



**УНИВЕРЗИТЕТ „ГОЦЕ ДЕЛЧЕВ“ – ШТИП**

**ЗЕМЈОДЕЛСКИ ФАКУЛТЕТ**

**Студиска програма: Преработка и контрола на земјоделските производи**

**Модул: Преработка и контрола на анимални производи**

**Штип**

**Зоран Арсевски**

**Определување на квалитет и присуство на афлатоксин во млеко од**

**Овчеполскиот Регион**

**МАГИСТЕРСКИ ТРУД**

**Штип, 2019 година**

Зоран Арсевски

**КОМИСИЈА ЗА ОЦЕНА И ОДБРАНА НА МАГИСТЕРСКИ ТРУД**

Ментор:

Вон.проф. д-р Сања Костадиновиќ Величковска

Земјоделски факултет, Универзитет „Гоце Делчев“ - Штип

---

Член:

Доцент д-р Фиданка Илиева

Земјоделски факултет, Универзитет „Гоце Делчев“ - Штип

---

Член:

Проф. д-р Ацо Кузелов

Земјоделски факултет, Универзитет „Гоце Делчев“ - Штип

---

Датум на одбрана: 21.02.2019

Зоран Арсевски

### **Апстракт**

Овој труд претставува увид на бројот на бактериите и соматските клетки, како и присуство на афлатоксинот М1 (AFM1), како индикатори за квалитет на суровото млеко од Овчеполскиот Регион. За потребите на ова истражување е спроведена анализа на 1320 примероци за присуство на бактерии во сурово млеко, 479 примероци за присуство на соматски клетки во период од јануари 2018 година, до јуни 2018 година и 60 примероци за присуство на афлатоксин М1. Резултатите индицираат дека само 10,45% од мострите од млекото ја задоволуваат националната легислатива и параметрите кои се дадени во истата. Според европските стандарди за квалитет на млеко, присуството на бактерии не го задоволува стандардот, додека параметрите за соматски клетки се на задоволувачко ниво со 95,5%. Присуството на афлатоксин М1 беше предмет на анализа за време на инцидентот со микотоксинот во периодот од март 2013 година, до ноември 2014 година. Мострите беа анализирани за AFM1 со ELISA и со HPLC флуоросцентен детектор како конфирмирачки метод. Концентрациите на AFM1 го надминаа максимумот на дозволените нивоа во 2 примерока, а највисоко детектираната концентрација беше 0,58 mg/kg

Од направените анализи кај млекопроизводителите кои беа предмет на анализа во овој труд, може да се заклучи дека истите не се придржуваат кон добрата земјоделска пракса, нивото на контаминација на млекото е на високо ниво, што е резултат на: недоволна хигиена, неправилно постапување со млекото после молзење и недоволна едукација на фармерите за хигиената во примарното производство.

**Клучни зборови:** Афлатоксин М1, Афлатоксин Б1, број на соматски клетки, број на бактерии, млеко, ELISA, HPLC-FD

Зоран Арсевски

### **Abstract**

This paper presents an insight into the number of bacteria and somatic cells, as well as the presence of Aflatoxin M1 (AFM1) in raw milk as an indicator of milk quality selected from the Ovche Pole region. For the purpose of this research, an analysis of 1320 samples of the presence of microorganisms in milk was made, 479 samples for the presence of somatic cells in the period from January 2018 to June 2018. The results indicate that only 10.45% of the milk samples satisfy the national leaflet and the parameters given therein. According to European milk quality standards, the presence of bacteria does not meet the standard, while the parameters for somatic cells are at a satisfactory level of 95.5%. The presence of aflatoxin was the subject of analysis during the mycotoxin incident in 2013 and the number of tested samples was 60, which was collected from March 2013 to November 2014. They were analyzed for AFM1 with ELISA as a projection and a HPLC fluorescent detector, such as Confirmation method. AFM1 concentrations exceeded the maximum permitted levels in 2 samples, and the highest detected concentration was 0.58 mg/kg.

From the analyzes carried out by the small producers that were the subject of analysis in this paper, it can be concluded that they do not adhere to the good agricultural practice, the level of contamination of the milk is at a high level due to insufficient hygiene, improper handling of milk after milking and insufficient education of farmers for hygiene in primary production.

### **Keywords**

Aflatoxin M1, Aflatoxin B1, Milk, number of somatic cells, number of bacteria, ELISA, HPLC-FD

Зоран Арсевски

## СОДРЖИНА

|                                                                           |           |
|---------------------------------------------------------------------------|-----------|
| <b>1. ВОВЕД.....</b>                                                      | <b>7</b>  |
| <b>2. ПРЕГЛЕД НА ЛИТЕРАТУРА.....</b>                                      | <b>10</b> |
| <b>2.1. Фактори за појава на бактерии во суровото млеко.....</b>          | <b>10</b> |
| 2.1.1. Контаминација со микроорганизми од вимето .....                    | 11        |
| 2.1.2. Контаминација со микроорганизми од надворешноста на вимето.....    | 12        |
| 2.1.3. Влијание на одржување на опремата и процедурите за санитација..... | 13        |
| 2.1.4. Температура и време на чување на млекото.....                      | 14        |
| 2.1.5. Вода.....                                                          | 15        |
| <b>2.2. Соматски клетки.....</b>                                          | <b>16</b> |
| 2.2.1. Маститис.....                                                      | 18        |
| 2.2.2. Контролни програми за маститис.....                                | 19        |
| 2.2.3. Главни предизвикувачи зарази и патогени.....                       | 24        |
| 2.2.4. Влијание на маститисот врз составот и квалитетот на млекото.....   | 25        |
| 2.2.5. Економски ефекти на маститис.....                                  | 27        |
| <b>2.3. Афлатоксинот M1 .....</b>                                         | <b>28</b> |
| 2.3.1. Формирање, токсичност, и регулација на афлатоксинот M1.....        | 31        |
| 2.3.2. Извор на афлатоксини во земјоделски производи.....                 | 34        |
| 2.3.3. Продукција на афлатоксин.....                                      | 35        |
| 2.3.4. Физички и хемиски својства на афлатоксини.....                     | 36        |
| 2.3.5. AFM1 во млекото.....                                               | 37        |
| 2.3.6. Ефект на преработка на млеко врз содржината AFM1.....              | 39        |

Зоран Арсевски

|                                                                              |    |
|------------------------------------------------------------------------------|----|
| 2.4. Техники за детекција.....                                               | 40 |
| 2.4.1. Имунолошки методи.....                                                | 45 |
| 2.4.2 Ензимски имуносорбент (ELISA).....                                     | 47 |
| 3. Цел на Истражувањето.....                                                 | 50 |
| 4. Материјали и метод.....                                                   | 50 |
| 4.1. Земање примероци.....                                                   | 50 |
| 4.2. Анализа на вкупен број соматски клетки и број на микроорганизми.....    | 51 |
| 4.3. Анализи на Афлатоксин М <sub>1</sub> кај сировото млеко со ELISA.....   | 52 |
| 4.4. Анализа на афлатоксин М <sub>1</sub> кај сировото млеко со HPLC-FD..... | 52 |
| 5. Резултати и дискусија.....                                                | 53 |
| 5.1. Број на микроорганизми (БМО).....                                       | 54 |
| 5.2. Број на соматски клетки (БСК).....                                      | 61 |
| 5.3. Афлатоксин М <sub>1</sub> .....                                         | 68 |
| 6. Заклучок.....                                                             | 69 |
| 7. Прилози.....                                                              | 70 |
| 8. Користена литература.....                                                 | 84 |

Зоран Арсевски

## 1. ВОВЕД

Млекото е основен прехранбен продукт за најранливите категории на населението (бебиња, деца и стари лица). Тоа е богато со висококвалитетни протеини и обезбедува внес на десет есенцијални аминокиселини. Млекото обезбедува: енергија, имуноглобулини, и други микронутриенти (FAO, 1997).

Млекото содржи адекватни количества на: протеини, масти, шеќери, витамини и минерали. Кравјото млеко е доминантен вид, но исто така се консумира и млеко од коза, биволи, овци и камили (FAO, 1997).

Генерално, млекото може да се смета како емулзија на млечните масти растворени во водена фаза, заедно со други материи во колоидна форма. Комерцијалното млеко може да се класифицира во две главни групи: течено млеко или млеко во прав (FAO, 1997).

Иако млекото е добар извор на многу хранливи материи, може да биде извор и на токсични супстанции, како што е афлатоксин M1 (AFM1) (Stoloff, 1980).

Афлатоксините се група на токсини произведени од страна на габи, како што е *Aspergillus flavus* (Kamkar, 2005). Нивното присуство во млекото е поврзано со исхрана на добитокот со храна контаминирана со афлатоксин Б1 (AFB1), а истиот потоа се метаболизира и излучува во млекото како AFM1 (Prandini et al., 2008). Афлатоксинот е поврзан со токсичност и канцерогеност кај човекот и животните (Verma, 2004). AFM1 е исто така познат и како хепатотоксичен и канцероген (Bullerman, 1979). AFM1 - токсинот останува стабилен и кога млекото е термички обработено. Според досегашните истражувања, не постои доказ дека во ладилници со концентрирање или сушење на млекото се менува нивото на AFM1 (Park, 2002).

Зоран Арсевски

Констатирано е дека контаминацијата на млекото и млечните производи со AFM1 прикажува варијации според географската положба на земјите и различни сезони. Нивото на контаминација со AFM1 е диференцирано од топли и ладни сезони, и се должи на фактот дека исхраната со трева од пасишта почесто се применува во пролет и лето, отколку во зима (Battilani, 2004). Кон крајот на летото повеќе се консумира свежа храна во однос на концентрирана храна, предизвикувајќи намалено ниво на AFM1 во млекото (Galvano et al, 1996. Pittet, 1998; Sarimehmetog et al., 2003).

За време на инцидентот со микотоксинот во 2013 година, од страна на Институтот за ветеринарна медицина - Скопје, научниот труд на Димитријевиќ-Стојковска индицирал присуство на афлатоксинот M1 (AFM1) во суровото млеко на територијата на Република Македонија. Вкупниот број на тестирани примероци бил 3635, селектирани од февруари 2013 година, до јануари 2014 година. Примероците биле анализирани за AFM1 со ELISA и со HPLC со флуоросцентен детектор како конфирмирачки метод. Концентрациите на AFM1 го надминале максимумот на дозволените нивоа со 2,9% од примероците, а највисоко детектираната концентрација била 408.1 ng/kg. (Dimitrieska-Stojkovic et al.2016)

Во Македонија се применува Правилникот за општите барања за безбедност на храната, со кој максимално дозволеното ниво на афлатоксин M1 во млекото изнесува 0,05 mg/kg. Правилникот е усогласен со европските стандарди кои се едни од најригорозните, кога е безбедноста на храната во прашање и гарантираат високо ниво на заштита на потрошувачите.

Како параметри за оценување на квалитетот на млекото и оценување на хигиенската исправност веќе подолго време се користат: бројот на соматските клетки и бројот на бактерии.



Зоран Арсевски

Според Правилникот за изменување на правилникот за посебни барања за безбедност и хигиена и начинот на постапката за вршење на службените контроли на млеко и млечни производи (Службен весник на РМ, бр.26 од 21.2.2012 година), се предвидува во периодот од 2013 до 2016 година бројот на бактерии да се намали од 800 000/мл до 100 000 на мл, а бројот на соматските клетки од 600 000/мл на 400 000 /мл. Со постигнување на овие вредности, би биле задоволени стандардите кои моментално важат во земјите членки на ЕУ, ЕС853/2004.

И покрај насоките од Европската Унија, во Република Македонија е донесена нова регулатива за квалитет на суровото млеко. Според Правилникот за изменување на Правилникот за посебни барања за безбедност и хигиена и начинот на постапката за вршење на службените контроли на млеко и млечни производи (Службен весник на РМ, бр. 197 од 28.10.2016 година), препораката треба да се спроведе во целост, а процесот на категоризација треба да заврши до 2020 година. Целта е унапредување на квалитетот на суровото млеко, од аспект на вкупен број бактерии и соматски клетки, согласно европската регулатива. Сите фарми што нема да ги исполнат дефинираните критериуми и што ќе влезат во т.н. *трета категорија*, нема да можат да го предаваат млекото за откуп и натамошна преработка. Фармите од втора категорија, пак, ќе можат да го предаваат млекото само за преработка на сирење *со зреење од најмалку 60 дена*.

Категоризацијата на фармите со молзни грла се врши според бројот на соматски клетки и вкупниот број на бактерии во млекото, согласно ЕУ регулативата за квалитетот на суровото млеко. Во првата категорија спаѓаат фармите каде бројот на соматски клетки во млекото е помал или еднаков на 400.000 во милилитар млеко, а вкупниот број бактерии е до 100.000. Фармите кои произведуваат млеко со соматски клетки и бактерии над дефинираните, се втора или трета категорија. Крајниот рок за постигнување на европските стандарди за

Зоран Арсевски

сурово млеко се одложуваше неколку пати. Границата на соматски клетки и бактерии беше флексибилна, но не се исполнуваше.

Поради горенаведеното, целите на истражувањето во оваа магистерска теза се: вкупниот број на бактерии (ВББ) и соматски клетки (ВБС), како и присуството на афлатоксинот во сурово млеко произведено од индивидуални фармери од Овчеполскиот Регион во Република Македонија.

## **2. ПРЕГЛЕД НА ЛИТЕРАТУРА**

### **2.1. Фактори за појава на бактерии во суровото млеко**

Млекото се синтетизира во специјални клетки за таа намена во млечната жлезда и во моментот на секреција од алвеолите во вимето млекото е стерилно. Откако ќе заврши оваа фаза, се зголемуваат условите за контаминација на млекото. Суровото млеко е еден од најсоодветните медиуми за раст на широк спектар на бактерии, особено веднаш по молзењето, кога тоа е речиси на телесната температура. Сепак, млекото содржи природен инхибиторен систем, кој значајно го спречува порастот на бројот на бактерии во текот на првите 2-3 часа. Ако млекото се лади во овој период на 4°C, тоа го задржува својот оригинален квалитет (Van Schaik et al., 2005).

Навременото ладење гарантира дека квалитетот на млекото останува добар за обработка и потрошувачка. Вкупниот број на бактерии во свежото сурово млеко треба да биде помал од 50.000 на милилитар млеко. За да се спречи преголемото размножување на бактериите, млекото треба да се произведува во што е можно похигиенски услови и треба да се лади или да се загрее во што е можно пократок период.

Болните крави преку млекото можат да лачат патогени бактерии. Затоа суровото млеко може да биде опасно за потрошувачот, и некои од болестите, како

Зоран Арсевски

што се: туберкулоза, бруцелоза и антракс, може да се пренесат директно на потрошувачот (O'Reilly et al., 2006; Pal et al., 2007).

Иако постои варијација во праксата при производство на млеко во светот, во повеќето развиени земји млекото се собира со машинско молзење и се пренесува во резервоари за складирање во фрижидер, каде што се чува пред транспортот.

Постојат повеќе фактори, кои предизвикуваат промена во микрофлората на суровото млеко. Посебно важна е здравствената состојба на животното, хигиената и околината во која се молзат кравите, процедурите за чистење на опремата, чувањето на млекото од моментот на молзење до предавање на млекарата или консументите, температурата на која се чува млекото, времето на чување итн. Сите горенаведени параметри се услов за спречување или намалување на ризикот за контаминација со бактерии на млекото и зголемување на нивниот број.

Присуството на бактерии на млекото може да се класира на повеќе начини:

- од самото виме
- од надворешноста на вимето
- процедурите за санитација на опремата
- температура и време на чување на млекото и
- квалитетот на водата што се користи при санитацијата.

#### **2.1.1. Контаминација со бактерии од вимето**

Суровото млеко при молзење кај здрави крави содржи низок процент на бактерии, или помалку од 1 000 во мл, додека кај кравите кои се заболени од маститис, бројот на бактериите е еноормно зголемен и зависи од сојот на

Зоран Арсевски

патогените, фазата на инфекцијата и процентот на заболени грла. Инфицираните грла имаат потенцијал да излучуваат преку 10 0000 000 бактерии во мл.

Маститисот е дефиниран како воспаление на млечната жлезда или вимето. Тоа воспаление може да биде: супклиничко, при кое не постојат видливи знаци на инфекција, потоа клиничко, каде постојат знаци на инфекција, или пак хронично, кога симптомите перзистираат во подолг временски период. Најчестите бактерии кои предизвикуваат маститис се: *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus agalactiae*, *Streptococcus uberis* и *Escherichia coli*.

Присуството на патогени бактерии во млекото не секогаш е показател дека животните се заболени со маститис.

Освен микроорганизми кои предизвикуваат маститис, други бактерии кои се патогени за луѓето и можат да го заразат вимето се: *Mycobacterium bovis*, што може да предизвика туберкулоза кај луѓето (Griffths, 2007), *Brucella abortus* (предизвикувач на бруцелоза или нелулантна треска), *Listeria monocytogenes*, *Coxiella burnetii* and *Salmonella* spp. (Pal, 2007). На пример, *C. Burnetii* не предизвикува клиничка болест кај говедата, но предизвикува Q-треска кај луѓето (Kim et al., 2005).

### 2.1.2. Контаминација со микроорганизми од надворешноста на вимето

На надворешноста на вимето се наоѓаат микроорганизми кои се поврзани со средината во која се чува и молзе животното и микроорганизми кои имаат контакт со самата кожа на животното. Директното влијание на овие

Зоран Арсевски

микроорганизми не се смета како фактор на контаминација бидејќи тие се сметаат за природни жители и не се размножуваат во млекото.

Значително поголемо влијание имаат оние микроорганизми кои се наоѓаат во постелката, фецесот, храната и калта во која лежат животните, и вршат директна контаминација на вимето и боските.

Микроорганизми кои се наоѓаат во постелката во шталите најчесто се: стрептококи, стафилококи, колиформни, спорогени бактерии и други грам-негативни микроорганизми. Многу често на надворешноста на вимето може да се констатираат и термофилни бактерии кои се отпорни на високи температури, ја преживуваат пастеризацијата и психрофилни соеви на бактерии кои растат на ниски температури. Сето ова укажува на фактот дека надворешната контаминација на вимето може да има огромно влијание врз вкупниот број на бактерии. (Bramley and McKinnon. 1990).

Студијата за факторите на ризик, поврзана со контаминација на сурово млеко од млечни форми на *Listeria monocytogenes*, покажала дека недоволната чистота на кравите, несоодветното осветлување на молзилиштата и плевните може да биде индикација за занемарување на хигиената на молзење. Несоодветната дезинфекција на крпите кои се користат за сушењето на вимето може значително да ја зголеми веројатноста за контаминација (Sana et al., 2003).

Силажата е исто така важен извор на контаминација со *Listeria spp.*, вклучувајќи *L. monocytogenes* и други потенцијални човечки патогени, како *Yersinia enterocolitica* и *Aeromonas hydrophila* (Sana et al., 2003).

### 2.1.3. Влијание на одржување на опремата и процедурите за санитација

Неправилните процедури за чистење на опремата и степенот на хигиена на системот за молзење е еден од најбитните фактори, кој има влијание на вкупниот

Зоран Арсевски

број на микроорганизми. Остатоците од млеко на контактните површини на опремата создаваат услови за раст на огромен број на микроорганизми.

Исто така, остатоците на млеко во системот за молзење се добар медиум за понатамошен развој на микроорганизмите. Старите гумени и напукнати делови од опремата се сметаат за добар извор на термофилни бактерии. Разни бактериски видови може да дојдат во контакт со млекото од минералните наслаги присутни во опремата за молзење и најверојатно најважните од нив се грам-негативните психотрофи, кои доминираат меѓу микрофлорите кои се детектираат на цевките од нефосувачки челик што се користат за пренос на млеко (Griffiths, 2004).

Разликите во начинот за чистење од фарма до фарма имплицираат значителна варијација во микрофлората на опремата за молзење. Единствената вистинска заштита од бактерии на опремата за време на молзењето е адекватната санација. Начинот на чистење на пониски температури и некористењето на хемиски средства за дезинфекција доведува до зголемен раст на грам-негативни микроорганизми, колиформни и млечни стрептококи. Микробиолошката контаминација на апаратите за молзење не зависи само од санитарната постапка, туку и од многу други фактори, како што се: постапките за молзење и животната средина во просторијата за молзење (Feldman et al., 2006).

#### **2.1.4. Температура и време на чување на млекото**

Чување на млекото на ниска температура има за цел да се стопира растот на останатите микроорганизми, а истовремено и го минимизира присуството на психрофилните бактерии и нивното позначајно учество во вкупниот број на микроорганизми, кои во понатамошната термичка обработка на млекото нема да ја преживеат пастеризацијата. При температури на чување на млекото над 6°C се

Зоран Арсевски

овозможуваат услови за развој на огромен број на микроорганизми. Слабото ладење на млекото често е поврзано со развој на стрептококи, кои ја зголемуваат киселоста на млекото и често резултира со појава на непријатен мирис. Температурата на чување над 15°C е најпогодна за развој на овој вид на бактерии (Gehring, 1980). Типот на бактериската популација која преовладува во вкупниот број на микроорганизми, сепак зависи од микрофлората на суровото млекото.

