of epiphytic yeasts with potential for biocontrol of *A. carbonarius* and *A. niger* on grape. *International Journal of Food Microbiology* 2006
- [4] Clark HA, Sueddeker SM. Ochratoxin A: its cancer risk and potential for exposure. *Journal of Toxicology and Environmental Health B*.2006
- [5] Creppy, E. E. Human ochratoxicosis. *J. Toxicol. Toxin* 1999
- [6] Cullen, J. M. and P. M. Newbarns. Acute Hepatotoxicity of Aflatoxin. *The Toxicology of Aflatoxin: Human Health, Veterinary, and Agricultural Significance*. 1994
- [7] Diener, U. L., R. J. Cole, T. H. Sanders, G. A. Payne, L. S. Lee, and M. A. Klich. Epidemiology of aflatoxin formation by *Aspergillus flavus*. *Annu. Rev. Phytopathol.* 1987
- [8] Dirheimer G., Creppy E.E. Mechanism of action of Ochratoxin A. *IARC Sci. Publ.* 1991
- [9] Gakle M, Silbernagl S.(1994) The role of the proximal tubule in ochratoxin A nephrotoxicity in vivo: toxicodynamic and toxicokinetic aspects. *Renal Physiology and Biochemistry*. 1994
- [10] Gemis and Stephen, "Personal Communication," June 2011.
- [11] Gürbay A, Girgin G, Sebuncuoğlu SA, et al. Ochratoxin A: is it present in breast milk samples obtained from mothers from Ankara, Turkey? *Journal of Applied Toxicology*. 2010
- [12] Creppy, E. E. Human ochratoxicosis. *J. Toxicol. Toxin* 1999
- [13] Hill, R. A., Wilson, D. M., McMillan, et al. Ecology of the *Aspergillus flavus* group and aflatoxin formation in maize and groundnut. *Trichothecenes and other mycotoxins* 1987
- [14] Kolars,J.C., Benedict,P., Schmiefflin Ren,P. and Watkins,P.B. Aflatoxin B1-adduct formation in rat and human small bowel enterocytes. *Gastroenterology* 1994
- [15] Malir F., Ostry V., Doškova M., et al. A levels in blood serum of Czech women in the first trimester of pregnancy and its correspondence with dietary intake of the mycotoxin contaminant. *Biomarkers*. 2013
- [16] Meisner H., Chan S. Ochratoxin A, an inhibitor of mitochondrial transport systems. *Biochem.* 1974
- [17] Molynaux R.J, Mahoney N, Kim J, Campbell B Mycotoxins in edible tree nuts. *Int J Food Microb* 2007
- [18] Naik, M., Modi V., and Patel N. Studies on aflatoxin biosynthesis in *A. flavus*. *Indian J. Exp. Biol.* 1970
- [19] Pitt,J.I. *Penicillium striobacum*, *Penicillium verrucosum*, and production of ochratoxin A. *Appl. Environ. Microbiol.* 5 1987
- [20] Stefanovic V, Poljanekovic M, Tomcheva D. Urothelial carcinoma associated with Balkan endemic nephropathy. A worldwide disease. *Pathol Biol (Paris)* 2011
- [21] Studer-Rohr I., Schlatzer J., Dietrich D.R. Kinetic parameters and intraindividual fluctuations of Ochratoxin A plasma levels in human. *Arch. Toxicol.* 2000
- [22] WHO, World Health Statistics, 2008.
- [23] Yoshinari T, Yaguchi A, Takahashi-Ando N, et al. Spiroethers of German chamomile inhibit production of aflatoxin G and trichothecene mycotoxin by inhibiting cytochrome P450 monooxygenases involved in their biosynthesis. 2008
- [24] Wild,C.P. and Hall,A.J. Hepatitis B virus and liver cancer: unanswered questions. *Cancer Surv* 1999
- [25] Wild,C.P. and Hall,A.J. Primary prevention of hepatocellular carcinoma in developing countries. 2000