Univerzita Hradec Králové

Přírodovědecká fakulta

Katedra biologie

Stanovení mykotoxinu ochratoxinu A ve vzorcích jelit metodou HPLC-FLD

Diplomová práce

Autor: Bc. Petra Mikysková

Studijní program: N0588A030001

Studijní obor: Biologie a ekologie – experimentální biologie

Vedoucí práce: RNDr. Jakub Toman, Ph.D.

Hradec Králové 2022

Prohlášení:

Prohlašuji, že jsem diplomovou práci zpracovala samostatně s použitím uvedené literatury.

V Hradci Králové dne Petra Mikysková

Poděkování:

Především bych chtěla poděkovat vedoucímu mé diplomové práce RNDr. Jakubovi Tomanovi, Ph.D. za jeho nesmírnou ochotu, vstřícnost a odborné vedení práce. Děkuji za veškerou pomoc a čas, který se mnou strávil při práci v laboratoři. Dále bych chtěla poděkovat Mgr. Darině Pickové, která mi též byla v laboratoři mnohokrát nápomocná. Oběma děkuji za jejich profesionalitu a lidský přístup.

Zvláštní poděkování patří mé rodině a příteli za neustálou podporu a trpělivost nejen při psaní této práce, ale i po celou dobu studia.

Anotace

MIKYSKOVÁ, P., 2022: *Stanovení mykotoxinu ochratoxinu A ve vzorcích jelit metodou HPLC-FLD*. Hradec Králové, 2022. Diplomová práce na Přírodovědecké fakultě Univerzity Hradec Králové, 79 s.

Cílem této diplomové práce je stanovit mykotoxin ochratoxin A u 200 vzorků jelit zakoupených na českém trhu v roce 2020/2021. Jelito je masný výrobek z vepřového masa, vnitřností a krve, dále obsahuje kroupy nebo drobné kousky pečiva a různé směsi koření. Všechny tyto složky mohou být potencionálními zdroji dietární expozice mykotoxinu ochratoxinu A.

Každý, kdo konzumuje maso a vnitřnosti zvířat, jež byly krmeny zaplísněným krmivem je vystaven riziku. OTA se kumuluje v krvi a vnitřnostech zvířat, jež byli takto krmeny. Následně se pak tyto suroviny dostávají do zabijačkových produktů a po konzumaci je spotřebitel exponován toxickým účinkům OTA, který je dáván do souvislosti s nefropatií.

Ke stanovení OTA ve vzorcích jelit byla použita analytická metoda vysokoúčinné kapalinové chromatografie s fluorescenční detekcí (HPLC-FLD) s předúpravou na imunoafinitních kolonkách.

Klíčová slova

Ochratoxin A, OTA, mykotoxin, kontaminace, živočišné produkty

Annotation

MIKYSKOVÁ, P., 2022: *Determination of mycotoxin ochratoxin A in blood sausages samples by HPLC-FLD method*. Hradec Králové, 2022. Diploma Thesis at Faculty of Science. University of Hradec Králové, 79 s.

The aim of the diploma thesis is to determine the mycotoxin ochratoxin A in 200 samples of blood sausages purchased on the Czech market in 2020/2021. Blood sausage is a meat product made from pork, porcine offal and blood, in addition it contains groats or small pieces of white bread and various spice mixtures. All of these components may be potential sources of dietary exposure to ochratoxin A.

Anyone who consumes meat and offal of animals that have been fattened with moldy feed is at risk. OTA accumulates in the blood and intestines of animals that have been fattened with, for example, moldy bread. Subsequently, it gets into blood products and after consumption, the consumer is exposed to the toxic effects of OTA, which is associated with kidney cancer.

An analytical method of high-performance liquid chromatography with fluorescence detection and pretreatment on immunoaffinity columns was used to determine OTA in blood sausages.