#### 2.1.5. Вода

Водата што се користи при производството на млеко треба да биде квалитетна и за пиење. Резервоарите за чување треба да бидат заштитени, за да се спречи пристапот на инсекти, глодари, птици и други извори на контаминација и опремата што се користи за испорака на вода треба да се исчисти соодветно. Проблемите можат да се појават кога водоснабдувањето не е соодветно третитано, а се користи за плакнење и миење на опремата. Таквата вода може да содржи разновиден спектар на микроорганизми, вклучувајќи: *Pseudomonas spp.*, *Coliforms*, *Bacillus spp.* и бројни други видови на бактерии (Bramley and Mckinnon, 2004).

Истражувањата на Perkins et al. (2007) покажаа потенцијал за контаминација на млекото со *E. coli* преку миење на опремата со вода. Бројот на микроорганизмите во водата што го загадуваат млекото можеби е мал, но тие имаат потенцијал за раст во кој било остаток на вода што останува на опремата. Затоа се препорачува претходно хлорирање на водата што се користи при производството на млеко. Во последниве години зголемена е присутноста на *Cryptosporidium parvum* во нетретирана вода. Тоа е паразит кој предизвикува *криптоспоридиоза*, болест на цревниот тракт на цицачите, што резултира со акутна, водена и некрвава дијареа. Криптоспоридиозата е особено загрижувачка

Зоран Арсевски

кај имунокомпромитирани пациенти (како што се пациенти со СИДА), кај кои со дијареата може да загуби од 10 до 15 литри вода дневно. Познато е дека ооцистите на овој паразит се спротивставуваат на хлорирање и се откриени во сурово млеко иако со ниски стапки на инциденца ( $<1\%$ ), но нивниот извор е неопределен (Perkins et al. 2007).

## 2.2. Соматски клетки

Соматските клетки се нормален дел од млекото, како негова природна состојка, и кај здравото виме не влијаат на неговиот состав и физичко-хемиските карактеристики (Natzke, Everett and Postle, 1972).

Соматските клетки се состојат од многу видови на клетки, вклучувајќи: полиморфонуклеарни леукоцити (ПМН), макрофаги, лимфоцити, еозинофили и разни епителни клетки од млечната жлезда. Клетките во млекото од здраво виме се претежно претставени од епителни клетки кои се по потекло од крвта (леукоцити). Од вкупниот број, 70% се епителни клетки на вимето (кожата, млечните канали и млечната цистерна), а остатокот од 30% го сочинуваат клетките од крвта. Вкупниот број на соматски клетки и процентуалната застапеност на поедините клеточни популации зависат од стадиумот на лактација, инфективниот стадиум на млечната жлезда, како и од некои физиолошки амбиентални фактори. Просечниот број на соматски клетки во млекото добиено од здрава млечна жлезда е 50 000/мл, а во најголем број од случаите тој е понизок од 150 000/мл и во него доминираат макрофаги и лимфоцити, а неутрофилите и епителните клетки се застапени во помал процент (Burvenich, Guidry & Paape 1995).



Зоран Арсевски

Зголемувањето на бројот на соматски клетки се должи на активација на имунолошкиот систем, кога доаѓа до зголемено преминување на леукоцити од крвта во луменот на алвеолите (Dohoo & Meek, 1982).

Секое зголемување на бројот на соматски клетки над 250 000 и 300 000 се смета како показател на маститис. Леукоцитите се главната клеточна популација при рано воспаление и тие играат заштитна улога во однос на инфективните заболувања во млечната жлезда (Kherli & Shuster, 1994; Persson-Waller et al., 1997).

Во млечните жлезди на добитокот, инфицирани со патогени кои предизвикуваат маститис, соматските клетки од млекото се состојат во повеќе од 95% од полиморфонуклеарни леукоцити, а полиморфонуклеарните леукоцити се показатели за инфламаторен одговор. Било утврдено дека експерименталната интрамамарна инфекција на овците со *Staphylococcus aureus* или *Escherichia coli* предизвикала значително зголемување на леукоцитите во рок од 24 часа од инфекцијата (Detilleux et al., 1997).

Во проучувањето на патологијата на млечната жлезда и дијагностиката на инфекцијата кај вимето се користи бројот на соматски клетки (БСК) во млекото. Бројот на соматските клетки е во корелација со промените на физичките и хемиските особини на млекото, па затоа овој параметар се користи како индикатор за квалитет на суровото млеко и се смета за најдобар показател за здравствената состојба на млечната жлезда. Здравото виме многу малку влијае или воопшто не влијае на вкупниот број на бактерии во збирното млеко, додека кај кравите со маститис се јавува опасност од ширење на голем број на микроорганизми во млекото (Persson-Waller et al., 1997).

Зоран Арсевски

### 2.2.1. Маститис

Маститисот е мултиетиолошка и комплексна болест, која е дефинирана како воспаление на млечните жлезди. Се карактеризира со физички, хемиски и бактериолошки промени во млекото и патолошки промени во ткивата на жлездата (Radostis et al., 2000). Појавата на болеста е резултат на интеракција помеѓу трите главни фактори: инфективни агенси, отпорност на домаќинот и животната средина (Gera & Guha, 2011)

Маститисот е глобален проблем, бидејќи негативно влијае врз здравјето на животните, квалитетот на млекото и производството на млеко во секоја земја, вклучувајќи ги и развиените земји и предизвикува големи финансиски загуби (Sharma, Maiti & Sharma, 2007). Постои согласност меѓу авторите дека маститисот е најраспространетата заразна болест кај млечните говеда и од економски аспект е најштетна (Tiwari et al., 2010; Sharma et al., 2012; Elango et al., 2010; Halasa et al., 2007; Mostert et al., 2004).

Клиничкиот и супклиничкиот маститис се двете главни форми на болеста. Клиничкиот маститис резултира со промени во составот и изгледот на млекото, намаленото производство на млеко и присуството на сериозни знаци на инфламација (болка, оток и црвенило, со или без температура, вимето е воспалено кај инфицираните животни, се појавуваат грутчиња и партали во млекото). Спротивно на тоа, откривањето на супклиничкиот маститис на вимето е потешко, поради недостаток на видливи симптоми на болеста (Kivaria et al., 2006).

Супклиничката форма е за 15 до 40 пати поприсутна од клиничката форма, обично ѝ претходи на клиничката форма и е долготрајна (Seegers, Fourichon & Beaudeau, 2003). Важно е да се нагласи дека супклинички погодените животни остануваат континуиран извор на инфекција кај стадата (Islam et al., 2011). Постојат различни нивоа за откривање на маститис: индивидуално ниво на крави

Зоран Арсевски

во стадото и редовно тестирање на млекото (Kivaria et al., 2006). Во однос на индивидуалното ниво на кравите, супклиничка форма на болеста може да се открие со бактериолошки преглед и според бројот на соматските клетки (Muhammad et al., 2010).

Броењето на соматски клетки е прифатен како најдобар индекс што треба да се користи за да се предвиди инфекција на вимето кај кравите и е широко користен како показател од 60-тите години на минатиот век (Pyorala et al., 2003; Kivaria et al., 2006). При теренски услови, определувањето на соматски клетки во млекото обично се прави со помош на Калифорнија маститис тест (CMT). На тој начин резултатите добиени од Калифорнија маститис тестот се директно поврзани со просечниот број на соматски клетки од секоја четвртина на вимето (Radostis et al., 2000; Pyorala et al., 2003). Калифорнија маститис тестот има предност бидејќи е многу евтин. Во исто време, кога бројот на заразени крави во стадото е висок, бројот на соматските клетки на млеко може да биде покачен. Маститисот е комплексна болест и затоа не постои едноставно решение за нејзиното контролирање, па разбирањето на нејзиното појавување, поврзаните фактори на ризик и вклучените маститогени патогени се основни елементи во развојот на контролната програма (Kivaria et al., 2006).

### **2.2.2. Контролни програми за маститис**

При појава на маститис постојат многу фактори кои дејствуваат истовремено, а болеста обично вклучува интеракција помеѓу практиката на управување и инфективните агенсии. Свесни дека особено супклиничкиот маститис е високо распространет меѓу стадата во земјите во развој, важно е да се идентификуваат факторите на ризик и да се процени нивниот придонес за

Зоран Арсевски

појавата на болеста. Идентификувањето на факторите на ризик е специфично за одредени области или за одредени фарми. Поради тоа, важно е спроведувањето на контролните програми за маститис кај кравите во однос на подолунавдените фактори (Almaw, Molla & Melaku, 2012)

- **Лична хигиена**

Молзачот пред молзењето секогаш треба да носи чиста облека и добро да ги измие рацете. Особено треба да се обрне внимание на ноктите, кои треба да се потсечени и чисти зашто може да го повредат вимето. Секоја мала гребнатица или повреда на вимето претставува потенцијална опасност за предизвикување на воспаление. Во случај кога молзачот има исеченици или ранички на рацете, повредите треба да се покриени со водоотпорен фластер. При рачно молзење, рацете по никоја цена не смеат да се потопуваат во млекото, зашто на овој начин се внесуваат сите микроорганизми од рацете и од под ноктите во млекото.

- **Правилна подготовка на кравата за молзење подразбира:**

- миење на вимето и боските;
- бришење и сушење на вимето и боските;
- користење на еднократни марамчиња за дезинфекција;
- масажа и преглед на вимето;
- дезинфекција на боските пред молзење со средство, при што се намалува ризикот од нови инфекции за 70 %;

Зоран Арсевски



Слика 1. Дезинфекција со средство пред молзење

Figure 1. Before milking disinfection with an agent

- измолзување на првите млазеви на млеко и нивно фрлање надвор од објектот;
- контрола на млекото на врна подлога;
- маститис-тест еднаш неделно за утврдување на бројот на соматски клетки.



Слика 2. Маститис-тест

Figure 2. Mastitis test

Зоран Арсевски

- **Молзење**

Молзењето може да се врши рачно или машински, а во зависност од начинот на одгледување на животните (врзани или слободни), молзењето може да се врши во самите лежишта или во молзилиште.



Слика 3. Рачно молзење

Figure 3. Manual milking



Слика 4. Машинско молзње

Figure 4. Machine Milking

Измолзеното млеко во канти или со млековод се изнесува надвор од шталата во посебна просторија (прирачна млекара). Најдобро е молзењето да се



---

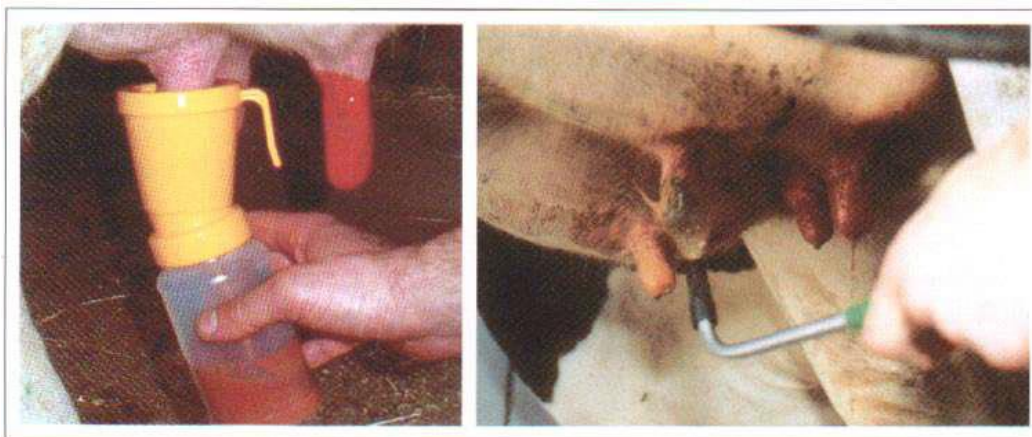
Зоран Арсевски

врши во молзилишта чија големина зависи од бројот на кравите. Понатаму, важно е и правилно и пријателско однесување со кравата пред и за време на молзењето. За време на молзењето во шталата мора да се одржува ред и мир. Молзењето треба да се прави пред или после хранењето на кравите.

Во текот на молзењето, шталата треба да биде чиста. При машинско молзење мораме да имаме исправен систем за молзење (правилен вакуум и пулсации), кој мора да биде темелно измиен и дезинфициран. Доколку молзењето се врши во молзилиште, истото веднаш по молзењето треба добро да се измие и дезинфицира.

- **Дезинфекција на боските после молзење**

Прстенестите мускули на крајот на боската го затвораат каналот за 15 минути после молзењето, кое се смета за критично време за контаминација со микроорганизми и појава на маститис, па затоа по молзењето боските треба веднаш да се дезинфицираат со средство кое дава заштита од 6 до 8 часа.



Слика 5. Дезинфекција на виме

Figure 5. Udder disinfectant

Зоран Арсеvски

Влага, кал и ѓубриво, присутни во околината на животните, се извори на патогени и предизвикуваат маститис. Хигиената ги намалува патогените организми и ги спречува да живеат во непосредна средина или на кожата на животните и го минимизираат нивното ширење за време на процесот на молзење. Околината на животните со валкани постелки или земја, инфициран прибор, лоша вентилација и висока влажност, се важни фактори на ризик. Преваленцата на маститис се зголемува кај стадата сместени во лоши и дренажни услови, и во стада каде кравите болни од маститис не се молзат.

Појавата на маститис зависи од сезона до сезона, бидејќи растот и размножувањето на организмите се одвиваат на одредена температура и влажност. Неправилната вентилација со висока температура и релативна влажност го поттикнува размножувањето на разни бактерии. Изложување на животните на висока температура може да го зголеми стресот на животните и да го поремети нивниот имунитет (Sudan & Sharma, 2010).

### 2.2.3. Главни предизвикувачи на зарази и патогени

Маститисот е предизвикан од неколку видови на заеднички бактерии, габи, микоплазми и алги (Batavani, Asri & Naebzadeh, 2007). Маститисот најчесто е од бактериско потекло, со само неколку видови на бактерии. Патогените мастити се категоризирани како заразни или еколошки (Kivaria et al., 2006).

Заразните патогени живеат и се размножуваат на и во млечната жлезда на кравата и се шират од крава до крава, првенствено при молзење. Заразните патогени микроорганизми вклучуваат: *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus agalactiae*, *Mycoplasma spp.* и *Corynebacterium bovis* (Radostis et al., 2000).

Еколошкиот маститис со интрамамарни инфекции (IMI) е предизвикан од патогени, чиј основен причинител е средината во која кравата живее (Smith,



Зоран Арсеvски

Todhunter & Schoenberger, 1985). Најчесто изолираните еколошки патогени микроорганизми се стрептококите, освен *S. agalactiae*, вообичаено се нарекуваат еколошки стрептококи (*S. uberis* и *S. dysgalactiae*) и грам-негативни бактерии, како што се: *Escherichia coli*, *Klebsiella spp.* и *Enterobacter spp.* (Hogan et al., 1999). Бидејќи маститисот е комплексна болест која вклучува различни фактори, идентификувањето на главните патогени и фактори на ризик на ниво на стадо е од фундаментално значење за развој на соодветни превентивни и контролни мерки. (Hegdeet et al., 2013). Фреквенцијата на изолација на колиформи (*E. coli*, *Enterococcus faecalis*, итн.) и други микроорганизми кои предизвикуваат еколошки маститис обично се директно под влијание на нехигиенските услови во кои се сместени животните (Mekonnen & Tesafaye, 2010).

Во нашата земја, во лабораторијата за контрола на млекото при Факултетот за ветеринарна медицина Скопје, во рамките на своите активности во периодот февруари-август 2008 година, изработена е студија за добивање на прелиминарни резултати за состојбата на суровото млеко кое се произведува во Р. Македонија, во однос на бројот на соматските клетки во млекото (БСК) и бројот на бактерии (ВББ). Во студијата беа извршени 2065 анализи на ВББ и 1625 анализи на БСК од производители на млеко од различни региони на државата. Од испитаните примероци, само 41.8 % ги исполниле критериумите за БСК, а 41,45 критериумите за ВББ, дадени во Правилникот за 2008 година, додека само 10.7% од примероците одговараа на критериумите на Европската легислатива (Angelovski et al., 2008).

#### **2.2.4. Влијание на маститисот врз составот и квалитетот на млекото**

Млекото и млечните производи имаат потенцијал да пренесат патогени на луѓето. Присуството на патогени што се пренесуваат преку храна со млеко се

Зоран Арсевски

должи на директен контакт со контаминирани извори во животната средина на млечната фарма или на излучување од вимето на заразено животно. Сите хранливи состојки кои го прават млекото и млечните производи важен дел од човечката исхрана, исто така, го поддржуваат растот на патогените организми (Oliver, Jayarao & Almeida, 2005). Кога млекото на крави со супклинички маститис (без видливи промени) се меша со збирното млеко, тоа влегува во синџирот на исхрана и може да биде опасно за луѓето (Hameed, Sender & Korwin-Kossakowska, 2007)

Маститисот не само што влијае негативно на производството на млеко, како што беше дискутирано погоре, туку има и негативно влијание врз составот на млекото и неговите физичко-хемиски карактеристики. Овие промени се припишуваат на промените во васкуларната пермеабилност поради воспалителниот процес и оштетувањето на епителните клетки кои се одговорни за синтеза на млечни компоненти, како и промени во ензимското дејство на соматски клетки или микроорганизми во заразената млечна жлезда (Kitchen et al., 1981). Bansal (2005) утврдил дека содржината на лактоза е повисока во здравите четвртини, отколку во четвртини со висок број на соматски клетки. Минералите  $\text{Na}^+$  и  $\text{Cl}^-$  се зголемуваат во маститското млеко, додека  $\text{K}^+$  во млекото опаѓа. Бидејќи најголемиот дел од калциумот во млекото е поврзан со казеин, нарушувањето на синтезата на казеин придонесува за намалено количество на калциум во млекото (Jones et al., 2006).

Овие промени влијаат врз квалитетот на млекото, директно преку промени во техничкиот и хигиенскиот квалитет на млекото, што резултира со помалку ефикасна обработка на млекото (Hogeveen et al., 2005).

Пастеризацијата го намалува бројот на одржливи микроорганизми, но често не ги уништува токсините произведени од бактериски патогени. Оттука и кога се консумира сурово млеко или кога пастеризацијата е погрешна, преносот на

Зоран Арсевски

термофилните токсини произведени од патогени кои предизвикуваат маститис во млекото е уште еден проблем при производство на млеко (Hogan et al., 2005).

Патоген кој често се среќава во млекото и се јавува како чест причинител на маститис кај млечните крави широм светот е *Staphylococcus aureus*. Млечната жлезда од говедата може да биде значаен резервоар на ентеротоксигенични соеви на *S. aureus*. Ентеротоксини произведени од ентеротоксигенични соеви на *S. aureus* често се причина во случаи на труење со храна (Hogan et al., 2005). Оваа бактерија е еден од најкомплицираните патогени кои предизвикуваат маститис кај повеќето клинички студии. Последно, но не и најмалку важно, остатоците од антибиотици можат да доведат до сериозни реакции кај луѓето кои се алергични на антибиотици (Hameed, Sender & Kossakowska. 2007).

#### **2.2.5. Економски ефекти на маститис**

Научно е докажано дека маститисот предизвикува промени кои влијаат на квалитетот на млекото, директно преку промени во техничкиот и хигиенскиот квалитет на млекото. Тоа резултира со помалку ефикасна обработка на млекото, што би можело да резултира со помалку поволни технолошки својства. Кога маститското млеко се користи за производство, вообичаените дефекти на производот вклучуваат зголемена коагулација и намалени приноси на сирење, продолжено време за добивање на путер, изменета топлинска стабилност на прашоците, намален рок на траење и лоши органолептички својства на многу производи (Auldist et al., 2011).

Зоран Арсевски

### 2.3. Афлатоксинот М1 во сурово млеко

Афлатоксините се продуцирани претежно од два вида на филаментозни габи, *Aspergillus flavus* и *Aspergillus parasiticus*. Неодамнешните студии покажаа дека некои *A. niger* и *A. tamarii* видови исто така се способни за продуцирање на афлатоксини, од кои *A. niger* е фенотипски сличен на *A. flavus* (Kurtzman et al., 1987; Goto et al., 1997). Ито и неговите соработници во 2001 година изолирале уште еден вид, *A. pseudotamarii*, кој исто така може да произведува афлатоксин. Овие габи припаѓаат на класата *Hyphomycetes*, и се подвид на *Deuteromycotina* од фамилијата на *Aspergillaceae*. Можат да контаминираат широк спектар на храна и земјоделски производи. Габите *Aspergillus* се способни за репродуцирање и колонизација на вариетети од супстрати, како и под вариетет на услови во локалната животна средина. Затоа, најголемиот дел од храната е подложна на афлатоксични габи во одредена фаза од продукцијата, процесирањето, транспортот или складирањето. Епидемијата на афлатоксикоза (позната како турска „Х“ болест) во 1960 година во Англија била причина за смртта на голем број домашни животни (Blount et al., 1961). Таа довела до откривање на афлатоксините во храна од кикиритки, кои биле истовремено контаминирани со *A. flavus* (Heseltine et al., 1979). Но, после угинувањето на 100. 000 мисирки во Англија (Turkey disease X) во 1960 година, од брашното од кикирики, кое било причина на угинувањето, изолирана е мувлата *Aspergillus flavus* како кристална супстанција, со сина флуоресценција. Тогаш овој токсин го добил и името:

**A (*Aspergillus*) + ФЛА (*flavus*) + ТОКСИН = АФЛАТОКСИН (Blount 1961)**

Следствено на тоа, афлатоксините биле откриени и во друга храна, посебно во пченката и оброците кои содржат влакнести семиња, (Chakrabarty et al., 1981; Sharma et al., 1994). Афлатоксинот М1 (AFM1) во млекото и млечните

Зоран Арсеvски

производи претставува значаен хигиенски ризик по човековото здравје. Резистентни на афлатоксин се: сојата, пченицата, овесот и јачменот.



