



Sütle Gelen Tehdit: Aflatoksin M1

Efsun Deligöz^{1*}, Nebahat Bilge²

¹Kafkas Üniversitesi, Veterinerlik Fakültesi, Gıda Hijyeni ve Üretimi Anabilim Dalı, 36000 Kars, Türkiye

²Kafkas Üniversitesi, Veterinerlik Fakültesi, Gıda Hijyeni ve Üretimi Anabilim Dalı, 36000 Kars, Türkiye

MAKALE BİLGİSİ

Derleme Makale

Geliş 01 Aralık 2016
Kabul 16 Şubat 2017

Anahtar Kelimeler:

Aflatoksin
Aflatoksin M1
Süt
Aflatoksin B1
Süt toksini

*Sorumlu Yazar:

E-mail: efsundeligoz@gmail.com

Ö Z E T

Başta çocuk gelişimi olmak üzere insan beslenmesinde önemli birer yer tutan süt ve süt ürünleri, halk sağlığını tehdit eden tehlikeleri de beraberinde getirmektedir. Karsinojenik etkileri ile bilinen ve özellikle hayvan yemlerinde bulunuşu ile dikkat çeken Aflatoksin B1 (AFB1) ve bunun canlı organizmadaki metabolizma ürünü olan Aflatoksin M1 (AFM1), karsinojenik, nörotoksik, nefrotoksik, hepatotoksik ve immunsupresif etkileri ile bilim çevrelerinde gündemde kalmaya devam etmektedir. AFM1' in başlıca atılım yolunun süt oluşu ve süte uygulanan pastörizasyon ve sterilizasyon gibi işlemlerden etkilenmeyişi, araştırmacıları detoksifikasyon konusunda yeni yollar aramaya teşvik etmektedir. Sorunla mücadelede, hâlihazırda gıdalarda toksine yönelik olarak kullanılan zaman alıcı ve maliyetli saptama yöntemlerine alternatif geliştirmek ve böylece yasal düzenlemelerde belirtilen limitlere uygunluğunu titizlikle denetlemek, bunun yanında gıdayı toksin açısından daha güvenli hale getirmek anahtar rolü oynamaktadır. Bu nedenle bu derleme ile hem AFM1' in dünya genelinde gıdalardaki yaygınlığına ışık tutmak hem de saptama ve detoksifikasyon yöntemlerindeki gelişmelere dikkat çekmek amaçlanmıştır.

Turkish Journal Of Agriculture - Food Science And Technology, 5(8): 846-857, 2017

Threat Coming with Milk: Aflatoxin

ARTICLE INFO

Review Article

Received 01 December 2016
Accepted 16 February 2017

Keywords:

Aflatoxin
Aflatoxin M1
Milk
Aflatoxin B1
Milk Toxin

*Corresponding Author:

E-mail: efsundeligoz@gmail.com

ABSTRACT

Even though dairy products play an important role in infant and human nutrition, they may also cause food borne diseases. Milk toxin AFM1 is one of the most important public health hazards. This toxin is produced by animals after consuming contaminated feed with AFB1 which is known for its carcinogenic effects and then excreted in milk. Same as AFB1, AFM1 is also carcinogenic, neurotoxic, nephrotoxic, hepatotoxic and immunosuppressive for humans and cannot be destroyed by sterilization or pasteurization. For that reason, studies on cost effective and rapid methods for detection and detoxification of AFM1 in milk are quite popular among researchers. In this review, the worldwide prevalence of AFM1 in milk and milk products has been presented as well as the developments in techniques to detect and detoxify.

Giriş

Mikotoksinler, *Aspergillus*, *Penicillium*, *Fusarium*, *Alternaria* ve *Claviceps* gibi mantar cinslerinin sekonder metabolizması sonucu oluşan, düşük molekül ağırlıklı, çok çeşitli kimyasal yapıya sahip doğal toksinlerdir (Girgin ve ark., 2001).

Mikotoksinleri üreten mantarların sporları, rüzgâr yoluyla, atmosferin çeşitli katmanları da dâhil çok uzak mesafelere taşınabilir ve çok geniş bir yelpazede gıda ve tarım ürününü kontamine edebilirler. Özellikle *Aspergillus* türleri farklı çevresel koşullarda ve farklı substratlarda rahatlıkla gelişebilme yeteneğine sahiptir. Bulaşma; üretim, işleme, taşınma ve depolamanın herhangi bir aşamasında meydana gelebilir. Mantarın gelişimi ve mikotoksin üretiminde nem, sıcaklık, substrat tipi ve besinsel faktörler, atmosfer oksijen ve karbon dioksit düzeyleri, diğer mantar türlerinin varlığı, coğrafi konum ve genetik şartlar etkilidir (Girgin ve ark., 2001).

Mikotoksinlerle kontamine olmuş gıda ve yemlerin tüketilmesiyle ortaya çıkan hastalıklar "Mikotoksikozis" olarak isimlendirilir. Bu kapsamda karsinojenik, teratojenik, tremorgenik, hemorajik, dermal, hepatotoksik, nefrotoksik, nörotoksik etkiler meydana gelebilmektedir. Bunun yanı sıra ölüme sebep olabilen akut tablolar da kendini gösterebilmektedir (Bakırcı, 2014).

İnsan ve hayvan sağlığı üzerinde güçlü toksik etkiler oluşturan bu metabolitlerin başlıcaları, Aflatoksin, Okratoksin, Patulin, Zeralenon, Trikotesen ve Fumonisinlerdir.

İngiltere'de, 1960 yılında yüz binden fazla hindi ve diğer çiftlik hayvanlarının ölümüyle sonuçlanan salgınlar sırasında "Turkey X" hastalığının etkeni olarak tanımlanan aflatoksinler, bilinen 400 mikotoksin arasında insan sağlığı açısından en tehlikelisi olarak kabul edilmektedir (Ergun ve ark. 2006). Çiftlik hayvanlarının beslenmesinde yararlanılan yemler yanında insanların diyetinde önemli bir yere sahip olan gıda maddelerinin aflatoksin ile kontaminasyonu, dünyanın çeşitli bölgelerinde sık karşılaşılan bir durumdur. Dolayısıyla bu kontaminasyonlar hem gıda güvenliğini etkileyerek halk sağlığı açısından risk oluşturmakta hem de tarım endüstrisinde önemli ekonomik kayıplara neden olmaktadır Aflatoksinler oluşturdukları toksik etki gücüne göre $AFB1 > AFG1 > AFB2 > AFG2$ şeklinde sıralanmaktadır (Yentür ve Er, 2012).

Başlıca, *Aspergillus flavus*, *A. parasiticus* ve *A. nomius* küfleri tarafından üretilen aflatoksinler (Yentür ve Er, 2012), ince tabaka kromatografisinde, uzun dalga boylu UV ışığı altında verdikleri floresan renklere göre B1 ve B2 (Blue - Mavi) ile G1 ve G2 (Green - Yeşil) olarak isimlendirilip gruplandırılırlar (Ergun ve ark., 2006).

Aflatoksin B1, küflü otlarla beslenen hayvanların sütüne geçerek kazeinle birleşir ve Aflatoksin M1 adı verilen bir metabolit oluşturur (Ergun ve ark., 2006).

AFM1'in Biyosentezi ve Toksisitesi

AFB1, asıl olarak karaciğerin mikrozomal çok fonksiyonlu oksidaz sistemi tarafından metabolize edilir. Ancak bunun yanında türlere göre değişen şekillerde farklı metabolik dönüşümlerden de geçebilir (Mohammadi, 2011).

Yemlerle alınan AFB1 öncelikle enzimlerle düzenlenen hidroliz, redüksiyon ve oksidasyon reaksiyonlarını içeren "faz 1" metabolizmasına uğrar. Ardından konjugasyon basamağını kapsayan "faz 2" metabolizması gelir. AFB1'in faz 1 metabolizması çoğunlukla cytochrome P450 (CYP450) enzimleri tarafından katalize edilen oksidasyon reaksiyonlarından oluşur. CYP450'ler AFB1'den en az üç adet monohidroksile metabolit üretimine aracılık eder; bunlar AFM1, AFQ1 ve AFB2a'dır. AFM1 ilk kez, kontamine yem ile beslenen sığırların ve farelerin sütlerinden izole edildiği için "milk toxin" (Süt Toksini) teriminin ilk harfinden yola çıkılarak isimlendirilmiştir. Ancak daha sonra yapılan çalışmalarda AFM1'in yalnızca memelilere özgü bir metabolit olmadığı, pek çok memeli harici tür tarafından da karaciğer enzimleri tarafından üretildiği gözlenmiştir. Örneğin, 35 gün boyunca 2,057 ppb düzeyinde AFB1 içeren diyetle beslenen piliçlerin, başta karaciğer ve böbrekler olmak üzere pek çok vücut dokusunda AFB1'e rastlanmıştır (Diaz ve Murcia, 2011).

Vücuda alınan AFB1 ortalama %1-2 oranında AFM1'e dönüşerek sütle dışarı atılır. Bu oran hayvandan hayvana, gündün güne ve bir sağımdan diğerine değişir. AFM1, AFB1'in gıda ile alınımını takip eden ilk 12-24 saat içerisinde sütle saptanabilir ve birkaç gün içerisinde oldukça yüksek düzeylere ulaşabilir. AFB1 alımı son bulduğunda sütle atılan AFM1 konsantrasyonları giderek azalır ve 72 saat içerisinde saptama limitlerinin altına düşer. Vücuda alınan AFB1 miktarı ile sütle atılan AFM1 arasında doğru orantılı bir ilişki söz konusudur (Mohammadi, 2011).