Слика 6. Пченка заразена со афлатоксин (*Aspergillus flavus*)

Figure 6. Corn infected with aflatoxin (*Aspergillus flavus*)

Цицачите кои консумираат афлатоксин Б1 контаминирана храна, го елиминираат во млекото главниот 4-хидроксилен метаболит, познат како „млечен токсин“ или афлатоксин М1. Економските загуби припишани на афлатоксините се рефлектирани директно преку намалување на житните реколти, домашни животни и млечни производи, додека индиректните последици се: зголемени трошоци за програми за контрола на квалитетот, истражување и едукација, помал обем на размена со надворешни партнери, како и добивка и зголемен обем на трошоци за складирање и пакување на ранливите комодитети. Потенцијалните ризици од афлатоксините за човековото здравје доведоа до светска мониторинг програма за контрола на токсинот, како и регулаторни постапки од страна на скоро сите држави. Афлатоксичните соединенија се термостабилни и пастеризирани и не можат да бидат уништени, поради тоа тие се појавуваат во стерилизираното

Зоран Арсевски

млеко, како и кај ферментираните млечни производи. (Iha et al., 2013). Кон крајот од 2012 и почетокот на 2013 година, следејќи ја Европската комисија на системот за брзо предупредување за храна и добиточна храна (EC, 2013), ризикот за микотоксично загадување на добиточна храна и млеко беше изведен пред јавноста на Балканот и централно-европските земји. За време на периодот, којшто е претходно споменат, беа пријавени 10 предупредувања за присуство на зголемено ниво AFB<sub>1</sub>. Беа детектирани концентрации на AFB<sub>1</sub>, помеѓу 22.4 и 204 µg/kg, односно повисоко ниво отколку што било поставено од страна на MRL, од 20 µg/kg (EC, 2006b).

Последователно на овие предупредувања и имајќи го предвид фактот дека Македонија е вклучена во увезување на добиточна храна, најмногу од пределот на Југоисточна Европа, се зголеми и загриженоста која водеше до поставување на мерки за афлатоксична контрола на примероците од суровото млеко и добиточната храна. По многубројни истражувања во врска со можните канцерогени, тератогени, генотоксични и имуносупресивни влијанија, IARC го класифицираше AFM<sub>1</sub>, заедно со други афлатоксини, како Група 1 канцероген (IARC, 1993).

Луѓето се изложени на AFM<sub>1</sub> преку ендогени продуцирања или преку внесување на млечни производи. Најизложени се доенчињата и малите деца, но, не може да се негира токсичното лачење на млекото и кај доилките (Turconi et al., 2004).

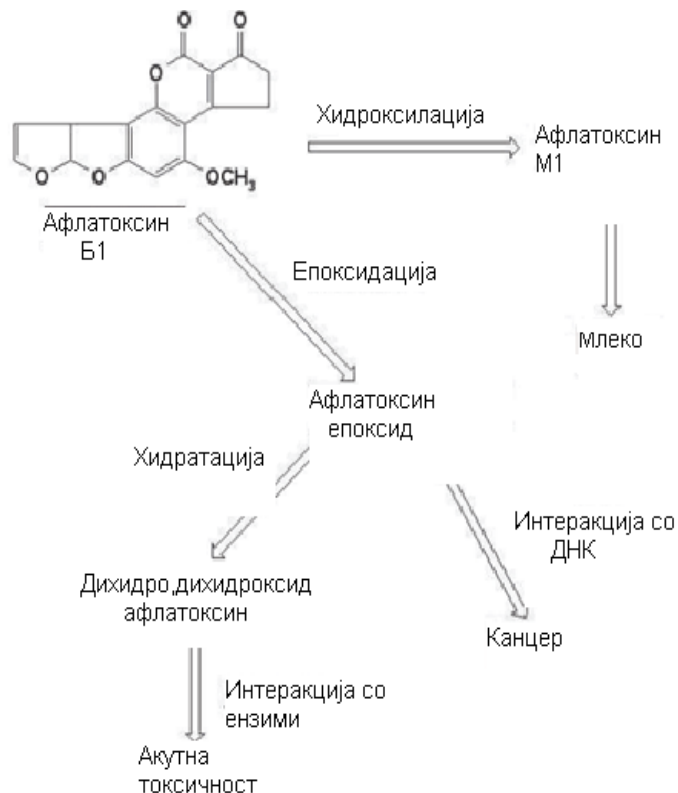
Зоран Арсевски

### 2.3.1. Формирање, токсичност, и регулација на афлатоксинот М1

Афлатоксинот Б1 (AFB1) се метаболизира од системот на хепатална микрозомална мешано-функциска оксидаза, но исто така може да предизвика и неколку други метаболички конверзии, во зависност од видот (Marsi et al, 1974).

Количината на афлатоксин М1 (AFM1) која се излучува во млекото, како процент од вкупниот AFB1 со средна вредност од 1 до 2%, варира од животно до животно, од ден на ден, како и од едно молзење до друго. AFM1 може да се детектира во млекото од 12 до 24 часа по првото консумирање, постигнувајќи го целосниот ефект по неколку денови. Кога внесувањето на AFB1 е завршено, концентracијата на AFM1 во млекото се намалува кон ниво кое не може да се детектира после 72 часа (Van Egmond et al., 1989). Battoccone со неговите соработници увидел дека постои линеарна врска помеѓу дозата и екскрецијата на AFM1 и AFB1 во овчото млеко (Battoccone et al., 2003).

Зоран Арсевски



Слика 7. Некои метаболитички производи од AFB1

Figure 7. Some metabolic products from AFB1

Интернационалната агенција за истражување на ракот (IARC, 1993) ги класифицира AFB1 и AFM1 соодветно како класа 1 и 2B (или како веројатни предизвикувачи) односно канцерогени.

Lafont воочил висока генотоксична активност на AFM1, иако таа била помала од таа на AFB1 (Lafont et al., 1989). Афлатоксините покажувале способност и за акутна и за хронична токсичност. Може да се забележи дека кај некои видови на животни, како на пример, кај глушецот, афлатоксините се со зголемена канцерогеност, додека пак кај некои други видови е потешко да се демонстрира истата канцерогеност. Постојат неколку метаболитички реакции, како



Зоран Арсевски

на пример, деметилацијата кон афлатоксин В1 и хидрација кон афлатоксин В2а, кои можат да доведат до намалување на токсичноста. Афлатоксините се еден од значајните етиолошки фактори кои придонесуваат за развој на Hepatocellular Carcinoma (IARC, 2002), додека пак во поново време се откриени и врски помеѓу изложеноста на афлатоксини за време на детството, како и слабеење на растот кај децата (Gong et al., 2004). Моменталните границите на AFM1 се високо варијабилни во зависност од степенот на развиеност и економскиот стандард на државата. Според Codex Alimentarius, максималното ниво на AFM1 во течното млеко во прав или процесирани млечни производи, не треба да ја надминуваат границата од 50 нанограми на килограм (Codex Alimentarius Commissions, 2001). Од друга страна пак, според регулативата на САД, нивото на AFM1 во млекото не треба да биде поголемо од 500 нанограми на килограм (Stoloff et al., 1991). Според тоа, постојат разлики во максимално дозволена граница на AFM1 во разни земји (Pohland & Yess, 1992). Сепак, Stoloff воочил дека мониторингот и превентивните програми засега се најефективните стратегии кои доведуваат до намалување на ризикот од изложеност кај луѓето и кај животните и тие се:

- Евалуација на нивото на човековата изложеност, и здравствените ризици базирани врз токсиколошките истражувања спроведени на животни;
- Тешкотии при проценката на консумацијата и исхраната; и
- Деконтаминација и отстранување на микотоксините од човековата и животинската исхрана (Stoloff et al., 1991).

Зоран Арсевски

### 2.3.2. Извор на афлатоксини во земјоделски производи

Контаминацијата на земјоделските производи со афлатоксин настанува поради раст на габични супстрати кои овозможуваат производство на афлатоксични мувли. Природната контаминација на житни култури, смокви, маслодајни растенија, ореви, тутун, и долг список на други стоки, е заедничка појава (Detroy et al., 1971).

Способноста да се создадат афлатоксини генетски е многу променлива. Понекогаш контаминацијата со афлатоксин настанува пред жетвата и обично е поврзана со температурните разлики и појава на т.н суша стрес (Klich et al., 1987).

Уште попроблематична е судбината на културите складирани под услови кои овозможуваат појава на мувла. При складирањето, важни променливи се: содржина на влага во просторијата за складирање и релативната влажност на околината (Diener et al., 2001).



Слика 8. Фактори кои влијаат на појавата на микотоксините во синџирот на исхрана

Figure 8. Factors which affect mycotoxins occurrence in the food chain

Зоран Арсевски

### 2.3.3. Продукција на афлатоксин

Афлатоксините можат да бидат произведени од страна на три видови на *Aspergillus* габи: *A. flavus*, *A. parasiticus* и ретки *A. nomius*, кои ги контаминираат растенијата и растителните производи. *A. flavus* и *A. parasiticus* се најприсутни габи, покажувајќи посебен афинитет за семиња со висок процент на растително масло. *A. flavus* и *A. parasiticus* колонизираат растенија од тропска или суптропска клима, но тие, исто така, може да колонизираат производи во постбербен период доколку не се соодветно дехидрирани, т.е сушени (Whitlow & Hagler, 2002). Спектарот на раст на овие габи изнесува од 12 до 48°C, или на 36-38°C. Создавање на афлатоксин се случува на температури помеѓу 20 и 30°C (Battilani et al., 2004).

Главни извори на афлатоксини во храната се: кикирики, пченка и памук. Овие габи можат да преживеат во почвата, во стрништата, и кога условите се погодни тие почнуваат да произведуваат спори кои се шират преку ветер (Battilani et al., 2004). *A. Parasiticus* ја претпочита почвата како своја животната средина, а сè почесто се наоѓа и на ореви, додека *A. flavus* е прилагодена на воздушна средина и доминира кај видови на суво овошје, памук и пченка. *A. flavus* е габа типична за пченката и генерално ги колонизира оштетените зрна на пченката, во некои случаи може да произведе ензими *пектиназа* и *кутиназа*, кои овозможуваат да навлезе во зрната или преку свилата од класот (Battilani et al., 2004).

Производството на афлатоксин е во силна корелација со влагата на зрната, еколошките услови, особено високи температури и суша. Начинот на режењето, исто така, може да игра важна улога во создавањето на афлатоксин. Одгледување на монокултура и садење на хибриди, несоодветни за областа на одгледување и ниска отпорност на удар од инсекти, се поволни фактори за

Зоран Арсевски

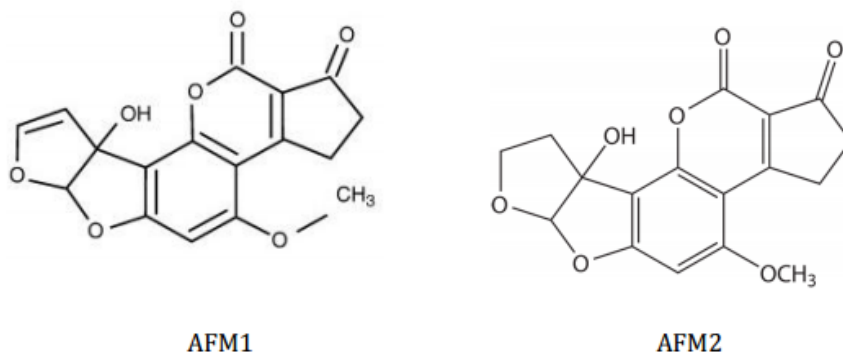
создавање на афлатоксин. Сите фактори како сушата, сеењето со несоодветна густина и тајминг, песоклива почва, неадекватна контрола на штетници и прекумерно ѓубрење со азотни ѓубрива, доведуваат да се зголеми акумулацијата на афлатоксин. Нивото на контаминација е кумулативно, па затоа бербата, времето и условите на сушење може да играат подеднакво важна улога во акумулацијата на афлатоксин (Battilani et al., 2004).

#### 2.3.4. Физички и хемиски својства на афлатоксини

Афлатоксините се токсични, канцерогени, мутагени, и имуносупресивни производи, како секундарни метаболити создадени од страна на габа *Aspergillus flavus* и *Aspergillus parasiticus* на различни прехранбени производи (Ozay et al., 2008). Афлатоксинот B1 (AFB1) обично преовладува на растенијата, како и во прехранбените производи. AFB1 има бледа кристално-жота боја и е без мирис (Guzman et al., 2007). Афлатоксините се растворливи во етанол, хлороформ, ацетон и ацетонитрил. *Aspergillus parasiticus* ги создава AFG1 и AFG2 како и AFB1 и AFB2.

Четири други афлатоксини M1, M2, B2A, G2A, кои може да се добијат во мала количина, се изолирани од културата од *A. flavus* и *A. parasiticus* (Ghorbanian et al., 2008). Афлатоксините M1 и M2 се главни метаболити на AFB1 и AFB2, и се наоѓаат во млеко од животни кои консумирале храна контаминирана со афлатоксин (Reddy & Waliyar, 2008).

Зоран Арсевски



Слика 9. Структурни формули на афлатоксините M1 и M2

Figure 9. Structural formula on aflatoxin M1 and M2

### 2.3.5. AFM1 во млекото

Млекото, како течност, е високо варијабилен продукт, кој рапидно може да го изгуби својот квалитет и да се расипе доколку не е одржуван правилно. Бидејќи млекото може да се произведе на различни начини, складирањето и процесирањето се од голема важност. Kiermier и Meshaley во 1977 год. ги проучувале ефектите од ладните третмани и воочиле дека AFM1-токсините се намалиле од 11 до 25% после првите 3 дена на температура од 5°C, 40% на 0°C, и 80% после 6 дена. McKinney во 1973 год. открил дека доколку млекото се замрзне на -18°C во период од 30 дена, процентот на токсинот се намалува до 14%, а по 53 дена дури и до 85%. Stollef сугестирал помала деградација на AFM1 на -18 °C, со незначителна загуба после 53-тиот ден. Но, кога станува збор за ефектите од затоплувањето, добиени се сосема контрадикторни извештаи. Choudhary во 1998 год. ги проучувал ефектите од различните третмани со затоплувања на токсинот AFM1 во кравјото млеко, и заклучил дека при стерилизацијата на млекото на 121°C во период од 15 минути, се предизвикува намалување на AFM1 за 12.21%, додека вриењето го намалило AFM1 за 14.50%. Според тоа, истражувачите

Зоран Арсевски

заклучиле дека уништувањето на AFM1 со топлински третман зависи од комбинацијата на температура и временскиот период. Bakirci во 2001 год. открил дека со пастеризацијата се предизвикува намалување на нивото на AFM1 со стапка од 7.62%. Други истражувачи потврдиле дека пастеризацијата може парцијално да ја намали количината на AFM1 во млекото (Deveci et al., 2007). Но, некои други извештаи упатуваат дека афлатоксините се стабилни за време на третмани со топлина, како на пример, пастеризација и стерилизација (Van-Egmond et al. 1977; Wiseman and Marth, 1983; Yousef and Marth, 1989; Govaris et al. 2001).

Дистрибуцијата на AFM1 во млекото не е хомогена. Отстранувањето на кајмакот може да влијае на дистрибуцијата на AFM1, бидејќи 80% од AFM1 се наоѓа во делот на безмасното млеко, што значи дека AFM1 се врзува за казеинот (Brackett, 1998/2a). Според Van Egmond and Paulsch во 1986 год. однесувањето на AFM1 во процеси кои инволвираат отстранување на маснотии, може да биде образложено со неговите полуполарни својства. Контрадикторни индикации се добиени во однос на влијанието на млечната концентрација врз AFM1. Kiermeier во 1973 година поднел извештај без загуби на AFM1, додека пак некои автори опсервирале загуби на AFM1, варирајќи од 60% до 75% (Moreau et al., 1976; Purchase et al., 1973). Многу автори, исто така, имаат покажано дека промената на сезоните може да влијае на концентрацијата на афлатоксинот M1. Истите автори поднеле извештај за зголемена концентрација на AFM1 за време на ладната сезона, споредбено за време на топлите сезони (Applebaum et al., 1982; Blanco et al., 1988b; Hussain & Anwar, 2008; Tajkarimi et al. 2008; Fallah et al., 2010; Bilandzic et al., 2010). Во зимските периоди најголемиот дел од молзните животни се прехрануваат со сточната храна, а тоа доведува до зголемена концентрација на афлатоксин B1, кој пак ја зголемува концентрацијата на AFM1 во млекото.

Зоран Арсевски

Покрај тоа, и температурите и влагата исто така придонесуваат за зголемена концентрација на афлатоксинот В1 во сточната исхрана. *A. flavus* и *A. Parasiticus* можат многу лесно да се формираат во сточна храна, каде што имаат влажност помеѓу 13% и 18%, како и влажност на околината помеѓу 50% и 60% (Jay et al., 1992). Уште една причина за ниските нивоа на AFM1 за време на летниот период се пасиштата.

Денес зголемената ефикасност на имуноензимната екстракција и прецизноста на аналитичката методологија и опрема, како на пример, високоефикасна течна хроматографија со флуоросцентен детектор, придонесуваат детектираните лимити да се намалуваат (Galvano et al., 1996).

#### **2.3.6. Ефект на преработка на млеко врз содржината AFM1**

- **Третман со висока температура**

Повеќето од студиите покажуваат дека третманите, како пастеризација и стерилизација, не предизвикуваат значително промени во износ од AFM1 во овие производи (Park et al., 2002)

- **Чување на ниска температура**

Според истражувањата, чувањето на замрзнато контаминирано млеко и други млечни производи за неколку месеци не влијаело на нивната содржина на AFM1 (JECFA, 2001).

Зоран Арсевски

- **Преработка на млечни производи**

Истражувањата покажале дека при преработка на млечни производи кои се произведени со загревање на млеко и додавање на стартер култура за да се иницира ферментација, како кефир и јогурт, не постои значително намалување на содржината на AFM1 во нивниот состав (Park et al., 2002).

- **Концентрација и сушење на млеко**

Дехидрирано, концентрирано или сушено млеко настанува со делумно или целосно отстранување на водата од млекото, со или без греење, што доведува до концентрирање на AFM1 (JECFA, 2001).

## **2.4 Техники за детекција**

По екстракција на афлатоксинот од примерокот и аплицирањето на стерилна подлога следува идентификација и квантификација. За идентификација на афлатоксините се користат:

- биолошки,
- аналитички и
- имунолошки методи.

Биолошкиот метод се употребува во случаи кога аналитичкиот и имунолошкиот метод не се достапни за рутинска анализа. Но, биолошките анализи се квалитативни и бараат повеќе време за анализа и затоа се избегнуваат при рутинска контрола на млекото.

Во поново време, развиени се и повеќе хроматографски методи, кои се употребуваат за контрола на квалитетот на млекото и тоа: тенкослојна



Зоран Арсевски

хроматографија, тенкослојна хроматографија со високи перформанси и течна хроматографија со високи перформанси (HPLC).

- **Тенкослојна хроматографија (Thin-layer chromatography TLC)**

Тенкослојна хроматографија е техника која се употребува за раздвојување, проценка на чистотата и идентификацијата на афлатоксините. Со помош на TLC-методот може да се идентификуваат и квантифицираат нивоа на афлатоксини почнувајќи од 1 ng/g. TLC се состои од стационарна фаза имобилизирана на стакло и растворувач кој има улога на мобилна фаза. Тенкослојната хроматографија е стандардниот AOAC-метод за анализа на афлатоксини уште од 1971 година (AOAC Official Method 974.17 1990). Во научната студија спроведена од Van Egmond и неговите соработници во 1978 год. е потврдена идентификација на афлатоксинот M1 преку реакција на афлатоксинот со трифлуорооцетна киселина (TFA). Rf-вредноста на синиот флуоросцентен дериват била споредена со стандардниот референтен систем за афлатоксин M1.

- **Тенкослојна хроматографија со високи перформанси (HP-TLC)**

Тенкослојна хроматографија со високи перформанси (HPTLC) е подобрена форма на тенкослојната хроматографија (TLC). HPTLC ги надминува проблемите поврзани со конвенционалните техники на TLC, преку автоматизација на апликацијата, развојот и примената на примероците. Не е изненадувачки што во моментот HPTLC е една од најефикасните и најпрецизни методи за анализа на афлатоксини. Сепак, условот за квалификувани оператори, трошоците за опремата и опсежната претходна обработка на примерокот, ја ограничуваат HPTLC за работа во лабораторија и затоа не се применува на терен (Ramesh, Sarathchandra & Sureshkumar, 1992).