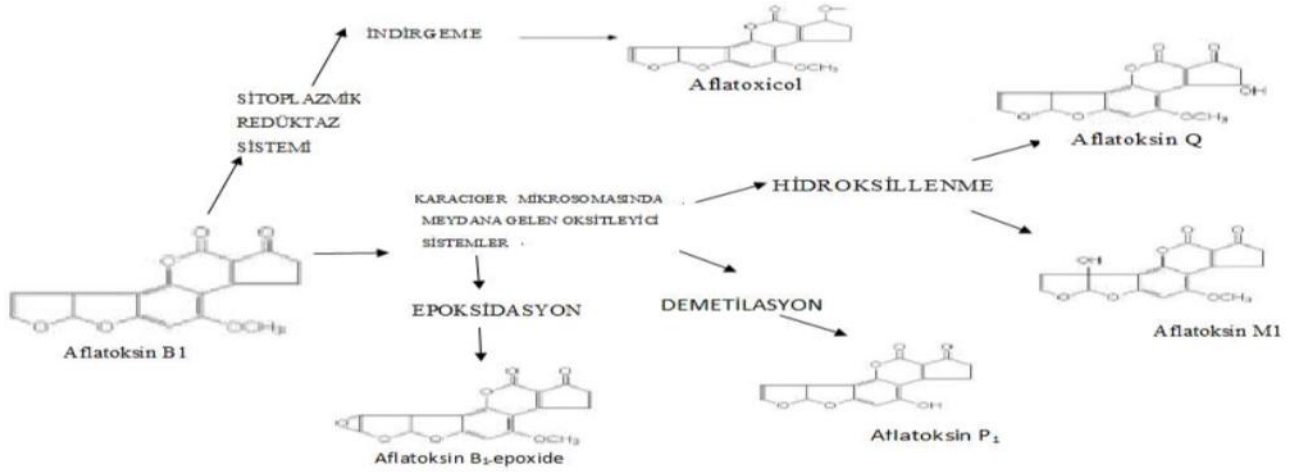
AFB1'in vücuttaki metabolizması Şekil 1'de sunulmuştur (Özkaya ve Temiz, 2003).

Aflatoksin M1'in Gıdalarda Bulunuşu ve Yaygınlığı

Toksijenik sporların inhalasyonu veya doğrudan deri ile temasın yanı sıra anneden fütüse kordon kanıyla ya da anneden bebeğe emzirme vasıtasıyla geçişler bildirilmiş olsa da mikotoksinlerin insanlara bulaşmasında en önemli yol, kontamine yemlerle beslenen hayvanlardan elde edilen ürünler ve kontamine besinlerin tüketimidir. Az gelişmiş veya gelişmekte olan ülkelerde besinlerin yaklaşık %25'inin mikotoksinlerle ve metabolitleriyle kontamine olduğu görülmektedir (Yentür ve Er, 2012).

Bu alanda, dünyanın farklı bölgelerinde pek çok çalışma yapılarak, söz konusu bağlantı açıkça ortaya konulmuştur. Örneğin, Çin'in bir bölgesinde karaciğer kanseri oranının yüksek olmasından hareketle başlatılan bir araştırmada, yörede üretilen mısır ve fıstık yağlarının yüksek oranda AFB1 ile kontamine olduğu saptanmış, çalışmanın ilerleyen aşamalarında, bölgede yaşayan insanlardan alınan idrar örneklerinde AFM1 varlığını ortaya konularak kontamine gıda tüketimi ve kişilerin toksine maruz kalması arasındaki ilişkiye açıklık getirilmiştir (Zhu ve ark., 1987).

Yine Çin'de yürütülen bir başka çalışmada, Yangzte Nehri Delta bölgesinde yer alan 18 mandıradan sağlanan süt örnekleri incelenmiş ve %59,7 oranında AFM1 kontaminasyonu ile karşılaşılmıştır. Ayrıca kış mevsiminde Aflatoksin konsantrasyonunun daha yüksek oranlarda ölçüldüğü belirtilerek mevsimsel farklılığa dikkat çekilmiştir (Xiang ve ark., 2013).



Şekil 1 AFB1'in vücuttaki metabolizması (Özkaya ve Temiz 2013).

Uzakdoğu'dan Ortadoğu'ya gelindiğinde de durum değişmemiş ve İran'ın merkez bölgesinde popüler marketlerden alınan örneklerden, pastörize sütlerin %71,5'i, UHT sütlerin ise %62,3'ünün AFM1 ile kontamine olduğu bildirilmiştir (Fallah, 2010). Ayrıca diğer bir çalışmada, yine İran'ın merkez bölgesinde popüler marketlerden alınan örneklerden, tereyağın %25,8'inin, yoğurdun %66,1'inin, beyaz peynirin %81,9'unun AFM1 taşıdığı belirtilmiştir (Fallah, 2010).

Araştırmacılar yakın dönemde yaptıkları çalışmalarla, Pakistan'ın da süt ve ürünlerinde AFM1 sorunu ile karşı karşıya olduğuna işaret etmişlerdir. Örneğin Pencab şehrinde yürütülen bir çalışmada, incelenen süt örneklerinin %71'i, yoğurtların %61'i, beyaz peynirlerin %78'i, krem peynirlerin %59'u, tereyağların ise %45'inde AFM1 saptanmıştır (Zafar ve Rafique, 2013). Yine Güney Pencab'da 2013-2014 yılları arasında süt örnekleri toplanarak incelenmiş, bunlardan %53'ü AB yasal limitlerini aşmak üzere %93'ünün değişen oranlarda AFM1 ile kontamine olduğu belirlenmiştir (İsmail ve ark., 2016).

Pek çok Avrupa Ülkesinden de sorunun devam ettiğini gösteren raporlar gelmeyi sürdürmektedir. Örneğin, Yunanistan'da yapılan bir çalışmada, gerek organik üretim yapan gerekse de geleneksel yöntemle yetiştiricilik yapan çiftliklerden 243 adet süt örneği toplanmış, bunlardan %1,7'sinin AB limitlerini aşan düzeylerde AFM1 taşıdığı belirlenmiştir. Organik örneklerde de toksin kontaminasyonuna rastlanması bu yöntemle yetiştiriciliğin güvenilirliğini tartışmalı hale getirmiştir (Malissiova ve ark., 2013). Yunanistan'da yürütülen bir diğer tarama çalışmasında ise 2009 Kasım'dan Haziran 2010'a kadar, organik sütler ve bebek devam sütleri de dâhil olmak üzere toplam 196 süt örneği toplanarak AFM1 yönünden analiz edilmiş ve %46,5 oranında pozitif sonuç ile karşılaşılmıştır. Her ne kadar sadece iki örnekteki düzey, AB yasal limitlerinin üzerine çıksa da kontaminasyonun yaygınlığı önemli bulunmuştur (Tsakaris ve ark., 2013).

Makedonya'dan bildirilen bir çalışmada, 2013 ile 2014 yılları arasında toplanan 3635 çiğ süt örneğinin %2,9'unun, yasal limitleri aşan düzeyde AFM1 ile kontamine olduğuna işaret etmiştir. Çalışmada ayrıca yem örnekleri de incelenmiş ve %31,8 oranında AFB1 kontaminasyonu belirlenmiş, buradan hareketle yemden

süte taşınma oranı %0,22 – 3,47 olarak hesaplanmıştır (Dimitrieska-Stojkovi ve ark., 2016).

Kosova'nın başkenti Piriştina'da yürütülen bir çalışmada ise 84 pastörize ve 94 UHT olmak üzere toplam 178 süt örneği incelenmiş ve pastörize örneklerin %83,3'ünün, UHT örneklerin ise %78,7'sinin AFM1 içerdiği gözlenmiştir (Rama, 2015).

Hırvatistan'da biraz daha kapsamlı bir araştırma yapılmış ve Haziran - Eylül 2013 dönemi süresince inek, keçi, koyun ve eşek sütleri taranmış, değişen oranlarda AFM1 değerleri ölçülmüştür. Özellikle inek ve keçi sütlerinde belirlenen seviyelerin yasal limitlerin üzerinde olması dikkat çekici bulunmuştur (Bilandžić ve ark., 2014).

Bir yıl sonrasında, Sırbistan'da 2013 ve 2014 boyunca yürütülen bir çalışmada ise 678 çiğ, 438 ısıyla muamele edilmiş süt ve 322 süt ürünü olmak üzere toplam 1438 örneğe analiz edilmiş ve çiğ sütlerin %56,3'ü, ısıyla muamele edilmiş sütlerin %32,6'sı, süt ürünlerinin ise %37,8'inin içerdiği AFM1 seviyelerinin, AB limitlerini aştığı ortaya konulmuştur (Tomasevic ve ark., 2015).

Bir diğer Avrupa Ülkesi olan Portekiz'de yapılan bir çalışmada, ülkede pazarlanan pastörize ve UHT yarım yağlı süt markalarının tümünü temsil eder nitelikte 40 örnek incelemeye alınmış ve %27,5 oranında AFM1 ile kontaminasyonu ile karşılaşılmıştır (Duarte ve ark., 2013).

Taramalar Güney Amerika'nın da problemle yüz yüze olduğunu göstermiştir. Örneğin, Brezilya'da, Oliveria ve ark. (2013) tarafından 2009'un Temmuz ayından Kasım'a kadar yürütülen çalışmada, test edilen 75 UHT süt örneğinden %30,7'sinin AFM1 yönünden pozitif olduğu saptanmıştır. Takip eden yılda yapılan çalışmada ise incelenen çiğ ve konsantre süt örneklerinin yalnızca AFM1 içerdiğini ancak pastörize ve UHT sütlerin AFM1'in yanı sıra AFB1 ile de kontamine olduğunu ortaya çıkarmışlardır. Buradan hareketle her iki toksinin birden varlığını saptayacak yöntemlerin üzerinde çalışılması gerektiğini savunmuşlardır (Scaglioni ve ark., 2014). Aynı ülkede yapılan bir diğer çalışmada da 152 UHT süt örneği analize alınmış ve bunlardan %87,5'inin AFM1 ile kontamine olduğu görülmüştür (Silva ve ark., 2015).

AFM1 kontaminasyonları Afrika Kıtası'ndan da bildirilmeye devam etmektedir. Bu raporlardan birinde

araştırmacılar, Fas'ın Fez şehrinde Ekim 2019 ile Eylül 2010 arasında toplanan çiğ süt örneklerinden, %8'i AB limitlerinin üzerinde olmak üzere toplamda %27'sinin AFM1 yönünden pozitif olduğunu ifade etmişlerdir (Marnissi ve ark., 2012).

Bununla birlikte Adejumo ve ark. (2013), Nijerya'da süt ve süt ürünlerinde AFM1 varlığına ve maruziyet riskine ilişkin verilerin son derece sınırlı olduğuna dikkati çekmişlerdir. Araştırmacılar, ülkenin bazı bölgelerinden elde edilen süt örneklerinde toksinin saptanmadığını, bazılarında ise sütün yanı sıra yoğurt ve dondurma örneklerinde de değişen miktarlarda AFM1 kontaminasyon bulunduğunu gösteren raporların literatürde yer aldığını makalelerinde sunmuşlardır.

Kontamine sütlerden elde edilen ürünlerde de dikkati çeken düzeylerde AFM1 ile karşılaşılması, bu toksinden kaynaklanan probleme ayrı bir boyut kazandırmaktadır. Örneğin dondurma bileşimine kontamine süt veya süt tozu eklenmesi halinde, pastörizasyon ya da sterilizasyon gibi ısı uygulamalarından etkilenmeyen toksin, üründe de kendini göstermektedir (Ossa ve ark., 2015). Lee ve Lee (2015), Kore'de yürüttükleri bir araştırma ile kontamine materyalden ürüne taşınmaya örnek teşkil edecek sonuçlar elde etmişlerdir. Çalışmada, aromalı süt, içilebilir nitelikte yoğurt, süt tozu, dondurma ve şerbet örnekleri AFM1 varlığı açısından analize alınmış ve en yüksek AFM1 kontaminasyonun (%74) süt tozunda olduğuna dikkat çekilmiştir. Bunu dondurma (%36), yoğurt (%14), süt (%6) ve şerbetin (%6) izlediğini bildirilmiş, ayrıca daha düşük oranlarda da olsa tüm örneklerde AFM2'ye rastlandığı ifade edilmiştir (Donghun ve Kwang-Geun 2015). Ayrıca, Arjantin ve Brezilya'da da süt tozu örneklerinin 0,1'den 0,92 µg/kg'a değişen düzeylerde AFM1 ile kontamine olduğu bildirilmiştir (Londoño ve ark., 2013).

Ne yazık ki ülkemizde de gerek süt gerekse süt ürünlerinde AFM1 varlığına ilişkin pek çok makale yayınlanmıştır. Bunlardan birinde Kabak ve Özbey (2012), inceledikleri 40 UHT süt örneğinin %70'inin AFM1 içerdiğini ve ikisindeki kontaminasyon düzeyinin AB yasal limiti olan 0,05 µg/l'nin üzerinde olduğunu bildirmiştir.

Adana'da 2012 yılı süresince yürütülen bir araştırmada ise 176 çiğ süt örneği incelenmiş, bunlardan 30'u yasal limitlerin üzerinde olmak üzere 53'ünün (%30,1) Aflatoksin M1 ile kontamine olduğu belirlenmiştir (Golge, 2014).

Atasever ve ark. (2014), peynirlerimizdeki AFM1 sorununa değindikleri makalelerinde, kontamine çiğ sütün hammadde olarak kullanımı ve startersız üretimin etkilerini tartışmışlardır.

Tekinşen ve ark. (2008) yürüttükleri bir çalışmada beş büyük şehirden (İstanbul, İzmir, Kayseri, Konya, Tekirdağ) elde ettikleri 100 krem peynir örneğinin %99'unun ve 92 tereyağ örneğinin tamamının AFM1 ile kontamine olduğunu ve tereyağ örneklerinin %28'inin, krem peynir örneklerinin %18'inin içerdiği AFM1 seviyelerinin Türk Gıda Kodeksinde (TGK) izin verilen maksimum limitleri aştığını bulmuşlardır.

Yaroğlu ve ark. (2005), inceledikleri 600 peynir örneğinden (200 beyaz peynir, 200 kaşar peyniri, 200 işlenmiş peynir) %1'i TGK'de belirtilen yasal limiti aşmak üzere toplamda %5'inin AFM1 içerdiğini

belirtmişlerdir.

Ayçiçek ve ark. (2005), Ankara'da satışa sunulan 223 süt örneğinin (49 peynir, 53 kaşar peyniri, 27 tereyağ) %90,58'inde AFM1 içeriğine rastlamışlar ve %8,52'sindeki AFM1 seviyesinin TGK yasal limit değerinin üzerinde olduğunu bildirmişlerdir.

Kamber (2005), Kars'ta yaptığı bir çalışmada, 30 kaşar ve 30 çeçil peynir örneğini incelemiş ve tamamında AFM1 varlığını tespit etmiştir. Kaşar peyniri örneklerinin %20'sinin ve çeçil peyniri örneklerinin %13'ünün TGK'deki limit değerlerini aştığını raporlamıştır.

Sezer ve ark. (2014) Kars'ta üretilip ambalajsız olarak satışa sunulan 50 adet dondurma örneğini incelemişler ve %100'ünde AFM1 olduğunu bildirmişlerdir. Bununla birlikte örneklerin %34'ünün TGK'de süt ve süt ürünleri için belirtilen AFM1 yasal limit seviyesini aştığını sunmuşlardır.

Yine Kabak (2012) tarafından yürütülen bir çalışmada, bu kez ülkemizdeki bebek formülasyonlarında saptanan AFM1'e dikkat çekilmiş, benzer tablonun İran, Hindistan, İspanya ve Mısır'daki bebek mamalarında da kendini gösterdiği, literatür ışığında ifade edilmiştir.

Tayin Yöntemleri

Klasik Tayin Yöntemleri

İnce tabaka kromatografisi: Kalitatif ve kantitatif olmak üzere iki şekilde uygulanabilir. Klasik ince tabaka kromatografisi ile yapılan mikotoksin analizlerinde analitik işlem basamakları; örnekleme, ekstraksiyon ve ekstrakt temizleme, yoğunlaştırma, kromatografik separasyon, kalitatif ve kantitatif tayin ve doğrulama testleri şeklindedir.

Ekstraksiyon işleminde "Kloroform-su", "Metanol-su" ve "Asetonitril-su" olmak üzere 3 farklı yöntemden yararlanılır. Bu basamaktaki amaç mikotoksinin solventle karşı karşıya gelmesi ve bu maddelerin moleküler düzeyde çarpışmasının sağlanmasıdır. Solvent seçiminde analizi yapılacak mikotoksinin polarlık derecesi göz önünde tutulur. Bu sırada mutlaka solventle birlikte su ilave edilir. Böylece solventin ürün içine girmesi sağlanır. Yoğunlaştırma işlemi ise rotary evaporatörde yapılır. İşlem sonunda Aflatoksin'e ait olan kalıntı, kloroformla yıkanarak vial alınır. Çeşitli işlemlerden geçirildikten sonra kromatografi işlemine tabi tutuluncaya kadar buzdolabında bekletilir (Var ve ark., 2004).

Yüksek performans sıvı kromatografisi: HPLC, mikotoksinler ve mikotoksinler gibi düşük molekül ağırlığına sahip diğer bileşiklerin analizlerinde son yıllarda üzerinde en çok çalışılan yöntemlerden birisidir. HPLC cihazı temel olarak, hareketli faz, pompa, enjektör bloğu, kolon, detektör kısımlarından oluşmaktadır.

- *Hareketli Faz:* Kullanılan çözümler uygulanan kromatografi şekline bağlıdır. Solvent rezervuarının çalışma esnasında ağzının kapalı olmasına özel bir dikkat gösterilmelidir. Buharlaştırmadan dolayı hareketli fazın kompozisyonu değişebilir. Aflatoksin analizlerinde hareketli faz olarak genellikle Asetonitril+Su (28+72) kullanılmaktadır Floresan şiddeti, hareketli fazın kompozisyonuna göre değişebilir. Örneğin AFB'ler, kloroform hareketli faz çözeltisinde AFG'lerden daha az floresan verir.

- *Kolon:* HPLC cihazında kullanılan kolonlar 4,5-5

mm iç çaplı ve 10-30 cm uzunluğa sahip paslanmaz çelik malzemelerdir ve 5-10µm çaplı sabit faz partikülleri içerir.

- **Kolon Dolgu Maddesi:** Dolgu maddesi seçiminde tanecik büyüklüğü, tanecik büyüklüğünün dağılımı, gözenek hacmi ve yüzey alanı gibi özellikler rol oynar. Sabit faz olarak genellikle poröz maddeler kullanılmaktadır. Kullanılan dolgu maddeleri silika ve alimüna esaslıdır.
- **Dedektör:** HPLC için ideal bir dedektör, geniş bir konsantrasyon aralığında yüksek duyarlılığa, düşük gürültü seviyesine ve yüksek seçiciliğe sahip olmanın yanı sıra kromatografik rezolüsyona kötü etki yapmaksızın kolon akışındaki bileşiklere duyarlılık göstermelidir. Aflatoksinler hem normal hem de ters faz sistemlerde, UV absorpsiyon, floresan ve MS (Mass Spectrometry) dedektörü ile HPLC’de analiz edilebilmektedir. Aflatoksinler yaklaşık 360 nm’de (metanol çözeltisinde) kuvvetli UV absorpsiyonu göstermektedir (Var ve ark., 2004).

Aflatoksinlerin HPLC ile analiz edilmesinde ilk aşama örneğe uygulanacak olan etkili bir ekstrakt temizleme işlemidir. Bu amaçla ekstraksiyonda çözücü olarak klorofomun kullanıldığı ve sadece yer fıstığı, yağlı tohumlar ve tahıl ürünlerinde uygulama imkanı bulan CB (Contamination Branch) ve ekstraksiyonda çözücü olarak metanol/hegzan karışımının kullanıldığı BF (Best Foods) (Mahindru 2009) yöntemleri ile son yıllarda daha popüler olan immunoaffinite kolon uygulamasından yararlanır. Immunoaffinite kolonla örnek hazırlama: Ekstrakte edilen örnekten alınan 10 ml filtrat immunoaffinite kolona aktarılır. Kolonun çıkışına bir toplama kabı konulur. Kolonu yıkamak için 2 defa 10 ml distile su kolondan geçirilir. Son olarak aflatoksinleri kolondan almak için 1 ml metanol uygulanır ve aflatoksinler kolondan alınır. Mikroenjektör vasıtasıyla örnek cihaza enjekte edilir ve örneğe ait kromatogram alınır. İkinci olarak aflatoksin standarttı enjekte edilir ve standartta ait kromatogram alınır. Kromatogramlardaki alıkonma zamanlarına bakılarak kalitatif ve kantitatif tayin yapılmaktadır.

Son yıllarda aflatoksin analizlerinde çok sık kullanılan HPLC cihazının bazı dezavantajları da bulunmaktadır:

- HPLC cihazının hassasiyetinin yüksek olmasından dolayı, örneklere etkili bir ekstrakt temizleme işleminin yapılması gerekir.
- Bir kerede sadece bir örnek analiz edilebildiğinden, otomatik enjeksiyon sistemi olsa bile çok sayıda örnek kısa sürede analiz edilemez.
- Cihazın pahalı olması ve kullanımı için iyi yetişmiş teknik elemana ihtiyaç duyulmaktadır (Var ve ark. 2004).

Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA): ELISA, antijen-antikör reaksiyonlarının direk olarak saptandığı bir enzim immunoassay yöntemidir. Mikotoksinler antijenik özellik göstermezler, onlara bu niteliği kazandırmak için bir protein veya polipeptid zincirine bağlanmaları gerekir. Bu amaçla protein olarak genellikle serum albumini, gamma globulin ve polyisine kullanılmaktadır. Okratoksin, patulin ve penisilik asit gibi reaktif gruplara sahip mikotoksinler direkt bağlanma

reaksiyonları gösterirler. Buna karşın aflatoksin ve trikotesenleri kapsayan birçok toksin ise reaktif gruplara sahip değildirler ve bu nedenle reaktif karboksil veya başka bir grubun öncelikle toksin molekülüne bağlanması gerekmektedir.