Зоран Арсевски



Слика 10. ХП ТЛЦ-апарат

Figure 10. HP TLC aparat

#### - Течна хроматографија со високи перформанси (HPLC)

Течната хроматографија со високи перформанси е многу прецизна и високоавтоматизирана техника со висока селективност и сензитивност. HPLC-методите се развиени за детекција на сите позначајни микотоксини во житариците и во другите земојделски култури. Во однос на поларноста на стационарна и мобилна фаза, се разликуваат: хроматографија со нормална фаза и хроматографија со реверзна фаза. Во хроматографијата со нормална фаза се употребуваат: поларна стационарна фаза (пример, силиконски гел) и неполарен

Зоран Арсевски

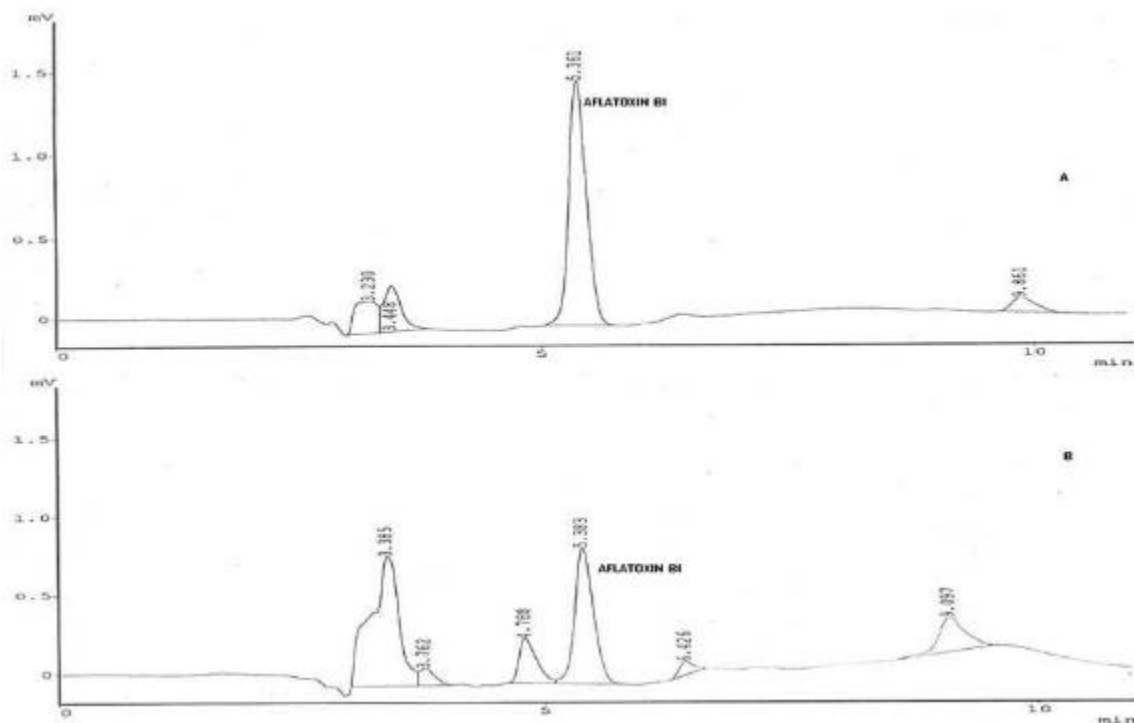
раствор (пример хексан). Хроматографијата со реверзна фаза (RP-HPLC) вклучува неполярна стационарна фаза (на пример: C-8 или C-18) и поларна мобилна фаза (на пример: вода, метанол или ацетонитрил). Со HPLC-методот за детекцијата најчесто се користи УВ (ултравиолетов) детектор или флуоросцентен детектор (FLD). Флуоросцентната детекција има супериорна сензитивност и таа најчесто се користи за детекција на афлатоксините. Реверзно-фазна RP-HPLC се користи вообичаено за детерминација на присуството на афлатоксини во храната. HPLC-системот дава резултати во форма на хроматограм. Хроматограмот дава квалитативен и квантитативен податок, односно дава информација за идентитетот на супстанцијата (преку ретенционо време), додека површината под пикот дава информација за количеството на компонентата во смесата.



Слика 11. HPLC-систем

Figure 11. HPLC system

Зоран Арсевски



Графикон 1: Примерок од HPLC-хроматограм, каде што A е стандардот, а Б е примерокот

Chart 1: A sample of the HPLC chromatogram, where A is the standard, and B is the sample

#### - Течна хроматографија со масена спектрометрија (HPLC-MS)

Течната хроматографија со масена спектрометрија (HPLC-MS) е релативно нова техника за детекцијата на афлатоксини и воедно е и една од најсовремените техники за идентификација и квантификација на афлатоксини. Со помош на масен детектор се врши раскинување на молекулата на афлатоксинот и фрагментите од молекулата се препознаваат преку споредување со масени спектри во базата на податоци што ја има секој инструмент.

Зоран Арсевски

#### 2.4.1 Имунолошки методи

Имунолошките методи се базираат на афинитетите на моноклоналните или поликлоналните антитела на афлатоксините. Поради напредувањата остварени на полето на биотехнологијата, високопрецизни антитела базирани тестови се сега комерцијално достапни за мерење на афлатоксини во храната за помалку од 10 минути. Потребни се две главни побарувања за имунолошките методи. Првото побарување се состои од антитела со висок квалитет, додека вториот е методологијата за употреба на антителата за да се направи проценка на афлатоксините. Бидејќи молекулите на афлатоксините се со ниска молекуларна тежина, тие не можат да го стимулираат имунолошкиот систем да продуцира антитела. Овие молекули, кои се со ниска молекуларна тежина, кои не можат да го евоцираат имунолошкиот систем, се нарекуваат хаптени. Затоа, пред имунизацијата, афлатоксините мора да бидат конјугирани во молекула-носач, која е со големина на ниво на протеин. *Bovine serum albumin* (BSA) е најчесто употребуван како протеин-носач и хаптенот конјугира со него. Трите типа на имунохемиски методи се: имуноафинитетна линиска анализа (ICA), радиоимуноесеј (RIA) и ензимски имуносорбент (ELISA). Имуноафинитетните линии се најчесто употребувани за намените за чистење, додека пак (RIA) има лимитирана улога во детекцијата на афлатоксини. Најчесто употребуван е ELISA за проценката на афлатоксини.

Многу брзи тестови, со употреба на специфични антитела за изолација и детекција на микотоксини во храната се дискутирани и аплицирани од страна на различни истражувачи (Newsome et al., 1987; Groopman & Donahue, 1988). Употребата на имуноафинитетни кертрици е напредок остварен во поново време во поглед на квантитативната екстракција на афлатоксини. Моноклоналните

Зоран Арсевски

антитела, кои се специфични за афлатоксините, се имобилизирани на Sepharose® кои понатаму се пакуваат во мали кертриџи.

Истражувачката работа на Mortimer и неговите соработници во 1987 година, била многу значајна, бидејќи таа е првиот публикуван метод за афлатоксинот M1 со имуноафинитетни линии. За детерминација на афлатоксинот, се употребува примерок од млеко кој е сместен во една од афинитетните линии. Антигенот, т.е афлатоксинот е селективно комплексиран од страна на специфичните антитела кои се наоѓаат на цврста основа, од која подоцна се развиваат антиген-антитело комплекс. Потоа, линијата (инструмент) се пречистува со вода за да се тргнат сите матични остатоци од примерокот. Мала количина на чист ацетонитрил се употребува да се отстрани афлатоксинот, кој подоцна се концентрира и анализира од HPLC придружуван со флуоросцентна детекција.

Досега има изведено многу колаборативни студии за да се развијат имунолошките методи; посебно за афлатоксинот M1. Имуноафинитетните базирани методи за афлатоксинот M1 беа модифицирани и последователно публикувани и студирани колаборативно под покровителство на Интернационалната млечна федерација и AOAC Интернационал, од страна на групи од најчесто европски лаборатории, кои можат да детерминираат афлатоксин M1 во млекото со концентрации еднакви на 0.05 µg/ литар. Студија на Tuinstra и неговите соработници во 1993 год. доведе до Стандардот 171 на Интернационалната млечна федерација.

Друга студија била спроведена со цел да се евалуира ефективността на имуноафинитетната линија за чистење на течната хроматографија за детерминација на афлатоксин M1 во млекото со предложените Европски регулаторни лимити (Dragacci et al. 2001). Процедурата вклучува центрифугирање, филтрација и апликација на тест-партицијата во имуноафинитетната линија. Потоа, како и во претходно опишаниот дел, линијата

Зоран Арсевски

се измива со вода и афлатоксинот се елутира со чист ацетонитрил. Афлатоксинот се сепарира со реверзибилно-фазна течна хроматографија, додека пак детекцијата се врши со флуоросцентен детектор.

#### **2.4.2 Ензимски имуносорбент (ELISA)**

Ензимски имуносорбент е најшироко употребуваниот тест досега за откривање и детекција на афлатоксини, во најголема мера поради неговата едноставност, робусност и сензитивност. Постојат два типа на ензимски имуносорбенти, кои се директно компетативни, ензимски имуносорбенти и индиректни компетативни ензимски имуносорбенти. Во директно компетативниот ензимски имуносорбент методот, специфично антитело се обложува до цврста фаза во микротитер плоча, додека пак кај индиректниот компетативен ензимски имуносорбент метод токсин-протеин коњугатот е обложен врз микротитерната плоча. При анализите на афлатоксините, методот на директно компетативни ензимски имуносорбенти е секогаш употребуван. Воопшто методот на ензимски имуносорбент е детекција и квантификација на антигенот (афлатоксинот) во даден примерок, со употреба на ензимски лабелиран токсин и антитела кои се специфични за афлатоксините. Ензимскиот имуносорбент е базиран на антиген-антитело реакцијата (Aycicek et al., 2005). Антигенот е супстанција која може да започне продукција на антитела кога е внесен во топлокрвните животни. Додека на почетокот антителата се гликопротеини кои се продуцираат како резултат на имунолошки одговор, по додавањето на антителата, доаѓа до продукцијата на специфичен антиген-антитело комплекс. Во директно компетативниот ензимски имуносорбент, специфични антитела на афлатоксинот се обложуваат во отворите во микротитер лентата. Тест-примероците или референтниот афлатоксин се ставаат во отворите исто така. По инкубацијата и измивањето (коњугат од

Зоран Арсевски

афлатоксин и серум албумин за говеда, се додава на енсимската молекула како на пример: рен пероксидаза или пеницилиназа или алкална фосфатаза) ензимскиот коњугат се додава во отворите. Слободните афлатоксини и афлатоксинскиот ензимен коњугат се натпреваруваат за афлатоксинните антитела и нивните лежишта во отворите. Чекорите со измивање ги отстрануваат неповрзаните ензимски коњугати. Потоа се додава супстрат/хромоген во отворите и се инкубира. Ензимски поврзаниот коњугат го конвертира безбојниот хромоген во син продукт. Потоа се додава „стоп“ солуцијата, која доведува до промена на бојата од сина во жолта. Потоа се земаат мерки со помош на 450 нанометарска фотометрија во ELISA-апарат. Апсорпцијата е обратно пропорционална со концентрацијата на афлатоксин во примерокот, т.е колку помала апсорпција, толку е повисока концентрацијата на афлатоксинот. Главниот инструмент кој се употребува во имуносорбентните истражување е ELISA-инструментот. Во основа тоа е фотометричен инструмент, кој ги дава апсорбентите или солуцијата на крајот на дадениот процес. Во следната фотографија е прикажан ELISA-инструмент.



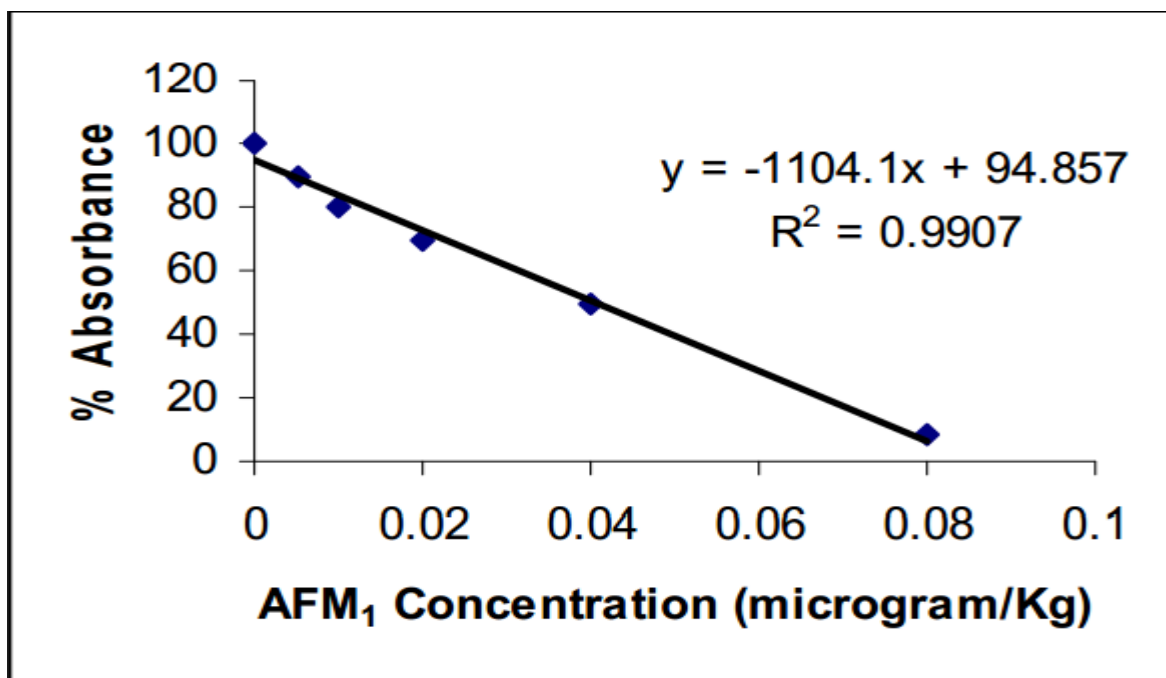
Слика 12. ELISA-инструмент

Figure 12. ELISA instrument



Зоран Арсевски

Примерок од ензимската имуносорбентна калибрациска крива е прикажана на следниот графикон. ELISA-инструментот дава исчитувања на апсорбентите, од каде пак понатаму се пресметува процентот на апсорпцијата. За стандардни раствори, процентот на апсорпцијата е поставен наспроти концентрацијата на афлатоксин за да се добие калибрациската крива. Концентрацијата на афлатоксинот е прикажана со x-кривата, додека пак апсорпцијата е прикажана на y-кривата. Од калибрациската крива се добива калкулацијата во примероците на концентрација на афлатоксини.



Слика 13. Примерок со калибрациона крива на анализа на имуносорбент поврзан со ензим.

Figure 13. A sample enzyme-linked immunosorbent assay calibration curve

Зоран Арсевски

### **3. Цел на Истражувањето**

Во овој труд основна цел беше да се определи квалитетот на млекото произведено во Овчеполскиот Регион. Бидејќи сè почесто корелацијата на соматски клетки и вкупниот број на бактерии се показатели на исправно и квалитетно млеко, една од задачите беше да истажине колкав е бројот на соматските клетки како индикатор на болест на млечната жлезда или популарно наречен маститис и вкупниот број на бактерии во млекото.

Во периодот од 2013 до 2014 година во Република Македонија беше откриена зголемена концентрација на афлатоксин М1 и негово присуство како во увезеното млеко, така и во домашното производство. Агенцијата за храна и ветеринарство најави зачестени контроли за откривање на афлатоксинот М1. Бидејќи станува збор за канцерогена супстанција во храна, која е доминантна кај најранливата популација од населението (бебиња, деца и стари лица), во овој труд беа опфатени и анализи за присуство на афлатоксинот М1 во млекото од Овчеполскиот Регион.

По извршените анализи се направени и споредби со последните студии објавени во Република Македонија, а исто така е направена и споредба со ЕУ-регулативите.

### **4. Материјали и методи**

#### **4.1. Земање примероци**

Во ова магистерска теза предмет на истражување за присуство на афлатоксин М1 беа 60 примероци на сурово млеко од Овчеполскиот Регион. Сите примероци беа чувани на температура од 2 до 8°C и беа тестирани за време од 24

Зоран Арсевски

часа. Некои примероци кои не бевме во можност да ги анализираме во рок од 24 часа, беа чувани на -20 °C.

За определување на вкупниот број на бактерии во периодот од јануари до јуни 2018 година, беа земени 1316 примероци, додека за определување на бројот на соматски клетки, 478 примероци на сурово млеко од производители од Овчеполскиот Регион. Примероците се земени и доставени во пластични стерилни и запечатени чаши со волумен од 50 мл, конзервирани од Adizol (Sigma-Aldrich vol. 25 мл.). Истите по земање се транспортирани на температура од 4°C во лабораторијата за испитување на квалитетот на сурово млеко при Факултетот за ветеринарна медицина - Скопје.

#### **4.2.   Анализа на вкупен број соматски клетки и број на бактерии**

Сите примероци се анализирани со акредитиран метод, во согласност со ISO 21187:2004. За испитувањата се користеше инструмент Bactoscan 8000S (Foss Electric Denmark). Процедурата за БМО беше изведена според стандардот Milk-Quantitative determination of bacteriological quality, IDF Standard 161A: 1995.

Овој апарат работи на принцип на бојење на бактериите со флуоросцентна боја. Во постапката по бојењето на бактериите тенок филм од примерокот на млеко, нанаесен на ротирачки диск, поминува под објективот на флуоросцентен микроскоп. Овој микроскоп ги брои обоените бактерии како светлосни пулсирања кои се конвертираат по електронски пат и се прикажуваат како нумерички податоци.

Пред да се започне со броење на соматските клетки, примероците се загреваат на температура од 40°C и истите двапати се анализираат на апаратот Fossomatic 5000 (FossElectric, Denmark). Процедурата за броење на соматски

Зоран Арсевски

клетки е изведена во согласност со акредитиран метод ISO 17025-FVM-SOP-398, според референци од ISO 13366-2:2006.

#### **4.3. Анализи на Афлатоксин M<sub>1</sub> кај сировото млеко со ELISA**

Тестирањето со помош на ELISA-опремата Immunoscreen AFM<sub>1</sub> (Tecna, s.r.l, Trieste, Italy) беше овозможено врз основа на инструкциите на производителот. Сите стандард контроли и примероци беа двојно изведени на 96-well плоча, обложени со анти – AFM<sub>1</sub> антитела. По извршување на колоризацијата, со помош на соодветниот хромоген, примероците беа измерени, користејќи микроплатен фотометар Bio-Rad Model 680 (Philadelphia, USA) поставен на 450 nm. Измерената апсорпција беше обратнопропорционална на концентрацијата на AFM<sub>1</sub> во примерокот и измерениот опсег на апаратурата изнесување од 5 до 250 ng/kg.

Аналитичкиот квалитет на ELISA-методот беше утврден со додавање на сеопфатна методска валидација. Како што е предвидено во Decision 2002/657/EC (EC, 2002), беа проценети последователните валидациони параметри: половично – максимална инхибиторна концентрација (IC<sub>50</sub>), детекција на ограничување (LOD), квантификационен лимит (LOQ), детектирање на способноста (CCβ), обновување и прецизност EN ISO 14675:2003 (ISO, 2003a). Понатаму резултатите од ELISA-методот беа споредени со резултатите од FAPAS-тестот.

#### **4.4. Анализа на афлатоксин M<sub>1</sub> кај сировото млеко со HPLC-FD**

Хроматографските анализи, со хроматографот Waters Alliance 2695, со мали модификации, всушност е ISO-методот за анализирање на AFM<sub>1</sub> во сирово млеко (ISO, 2007). За испитување е користена хроматографска колона со реверзна фаза (C18, 150 mm, 4.6 mm I.D., 5 μm честички), а раздвојувањето беше изведено

Зоран Арсевски

на собна температура. Применет е изократски мод со смеша од вода и ацетонитрил (75/25 v/v), со проток од 1 mL/min. По инјектирањето на 100  $\mu$ L екстракт од примерокот во хроматографскиот систем, идентификацијата на AFM<sub>1</sub> беше изведено на 365 и 435 nm. Примероците од млекото беа прочистени, преку употреба на Aflarper M AF M<sub>1</sub> имуно-афимирани екстрактни колони на цврста фаза (R-Biopharm, Darmstadt, Germany), овозможувајќи концентрирање на токсинот и до 25 пати. Како референтен стандард, ние користевме AFM<sub>1</sub> матичен раствор во ацетонитрил, со концентрација од 0,5  $\mu$ g/mL, обезбедени од страна на R-Biopharm (Darmstadt, Germany). Методот беше валидизиран, врз основа на барањата и критериумите, поставени од страна на Commission Regulation No. 406/2006/EC (EC, 2006a), последователно на пристапот (EC, 2002) на Комисиската одлука 202/657/EC. Како додаток, веродостојноста на методот беше спореден со резултатите добиени од FAPAS-тестот.