Antijenler antikörlere hidrojen bağları, elektrostatik etkileşimler, hidrofobik etkileşimler ve Vander Wals güçleri gibi kovalent olmayan bağlarla geri dönüşümlü olarak bağlanırlar.

Mikotoksin analizlerinde antijenlerin işaretlenmesinde genellikle peroksidaz ve alkalifosfat enzimleri kullanılmaktadır. Bu enzimlerle reaksiyon veren birçok substrat reaksiyon sonucunda renkli maddeler oluşturarak reaksiyon sonucunun gözle saptanmasına olanak tanırırlar.

ELISA yönteminin değişik mikotoksin analizlerinde kullanılması, farklı mikotoksinlere karşı spesifik antikör üretimine bağlıdır. Bu nedenle antikör üretimi için daha etkili yöntemlerin geliştirilmesine ihtiyaç duyulmaktadır (Var ve ark., 2004).

Biyosensörler: Tüm canlılar, yaşadıkları ortamdaki değişimleri derhal algılayıp yaşamlarını sürdürebilmek için değişimlere uymaya çalışırlar. İşte bu algılama mekanizması biyosensörlerin *in vitro* kullanımı için temel oluşturmaktadır.

Canlılar, teknologların hayal bile edemeyeceği duyarlık performansı göstermektedirler. Örneğin bazı köpeklerin koku almaları insanlardan 100 000 kat daha duyarlıdır. Yılan balıkları tonlarca su içerisine ilave edilen birkaç damla yabancı maddeyi derhal algırlar. Kelebekler partnerlerinin yaydığı birkaç molekül bile hissederler. Algiler ise zehirli maddelere karşı çok duyarlıdır. Canlılara bu uyarıları algılamayı mümkün kılan biyolojik maddelerin analiz sistemleri ile birleştirilmesi biyosensörleri oluşturmaktadır. (http://eng.ege.edu.tr/~otles/Biyosensorler/turkce/sensork_av.html, Erişim tarihi: 6 Şubat 2016), (Resim1).

Fiziksel bir özelliği belirleyerek kaydeden cihaza sensör, biyolojik sistemle kombine edilen sensörlere ise biyosensör ismi verilmektedir. Biyosensörler, biyolojik moleküllerin veya sistemlerin seçimler özellikleri ile modern elektronik tekniklerin işlem yeteneğinin birleştirildiği biyoanalitik cihazlardır.

Biyolojik bir olayın elektriksel sinyale dönüştürüldüğü bu sistemler, Biyosensörler biyolojik (reseptör) ve fiziksel (transducer) olmak üzere iki komponentten oluşur (http://eng.ege.edu.tr/~otles/Biyosensorler/turkce/sensork_av.html, Erişim tarihi: 6 Şubat 2016). Şekil 2’ de bir biyosensörün şematik gösterimi bulunmaktadır.

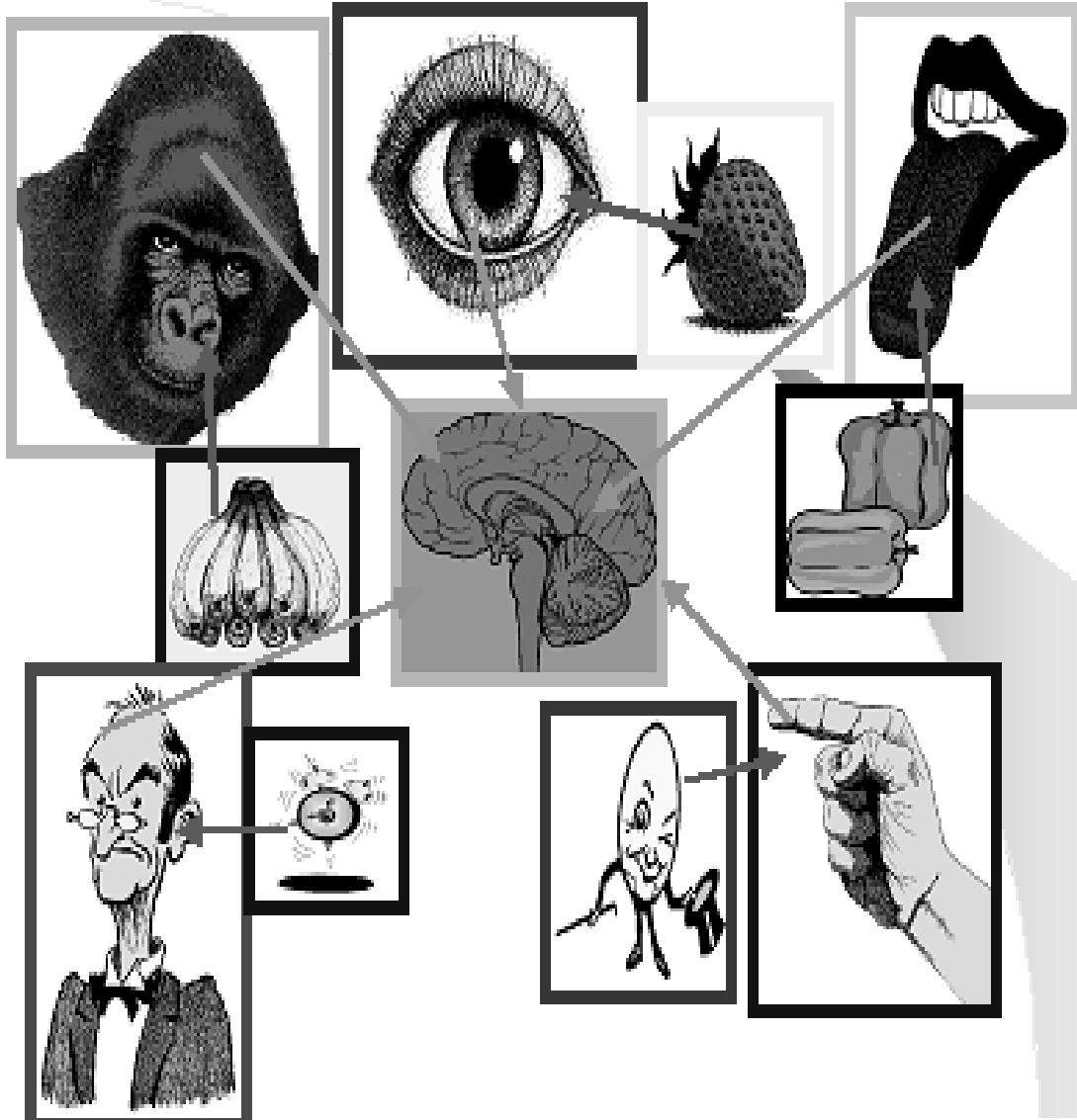
Biyosensörlerde analiz edilecek madde ve yapılar genel olarak analit olarak adlandırılmaktadır. Biyoreseptörler analiz edilecek maddeyi dönüşüme uğratar.

Transduserler, reseptörlerin biyolojik reaksiyonunu ölçülebilir fiziksel bir sinyale dönüştürürler(<http://eng.ege.edu.tr/~otles/Biyosensorler/turkce/yapi.html>, Erişim tarihi: 5 Şubat 2016). Şekil 3’te bir biyosensör sisteminin çalışma prensibi yer almaktadır.

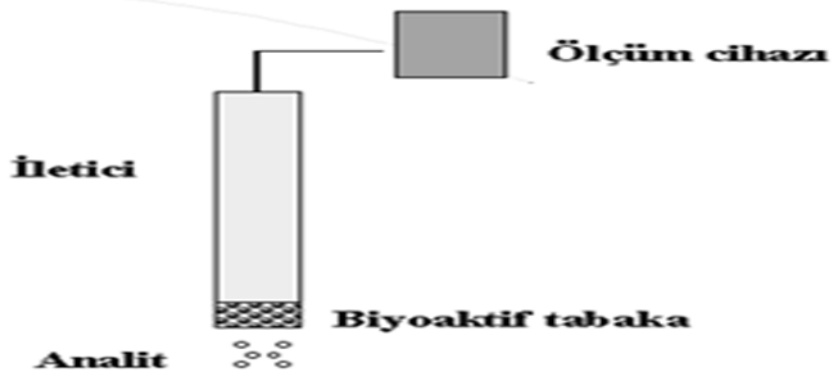
İnce tabaka kromatografisi ve HPLC yöntemleri, uzun zamana gereksinim duyulması, örneğin kapsamlı bir ekstrakt temizleme işlemini gerektirmesi ve çok fazla miktarda solventle çalışılması gibi bazı dezavantajlara sahiptir. ELISA yönteminin ise basit olması, kısa sürede çok sayıda analiz yapılabilmesi, fazla solventle

çalışılmaması gibi avantajları bulunmaktadır. Buna karşın, mikotoksinlerin ürüne homojen bir şekilde yayılmamasından dolayı, ELISA yönteminde az miktarda örnek kullanılması en önemli sorunu oluşturmaktadır.

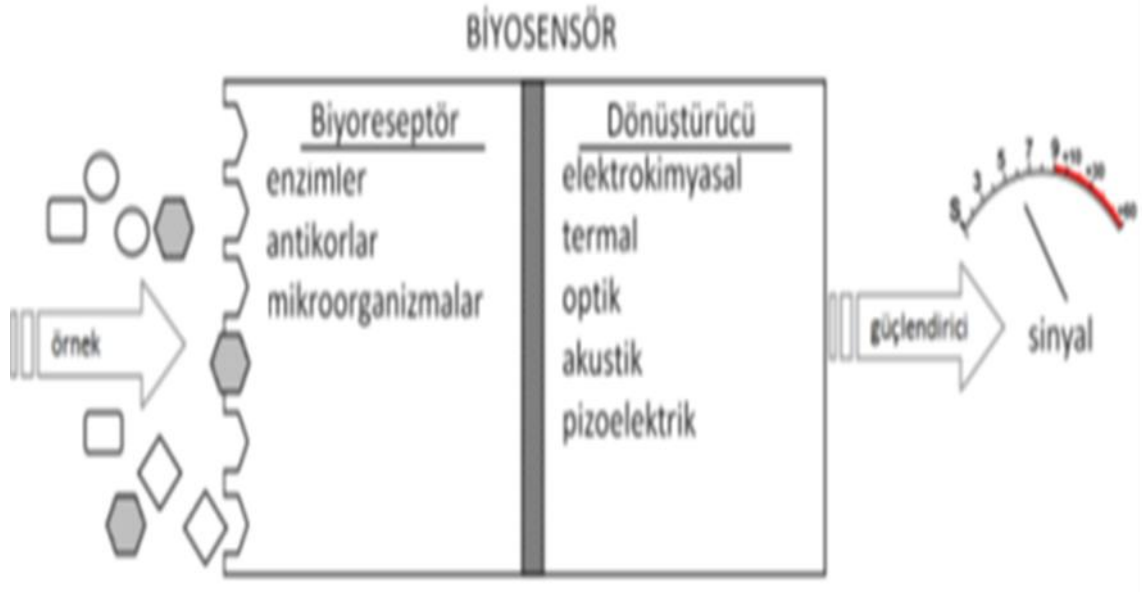
Mikotoksinlerin doğru, hızlı, etkin ve pratik bir şekilde ölçümlerini sağlamak amacıyla yeni yöntem araştırmaları ya da var olan metotlarda modifikasyon çalışmaları devam etmektedir (Var ve ark. 2004).