## 5. Резултати и дискусија

Во однос на последните истражувања во Република Македонија на Ангеловски и неговите соработници во 2008 година, за квалитетот на суровото млеко во однос на бројот на соматските клетки во млекото (БСК) и бројот на бактерии (ВББ), од испитаните примероци само 41.8% ги исполниле критериумите за БСК, а 41,45% критериумите за (ВББ), дадени во Правилникот за 2008 година, додека само 10.7% од примероците одговараа на критериумите на европската легислатива (Angelovski et al., 2008).

Истражувањето кое беше спроведено во овој магистерски труд е ограничено на еден регион (Овчеполскиот) во период од јануари до јуни 2018 година и истото се работеше според Правилник за изменување на правилникот за посебните барања за безбедност и хигиена и постапката на вршење на

---

Зоран Арсевски

службените контроли на млекото и млечните производи (Службен весник на РМ, бр. 197 од 28.10.2016 година).

Табела 1 Регулација за присуство на соматски клетки и бактерии во сурово млеко

Table 1 Regulation of the presence of somatic cells and bacteria in raw milk

| Година      | Број на Микроорганизми | Број на соматски клетки |
|-------------|------------------------|-------------------------|
| 01.01. 2017 | 400.000                | 400.000                 |
| 01.01. 2018 | 200.000                | 400.000                 |
| 01.01. 2019 | 200.000                | 400.000                 |
| 01.01. 2020 | 100.000                | 400.000                 |

#### 5.1. Вкупен број на бактерии (ВББ)

Од вкупно 1320 анализи кои се земени двапати месечно во прва и втора половина од месецот (анализа 1 - 667 примерока и анализа 2 - 653 примерока) само 138 примерока ги задоволуваат националните стандарди, додека според ЕУ (*Council Directive 92/46 EEC*) стандарди за квалитет на млеко, присуството на бактерии не го задоволува стандардот. Претставено по месеци, како средна вредност на бактерии кои биле детектирани во суровото млекото, видно е дека просечната вредност во месец јануари е најмала со 326069,44 cfu/ml, додека во мај е најголема со 623395,6 cfu/ml.

Зоран Арсевски

Табела 2 Вкупен број на бактерии со средна вредност по месеци

Table 2 Number of bacteria average value per month

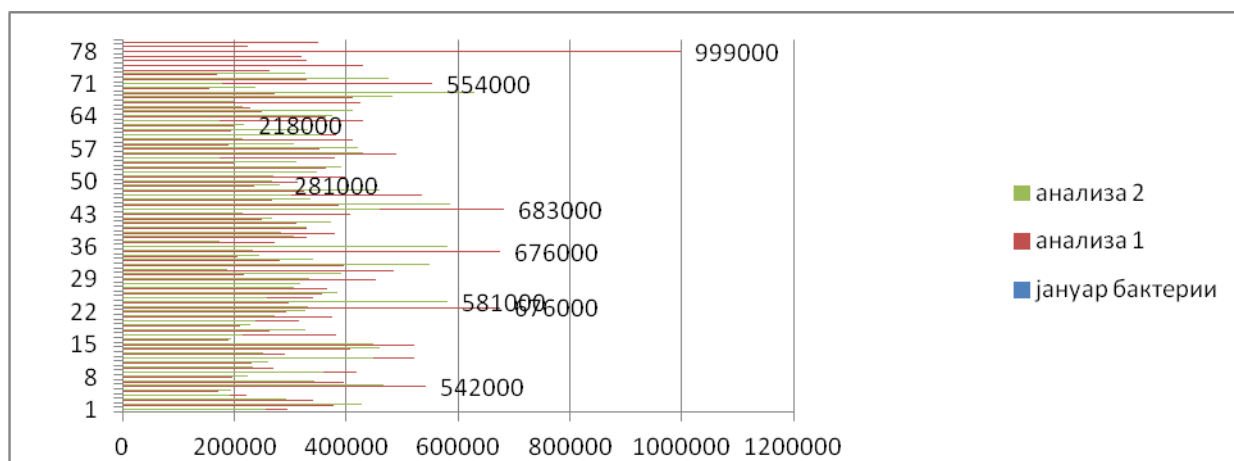
| Месец    | Анализа 1 | Анализа 2 | Средна вредност 1   | Средна вредност 2   |
|----------|-----------|-----------|---------------------|---------------------|
| Јануари  | 80        | 72        | 348860,75<br>cfu/ml | 326069,44<br>cfu/ml |
| Февруари | 87        | 81        | 392069,76<br>cfu/ml | 332160,49<br>cfu/ml |
| Март     | 102       | 102       | 464715,68<br>cfu/ml | 454764,70<br>cfu/ml |
| Април    | 124       | 124       | 581274,19<br>cfu/ml | 538637,09<br>cfu/ml |
| Мај      | 137       | 137       | 623395,6<br>cfu/ml  | 605548,18<br>cfu/ml |
| Јуни     | 137       | 137       | 538208,82           | 552102,9            |

Од извршените мерења во однос на вкупниот број на бактерии по месеци, добиени се следните резултати:

Зоран Арсевски

### ❖ Јануари

Најголема измерена вредност на ВББ изнесува 999000cfu/ml, а најмала измерена вредност на ВББ е 156 000cfu/ml (слика 14). Вкупно 18 примерока беа под пропишаните 200 000 cfu/ml според националната регулатива, додека ниеден примерок не ги исполни ЕУ-стандардите за квалитет на млекото.



Слика 14. Вкупен број на бактерии за месец јануари

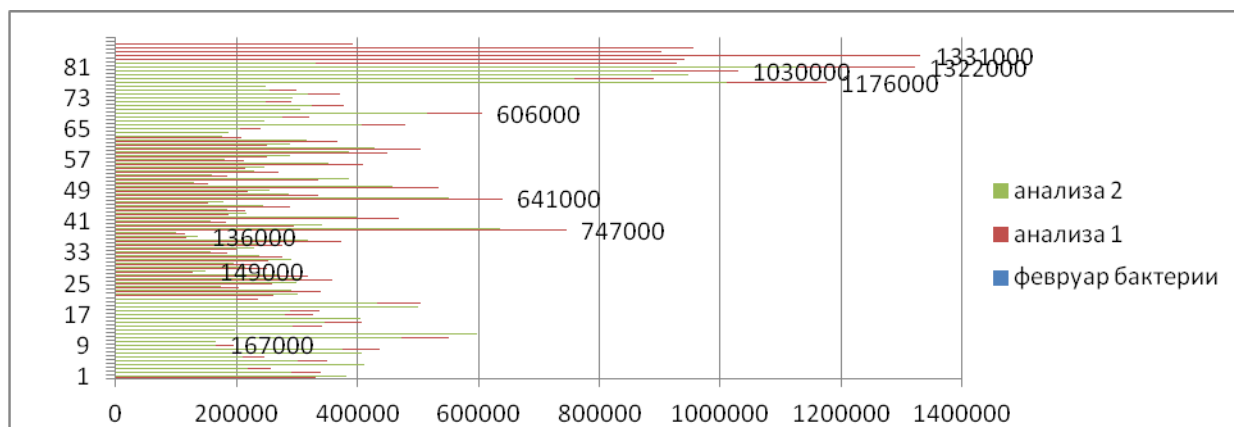
Figure 14. Total number of bacteria for January

### ❖ Февруари

Најголема измерена вредност на ВББ изнесува 1322000 cfu/ml, додека најмала измерена вредност на ВББ е 129 000 cfu/ml (слика 15). Триесет (30) примерока беа под пропишаните 200 000 cfu/ml, според националната регулатива, додека ниеден примерок не ги исполни ЕУ-стандардите за квалитет на млекото.



Зоран Арсевски

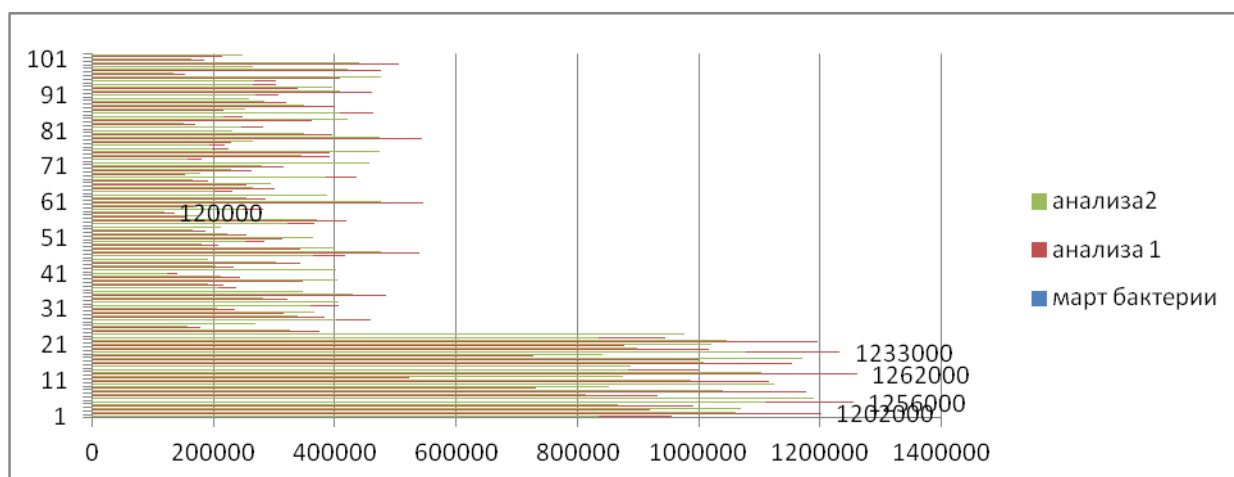


Слика 15. Вкупен број на бактерии за месец февруари

Figure 15. Total number of bacteria for Fevruar

#### ❖ Март

Најголема измерена вредност на ВББ изнесува 1262000 *cfu/ml*, додека најмала измерена вредност изнесува 120 000 *cfu/ml* (слика 16). Триесет и два (32) примерока беа под пропишаните 200 000 *cfu/ml*, според националната регулатива, додека ниеден примерок не ги исполни ЕУ-стандардите за квалитет на млекото.



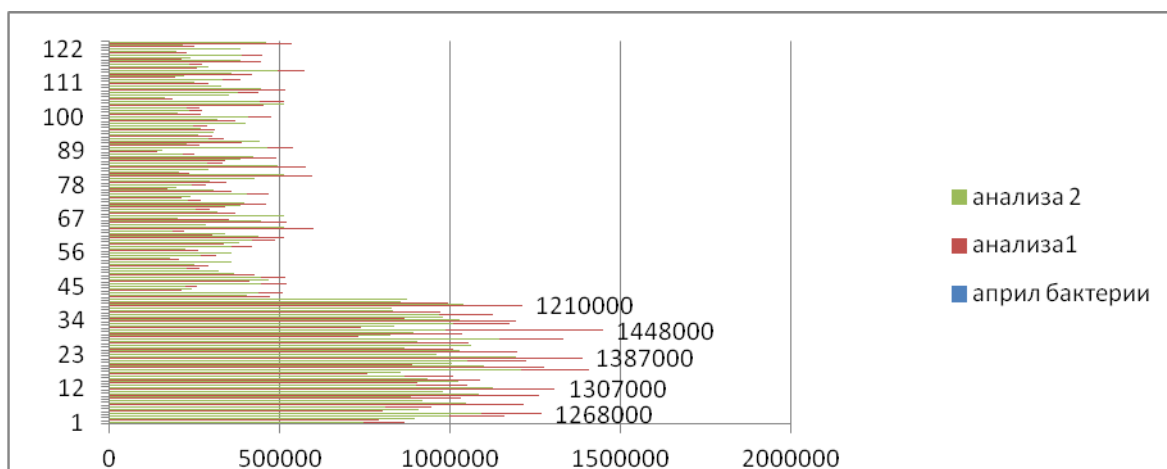
Слика 16. Вкупен број на бактерии за месец март

Figure 16. Total number of bacteria for March

Зоран Арсевски

#### ❖ Април

Најголема измерена вредност на ВББ изнесува 11448000 *cfu/ml*, додека најмала измерена вредност изнесува 139000 *cfu/ml* (слика 17). Десет (10) примерока беа под пропишаните 200 000 *cfu/ml* според националната регулатива, додека ниеден примерок не ги исполни ЕУ-стандардите за квалитет на млекото.



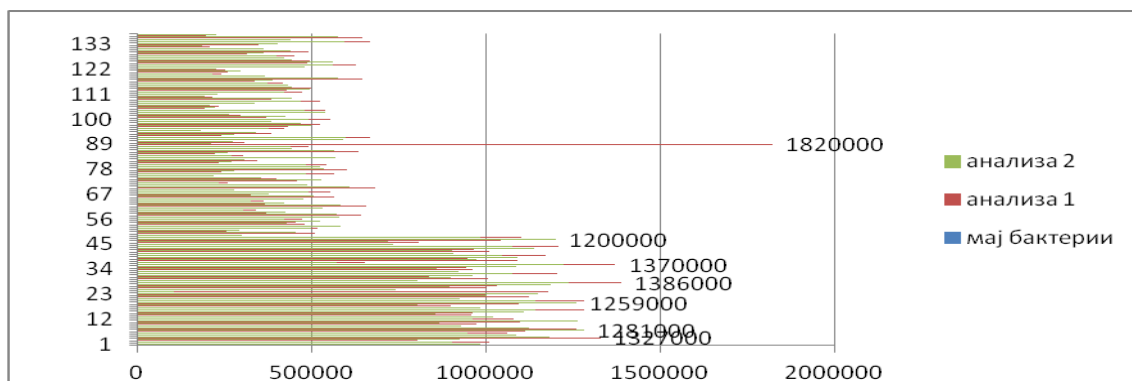
Слика 17. Вкупен број на бактерии за месец април

Figure 17. Total number of bacteria for April

#### ❖ Мај

Најголема измерена вредност на ВББ изнесува 1820000 *cfu/ml*, додека најмала измерена вредност изнесува 105000 *cfu/ml* (слика 18). Единаесет (11) примерока беа под пропишаните 200 000 *cfu/ml* според националната регулатива, додека ниеден примерок не ги исполни ЕУ-стандардите за квалитет на млекото.

Зоран Арсевски

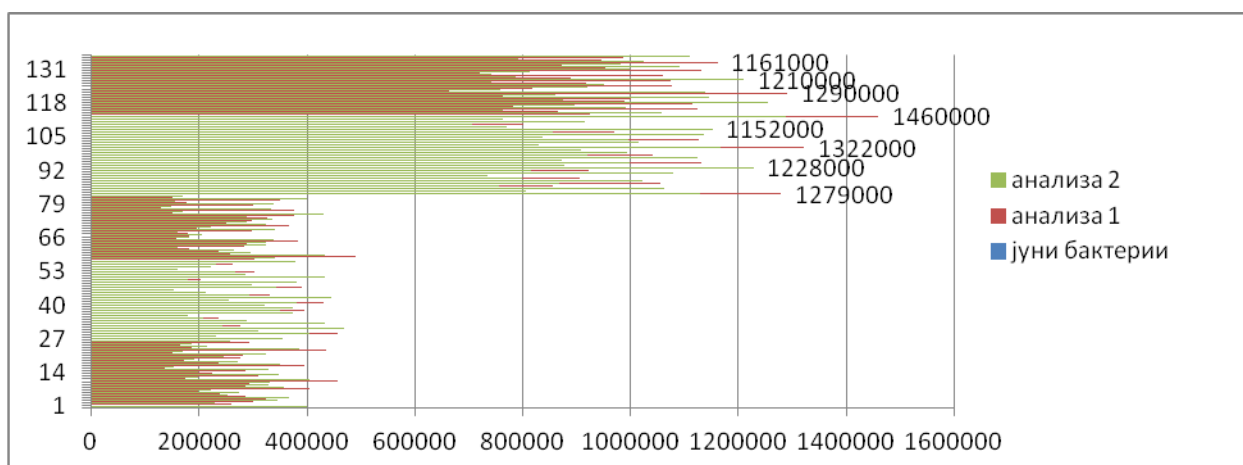


Слика 18. Вкупен број на бактерии за месец мај

Figure 18. Total number of bacteria for May

#### ❖ Јуни

Најголема измерена вредност на ВББ изнесува 1460000 *cfu/ml*, додека најмала измерена вредност изнесува 129000 *cfu/ml* (слика 19). Триесет и осум (38) примерока беа под пропишаните 200 000 *cfu/ml* според националната регулатива, додека ниеден примерок не ги исполни ЕУ-стандардите за квалитет на млекото.



Слика 19. Вкупен број на бактерии за месец јуни

Figure 19. Total number of bacteria for Jun

Зоран Арсевски

Резултатите од истражувањето на Ангеловски и неговите соработници, покажале дека 41,45 % од мострите ги исполниле критериумите за ВББ, дадени во Правилникот за 2008 година. Во 2009 година повторно е спроведена истата студија од страна на истите истражувачи за утврдување на квалитетот на млекото и присуството на бактерии на територијата на Република Македонија. Добиените резултати покажуваат тенденција на подобрување на квалитетот на млекото бидејќи 56,20% од примероците ги исполнуваат зададените критериуми (Angelovski et al., 2009). Студиите се работени според Правилникот и границата за дозволен број на бактерии е 600 000 *cfu/ml*.

Резултатите од нашето истражување на мострите селектирани од Овчеполскиот Регион покажаа дека само 10,45% ги задоволуваат критериумите според Правилникот за изменување на правилникот за посебни барања за безбедност и хигиена и начинот на постапката за вршење на службените контроли на млеко и млечни производи (Службен весник на РМ, бр. 197 од 28.10.2016 година), каде границата за дозволен број на бактерии е 400 000 *cfu/ml*, додека пак ниту еден од примероците не одговараат на критериумите на европската легистатива.

Зоран Арсевски

Табела 5 Добиени резултати според Правилник

Table 5 Results obtained according to the rulebook

| Година | БМО               | Број на примероци | Национална легистатива | ЕУ легистатива |
|--------|-------------------|-------------------|------------------------|----------------|
| 2008   | 0- 800 000 cfu/ml | 2065              | 41,45 %                | 10.7%          |
| 2018   | 0- 200 000 cfu/ml | 1320              | 10,45%                 | 0%             |

Загадувањето на млекото со бактерии може да дојде од различни извори како што се: воздухот, опремата што се користи за молзење и складирање на млеко, храна, почва, измет, постелка, здравјето на животните и слабо ладење (Karmen & Teger, 2008).

## 5.2. Број на соматски клетки (БСК)

Од извршените анализи кај 479 примероци кои се земени еднаш месечно, 462 примерока ги задоволуваат националните и ЕУ-стандардите за БСК, како параметар за квалитетно млеко.

Измерените средни вредности покажуваат дека најголема вредност на БСК е 277743,90 *scc/m* во месец јуни, а најниска измерена средна вредност е 233701,3 *scc/m* во месец март.

---

Зоран Арсевски

Табела 4 Соматски клетки средни вредности по месеци

Table. 4 Somatic cell average values by months

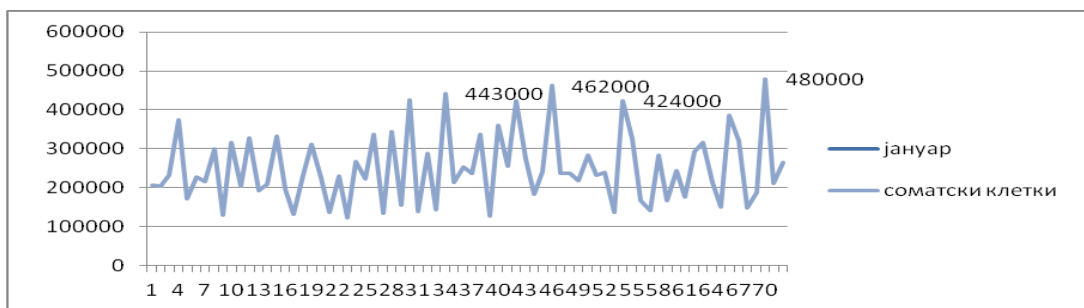
| месец    | Број на примероци | Средна вредност  |
|----------|-------------------|------------------|
| Јануари  | 72                | 249736,11 scc/ml |
| Февруари | 76                | 259723,7 scc/ml  |
| Март     | 77                | 233701,3 scc/ml  |
| Април    | 83                | 246797,59 scc/ml |
| Мај      | 89                | 266853,93 scc/ml |
| Јуни     | 82                | 277743,90 scc/ml |

Анализите по месеци го покажуваат следното:

Зоран Арсевски

#### ❖ Јануари

Од 72 примерока, само 6 примерока ја надминаа дозволената граница на соматски клетки од 400 000 *scc/ml*, а најголема вредност беше измерена од 480 000 *scc/ml*

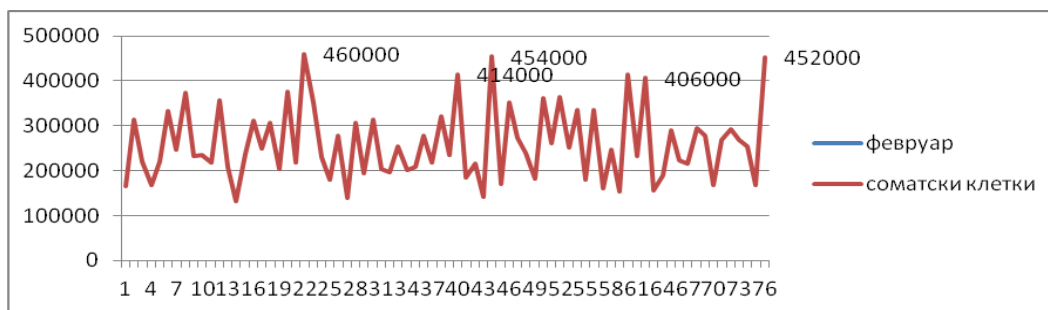


Слика 20. Број на соматски клетки за месец јануари

Figure 20. Number of somatic cells for January

#### ❖ Февруари

Од вкупно 76 примероци, само 6 примерока ја надминаа дозволената граница на соматски клетки од 400 000 *scc/ml*, а најголема вредност беше измерена од 460 000 *scc/ml*



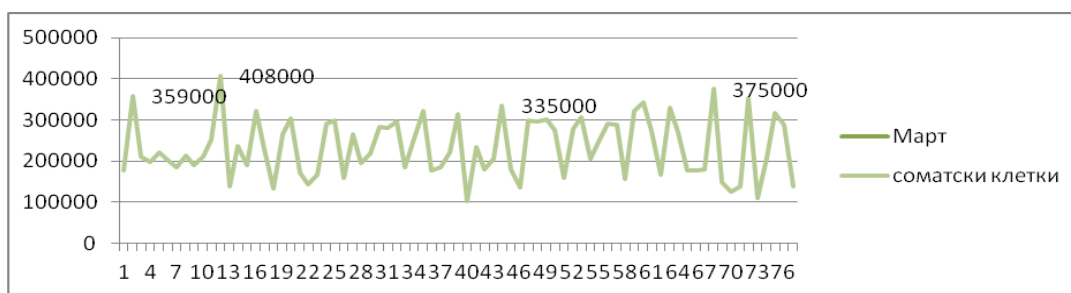
Слика 21. Број на соматски клетки за месец февруари

Figure 21. Number of somatic cells for February

Зоран Арсевски

#### ❖ Март

Од вкупно 77 примероци, само 1 примерок ја надмина дозволената граница на соматски клетки од 400 000 *scc/ml*, а најголема вредност беше измерена од 408 000 *scc/ml*.

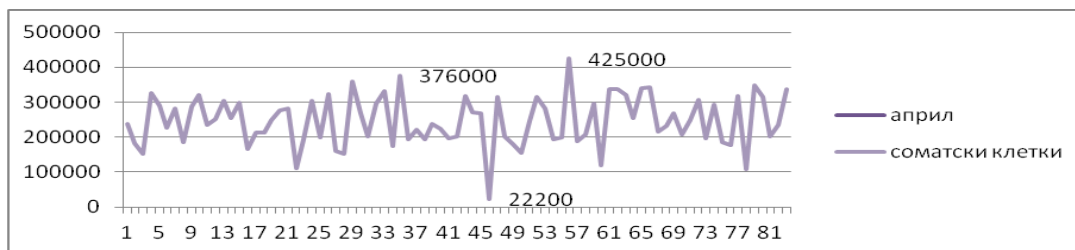


Слика 22. Број на соматски клетки за месец март

Figure 22. Number of somatic cells for March

#### ❖ Април

Од вкупно 83 примероци, само еден (1) примерок ја надмина дозволената граница на соматски клетки од 400 000 *scc/ml*, а најголема вредност беше измерена од 425 000 *scc/ml*.



Слика 23. Број на соматски клетки за месец април

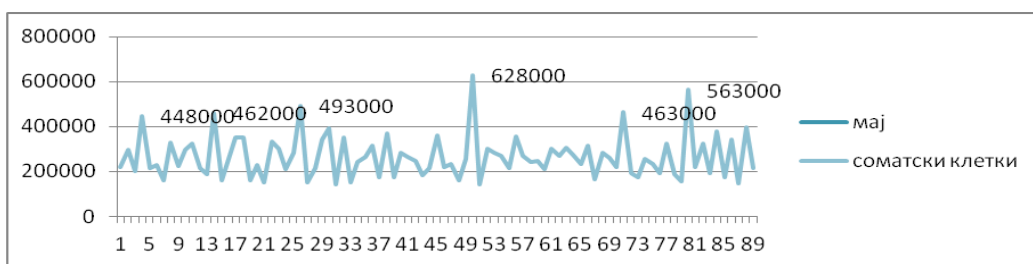
Figure 23. Number of somatic cells for April



Зоран Арсевски

#### ❖ Мај

Од вкупно 89 примероци, само 6 примерока ја надминаа дозволената граница на соматски клетки од 400 000 *scc/ml*, а најголема вредност беше измерена од 628 000 *scc/ml*.

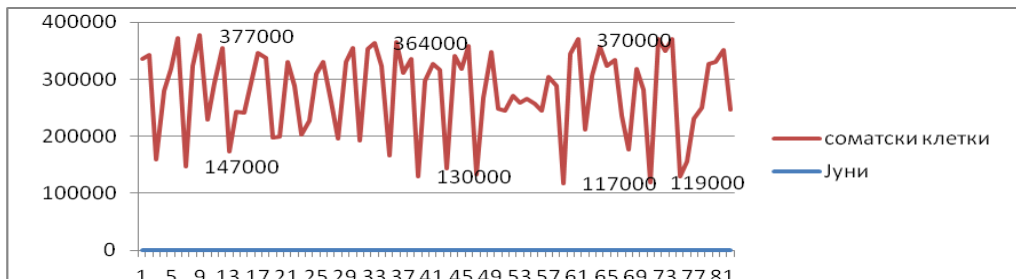


Слика 24. Број на соматски клетки за месец мај

Figure 24. Number of somatic cells for May

#### ❖ Јуни

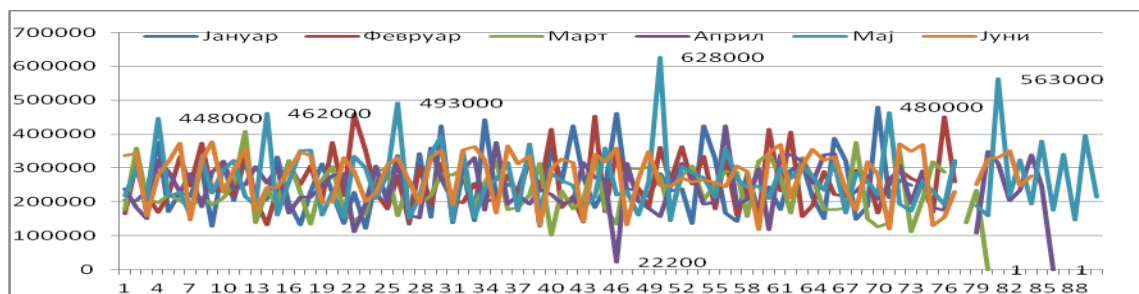
Од вкупно 82 примероци, ниту еден примерок не ја надмина дозволената граница на соматски клетки од 400 000 *scc/ml*, а најголема вредност беше измерена од 377 000 *scc/ml*.



Слика 25. Број на соматски клетки за месец јуни

Figure 25. Number of somatic cells for Jun

Зоран Арсевски



Слика 26. Број на соматски клетки од јануари до јуни

Figure 26. Number of somatic cells from January to June

Зоран Арсевски

Табела 6. Добиени резултати според Правилник

Table 6. Results obtained according to the rulebook

| Година | БСК        | Број на примероци  | Национална легислатива | ЕУ-легислатива |
|--------|------------|--------------------|------------------------|----------------|
| 2008   | 0-600 000  | 1625 <i>scc/ml</i> | 41,8 %                 | 42,7%          |
| 2018   | 0- 400 000 | 482 <i>scc/ml</i>  | 95,8%                  | 95,8%          |

Од изработената студија за БСК од страна на Ангеловски и неговите соработници на Факултетот за ветеринарна медицина и од добиените резултати во истата, од 1625 примероци, 41,8% ги исполниле критериумите за БСК според Правилникот за 2008 година, додека според барањата на Council Directive, 42,7% од примероци ги исполниле условите на Европската Унија (Angelovski et al., 2008). Според нашите истражувања и добиените резултати од 479 примерока собрани во Овчеполскиот Регион, 95,8% ги задоволија критериумите пропишани во Правилникот од 2016 год., каде максималниот број на соматски клетки може да биде 400.000 cfu/ml во суровото кравјо млеко, а исто така, задоволени се и ЕУ-стандардите за квалитет на млеко.

Идентификувањето на факторите на ризик, специфични за одредени области или специфични за одредена фарма, се пресудни во контролните програми за маститис кај кравите (Almaw, Molla & Melaku, 2012).

Од горенаведените резултати може да се констатира дека млекото во однос на БСК е со добар квалитет и станува збор за исклучиво здрави грла говеда со низок процент на заболени од маститис и добра контрола на млечната жлезда.

Зоран Арсевски

### 5.3. Афлатоксин M1

Анализите за афлатоксин M1 во Овчеполскиот Регион во истражувањето спроведено од Димитриевска-Стојковиќ и нејзините соработници, покажаа дека од вкупниот број на тестирани примероци (3635), кај 1539 (42.3%) беше детектиран афлатоксинот AFM<sub>1</sub> (Dimitrievska-Stojković et al., 2016). Од нив, 105 примерока (2.9%) содржеа микотоксин во концентрации над дозволената граница во периодот од февруари 2013 година, до јануари 2014 година. Во Овчеполскиот Регион за време на инцидентот со микотоксинот во 2013 година, бројот на тестирани примероци беше 60, селектирани од март 2013 година, до ноември 2014 година. Тие беа анализирани за AFM<sub>1</sub> со ELISA-методот. Кај два примерока беше констатирана концентрација од 0,05 ng/kg и кај истите е направена дополнителна анализа со HPLC флуоросцентен детектор, како конфирмирачки метод. Концентрациите на AFM<sub>1</sub> кај двата примерока (3,3%) го надминаа максимумот на дозволените нивоа, а највисоко детектираната концентрација беше 0,58 ng/kg, што е за 0,08 ng/kg над дозволената граница.

Зоран Арсевски

## 6. Заклучок

Квалитетот на суровото млекото од Овчеполскиот Регион беше цел на истражувањето во ова магистерска теза. Резултатите од истражувањето покажаа дека квалитетот на суровото млеко во однос на бројот на соматски клетки (БСК) и присуство на афлатоксинот е на задоволително ниво.

Главниот проблем за квалитетот на суровото млеко селектирано од Овчеполскиот Регион е зголемениот број на бактерии. Овој проблем може да се реши со едукација на фармерите за поголема хигиена при молзењето, транспорт и складирање на збирното млеко.

Вториот пристап кон решавање на овој проблем е стимулација на фармерите за инвестиција во автоматизирани линии за измолзување, наместо мануелно молзење, со што би се избегнало микробиолошко загадување на суровото млеко.

Зоран Арсеvски

## 7. ПРИЛОЗИ

Во прилозите табеларно се претставени сите резултати кои беа добиени како резултат на истражувањето во овој магистерски труд, а во делот резултати и дискусија се претставени табеларно.

### Вкупен број на Бактерии

| 1  | Резултат 1<br>Јануари | Резултат 2<br>Јануари | Резултат 1<br>февруари | Резултат 2<br>Февруари | Резултат 1<br>Март | Резултат 2<br>Март |
|----|-----------------------|-----------------------|------------------------|------------------------|--------------------|--------------------|
| 2  | 294000                | 255000                | 331000                 | 381000                 | 956000             | 835000             |
| 3  | 377000                | 427000                | 340000                 | 292000                 | 1202000            | 1062000            |
| 4  | 341000                | 293000                | 258000                 | 220000                 | 920000             | 1070000            |
| 5  | 221000                | 192000                | 358000                 | 412000                 | 991000             | 866000             |
| 6  | 171000                | 193000                | 351000                 | 302000                 | 1256000            | 1110000            |
| 7  | 542000                | 466000                | 247000                 | 210000                 | 1022000            | 1189000            |
| 8  | 395000                | 343000                | 354000                 | 408000                 | 932000             | 814000             |
| 9  | 197000                | 223000                | 436000                 | 375000                 | 1178000            | 1041000            |
| 10 | 418000                | 359000                | 196000                 | 167000                 | 732000             | 852000             |
| 11 | 269000                | 233000                | 145000                 | 167000                 | 947000             | 1124000            |
| 12 | 230000                | 260000                | 551000                 | 474000                 | 1117000            | 987000             |
| 13 | 522000                | 449000                | 415000                 | 597000                 | 522000             | 875000             |
| 14 | 291000                | 252000                | 172000                 | 198000                 | 1262000            | 1103000            |
| 15 | 407000                | 461000                | 342000                 | 294000                 | 1000000            | 884000             |
| 16 | 521000                | 448000                | 408000                 | 347000                 | 762000             | 887000             |
| 17 | 190000                | 195000                | 351000                 | 405000                 | 1155000            | 1009000            |

**Определување на квалитет и присуство на афлатоксин во млеко од**

**Овчеполскиот Регион**

**Зоран Арсевски**

|    |        |        |        |        |         |         |
|----|--------|--------|--------|--------|---------|---------|
| 18 | 382000 | 215000 | 326000 | 280000 | 999000  | 1172000 |
| 19 | 263000 | 328000 | 338000 | 288000 | 728000  | 842000  |
| 20 | 210000 | 228000 | 435000 | 501000 | 1233000 | 1077000 |
| 21 | 315000 | 238000 | 504000 | 433000 | 1017000 | 899000  |
| 22 | 376000 | 271000 | 236000 | 201000 | 877000  | 1020000 |
| 23 | 293000 | 326000 | 262000 | 302000 | 1197000 | 1046000 |
| 24 | 676000 | 332000 | 339000 | 291000 | 946000  | 836000  |
| 25 | 297000 | 581000 | 204000 | 174000 | 840000  | 977000  |
| 26 | 340000 | 258000 | 259000 | 299000 | 374000  | 327000  |
| 27 | 356000 | 385000 | 358000 | 308000 | 179000  | 158000  |
| 28 | 366000 | 306000 | 319000 | 272000 | 232000  | 270000  |
| 29 | 294000 | 317000 | 129000 | 149000 | 460000  | 402000  |
| 30 | 454000 | 333000 | 250000 | 215000 | 384000  | 339000  |
| 31 | 217000 | 390000 | 229000 | 195000 | 315000  | 367000  |
| 32 | 485000 | 188000 | 253000 | 291000 | 236000  | 206000  |
| 33 | 396000 | 549000 | 276000 | 237000 | 406000  | 359000  |
| 34 | 281000 | 340000 | 186000 | 158000 | 349000  | 406000  |
| 35 | 206000 | 244000 | 200000 | 230000 | 322000  | 281000  |
| 36 | 676000 | 233000 | 276000 | 237000 | 485000  | 429000  |
| 37 | 201000 | 581000 | 373000 | 318000 | 299000  | 348000  |
| 38 | 271000 | 174000 | 118000 | 136000 | 238000  | 208000  |
| 39 | 330000 | 307000 | 116000 | 100000 | 216000  | 191000  |
| 40 | 380000 | 284000 | 747000 | 636000 | 347000  | 404000  |
| 41 | 330000 | 330000 | 296000 | 341000 | 244000  | 213000  |
| 42 | 311000 | 373000 | 184000 | 158000 | 140000  | 124000  |
| 43 | 248000 | 267000 | 469000 | 399000 | 346000  | 403000  |

**Определување на квалитет и присуство на афлатоксин во млеко од**

**Овчеполскиот Регион**

**Зоран Арсевски**

|    |        |        |        |        |        |        |
|----|--------|--------|--------|--------|--------|--------|
| 44 | 407000 | 215000 | 188000 | 217000 | 233000 | 204000 |
| 45 | 683000 | 460000 | 215000 | 185000 | 343000 | 303000 |
| 46 | 387000 | 587000 | 288000 | 245000 | 164000 | 191000 |
| 47 | 267000 | 336000 | 154000 | 178000 | 417000 | 364000 |
| 48 | 536000 | 302000 | 641000 | 551000 | 539000 | 476000 |
| 49 | 324000 | 461000 | 336000 | 286000 | 344000 | 400000 |
| 50 | 236000 | 281000 | 220000 | 254000 | 207000 | 181000 |
| 51 | 314000 | 267000 | 534000 | 459000 | 285000 | 252000 |
| 52 | 400000 | 270000 | 154000 | 131000 | 314000 | 365000 |
| 53 | 346000 | 347000 | 335000 | 386000 | 255000 | 223000 |
| 54 | 363000 | 391000 | 185000 | 159000 | 187000 | 165000 |
| 55 | 199000 | 312000 | 269000 | 229000 | 182000 | 212000 |
| 56 | 379000 | 173000 | 214000 | 247000 | 367000 | 321000 |
| 57 | 490000 | 429000 | 410000 | 352000 | 419000 | 370000 |
| 58 | 353000 | 421000 | 213000 | 181000 | 152000 | 177000 |
| 59 | 190000 | 306000 | 250000 | 288000 | 137000 | 120000 |
| 60 | 412000 | 215000 | 450000 | 387000 | 281000 | 248000 |
| 61 | 383000 | 354000 | 504000 | 429000 | 168000 | 196000 |
| 62 | 193000 | 332000 | 250000 | 288000 | 546000 | 477000 |
| 63 | 201000 | 218000 | 368000 | 316000 | 287000 | 254000 |
| 64 | 431000 | 173000 | 208000 | 177000 | 333000 | 387000 |
| 65 | 364000 | 374000 | 163000 | 188000 | 231000 | 202000 |
| 66 | 249000 | 412000 | 240000 | 206000 | 300000 | 265000 |
| 67 | 228000 | 214000 | 479000 | 408000 | 254000 | 295000 |
| 68 | 426000 | 198000 | 214000 | 247000 | 190000 | 166000 |
| 69 | 412000 | 482000 | 321000 | 276000 | 436000 | 385000 |



Определување на квалитет и присуство на афлатоксин во млеко од

Овчеполскиот Регион

Зоран Арсевски

|    |        |        |         |         |        |        |
|----|--------|--------|---------|---------|--------|--------|
| 70 | 273000 | 630000 | 606000  | 516000  | 154000 | 179000 |
| 71 | 156000 | 237000 | 265000  | 305000  | 263000 | 230000 |
| 72 | 554000 | 177000 | 378000  | 325000  | 316000 | 279000 |
| 73 | 329000 | 476000 | 292000  | 249000  | 393000 | 457000 |
| 74 | 168000 |        | 254000  | 293000  | 181000 | 158000 |
| 75 | 263000 |        | 371000  | 319000  | 391000 | 346000 |
| 76 | 430000 |        | 299000  | 255000  | 391000 | 475000 |
| 77 | 330000 |        | 215000  | 248000  | 225000 | 197000 |
| 78 | 320000 |        | 1176000 | 1011000 | 218000 | 193000 |
| 79 | 999000 |        | 890000  | 758000  | 228000 | 265000 |
| 80 | 225000 |        | 822000  | 947000  | 544000 | 475000 |
| 81 |        |        | 1030000 | 885000  | 395000 | 349000 |
| 82 |        |        | 1322000 | 1126000 | 199000 | 232000 |
| 83 |        |        | 928000  |         | 282000 | 246000 |
| 84 |        |        | 941000  |         | 170000 | 150000 |
| 85 |        |        | 1331000 |         | 363000 | 422000 |
| 86 |        |        | 902000  |         | 248000 | 217000 |
| 87 |        |        | 956000  |         | 463000 | 409000 |
| 88 |        |        |         |         | 217000 | 252000 |
| 89 |        |        |         |         | 401000 | 350000 |
| 90 |        |        |         |         | 320000 | 283000 |
| 91 |        |        |         |         | 222000 | 258000 |
| 92 |        |        |         |         | 308000 | 269000 |
| 93 |        |        |         |         | 462000 | 408000 |

**Определување на квалитет и присуство на афлатоксин во млеко од**

**Овчеполскиот Регион**

**Зоран Арсевски**

|     |  |  |  |  |        |        |
|-----|--|--|--|--|--------|--------|
| 94  |  |  |  |  | 339000 | 395000 |
| 95  |  |  |  |  | 303000 | 265000 |
| 96  |  |  |  |  | 302000 | 267000 |
| 97  |  |  |  |  | 409000 | 476000 |
| 98  |  |  |  |  | 153000 | 134000 |
| 99  |  |  |  |  | 476000 | 421000 |
| 100 |  |  |  |  | 228000 | 265000 |
| 101 |  |  |  |  | 505000 | 441000 |
| 102 |  |  |  |  | 184000 | 163000 |
| 103 |  |  |  |  | 214000 | 249000 |

| 1  | Резултат 1<br>Април | Резултат 2<br>Април | Резултат 1<br>Мај | Резултат 2<br>Мај | Резултат 1<br>Јуни | Резултат 2<br>Јуни |
|----|---------------------|---------------------|-------------------|-------------------|--------------------|--------------------|
| 2  | 866000              | 744000              | 853000            | 983000            | 355000             | 399000             |
| 3  | 791000              | 895000              | 1010000           | 901000            | 259000             | 229000             |
| 4  | 1160000             | 997000              | 802000            | 924000            | 301000             | 345000             |
| 5  | 1268000             | 1090000             | 1327000           | 1183000           | 325000             | 366000             |
| 6  | 802000              | 907000              | 942000            | 1086000           | 285000             | 252000             |
| 7  | 944000              | 811000              | 1060000           | 945000            | 239000             | 274000             |
| 8  | 1216000             | 1045000             | 1112000           | 1281000           | 197000             | 222000             |
| 9  | 812000              | 919000              | 1258000           | 1122000           | 405000             | 358000             |
| 10 | 1031000             | 886000              | 806000            | 929000            | 287000             | 329000             |
| 11 | 1259000             | 1082000             | 972000            | 867000            | 293000             | 330000             |
| 12 | 864000              | 978000              | 1096000           | 1263000           | 458000             | 404000             |