Resim 1 Canlıların doğadaki olayları algılama yetenekleri
(<http://eng.ege.edu.tr/~otles/Biyosensorler/turkce/sensorkav.html>)



Şekil 2 Bir biyosensörün genel şematik gösterimi
(<http://eng.ege.edu.tr/~otles/Biyosensorler/turkce/yapi.html>, Erişim tarihi: 6 Şubat 2016)



Şekil 3 Bir biyosensör sisteminin çalışma prensibi

Yeni Gelişmeler

AFM1'in saptanması amacıyla kullanılan yöntemlerde temizleme veya zenginleştirme tekniği önemli bir basamak olarak görülmektedir. Bu doğrultuda çoklu fonksiyona sahip temizleme kolonları ve immunoafinite kolonları (IAC) en çok tercih edilenler arasındadır. OASIS HLB kartuşları da bazı araştırmacılar tarafından HPLC ve MS'nin kombine edildiği teknikler kapsamında sütteki mikotoksinlerin temizlenmesi amacıyla kullanılmış ve sonuçlar tartışmaya açılmıştır. Wang ve ark. (2012), bu çalışmaları takip ederek OASIS HLB kartuşlarını optimize ve valide etmeye yönelik bir araştırma yürütmüş ve bunun sonucunda OASIS HLB'de SPE (Solid Phase Extraction) ve FLD (Fluorescence Detector) ile birlikte HPLC kullanarak uygulaması kolay ve uygun maliyetli bir metod geliştirmişlerdir.

Bacher ve ark. (2012), sütte bulunan AFM1'in saptanabilmesi amacıyla gümüş kablo elektrotu temeline dayanan bir immunosensör sistemi geliştirmişler ve bu alanda kullanılan ELISA ve kromatografik analizlere yüksek duyarlılığı sayesinde iyi bir alternatif olarak sunduklarını ifade etmişlerdir.

Larou ve ark. (2013), AFM1'in saptanmasına yönelik olarak BERA (Bioelectric Recognition Assay) temeline dayanan hızlı ve yeni bir biyosensör sistemini geliştirmeyi amaçladıkları çalışmalarında, toksinin en düşük konsantrasyonlarında dahi üç dakika gibi çok hızlı bir zaman diliminde başarılı sonuçlar elde ettiklerini bildirmişlerdir. Sonuç olarak yöntemin bugün için bilinen diğer biyosensör temelli yöntemlere göre daha duyarlı olduğunu ifade etmişlerdir.

Çeşitli gıda maddelerinde AFM1'in izlenmesi ve takibinin yapılması amacıyla kullanılan yöntemlerde basitlik, yüksek saptama duyarlılığı ve yüksek verimlilik aranan en önemli özelliklerdir. Floresan dedektörlerin kullanıldığı HPLC ve ELISA rutin analizelerde yararlanılan başlıca tekniklerdir. Ancak bilindiği üzere

HPLC kompleks bir uygulamadır oldukça uzun bir zaman gerektirir. Çok fazla enstrümandan yararlanır ve maliyeti yüksektir. Bununla birlikte ELISA bu olumsuzluklardan hiçbirini taşımaz. Bu nedenle yaygın olarak kullanılan standart yöntemdir. Pratik ELISA formatları arasında en yüksek duyarlılığa sahip olanı, ECR (Enhanced Chemiluminescent-CL) reaksiyonunda peroksidaz işaretli immün ayraçların enzim aktivitesinden yararlanılan yöntemdir. Bu reaksiyonun prensibi; geliştiricilerin (enhancer) varlığında luminolun hidrojen peroksit tarafından oksidatif olarak katalize edilmesi temeline dayanır. Vdovenko ve ark. (2014), bu çerçevede CL-ELISA yönteminin AFM1 saptanmasındaki etkinliğini arttırmak amacıyla geliştirici olarak 3 - (10'-phenothiazinyl)-propane-1-sulfonate (SPTZ) ve 4-morpholinopyridine (MORPH) karışımından yararlanılmışlar ve etkili sonuçlar elde etmişlerdir.

Taherimaslak ve ark. (2014), süt örneklerinde AFM1'in saptanması amacıyla geliştirdikleri yöntemde, adsorban olarak modifiye manyetik nanopartiküller kullanmış, floresan geliştirici olarak da β -Cyclodextrin'den yararlanmıştır. Araştırmacılar, SPE ve spektroflometrinin bu yeni tekniğin, klasik SPE'de bir dezavantaj olarak görülen kolondan geçirerek separe etme süresini yaklaşık olarak 15 dakika kadar kısalttığını, uygulamasının kolay ve maliyetinin düşük olduğunu bildirmişlerdir.

Mulunda ve Mike (2014), sütte AFM1'in daha etkin biçimde saptanabilmesi amacıyla immunoafinite kolonları (IAC) ile temizleme prosedürü uygulamışlar ve CoBrA cell ile birlikte sıvı kromatografisi kullanarak analiz gerçekleştirmişlerdir. Araştırmacılar, kullandıkları bu yeni yöntemin başarılı sonuç verdiğini ancak pahalı olduğunu belirtmişlerdir.

AFM1'in saptanması amacıyla kullanılan yöntemler arasında immunokromatografi, uygulama kolaylığı, hızı ve düşük maliyeti nedeniyle son zamanlarda daha fazla

tercih edilir hale gelmiştir. İmmunomanyetik nanobilyeler ise (IMB), analizin duyarlılığını arttırmak üzere, zenginleştirme ve mıknaatısla analitik ayırma basamakları sırasında kullanılan bir ön işlem materyalidir. IMB aynı zamanda immunokromatografide de işaretli materyal olarak kullanım alanına sahiptir. Huang ve ark. (2014), belirtilen tekniklerin literatürdeki uygulamaları ve elde edilen sonuçlardan hareketle, IMB temeline dayanan analiz metodu ile zenginleştirme ve immunokromatografiyi (IMB-EIC) bir araya getirerek yeni bir metod tasarlamışlardır. Öne sürülen bu yeni yöntemde, anti - aflatoksin M1 antikoruyla kaplı immunomanyetik nanobilyeler, EDC/NHS (1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl) karbodiimide/N-hydroxy-succinimide) metoduyla sentezlenmiş ve immunokromatografik strip, konjugat pedi, örnek pedi, adsorban ped ve nitroselüloz membran ile birleştirilmiştir. Nitroselüloz membran; test satırları için aflatoksin M1 – BSA, kontrol satırları için de eşek-anti fare antikorlarıyla spreylemiştir. Saptama işleminde, AFM1'in zenginleştirilmesi ve separe edilmesi amacıyla immunomanyetik nanobilyeler örnekle karıştırılmış, ardından zenginleştirme solüsyonu immunokromatografik strip ile incelenmiştir. Araştırmacılar, işlem sırasında diğer mikotoksinlerle çapraz reaksiyonların meydana gelmeyişi ve ELISA ile uyumlu bir şekilde çalışma potansiyeline sahip olması nedeniyle, uyguladıkları bu yeni tekniği, sütte AFM1'in hızlı bir şekilde saptanmasında iyi bir yöntem olarak ileri sürmüşlerdir.

Huang ve ark. (2015), süt örneklerinden AFM1'in ekstraksiyonu ve saptanması amacıyla HF - LPME (Hollow Fiber – Liquid Phase Microextraction) ile LC-MS/MS (Liquid Chromatography/ Tandem Mass Spectrometry) yöntemlerini birleştirerek kullanmışlar, ekstraksiyonun verimliliğini etkileyen parametreleri değerlendirmişler ve elde ettikleri bulgular ışığında, öne sürdükleri yöntemin AFM1 analizleri için yüksek derecede spesifik özellik gösterdiğini belirtmişlerdir.

AFM1' in saptanması amacıyla çok çeşitli tekniklerden yararlanılmakla birlikte HPLC ve bunu takip eden FL (Fluoremetry) veya MS (Mass Spectroscopy) altın standart olarak kabul edilmektedir. Ancak bu standart yöntemin çok zaman alması, maliyetinin yüksek olması ve laboratuvarlarda uygulama alanının sınırlı olması araştırmacıları yeni metodlar geliştirmeye teşvik etmektedir. Bununla birlikte yeni geliştirilecek olan yöntemin hızlı, güvenilir, doğru, kesin sonuçlar vermesi ve çok düşük miktarları dahi her zaman aynı doğrulukta saptayabilir olması çalışmaların önünde aşılması gereken engeller olarak varlığını sürdürmektedir. Kullanılan teknik her ne olursa olsun, düşük konsantrasyonlardaki Aflatoksinlerin çeşitli gıda ortamlarında saptanabilmesi için örneğin konsantrasyonun artırılması bir gerekliliktir. Bugüne kadar Aflatoksinlerin çeşitli matrislerden ekstrakte ve konsantrasyon artırılması amacıyla pek çok yöntem denenmiştir. DLLME (Dispersive Liquid Liquid Microextraction) bu doğrultuda değerlendirilen yollardan biridir ve ilk kez Rezaee ve ark. (2006), tarafından denenip önerilmiştir. Ancak yöntemin pek çok dezavantajı bulunmaktadır. Bu nedenle yeni bir çalışma tasarlanmış ve bu dezavantajlar ortadan kaldırılmıştır. LDS (Low-Density Solvent) – DLLME'yi takip eden VA-D-SPE (Vortex-Assisted-Dispersive Solid Phase

Extraction) uygulamalarını içeren bu yeni yöntemle etkin, basit ve hızlı bir şekilde doğru sonuçlar elde edilmiştir (Amoli-Diva ve ark. 2015).