Определување на квалитет и присуство на афлатоксин во млеко од

Овчеполскиот Регион

Зоран Арсевски

|    |         |         |         |         |        |        |
|----|---------|---------|---------|---------|--------|--------|
| 13 | 1307000 | 1123000 | 1077000 | 960000  | 174000 | 199000 |
| 14 | 1048000 | 901000  | 884000  | 1019000 | 309000 | 348000 |
| 15 | 905000  | 1024000 | 959000  | 855000  | 225000 | 199000 |
| 16 | 1088000 | 935000  | 961000  | 1108000 | 286000 | 328000 |
| 17 | 1009000 | 867000  | 1280000 | 1141000 | 136000 | 153000 |
| 18 | 757000  | 856000  | 853000  | 983000  | 396000 | 350000 |
| 19 | 1407000 | 1209000 | 898000  | 801000  | 237000 | 271000 |
| 20 | 1276000 | 1097000 | 1093000 | 1259000 | 171000 | 192000 |
| 21 | 888000  | 1005000 | 1280000 | 1141000 | 277000 | 245000 |
| 22 | 1221000 | 1049000 | 803000  | 925000  | 282000 | 323000 |
| 23 | 1387000 | 1192000 | 1124000 | 1002000 | 150000 | 169000 |
| 24 | 848000  | 959000  | 996000  | 1148000 | 436000 | 385000 |
| 25 | 1197000 | 1029000 | 1177000 | 105000  | 187000 | 214000 |
| 26 | 1008000 | 866000  | 644000  | 742000  | 166000 | 187000 |
| 27 | 938000  | 1061000 | 1001000 | 893000  | 292000 | 258000 |
| 28 | 1052000 | 904000  | 1029000 | 1186000 | 311000 | 356000 |
| 29 | 1331000 | 1144000 | 1386000 | 1236000 | 206000 | 232000 |
| 30 | 730000  | 826000  | 698000  | 804000  | 458000 | 404000 |
| 31 | 1036000 | 890000  | 1006000 | 897000  | 271000 | 310000 |
| 32 | 1448000 | 987000  | 834000  | 961000  | 418000 | 470000 |
| 33 | 737000  | 834000  | 1204000 | 1074000 | 276000 | 244000 |
| 34 | 1172000 | 1007000 | 799000  | 921000  | 378000 | 433000 |
| 35 | 1194000 | 1026000 | 962000  | 858000  | 256000 | 288000 |
| 36 | 865000  | 979000  | 942000  | 1085000 | 236000 | 208000 |
| 37 | 1126000 | 968000  | 1370000 | 1222000 | 157000 | 180000 |
| 38 | 969000  | 833000  | 652000  | 57100   | 331000 | 373000 |

Определување на квалитет и присуство на афлатоксин во млеко од

Овчеполскиот Регион

Зоран Арсевски

|    |         |         |         |         |        |        |
|----|---------|---------|---------|---------|--------|--------|
| 39 | 732000  | 828000  | 1091000 | 973000  | 395000 | 349000 |
| 40 | 1210000 | 1040000 | 947000  | 1091000 | 327000 | 375000 |
| 41 | 995000  | 855000  | 1171000 | 1044000 | 285000 | 321000 |
| 42 | 771000  | 872000  | 785000  | 905000  | 430000 | 380000 |
| 43 | 470000  | 404000  | 1010000 | 901000  | 222000 | 254000 |
| 44 | 508000  | 437000  | 966000  | 1136000 | 396000 | 446000 |
| 45 | 213000  | 241000  | 1206000 | 1075000 | 331000 | 292000 |
| 46 | 258000  | 222000  | 637000  | 734000  | 186000 | 213000 |
| 47 | 519000  | 446000  | 806000  | 719000  | 136000 | 153000 |
| 48 | 412000  | 466000  | 1041000 | 1200000 | 390000 | 344000 |
| 49 | 515000  | 443000  | 1102000 | 983000  | 260000 | 298000 |
| 50 | 424000  | 364000  | 260000  | 300000  | 339000 | 382000 |
| 51 | 283000  | 320000  | 508000  | 453000  | 202000 | 178000 |
| 52 | 265000  | 228000  | 254000  | 293000  | 378000 | 433000 |
| 53 | 290000  | 249000  | 515000  | 499000  | 254000 | 286000 |
| 54 | 316000  | 358000  | 504000  | 581000  | 302000 | 267000 |
| 55 | 205000  | 176000  | 478000  | 426000  | 139000 | 159000 |
| 56 | 313000  | 269000  | 453000  | 522000  | 197000 | 222000 |
| 57 | 316000  | 358000  | 471000  | 420000  | 263000 | 232000 |
| 58 | 261000  | 224000  | 501000  | 577000  | 331000 | 379000 |
| 59 | 419000  | 360000  | 641000  | 572000  | 302000 | 340000 |
| 60 | 337000  | 381000  | 369000  | 425000  | 490000 | 433000 |
| 61 | 485000  | 417000  | 338000  | 301000  | 258000 | 296000 |
| 62 | 511000  | 439000  | 461000  | 531000  | 235000 | 265000 |
| 63 | 300000  | 340000  | 654000  | 583000  | 181000 | 160000 |
| 64 | 218000  | 187000  | 36400   | 420000  | 283000 | 324000 |

**Определување на квалитет и присуство на афлатоксин во млеко од**

**Овчеполскиот Регион**

**Зоран Арсевски**

|    |        |        |         |        |         |         |
|----|--------|--------|---------|--------|---------|---------|
| 65 | 598000 | 514000 | 362000  | 323000 | 288000  | 324000  |
| 66 | 250000 | 283000 | 413000  | 476000 | 383000  | 338000  |
| 67 | 518000 | 445000 | 565000  | 504000 | 158000  | 181000  |
| 68 | 351000 | 202000 | 325000  | 375000 | 182000  | 205000  |
| 69 | 453000 | 513000 | 552000  | 492000 | 180000  | 159000  |
| 70 | 368000 | 316000 | 240000  | 277000 | 298000  | 341000  |
| 71 | 296000 | 254000 | 681000  | 607000 | 196000  | 221000  |
| 72 | 340000 | 385000 | 421000  | 485000 | 367000  | 324000  |
| 73 | 461000 | 396000 | 260000  | 232000 | 251000  | 288000  |
| 74 | 268000 | 230000 | 457000  | 527000 | 299000  | 337000  |
| 75 | 211000 | 239000 | 398000  | 355000 | 327000  | 289000  |
| 76 | 468000 | 402000 | 189000  | 218000 | 377000  | 432000  |
| 77 | 357000 | 307000 | 563000  | 484000 | 150000  | 169000  |
| 78 | 172000 | 195000 | 240000  | 276000 | 377000  | 333000  |
| 79 | 283000 | 243000 | 601000  | 536000 | 129000  | 148000  |
| 80 | 343000 | 295000 | 454000  | 523000 | 301000  | 339000  |
| 81 | 375000 | 424000 | 541000  | 482000 | 176000  | 155000  |
| 82 | 596000 | 512000 | 233000  | 269000 | 350000  | 401000  |
| 83 | 236000 | 203000 | 344000  | 307000 | 150000  | 169000  |
| 84 | 257000 | 291000 | 493000  | 568000 | 1279000 | 1129000 |
| 85 | 575000 | 494000 | 303000  | 270000 | 704000  | 806000  |
| 86 | 332000 | 285000 | 223000  | 257000 | 945000  | 1063000 |
| 87 | 341000 | 386000 | 634000  | 565000 | 855000  | 755000  |
| 88 | 491000 | 422000 | 383000  | 441000 | 1055000 | 867000  |
| 89 | 249000 | 214000 | 491000  | 438000 | 907000  | 1021000 |
| 90 | 139000 | 157000 | 1820000 | 210000 | 905000  | 799000  |

**Определување на квалитет и присуство на афлатоксин во млеко од**

**Овчеполскиот Регион**

**Зоран Арсевски**

|     |        |        |        |        |         |         |
|-----|--------|--------|--------|--------|---------|---------|
| 91  | 540000 | 464000 | 307000 | 274000 | 641000  | 734000  |
| 92  | 265000 | 228000 | 510000 | 588000 | 958000  | 1078000 |
| 93  | 389000 | 440000 | 667000 | 595000 | 923000  | 815000  |
| 94  | 336000 | 289000 | 241000 | 278000 | 1072000 | 1228000 |
| 95  | 303000 | 260000 | 382000 | 341000 | 780000  | 878000  |
| 96  | 270000 | 306000 | 158000 | 182000 | 1131000 | 999000  |
| 97  | 311000 | 267000 | 422000 | 376000 | 762000  | 873000  |
| 98  | 285000 | 245000 | 432000 | 498000 | 1000000 | 1125000 |
| 99  | 354000 | 401000 | 525000 | 468000 | 1041000 | 919000  |
| 100 | 370000 | 318000 | 332000 | 383000 | 868000  | 994000  |
| 101 | 474000 | 407000 | 552000 | 492000 | 806000  | 907000  |
| 102 | 267000 | 202000 | 369000 | 425000 | 1322000 | 1167000 |
| 103 | 271000 | 233000 | 294000 | 262000 | 72400   | 829000  |
| 104 | 264000 | 227000 | 467000 | 538000 | 901000  | 1014000 |
| 105 | 452000 | 512000 | 537000 | 479000 | 1127000 | 995000  |
| 106 | 513000 | 441000 | 191000 | 220000 | 731000  | 837000  |
| 107 | 187000 | 161000 | 233000 | 208000 | 1009000 | 1136000 |
| 108 | 308000 | 349000 | 291000 | 335000 | 971000  | 857000  |
| 109 | 437000 | 376000 | 524000 | 467000 | 1006000 | 1152000 |
| 110 | 515000 | 443000 | 383000 | 441000 | 685000  | 771000  |
| 111 | 289000 | 327000 | 215000 | 192000 | 801000  | 707000  |
| 112 | 291000 | 250000 | 198000 | 228000 | 799000  | 915000  |
| 113 | 386000 | 332000 | 473000 | 422000 | 678000  | 763000  |
| 114 | 193000 | 218000 | 428000 | 493000 | 1460000 | 1289000 |
| 115 | 419000 | 360000 | 497800 | 443000 | 924000  | 1058000 |
| 116 | 572000 | 492000 | 374000 | 431000 | 866000  | 764000  |

Определување на квалитет и присуство на афлатоксин во млеко од

Овчеполскиот Регион

Зоран Арсевски

|     |        |        |        |        |         |         |
|-----|--------|--------|--------|--------|---------|---------|
| 117 | 255000 | 289000 | 416000 | 371000 | 1123000 | 992000  |
| 118 | 272000 | 234000 | 336000 | 387000 | 782000  | 896000  |
| 119 | 446000 | 383000 | 646000 | 576000 | 1114000 | 1254000 |
| 120 | 211000 | 239000 | 318000 | 366000 | 990000  | 874000  |
| 121 | 450000 | 387000 | 239000 | 213000 | 1000000 | 1145000 |
| 122 | 227000 | 195000 | 258000 | 297000 | 764000  | 860000  |
| 123 | 341000 | 386000 | 251000 | 224000 | 1290000 | 1139000 |
| 124 | 250000 | 215000 | 417000 | 480000 | 663000  | 759000  |
| 125 | 534000 | 459000 | 627000 | 559000 | 817000  | 920000  |
| 126 |        |        | 485000 | 559000 | 1077000 | 951000  |
| 127 |        |        | 495000 | 441000 | 917000  | 743000  |
| 128 |        |        | 366000 | 422000 | 1075000 | 1210000 |
| 129 |        |        | 449000 | 400000 | 890000  | 786000  |
| 130 |        |        | 312000 | 360000 | 1060000 | 741000  |
| 131 |        |        | 491000 | 438000 | 721000  | 812000  |
| 132 |        |        | 315000 | 363000 | 1131000 | 999000  |
| 133 |        |        | 206000 | 184000 | 954000  | 1092000 |
| 134 |        |        | 348000 | 401000 | 873000  | 982000  |
| 135 |        |        | 666000 | 594000 | 1161000 | 1025000 |
| 136 |        |        | 380000 | 438000 | 947000  | 791000  |
| 137 |        |        | 644000 | 574000 | 986000  | 1110000 |
| 138 |        |        | 196000 | 226000 |         |         |

Определување на квалитет и присуство на афлатоксин во млеко од

Овчеполскиот Регион

Зоран Арсевски

Соматски Клетки

| Реден број | Број на соматски клетки | Јануари | Февруари | Март   | Април  | Мај    | Јуни   |
|------------|-------------------------|---------|----------|--------|--------|--------|--------|
| 1          | scc/ml                  | 206000  | 165000   | 177000 | 238000 | 218000 | 336000 |
| 2          | scc/ml                  | 204000  | 313000   | 359000 | 183000 | 299000 | 343000 |
| 3          | scc/ml                  | 233000  | 221000   | 210000 | 151000 | 201000 | 159000 |
| 4          | scc/ml                  | 375000  | 169000   | 198000 | 325000 | 448000 | 280000 |
| 5          | scc/ml                  | 172000  | 220000   | 221000 | 290000 | 217000 | 319000 |
| 6          | scc/ml                  | 228000  | 333000   | 203000 | 228000 | 228000 | 373000 |
| 7          | scc/ml                  | 215000  | 246000   | 186000 | 283000 | 161000 | 147000 |
| 8          | scc/ml                  | 299000  | 374000   | 214000 | 186000 | 330000 | 323000 |
| 9          | scc/ml                  | 129000  | 233000   | 191000 | 288000 | 226000 | 377000 |
| 10         | scc/ml                  | 315000  | 236000   | 211000 | 321000 | 296000 | 229000 |
| 11         | scc/ml                  | 204000  | 219000   | 252000 | 236000 | 323000 | 294000 |
| 12         | scc/ml                  | 328000  | 356000   | 408000 | 251000 | 215000 | 355000 |
| 13         | scc/ml                  | 193000  | 208000   | 139000 | 303000 | 190000 | 174000 |
| 14         | scc/ml                  | 208000  | 133000   | 237000 | 254000 | 462000 | 243000 |
| 15         | scc/ml                  | 333000  | 237000   | 191000 | 300000 | 161000 | 242000 |
| 16         | scc/ml                  | 197000  | 312000   | 322000 | 167000 | 258000 | 293000 |
| 17         | scc/ml                  | 132000  | 250000   | 229000 | 214000 | 351000 | 346000 |
| 18         | scc/ml                  | 231000  | 307000   | 134000 | 213000 | 353000 | 337000 |
| 19         | scc/ml                  | 312000  | 203000   | 266000 | 248000 | 160000 | 198000 |
| 20         | scc/ml                  | 226000  | 376000   | 304000 | 277000 | 228000 | 199000 |
| 21         | scc/ml                  | 137000  | 218000   | 172000 | 283000 | 153000 | 331000 |
| 22         | scc/ml                  | 229000  | 460000   | 144000 | 112000 | 335000 | 289000 |



Определување на квалитет и присуство на афлатоксин во млеко од

Овчеполскиот Регион

Зоран Арсевски

|    |        |        |        |        |        |        |        |
|----|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|
| 23 | scc/ml | 122000 | 351000 | 166000 | 194000 | 300000 | 202000 |
| 24 | scc/ml | 268000 | 229000 | 291000 | 305000 | 209000 | 227000 |
| 25 | scc/ml | 222000 | 180000 | 298000 | 198000 | 281000 | 309000 |
| 26 | scc/ml | 337000 | 277000 | 158000 | 323000 | 493000 | 331000 |
| 27 | scc/ml | 134000 | 140000 | 264000 | 161000 | 152000 | 261000 |
| 28 | scc/ml | 343000 | 306000 | 196000 | 152000 | 214000 | 195000 |
| 29 | scc/ml | 155000 | 194000 | 219000 | 360000 | 343000 | 331000 |
| 30 | scc/ml | 425000 | 314000 | 283000 | 269000 | 393000 | 354000 |
| 31 | scc/ml | 139000 | 203000 | 280000 | 203000 | 144000 | 192000 |
| 32 | scc/ml | 289000 | 197000 | 297000 | 295000 | 352000 | 353000 |
| 33 | scc/ml | 144000 | 255000 | 185000 | 331000 | 152000 | 364000 |
| 34 | scc/ml | 443000 | 201000 | 255000 | 175000 | 240000 | 324000 |
| 35 | scc/ml | 214000 | 208000 | 321000 | 376000 | 266000 | 166000 |
| 36 | scc/ml | 252000 | 279000 | 177000 | 194000 | 316000 | 365000 |
| 37 | scc/ml | 236000 | 218000 | 184000 | 220000 | 173000 | 312000 |
| 38 | scc/ml | 337000 | 322000 | 220000 | 194000 | 371000 | 336000 |
| 39 | scc/ml | 128000 | 234000 | 314000 | 237000 | 174000 | 130000 |
| 40 | scc/ml | 361000 | 414000 | 101000 | 223000 | 284000 | 297000 |
| 41 | scc/ml | 256000 | 184000 | 233000 | 196000 | 264000 | 327000 |
| 42 | scc/ml | 424000 | 216000 | 179000 | 201000 | 248000 | 317000 |
| 43 | scc/ml | 274000 | 141000 | 205000 | 317000 | 182000 | 143000 |
| 44 | scc/ml | 184000 | 454000 | 335000 | 272000 | 215000 | 340000 |
| 45 | scc/ml | 242000 | 170000 | 181000 | 268000 | 360000 | 318000 |
| 46 | scc/ml | 462000 | 351000 | 135000 | 22200  | 220000 | 359000 |
| 47 | scc/ml | 236000 | 274000 | 300000 | 314000 | 233000 | 133000 |
| 48 | scc/ml | 237000 | 240000 | 297000 | 202000 | 161000 | 267000 |

Определување на квалитет и присуство на афлатоксин во млеко од

Овчеполскиот Регион

Зоран Арсевски

|    |        |        |        |        |        |        |        |
|----|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|
| 49 | scc/ml | 217000 | 182000 | 301000 | 181000 | 257000 | 348000 |
| 50 | scc/ml | 283000 | 361000 | 275000 | 156000 | 628000 | 249000 |
| 51 | scc/ml | 232000 | 260000 | 159000 | 246000 | 144000 | 245000 |
| 52 | scc/ml | 239000 | 364000 | 278000 | 315000 | 303000 | 271000 |
| 53 | scc/ml | 136000 | 252000 | 306000 | 281000 | 285000 | 258000 |
| 54 | scc/ml | 424000 | 335000 | 206000 | 194000 | 271000 | 266000 |
| 55 | scc/ml | 326000 | 179000 | 251000 | 198000 | 213000 | 257000 |
| 56 | scc/ml | 167000 | 336000 | 290000 | 425000 | 358000 | 245000 |
| 57 | scc/ml | 142000 | 160000 | 288000 | 189000 | 269000 | 305000 |
| 58 | scc/ml | 283000 | 247000 | 156000 | 208000 | 243000 | 289000 |
| 59 | scc/ml | 168000 | 153000 | 321000 | 297000 | 247000 | 117000 |
| 60 | scc/ml | 244000 | 415000 | 343000 | 118000 | 210000 | 344000 |
| 61 | scc/ml | 177000 | 232000 | 273000 | 338000 | 300000 | 370000 |
| 62 | scc/ml | 293000 | 406000 | 167000 | 338000 | 270000 | 212000 |
| 63 | scc/ml | 317000 | 156000 | 331000 | 321000 | 306000 | 306000 |
| 64 | scc/ml | 213000 | 189000 | 271000 | 254000 | 275000 | 356000 |
| 65 | scc/ml | 150000 | 289000 | 177000 | 339000 | 235000 | 323000 |
| 66 | scc/ml | 387000 | 222000 | 177000 | 343000 | 316000 | 333000 |
| 67 | scc/ml | 320000 | 215000 | 181000 | 215000 | 166000 | 236000 |
| 68 | scc/ml | 148000 | 294000 | 375000 | 231000 | 285000 | 176000 |
| 69 | scc/ml | 188000 | 278000 | 150000 | 269000 | 261000 | 318000 |
| 70 | scc/ml | 480000 | 167000 | 125000 | 208000 | 221000 | 282000 |
| 71 | scc/ml | 212000 | 268000 | 138000 | 250000 | 463000 | 119000 |
| 72 | scc/ml | 265000 | 293000 | 352000 | 308000 | 193000 | 371000 |
| 73 | scc/ml |        | 269000 | 111000 | 195000 | 174000 | 350000 |
| 74 | scc/ml |        | 255000 | 207000 | 292000 | 258000 | 370000 |