Günümüzde immunoaffinite kolonla temizleme yöntemiyle birlikte kullanılan HPLC seperasyonu ve floresanla saptama, AFM1'in rutin analizlerinde halen en sık kullanılan kantitatif yöntemlerden biridir. Mao ve ark.(2015), geleneksel HPLC'deki kromatografi kolonlarını 2,6 µm çaplı core-shell partiküllerle doldurup enstrümantal koşulları optimize ederek, tamamen poröz kolonların kullanıldığı geleneksel yöntemle göre analiz performansını daha yüksek bir seviyeye çıkarmışlardır. Araştırmacılar aynı zamanda, klasik yöntemdeki, ultra yüksek basıncı sağlayan enstrümanlardan kaynaklanan yüksek maliyetin de önüne geçtiklerini belirtmişlerdir. Bu yeni deneme ile enstrüman duyarlılığının artırılmış olması, örnek hazırlamayı da daha basit hale getirmiştir.

Ossa ve Peñuela (2015), dondurma örneklerinde AFM1'in selektif olarak saptanabilmesi amacıyla UHPLC-MS/MS (Ultra High Performance Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry) tekniğini kullanarak duyarlılığı yüksek bir yöntem geliştirmişler ve bu sayede çalışılan örneklerdeki AFM1 düzeylerinin AB yasal düzenlemelerinde belirtilen seviyelerle doğru ve etkin biçimde karşılaştırma olanağı elde etmişlerdir.

Busman ve ark. (2015), süt örneklerinde AFM1'in kantitatif olarak saptanması amacıyla DART (Direct Analysis in Real Time) iyonizasyon tekniğini MS (High Resolution Mass Spectrometer) ile birleştirerek kullanmışlardır. Araştırmacılar elde ettikleri bulgular ışığında, DART tekniğinin, kütle spektrometresi (MS) ile birlikte kullanımının, süt gibi mikotoksinler açısından çalışması zor matrislerde duyarlı, güvenilir ve hızlı sonuçlar verdiğini ifade etmişlerdir.

Lee ve Lee (2015), çeşitli süt ürünlerinde AFM1 ve AFM2'nin varlığını ortaya koymak amacıyla HPLC – FD (High Performance Liquid Chromatography – Fluorescence Detector) tekniğinden yararlandıkları çalışmalarında, örnek hazırlama aşamasında brominasyon ve trifloro asetik asit türevlendirme yöntemlerini karşılaştırmışlar ve brominasyon seçeneğinin daha etkin sonuç verdiğini bildirmişlerdir (Donghun ve Kwang-Geun 2015).

Peynirde aflatoksin M1 ekstraksiyonu genellikle klorlu organik çözücüler kullanılarak yapılır. Ancak, sert yapılı peynirler rendelenseler dahi klorlu çözücüler içerisinde tam olarak yapılarını kaybetmemekte hatta zaman zaman çalkalama sırasında küçük boyutlu çöküntüler oluşabilmektedir. Bu da AFM1 ekstraksiyonunda yöntemin güvenilirliğine gölge düşürmektedir. Bu sorunu gidermek amacıyla AFM1'in EA (Enzyme-Assisted) ekstraksiyonunu takiben IA kolonunu kullanarak ekstraktın temizlenmesi aşamalarını içeren ve devamında HPLC-FLD tekniğini uygulandığı yeni bir yöntem denenmiş ve başarılı sonuçlar elde edilmiştir (Pietri ve ark. 2016).

Zhang ve ark. (2016), sütte AFM1 varlığını tespit etmek amacıyla FM – ICTS (Fluorescent Microsphere Immunochromatographic Test Strip) yöntemini geliştirmişler ve bu amaçla ultrasensitif anti-AFM1 monoklonal antikor (MAb) 1D3'ü hazırlayıp tanımlamışlardır. Monoklonal antikor karboksilat-modifiye floresan mikrosferlerle kovalent olarak konjuge

edilmiş ve yarışmalı immunokromatografi analizinde işaretlemeye kullanılmıştır. Antijen kaplamada hapten-protein çifti oranının orta düzeyde tutulması immunoassay duyarlılığını arttırmıştır. Araştırmacılar sonuç olarak FM-ICTS tekniğinin sütte AFM1 varlığının saptanmasında uygulaması kolay, hızlı, yüksek duyarlılığa sahip ve spesifik olduğunu savunmuşlardır.

AFM1'in Toksisitesi ve Oluşturduğu Hastalıklar

AFB1, memeliler için bilinen en güçlü hepatokarsinojen olup, Uluslararası Kansere Araştırma Kuruluşu (International Agency of Research on Cancer, IARC) tarafından 1A kategorisinde karsinojen olarak sınıflandırılmaya alınmıştır (IARC 2002). Aflatoxin B1'in metaboliti olan aflatoxin M1 ise insanlar için muhtemel karsinojen olarak gruplandırılmış ve Grup 2B sınıfında yer almıştır (IARC, 1993). Daha sonra yapılan yeni bir sınıflandırma ile süt toksini olarak da isimlendirilen AFM1, en güçlü karsinojenleri içeren Grup 1 içerisinde yeniden değerlendirilmiştir (IARC, 2002).

AFB1'in toksik ve karsinojenik etkileri için temelde hedef organlar karaciğer ve böbrek olmakla birlikte intestinal tümörlere de neden olabildiği bildirilmektedir. Farklı hayvan türlerinde yapılan deneysel çalışmalar, hepatotoksik, hepatokarsinojenik ve teratojenik etkileri açıkça ortaya koymuştur (Yentür ve Er, 2012).

Genel olarak AFB1'in monohidroksile metabolitleri detoksifiye edilmiş olarak kabul edilir. Ancak AFM1 bu kapsamda değerlendirilemez. Yapılan deneysel çalışmalar AFM1'in sitotoksik ve karsinojenik etkilerinin yanı sıra karaciğer ve böbrek lezyonlarının, AFB1 ile benzerlik gösterdiğini ortaya koymuştur (Diaz ve Murcia, 2011).

Bunun yanında, süt yoluyla AFM1 ya da yan ürünlerine maruz kalan bebeklerde düşük vücut ağırlığı, gelişim bozukluğu, bazı yaşamsal organ ve dokuların özellikle merkezi sinir sistemi gelişiminin tamamlanamaması, enfeksiyon hastalıklarına duyarlılık ve metabolizma hızında artış kendini gösterebilmektedir (IARC, 2002; Adejumo ve ark., 2013; Shuaib ve ark., 2010).

AFM1'in Stabilitesi Ve Redüksiyonu

Yapılan bir çalışmada test edilen probiyotik bakteriler (*Bifidobacterium longum*, *Bifidobacterium species* 420, *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus acidophilus* NFCM 150B, *Lactobacillus casei*, *Shirota*, *Lactobacillus rhamnosus*) varlığında AFM1 biyoerisebilirliğinin % 15,5i - 31,6 oranında azaldığı gözlenmiştir (Kabak ve Ozbey, 2012)

Bir diğer çalışmada ise laktik asit bakterilerinin farklı suşlarının (*Lactobacillus acidophilus* ATCC 20552, *Lactobacillus rhamnosus* TISTR 541, *Lactobacillus plantarium*, *Streptococcus thermophilus*, *Lactobacillus delbrueckii spp. bulgaricus*) ve bifidobakterilerin varlığında (*Bifidobacterium angulatum* DSMZ 20098), yoğurttan AFM1'in indirgenebilirliği incelenmiş, kontamine sütle üç farklı uygulama gerçekleştirilmiştir. Araştırmada en başarılı sonuç %50 yoğurt kültürü (*Streptococcus thermophilus* ve *Lactobacillus bulgaricus*) ve 50% *Lactobacillus plantarium* ile yapılan uygulamada elde edilmiştir (Elsanhoty ve ark. 2014).

Govaris ve ark. (2002), 0,05 ve 0,1 µg/l konsantrasyonlarında AFM1 inokule edilen yoğurttta 4 hafta boyunca 4°C'de pH 4 - 4,6 değerlerinde AFM1'in stabilitesini incelemişlerdir. pH 4,6'da AFM1 değerlerinin önemli ölçüde değişmediğini ancak pH 4,0'da depolamanın üçüncü ve dördüncü haftalarında AFM1'in her iki konsantrasyon seviyelerinde düşüş olduğunu belirlemişlerdir. Araştırmacılar AFM1 konsantrasyonlarındaki bu düşüşün düşük pH'dan, organik asitlerin oluşumundan ya da fermentasyonun diğer yan ürünlerinden hatta *Lactobacillus* türlerinden kaynaklandığını öne sürmüşlerdir (Govaris ve ark., 2002).

Carraro ve ark. (2014), sığır sütlerinde AFM1 oranını azaltmak için kilden yararlanmayı denemişlerdir. Bu çalışmada, alüminyum ve magnezyum içeriği zengin volkanik kül, tüf ve lavların kimyasal ayrışmasıyla veya bozulmasıyla oluşan; suyu emince, kabarıp şişen ve jelimsi bir kitle meydana getiren; iyon (katyon) değiştirme kapasitesi yüksek, sindirim sistemindeki bakterileri, parazitleri ve toksinleri mıknaş gibi çeken bir sünger özelliğine sahip bentoniti kullanmışlardır (Kayır, 2007).

Yemeklik yağlarda saflaştırma işleminde ağartıcı olarak ve bira, şarap, maden suyu, meyve suyu üretiminde berraklaştırıcı olarak kullanılan bentonitin (Kayır, 2007), sığır sütündeki AFM1 değerlerini (yaklaşık 80ng/l'ye kadar) güvenilir seviyeye kadar (yetişkinler için 50ng/l, süt emen çocuklar için 0,25ng/l) düşürdüğünü tespit etmişler ve sütün besinsel değerlerinde önemsiz değişikliklere yol açtığını gözlemlemişlerdir (Carraro ve ark., 2014).

Catteneo ve ark. (2013) Ricotta peyniri üretiminde açığa çıkan peynir altı suyunda ve proteinden arındırılmış peynir altı suyunda AFM1'in stabilitesini incelemişlerdir. Ricotta peyniri üretimi sırasında AFM1'in %94'ü atık peynir altı suyuyla uzaklaştırılmış, sadece %6'sı pıhtıda kalmıştır. Daha sonra peynir altı sularına ultrafiltrasyon ve püskürtmeli kurutma işlemleri uygulanmış ve başarılı sonuç elde edilmiştir.