Определување на квалитет и присуство на афлатоксин во млеко од

Овчеполскиот Регион

Зоран Арсевски

|    |        |  |        |        |        |        |        |
|----|--------|--|--------|--------|--------|--------|--------|
| 75 | scc/ml |  | 169000 | 318000 | 184000 | 232000 | 130000 |
| 76 | scc/ml |  | 452000 | 288000 | 176000 | 192000 | 155000 |
| 77 | scc/ml |  |        | 138000 | 318000 | 323000 | 230000 |
| 78 | scc/ml |  |        |        | 107000 | 189000 | 250000 |
| 79 | scc/ml |  |        |        | 348000 | 158000 | 326000 |
| 80 | scc/ml |  |        |        | 314000 | 563000 | 330000 |
| 81 | scc/ml |  |        |        | 203000 | 219000 | 351000 |
| 82 | scc/ml |  |        |        | 234000 | 324000 | 247000 |
| 83 | scc/ml |  |        |        | 338000 | 194000 |        |
| 84 | scc/ml |  |        |        |        | 380000 |        |
| 85 | scc/ml |  |        |        |        | 176000 |        |
| 86 | scc/ml |  |        |        |        | 341000 |        |
| 87 | scc/ml |  |        |        |        | 146000 |        |
| 88 | scc/ml |  |        |        |        | 396000 |        |
| 89 | scc/ml |  |        |        |        | 213000 |        |

Зоран Арсевски

## 8. Користена литература

- 1.Almaw, G., Molla, W. & Melaku, A. 2012 Incidence rate of clinical bovine mastitis in selected smallholder dairy farms in Gondar Town in Ethiopia. Ethiopian Veterinary Journal, 16(1): 93–99.
- 2.Ангеловски, Љ.,Јанкуловски, Д., Костова, С., Раткова, М., Ераковиќ Токалиќ, И., Секуловски, П. (2008) Квалитетот на суровото кравјо млеко во Република Македонија согледан преку испитување на бројот на соматските клетки и бројот на микроорганизми.Македонски ветеринарен преглед Вол.31,Но.
- 3.Ангеловски, Љ.,Секуловски, П.,Јанкуловски, Д.,Раткова, М.,Костова, С.,Проданов,М. (2009) Фактори за појава на висок број на бактерии во суровото кравјо млеко Македонски ветеринарен преглед Вол 32, Бр.1; 37 - 43, 2009
- 4.AOAC Official Method 971.24, First Action 1971 and Final Action 1988 (AOAC Official Method 971.24, 2000)
- 5.AOAC Official Method 2000.08 (2005). Aflatoxin M1 in liquid milk, immunoaffinity column by liquid chromatography. Natural Toxins-chapter 49 (pp. 45-47). Official Methods of Analysis of AOAC International, 18th edition, AOAC International. Gaithersburg, Maryland 20877-2417, USA
- 6.Applebaum, R. S.; Brackett, R. E.; Wiseman, D. W.; & Marth, E. H. (1982). Aflatoxins: toxicity to dairy cattle and occurrence in milk and milk products. Journal of Food Protection, No. 45, pp. (752-777)
- 7.Auldish, M. 2011. Milk quality and udder health effects on processing characteristics. pp. 902–907, in: Encyclopedia of Dairy Sciences (2nd edition).
- Aycicek, H., Aksoy, A. & Saygi, S. (2005). Determination of aflatoxin levels in some dairy and food products which consumed in Ankara, Turkey. Food Control, Vol.16, No.3, pp. 263-266

Зоран Арсевски

- 8.Bansal, B.K., Hamann, J., Grabowski, T.N. & Singh, K.B. 2005. Variation in the composition of selected milk fraction samples from healthy and mastitic quarters, and its significance for mastitis diagnosis. *Journal of Dairy Research*, 72(2): 144–152.
- 9.Batavani, R.A., Asri, S. & Naebzadeh, H. 2007. The effect of sub-clinical mastitis on milk composition in dairy cows. *Iranian Journal of Veterinary Research*, 8(3): 205–211.
- 11.Battaccone, G.; Nudda, A.; Cannas, A.; Cappio Borlino, A.; Bomboi, G.; & Pulina, G. (2003). Excretion of aflatoxin M1 in milk of dairy ewes treated with different doses of aflatoxin B1. *Journal of Dairy Science*, No. 86, pp. (2667-2675)
- 12.Battilani, P. (2004). Ferite alle cariossidi e umidita` favoriscono i funghi aflatossigeni. *L'Informatore Agrario*, 14- 47.
- 13.Blount, W.P.(1961). Turkey "X" disease. *Turkeys*, Vol. 9, No. 2, pp. (52, 55-58, 61,77)
- 14.Bramley, A.J. and C.H. McKinnon. 1990. Themicrobiology of raw milk. pp. 163-208 In *DairyMicrobiology*, Vol. 1. Robinson, R.K. (ed.)Elsevier Science Publishers, London
- Burvenich, C., A.J. Guidry, M.J. Paape. 1995.Natural defense mechanisms of the lactating and dry mammary gland (overview paper). *Proc. 3rd IDF Int. Mastitis Seminar*. Tel Aviv, Israel
- 15.Codex Alimentarius Commissions .(2001). Comments submitted on the draft maximum level for Aflatoxin M1 in milk. Codex committee on food additives and contaminants 33rd sessions, Hauge, The Netherlands.
- 16.Decastelli, L.; Lai, J.; Gramaglia, M.; Monaco, A.; Nachtmann, C.; Oldano, F.; Ruffer, M.; Sezian, A.; Bandirola, C. (2007). Aflatoxins occurrence in milk and feed in Northern Italy during 2004–2005. *Food Control*, No. 18, pp. (1263–1266)
- 17.Detroy, R. W.; Lillehoj, E. B. and Ciegler, A. (1971). Aflatoxin and related compounds, p. 3–178. In: A. Ciegler, S. Kadis, and S. J. Ajl (ed.), *Microbial toxins*, vol. VI: Fungal toxins. Academic Press, New York, N.Y.

Зоран Арсевски

18.Diener, U. L.; Cole, R. J.; Sanders, T. H.; Payne, G. A.; Lee, L. S.and Klich, M. A. (2001). Epidemiology of aflatoxin formation by *Aspergillus flavus*. Annu. Rev. Phytopathol., 25:249–270

Dohoo, I.R. and A.H.Meek. 1982. Somatic cell counts in bovine milk. Can. Vet. J. 23:119-125

19.Dragacci, S., Grosso, F., & Gilbert, J. (2001). Immunoaffinity column clean-up with liquid chromatography for determination of aflatoxin M1 in liquid milk: Collaborative study. Journal of AOAC International, Vol.84 No.2, pp. 437-443

20.EY, EC853/2004 (Regulation (EC) No 853/2004 of the European Parliament and of the Council of 29 April 2004 laying down specific hygiene rules for food of animal origin).

European Commission. (2013). Rapid alert system for food and feed. Retrieved 22.07.2013 [http://ec.europa.eu/food/foodrapid alert/index\\_en.htm](http://ec.europa.eu/food/foodrapid alert/index_en.htm).

21.Galvano, F.; Galofaro, V.; & Galvano, G. (1996). Occurrence and stability of aflatoxin M1 in milk and milk products: a worldwide review. Journal of Food Protection, No. 10, pp. (1079-1090)

FAO, 1997).

22.Fernandes, A.M., C.A.F. Oliveira, P. Tavolaro.2004. Relationship between somatic cell counts and composition of milk from individual Holstein cows. Arq. Inst. Biol. 71 (2): 163-166.

23.Gera, S. & Guha, A. 2011. Assessment of acute phase proteins and nitric oxide as indicator of subclinical mastitis in Holstein × Haryana cattle. Indian Journal of Animal Sciences, 81(10): 1029–1031.

24.Gehringer, G. (1980). Multiplication of bacteria during farm storage. In Factors influencing the bacteriological quality of raw milk. International Dairy Federation Bulletin, Document 120)

Зоран Арсевски

- 25.Ghorbanian, M.; Razzaghi-Abyaneh, M.; Allameh, A.; Shams-Ghahfarokhi, M. and Qorbani, M. (2008). Study of the effect of neem (Azadirachata indica) leaf extract on the growth of fungi. *Mycosis*, 51 (1): 35-39.
- 26.Gong, Y.; Hounsa, A.; Egal, S.; Turner, P. C.; Sutcliffe, A. E.; Hall, A. J.; Cardwell, K.; & Wild, C. P. (2004). Postweaning exposure to aflatoxin results in impaired child growth: a longitudinal study in Benin, West Africa. *Environmental Health Perspectives*, No. 112, pp. (1334–1338)
- 27.Guzman, D. (2007). Exposure to aflatoxin B1 in experimental animals and its public health signification. *Salud Publica Mex.*, 49 (3): 227-235.
- 28.Grant, D. W.; & Carlson, F. W. (1971). Partitioning behavior of aflatoxin M1 in dairy products. *Bulletin of the Environmental Contamination and Toxicology*, No. 6, pp. (521-524)
- Hameed, K.G.A., Sender, G. & Korwin-Kossakowska, A. 2007. Public health hazard due to mastitis in dairy cows. *Animal Science Papers and Reports*, 25(2): 73–85.
- 29.Hegde, R., Isloor, S., Nithin Prabhu, K., Shome, B.R., Rathnamma, D., Suryanarayana, V.V.S., Yatiraj, S., Hogan, J. 2005. Human health risks associated with high SCC milk. pp. 21–124, in: *Proceedings of the British Mastitis Conference, 2005*. Stoneleigh, Warwickshire, UK, 12 October 2005. Institute for Animal Health. Available at <http://www.britishmastitisconference.org.uk/BMC2005Proceedings.pdf> Accessed 2013-07-25.
- 30.Hogeveen, H. 2005. Mastitis is an economic problem. pp. 1–13, in: *Proceedings of British Mastitis Conference (2005)* Stoneleigh. Institute for Animal health/ The Dairy Group. Available at <http://www.britishmastitisconference.org.uk/BMC2005Proceedings.pdf> Accessed 2013-07-08
- 31.IARC. (1993). Some naturally occurring substances - food items and constituents, heterocyclic aromatic amines and mycotoxins. *IARC Monogr Eval Carcinog Risk Hum*, Lyon, France, 56, pp. (245–391)

Зоран Арсевски

- 32.IARC. (2002). Some traditional herbal medicines, some mycotoxins, naphthalene and styrene. IARC Monogr Eval Carcinog Risk Hum, Lyon, France, pp. 1–556
- 33.Iha, M. H., Barbosa, C. B., Okada, I. A., & Trucksess, M.W. (2013). Aflatoxin M1 in milk and distribution and stability of aflatoxin M1 during production and storage of yoghurt and cheese. Food Control, 29(1), 1e6. Kabak, B., & Ozbey, F. (2012).
- 34.IFAD (International Fund for Agricultural Development). 2004. Livestock services and the poor. A global initiative. Collecting, coordinating and sharing experiences. IFAD, Rome, Italy. 132 p
- Islam, M.A., Islam, M.Z., Islam, M.A., Rahman, M.S. & Islam, M.T. 2011. Prevalence of sub-clinical mastitis in dairy cows in selected areas of Bangladesh. Bangladesh Journal of Veterinary Medicine, 9(1): 73–78.
- 35.Ito, Y.; Peterson, S. W.; Wicklaw, D. T.; & Goto T. (2001). Aspergillus pseudotamarii, a new aflatoxin producing sp. Mycology Research, No.105, pp. (233-239)
- 36.Jay, J. M. (1992). Modern food microbiology, pp. (1–701), Chapman and Hall, New York Jose Barrios, M. ; Jesus Gualda, M. ; Cabanas, J. M. ; Medina, L. M. ; & Jordano, R. (1996). Occurrence of aflatoxin M1 in cheeses from the South of Spain, Journal of Food Protection, No. 8, pp. (898-900)
- 37.JECFA, (2001). Safety evaluation of certain mycotoxins in food prepared by the 56th meeting of the JECFA (Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives), FAO Food and Nutrition Paper 74/WHO Foods Additives Series 47.
- 38.Jones, G.M. 2006. Understanding the basics of mastitis. Virginia Cooperative Extension, Publication 404-233. 7 p. Virginia State University, USA.
- 39.Kehrli, M.E. Jr., D.E. Shuster. 1994. Factors affecting milk somatic cells and their role in health of the bovine mammary gland. J. Dairy Sci. 77: 619-627. J. Ramesh, G. Sarathchandra, and V. Sureshkumar, “Analysis of feed samples for aflatoxin b1 contamination by hptlc-a validated method,” International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences, vol. 2, pp. 373–377, 2013.



Зоран Арсеvски

- 40.Kiermeier, F. (1973). Aflatoxins residues in fluid milk. Pure Applied Microbiology, No. 35, pp. (271-273)
- 41.Kitchen, B.J. 1981. Review of the progress of dairy science - bovine mastitis - milk compositional changes and related diagnostic-tests. Journal of Dairy Research, 48(1): 167–188
- 42.Klich, M. A. (1987). Relation of plant water potential at flowering to subsequent cottonseed infection by *Aspergillus flavus*. Phytopathology, 77: 739–741
- 43.Kivaria, F.M. 2006. Epidemiological studies on bovine mastitis in smallholder dairy herds in the Dar es Salaam Region, Tanzania. Doctoral thesis, Utrecht University, The Netherlands.
- Seegers, H., Fourichon, C. & Beaudeau, F. 2003. Production effects related to mastitis and mastitis economics in dairy cattle herds. Veterinary Research, 34: 475–491.
- 44.Kurtzman, C. P.; Horn, B. W. & Hesseltine, C. (1987). A new species, a new aflatoxin producing species related to *A. flavus* and *A. Tamarii*. Antonie Van Leeuwenhoek, No. 53, pp. (147-158)
- 45.Lafont, P.; Siriwardana, M.; & Lafont, J. (1989). Genotoxicity of hydroxy-aflatoxins M1 and M4. Microbiology Alimentarius Nutrition, NO. 7, pp (1-8)
- 46.Marsi, M. S.; Booth, A. N.; & Hsieh, D. P. H. (1974). Comparative metabolic conversion of aflatoxin B1 in aflatoxin M1 and Q1. Life Science, No. 15, pp (203-209)
- 47.Mekonnen, H. & Tesafaye, A. 2010. Prevalence and etiology of mastitis and related management factors in market oriented smallholder dairy farms in Adama, Ethiopia. Revue de Medecine Veterinaire, 161(12): 574–579
- 48.Moreau, C. (1976). Les mycotoxines dans les produits laitiers. Lait, No. 55, pp. (286-303)
- 49.Mortimer, D. N., Gilbert, J., & Shepherd, M. J. (1987). Rapid and highly sensitive analysis of aflatoxin M1 in liquid and powdered milks using affinity column clean-up. Journal of Chromatography, Vol.407, pp. 393-398

Зоран Арсевски

- 50.Muhammad, G., Naureen, A., Nadeem Asi, M., Saqib, M. & Fazul-ur-Rehman. 2010. Evaluation of a 3% Surf solution (Surf Field Mastitis Test) for the diagnosis of sub-clinical bovine and bubaline mastitis. Tropical Animal Health and Production, 42:457-464
- 51.Natzke, R.P., R.W.Everett and D.S.Postle.Normal milk somatic cell counts. J.Milk Fd.Technol. 35:261-263. 1972)
- 52.Oliver, B.M., Jayarao, S.P. & Almeida, R.A. 2005. Foodborne pathogens in milk and the dairy farm environment: food safety and public health implications. Foodborne Pathogens and Disease, 2(2): 115–129.
- 53.Ozay, G.; Seyham, F.; Pembeci, C.; Saklar, S. and Yilmaz, A. (2008). Factors influencing fungal and aflatoxins levels in Turkish hazelnuts (*Corylus avellana* L.) during growth, harvest, drying and storage, A 3-years study, Food Addit. Contam., 25 (2): 209-218.
- 54.Правилник за посебните барања за безбедност и хигиена на млеко и млечни производи (сл.весник на Р.М бр. 151/07)Parliament and of the Council of 29 April 2004laying down specific hygiene rules for food ofanimal origin. )
- 55.Prasad, R., Krishnaveni, C., Sundareshan, N., Akhila, D.S., Gomes, A.R. & Hegde, N.R. 2013. Incidence of sub-clinical mastitis and prevalence of major mastitis pathogens in organized farms and unorganized sectors. Indian Journal of Microbiology, 53(3): 315–320.
- 56.Park, D. L. (2002). Effect of processing on aflatoxin. Adv. Exp. Med. Bio.,504: 173-179.
- 57.Pohland, A. E.; & Yess, N. J. (1992). Food Contaminants: scientific and public health implications. Proceedings of the Nutrition Society of Australia, No. 17, pp. (1-12)
- 58.Pyorala, S. 2003. Indicators of inflammation in the diagnosis of mastitis. Veterinary Research, 34: 565–578

Зоран Арсевски

- 59.Radostis, O.M., Gay, C.C., Blood, D.C. & Hinchkliff, K.W. (editors). 2000. Veterinary Medicine: A Textbook of the Diseases of Cattle, Sheep, Pigs, Goats and Horses. 9th ed. ELBS & Baillier Tindall. See pp. 563–660.Regulation (EC) No 853/2004 of the European  
Reddy, S. V. and Waliyar (2008). Properties of aflatoxin and producing fungi, *Sperogillus* and Aflatoxin in groundnuts. International Crop Research, 3: 1-5.
- 60.Sandholm, M., T.H. Buzalski, L. Kaartinen, S.Pyorala. 1995. The bovine udder and mastitis.University of Helsinki, Faculty of VeterinaryMedicine, Helsinki.
- 61.Sharma, R. S.; Trivedi, K. R.; Wadodkar, U. R.; Murthy, T. N.; & Punjarath J. S. (1994). Aflatoxin B1 content in deoiled cakes, cattle feeds and damaged grains during different seasons in India. Journal of Food Science and Technology, Vol. 31, No. 3, pp (244-246)
- 62.Sharma,N., Maiti, S.K. & Sharma, K.K. 2007. Prevalence, etiology and antiobiogram of micro-organisms associated with sub-clinical mastitis in buffaloes in Durg, Chhattisgrh State (India). International Journal of Dairy Science, 2(2): 145–151
- 63.Shephard, G. (2009). Aflatoxin analysis at the beginning of the twenty-first century. Analytical and Bioanalytical Chemistry, 395, 1215e1224. Smith, K.L., Todhunter, D.A. & Schoenberger, P.S. 1985. Environmental mastitis: cause, prevalence, prevention. Journal of Dairy Science, 68(6): 1531–1553
- 64.Stoloff, L.; Park, D. L.; & Van Egmond, H. P. (1991). Rationales for the establishments of limits and regulations for mycotoxins. Food Additives and Contaminants, No. 8, pp. (213-221)
- 65.T. G. Karmen and G. S. Teger, “The Microbiological Quality of Raw Milk after Introducing the Two Day’s Milk Collecting System,” Acta Agriculturae Slovenica, Vol. 92, No. 1, 2008, pp. 61-74.
- 66.Tiwari, A., Sisodia, R.S., Sharma, R.K., Misraulia, K.S. & Garg, U.K. 2000. Incidence of sub-clinical mastitis in cows of Malwa Region of Madhya Pradesh. Indian Journal of Dairy Science, 53(4): 328–331.

Зоран Арсевски

67. Tuinstra, L. G. M. T., Roos, A. H., & Van Trijp, J. M. P. (1993). Liquid chromatographic determination of aflatoxin M1 in milk powder using immunoaffinity columns for clean-up: Interlaboratory study. *Journal of AOAC International*, Vol.76, pp. 1248-1254
68. Van Egmond, H. P.; & Paulsch, W. E. (1986). Mycotoxins in milk and milk products. *Netherlands Milk Dairy Journal*, No. 40, pp. (175-188)
69. Van Egmond, H. P., Paulsch, W. E., & Schuller, P. L. (1978). Confirmatory test for aflatoxin M1 on thin layer plate. *Journal of AOAC*, Vol.61, No.4, pp. 809-812
70. Van Egmond, H. P. (1989b). Introduction. In: Van Egmond, H. P. (Ed.), *Mycotoxins in dairy products*. Elsevier Applied Science, London and New York, pp. 1–10.
71. Van Egmond, H. P. (1989a). Aflatoxin M1: occurrence, toxicity and regulation. In: Van Egmond, H.P. (Ed.), *Mycotoxins in dairy products*. Elsevier Applied Science, London and New York, pp. 11–55.
72. Veldman, A.; Meijs, J. A. C.; Borggreve, G. J. and Heeres-van-der-Tol, J. J. (1992). Carry-over of aflatoxin from cows' food to milk, *Ann.Prod.*, 55, 163–168.
73. Whitlow, L. W. and Hagler, W. M. (2002). Mycotoxins in feeds. *Feedstuffs*, 74 (28): 1-10.

Определување на квалитет и присуство на афлатоксин во млеко од

Овчеполскиот Регион

---

Зоран Арсевски

Зоран Арсевски

Определување на квалитет и присуство на афлатоксин во млеко од

Овчеполскиот Регион

Универзитет „Гоце Делчев“ – Штип