AFM1'e İlişkin Yasal Düzenlemeler

Ülkemizde ve bazı dünya ülkelerinde süt ve süt ürünlerinde AFM1'in maksimum limitleri Tablo 1'de sunulduğu gibidir.

Sonuç

Dünyanın farklı bölgelerinden bildirilen raporlar, hayvan yemlerindeki AFB1 ile süt ve süt ürünlerindeki AFM1 sorununun günümüzde halen ciddiyetini koruduğuna işaret etmektedir ve ne yazık ki toksine maruz kalınması ile ilişkilendirilen her yıl onlarca hastalık vakası kayıtlara geçmeyi sürdürmektedir.

Durum onu göstermektedir ki, hayvan yemlerinin küflenmesinin önüne geçilmediği ve toksinli rasyonla beslemeye devam edildiği sürece, sütle AFM1 atılımı devam edecektir. Bugün için, alternatif yeni yöntemlerle çalışmalar sürüyor da olsa, pastörizasyon ya da sterilizasyon gibi ısı işlemleri sütler bu anlamda güvenli hale getirilememektedir. Dolayısıyla eğer sütte AFM1 var ise, tüketen bireyin vücuduna aynen taşınacağı açıkça görülmektedir. Toksinin, Uluslararası Kansere Araştırma Ajansı (IARC) tarafından AFB1 ile birlikte en güçlü

karsinojenleri içeren Grup1 içerisinde değerlendirildiği de düşünülürse, özellikle 3 yaş altı çocukların ana besin kaynağını oluşturan ve yetişkinlerin diyetinde de önemli bir yer tutan süt ve süt ürünlerinin, halk sağlığını nasıl tehdit ettiği gözler önüne serilecektir. Bu tehlikenin önlenmesi amacıyla ülkeler, yasaları bünyesinde düzenlemeler getirmiş durumdadır.

Konunun ekonomik boyutu da göz ardı edilmemelidir. Zira yasal limitleri aşan oranlarda kontaminasyona sahip yem veya gıda maddeleri, ithalat ve ihracat sırasında kabul görmemekte ve uluslararası ticaret olumsuz yönde etkilenmektedir.

Yapılan araştırmalar, kontamine ürünlerin saptanması sırasında da sıkıntılar yaşandığına işaret etmektedir. Zira halihazırdaki yöntemlerin önemli çoğunluğu hem zaman alıcı hem de yüksek maliyetlidir.

Sonuç olarak, halk sağlığının korunması için öncelikle, yem-hayvan-hayvansal ürün-insan zincirinin bir noktada kırılması zorunludur. Yemlerin küflenmesi ve toksin ile kontaminasyonunun nasıl önleneceği açıkça bilinmektedir, konuya titizlikle yaklaşılması ve duyarlı olunması, sorunu en başında çözecektir. Eğer bu mümkün

olamıyorsa, en azından daha hızlı ve daha uygun maliyetli yeni yöntemler geliştirip yaygınlaştırarak, kontamine gıdalar doğru ve etkin biçimde saptanmalı ve bunların sofralara ulaşması engellenmelidir. Bunun yanında, süt ve ürünlerindeki detoksifikasyon denemeleri de oldukça önemlidir. Ne yazık ki sözü edilen zincirin her aşamasında yer alan eksiklikler, AFM1 probleminin uzun bir süre gündemde kalacağını göstermektedir.

Öncelikle tarladan başlamak üzere Aflatoksinlerin hayvan diyetinde yer alan yemlerde üremeleri ve AFB1 sentezlemeleri önlenmeli, yemler uygun koşullarda taşınmalı ve depolanmalıdır. Bu konuda çiftçilerden üreticilere, yem işlenmesinde çalışan personelden tüketiciye kadar halkın tamamının bilinçlendirilmesi gereklidir. AFB1 oluşumunun önüne geçilmelidir. Her ne kadar AFM1'in detoksifikasyonu için yoğurtta LAB ile yapılan çalışmalar pozitif sonuçlansa da ve sütte bentonit kullanımıyla indirgeme gerçekleştirilse de, bu iki yöntem henüz deneme aşamasındadır. Bu konuda bilimsel çalışmalar yürütülmeye devam edilmeli, yapılan incelemeler ileriki boyutlara taşınmalı, bilim adamlarına her türlü teknik ve ekonomik güvence sağlanmalıdır.

Tablo 1. Süt ve süt ürünlerinde AFM1'in maksimum limitleri*

Ülke	Süt (µg/Kg)	Süt Ürünleri (µg/Kg)
Türkiye	0,05 (Çiğ süt, ısıtılmış süt, süt bazlı ürünlerin üretiminde kullanılan süt)	-
Abd	0,50	0,50
Ab ^a	0,05	0,05
Avusturya	0,05 (0,01-pastörize bebek sütü)	0,02 (Tereyağ) 0,25 (Peynir) 0,4 (Süt tozu)
Fransa	0,05 (0,03-3 yaş altı çocuk için)	-
İsviçre	0,05	0,025 (Peynir altı suyu ve ürünleri) 0,25 (Peynir) 0,02 (Tereyağ)
Bulgaristan	0,50	0,10 (Süt tozu)
Brezilya	0,50	5,0 (Süt tozu)
Çek Cumhuriyeti	0,05	-
Romanya	0	0
Arjantin	0,05	0,50 (Tüm süt ürünleri)
Honduras	0,05	0,25(Peynir)
Mısır	0	0
Nijerya	1	-
İran	0,50	-
Kore	0,5 µg/l	-
Fas	0,05 0,03 (Üç yaşın altındaki çocuklarda)	0,05 0,5 (Süt tozu) 0,03 (Süt tozu – üç yaşın altındaki çocuklarda)
Avustralya	0,02 (Çocuk sütlerinde)	-

*(Oliveria ve ark. 2013, Iqbal ve ark. 2015, Mohammadi 2011, T.C. Resmî Gazete, 29 Aralık 2011, sayı: 28157) ^a: AB ülkeleri genel

Kaynaklar

- Adejumo O, Atanda O, Raiola A, Somorin Y, Bandyopadhyay R, Ritieni A. 2013. Correlation between aflatoxin M1 content of breast milk, dietary exposure to aflatoxin B1 and socioeconomic status of lactating mothers in Ogun State, Nigeria. Food and Chemical Toxicology, 56: 171 – 177.
- Amoli - Diva M, Taherimaslak Z, Allahyari M, Purghazi K, Manafi MH. 2015. Application of dispersive liquid - liquid microextraction coupled with vortex - assisted hydrophobic magnetic nanoparticles based solid - phase extraction for determination of aflatoxin M1 in milk samples by sensitive micelle enhanced spectrofluorimetry. Talanta, 134: 98-104.
- Aycicek H, Aksoy A, Saygı S. 2005. Determination of aflatoxin levels in some dairy and food products which consumed in Ankara, Turkey. Food Control, 16 (3) : 263-266.
- Bacher G, Pal S, Kanungo L, Bhand S. 2012. A label-free silver wire based impedimetric immunosensor for detection of aflatoxin M1 in milk. Sensors and Actuators B, 168 : 223-230.
- Bakırcı TG. 2014. Tahıl ve tahıl ürünlerinin aflatoxin, okratoksin a, zearalenon, fumonisin ve deoksinivalenol mikotoksinleri yönünden incelenmesi. Akademik Gıda 12(2): 46-56.

- Bilandžić N, Božić D, Dokić M, Sedak M, Kolanović BS, Varenina I, Cvetnić Z. 2014. Assessment of aflatoxin M1 contamination in the milk of four dairy species in Croatia. *Food Control*, 43: 18-21.
- Busman M, Bobell JR, Maragos CM. 2015. Determination of the aflatoxin M1(AFM1)from milk by direct analysis in real time – mass spectrometry (DART – MS). *Food Control*, 17: 592-598.
- Chambers JP, Arulanandam BP, Matta LL, Weis A, Valdes JJ. 2008. Biosensor recognition elements. *Curr Issues Mol Biol*, 10(1-2): 1-12.
- Carraro A, Giacomo AD, Giannossi ML, Medici L, Muscarella M, Palazzo L, Quaranta A, Summa V, Tateo F. 2014. Clay minerals as adsorbents of Aflatoxin M1 from contaminated milk and effects on milk quality. *Applied Clay Science*, 88-89 : 92-99.
- Cattaneo TMP, Marinoni L, Iametti S, Monti L: Behaviour of Aflatoxin M1 in dairy wastes subjected to different technological treatments: Ricotta cheese production, ultrafiltration and spray-drying. *Food Control*, 32: 77-82.
- Diaz JG, Murcia WH: Biotransformation of Aflatoxin B1 and its relationship with the differential toxicological response to aflatoxin in commercial poultry species, *Aflatoxins – Biochemistry and Molecular Biology*, Dr. Ramon G. Guevera-Gonzalez(Ed), ISBN: 978-953-307-395-8, 2011. *oç. Erişim tarihi: 5.02.2016.*
- Dimitrieska - Stojkovi E, Stojanovska-Dimzoska B, Ilievska G, Uzunov R, Stojkovi G, Hajrulai-Musliu Z, Jakuzi D. 2016. Assessment of aflatoxin contamination in raw milk and feed in Macedonia during 2013. *Food Control*, 59: 201-206.
- Donghun L, Kwang – Geun L. 2015. Analysis of aflatoxin M1 ve M2'in commercial dairy products using high-performance liquid chromatography with a fluorescence detector. *Food Control*, 50: 467- 471.
- Duarte S.C, Almedia A.M, Teixeira A.S, Pereira A.L, Falcão A.C, Pena A, Lino C.M. 2013. Aflatoxin M1 in marketed milk in Portugal: Assessment of human and animal exposure. *Food Control*, 30: 411-417.
- Elsanhoty RM, Salam SA, Ramadan MF, Badr FH. 2014. Detoxification of aflatoxin M1 in yoghurt using probiotics and lactic acid bacteria. *Food Control*, 43: 129-134.
- Ergun B, Altuokka G, Atkoşar Z. 2006. Aflatoxinler : Tayin yöntemleri üzerine. *Anadolu Üniversitesi Bilim ve Teknoloji Dergisi*, 7(1) : 75-81.
- Fallah AA. 2010. Aflatoxin M1 contaminantion in diary products marketed in Iran during winter and summer. *Food Control*, 21 (11) : 1478-1481.
- Fallah AA. 2010. Assessment of Aflatoxin M1 contaminantion in pasteurized and UHT milk marketed in central part of Iran. *Food and Chemical Toxicology*, 48: 988 – 991.
- Girgin G, Başaran N, Şahin G. 2001. Dünyada ve Türkiye’de insan sağlığını tehdit eden mikotoksinler. *Türk Hij Den Biyol Derg.* 58(3): 97-118.
- Golge Ö. 2014. A survey on the occurrence of aflatoxin m1'in raw milk produced adana province of Turkey. *Food Control*, 45: 150 – 155.
- Govaris A, Roussi V, Koidis PA, Botsoglou NA. 2002. Distribution and stability of Aflatoxin M1 during production and stability of yoghurt. *Food Additives and Contaminants*, 19(11): 1043-1050.
- Huang S, Hu D, Wang Y, Zhu F, Jiang R, Ouyang G. 2015. Automated hollow-fiber liquid-phase microextraction coupled with liquid chromatography / tandem mass spectrometry for the analysis of aflatoxin M1 in milk. *Journal of Chromatography A*, 1416: 137-140.
- IARC. 1993. Some naturally occurring substances – food items and constituents, heterocyclic aromatic amines and mycotoxins. *IARC Monogr Eval Carcinog Risk Hum*, Lyon, France, 56: 245-391. <http://monographs.iarc.fr/ENG/Monographs/vol56/>. Erişim tarihi: 10.02.2016.
- IARC. 2002. Some traditional herbal medicines, some mycotoxins, natphtalene and styrene. *IARC Monogr Eval Carcinog Risk Hum*, Lyon,France, volume 82. <http://monographs.iarc.fr/ENG/Monographs/vol82/>. Erişim tarihi: 10.02.2016.
- Ismail A, Rıza M, E.Levin R, Aktar S, Gong YY, Hameed A. 2016. Seasonal prevalence level of aflatoxin M1 and its estimated daily intake in Pakistan. *Food Control*, 60: 461-465.
- Kabak B, Ozbey F. 2012. Aflatoxin M1'in UHT milk consumed in Turkey and first assessment of its bioaccessibility using an in vitro gestion model. *Food Control*, 28: 338-344.
- Kamber U. 2005. Aflatoxin M₁ Contamination of Some Commercial Turkish Cheeses From Markets in Kars, Turkey. *Fresenius Environmental Bulletin*, 14: 11.
- Kayır ZY. 2007. *kosgeb Sincan İşletme Geliştirme Merkezi Ankara.*
- Larou E, Yikaoumettis I, Kaltsas G, Petropoulos A, Skandamis P, Kintzios S. 2013. High throughput cellular biosensor for the ultra-sensitive, ultra-rapid detection of Aflatoxin M1. *Food Control*, 29: 208-212.
- Londoño VAG, Boasso A, Paula MCZ, Garcia LP, Scussel VM, Resnik S, Pacín A. 2013. Aflatoxin M1 survey on randomly collected milk powder commercialized in Argentina and Brazil. *Food Control*, 34: 752 – 755.
- Malissiova E, Tsakalof A, Arvanitoyannis I.S, Katsafliaka A, Katsioulis A, Tserkezou P, Govaris A, Hadjichristodoulou C. 2013. Monitoring Aflatoxin m1 levels in ewe's and goat's milk in Thessaly, Greece; potential risk factors under organic and conventional production scheme's. *Food Control*, 34: 241- 248.
- Mao J, Lei S, Liu Y, Xiao D, Fu C, Zhong L, Okuyan H. 2015. Quantification of aflatoxin M1 in raw milk by a core-shell column on a conventional HPLC with large volume injection and step gradient elution. *Food Control* 51: 156-162.
- Marnissi EIB, Belkhou R, Morgavi DP, Benjamin L, Bora H. 2012. Occurrence of aflatoxin M1 in raw milk collected from traditional dairies in Morocco. *Food and Chemical Toxicology*, 50: 2819 – 2821.
- Mahindru SN: *Food Contaminants- Origin, Propagation and Analysis*, A.P.H Publishing Corporation, New Delhi.p.235-236, 2009. <https://books.google.com.tr/books?id=yg4P9TUoz4C&pg=PA235&dq=Contamination+Branch+method&hl=tr&sa=X&ved=0ahUKEwim5baNnO7KAhVKExoKHQp6DqAQ6AEIGzAA#v=onepage&q=Contaminantion%20Branch%20method&f=false>. Erişim tarihi: 10.02.2016.
- Mohammadi H: *A Review of Aflatoxin M1, Milk, and Milk Products*, *Aflatoxins – Biochemistry and Molecular Biology*, Dr.RamonG.Guevara-Gonzales(Eds),ISBN:978-953-307-395-8,2011. <http://www.intechopen.com/books/aflatoxins-biochemistry-and-molecular-biology/a-review-of-aflatoxin-m1-milk-and-milk-products> . Erişim tarihi: 5.02.2016.
- Mulunda M, Mike D. 2014. Occurrence of Aflatoxin M1 from rural subsistence abd commercial farms from select areas of South Africa. *Food Control*, 39: 92-96.
- Oliveria CP, Soares NFF, Oliveria TV, Júnior J.C.B, Silva, WA. 2013. Aflatoxin M1 occurrence in ultra high temperature (UHT) treated fruit milk from Minas Gerais / Brazil. *Food Control*, 30: 90-92.
- Ossa DEH, Hincapié DA, Penuéla GA. 2015.Determinatiopon of Aflatoxin M1'in ice cream samples using immunoaffinity column and ultra-highperformance liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry. *Food Control*, 56: 34- 40.
- Ötle S. *Biosensors*, <http://eng.ege.edu.tr/~otles/Biyosensorler/turkce/sensorkav.html>. Erişim tarihi: 6 Şubat 2016a. *Biosensors*, <http://eng.ege.edu.tr/~otles/Biyosensorler/turkce/yapi.html>. Erişim tarihi:6 Şubat 2016b.

- Özkaya Ş, Temiz A. 2013. Aflatoksinler : Kimyasal Yapıları, toksisiteleri ve detoksifikasyonları. Orlab On-Line Mikrobiyoloji Dergisi [Elektronik Dergi], 1(1) : 1-21, 2013. www.mikrobiyoloji.org/pdf/702030101. Erişim tarihi: 4.01.2016.
- Pietri A, Fortunati P, Mulazzi A, Bertuzzi T. 2016. A direct competitive chemiluminescent enzyme - linked immunosorbent assay (CL - ELISA) for detecting aflatoxin M1 was developed. Food Chemistry, 192: 235 – 241.
- Rama A, Latifi F, Bajraktari D, Ramadani N. 2015. Assessment of aflatoxin M1 levels in pasteurized and UHT milk consumed in Prishtina, Kosova. Food Control, 57: 351-354.
- Scaglioni PT, Becker - Algeri T, Drunkler D, Bediale - Furlong E. 2014. Aflatoxin B1 ve M1. Analytical Chemical Acta, 829: 68 – 74.
- Sezer Ç, Aksoy A, Vatansver L, Bilge N. 2014. Kars İlinde Satışa Sunulan Dondurmalarda Aflatoksin M1 Varlığının Belirlenmesi. İstanbul Üniversitesi Veterinerlik Fakültesi Dergisi, 40(1): 90-94.
- Shuaib FMB, Ehiri J, Abdullahi A, Williams JH, Jolly P. 2010. Reproductive health effects of aflatoxin: A review of the literature. Reproductive Toxicology, 29: 262-270.
- Silva MV, Janeiro V, Bando E, Machinski Jr M. 2015. Occurrence and Estimative of Aflatoxin M1 intake in UHT cow milk in Paraná State, Brazil. Food Control, 53: 222-225.
- T.C. Resmi Gazete, Türk Gıda Kodeksi Bulaşanlar Yönetmeliği, 29 Kasım 2011, Başbakanlık Basımevi Döner Sermaye İşletmesi Müdürlüğü, Ankara
- Tekinşen KK, Uçar G. 2008. Aflatoxin M1 levels in butter and cream cheese consumed in Turkey. Food Control 19 (1): 27-30.
- Tomasevic I, Petrovic J, Jovetic M, Raicevic S, Milojevic M, Miodinovic J. 2015. Two year survey on the occurrence and seasonal variation of aflatoxin M1 in milk and milk products in Serbia. Food Control, 56: 64 – 70.
- Tsakaris NI, Tzatzarakis NM, Alegakis KA, Vlachio MI, Renieri EA, Tsatsakis AM. 2013. Risk Assessment Scenarios of children's Exposure to aflatoxin M1 residues in different milk types from the Greek market. Food and Chemical Toxicology, 56: 261-265.
- Var A, Kabak B, Özkarslı M. 2004. Mikotoksin aranmasında kullanılan analiz yöntemleri Orlab On-Line Mikrobiyoloji Dergisi [Elektronik Dergi], 2(11) : 1-11, www.mikrobiyoloji.org/pdf/702041101. Erişim tarihi: 4.01.2016.
- Vdovenko MM, Lu C-C, Yu F-Y, Sakharov IY. 2014. Development of ultrasensitive direct chemiluminescent enzyme immunoassay for determination of aflatoxin M1 in milk. Food Chemistry, 158: 310-314.
- Wang Y, Liu X, Xiao C, Wang Z, Wang J, Xiao H, Cui L, Xiang Q, Yue T. 2012. Determination of Aflatoxin M1 in liquid milk and milk powder using solid phase extraction on OASIS HLB. Food Control, 28 :131-134.
- Xiang JL, Wang YM, Ma MR, Liu JX. 2013. Seasonal variation of aflatoxin M1 in raw milk from Thé Yangzte River Delta Region of China. Food Control, 34: 703-706.
- Yaroğlu T, Oruç HH, Tayar M. 2005. Aflatoxin M1 levels in cheese samples from some provinces of Turkey. Food Control, 16 (10): 883-885.
- Yentür G, Er B. 2012. Gıdalarda aflatoxin varlığının değerlendirilmesi. Türk Hijyen ve Deneysel Biyoloji Dergisi, 69(1) : 41-52.
- Zafar IS, Rafique MA. 2013. Assessment of aflatoxin in milk and milk products from Punjab, Pakistan. Food Control, 30: 235-239.
- Zhang X, Wen K, Jiang H, Beier RC, Shen J: An ultrasensitive monoclonal antibody – based fluorescent microsphere immunochromatographic test strip assay for detecting aflatoxin M1 in milk. Food Control, 60: 588-595
- Zhu J, Zhang L, Hu X, Xiao Y, Chen J, Xu Y, Freymy J, Chu FS, Correlation of Dietary Aflatoxin B₁ Levels with Excretion of Aflatoxin M₁ in Human Urine Cancer Res, 47: 1848-1852, 1987. <http://cancerres.acrjournals.org/content/47/7/1848>. Erişim tarihi: 4.02.2016