Keywords

Ochratoxin A, OTA, mycotoxin, contamination, animal products

Obsah

1 Úvod a cíle práce 12

2 Teoretická část 13

2.1 Mykotoxiny 13

2.1.1 Mykotoxiny v krmivech 15

2.1.2 Legislativa mykotoxinů v krmivech 16

2.1.3 Limity a směrné hodnoty pro vybrané mykotoxiny v krmivech 17

2.1.4 Vliv mykotoxinů na zdraví zvířat 19

2.2 Ochratoxin A 21

2.2.1 Chemické a fyzikální vlastnosti OTA 21

2.2.2 Producenti OTA 23

2.2.3 Toxicita OTA 24

2.2.4 Výskyt OTA v potravinách a jeho regulace 26

2.2.5 Posouzení rizika expozice člověka OTA při konzumaci potravin 30

2.3 Jelita a související krevní produkty 31

2.3.1 Obecný proces výroby jelit 31

2.3.2 Mezinárodní složení jelit 32

3 Metodika 34

3.1 Základní chemikálie 34

3.2 Roztoky 34

3.3 Spotřební materiál 35

3.4 Přístroje a pomocná zařízení 35

3.5 Použité programy a software 36

3.6 Požadavky na pracovní techniku 37

3.7 Princip metody 38

3.7.1 HPLC-FLD 38

4 Pracovní postup 40
4.1 Odběr, doprava a skladování vzorků 40
4.2 Úprava a homogenizace 40
4.3 Extrakce a příprava vzorků k analýze 41
4.4 Dekontaminace laboratorního skla 42
4.5 Chromatografický postup a analýza OTA na HPLC-FLD 43
4.5.1 Podmínky stanovení 43
4.6 Kalibrace 44
4.6.1 Kalibrační křivka 44
4.6.2 Slepý vzorek 44
4.7 Validované parametry 44
4.7.1 Opakovatelnost retenčního času 44
4.7.2 Linearita 44
4.7.3 Mez detekce a mez stanovitelnosti 45
4.7.4 Opakovatelnost stanovení 45
4.7.5 Výtěžnost metody 45
4.8 Způsob zapisování primárních dat 45
5 Výsledky 46
6 Diskuse 48
7 Závěr 50
8 Seznam literatury 51
9 Přílohy 61

Seznam obrázků

Obrázek 1 Strukturní vzorec OTA (Mikysková, 2022) 22
Obrázek 2 Obecný princip imunoafinitní chromatografie (Mikysková, 2022). 39
Obrázek 3 Rozmražené jelito připravené na nařezání na menší kusy 61
Obrázek 4 Kusy jelita připravené k homogenizaci 61
Obrázek 5 Homogenizátor A a B 62
Obrázek 6 Jelito po procesu homogenizace 62
Obrázek 7 5 g vzorku navážených do konických plastových nádobkách 63
Obrázek 8 Filtrace vzorku na filtračním zařízení Morton s fritou S3 63
Obrázek 9 Filtráty jednotlivých vzorků 64
Obrázek 10 Filtráty zředěné PBS na vakuovém prosávacím zařízení 64
Obrázek 11 Eluce okyseleným metanolem 65
Obrázek 12 Odpařování eluátu dusíkem pomocí koncentrátoru vzorků EVATERM 65
Obrázek 13 Rozpouštění odparku v mobilní fázi pomocí ultrazvuku 66
Obrázek 14 Filtrace vzorku přes membránový filtr a příprava kalibrační řady 66
Obrázek 15 Sekvence vzorků včetně kalibrační řady a blanku 67
Obrázek 16 HPLC 67

Seznam tabulek

Tabulka 1 Limity pro aflatoxin B1 v krmivech, (Florián, 2013). 17
Tabulka 2 Směrné hodnoty pro OTA v krmivech, (Florián, 2013). 17
Tabulka 3 Směrné hodnoty pro deoxynivalenol v krmivech, (Florián, 2013). 18
Tabulka 4 Směrné hodnoty pro fumonisin B1+B2 v krmivech, (Florián, 2013). 18
Tabulka 5 Směrné hodnoty pro zaralenon v krmivech, (Florián, 2013). 18
Tabulka 6 Toxinogenní plísně rodu *Aspergillus* a *Penicillium* produkující OTA (Ostrý *et al*., 2013). 23
Tabulka 7 Platné maximální limity OTA v potravinách a krmivech pro ČR (Evropská komise, 2006; 2010; 2012; 2015) 27
Tabulka 8 Navrhované limity pro OTA v potravinách diskutované Evropskou Komisí (MZe, Odbor bezpečnosti potravin, 2021). 28
Tabulka 9 Jednotlivé národní maximální limity OTA v potravinách živočišného původu v zemích EU (Vila-Donat *et al*., 2018). 30
Tabulka 10 Lokální název a složení jelit v některých zemích (AtlasMedia Ltd., 2022; Meatsandsausages, 2020; Guise Bule, 2019). 33
Tabulka 11 HPLC-FLD podmínky 43
Tabulka 12 Koncentrace OTA ve vzorcích jelit. 46
Tabulka 13 Statistické zpracování dat ve vzorcích jelit 47

Terminologický slovník

Agens	Původce, činitel, vyvolavatel onemocnění.
Analyt	Konkrétní látky/složky vzorku, které mají být chromatograficky rozděleny, a to na základě rozdílné distribuce mezi mobilní a stacionární fází.
Embryotoxický	Mít toxický účinek na embryo (zárodek).
Genotoxický	Mít toxický účinek na genetický materiál
Hepatotoxický	Mít toxický účinek na jaterní tkáň.
Difundovat	Pohybovat se, prostupovat.
Imunotoxický	Mít toxický účinek na imunitní systém.
Imunosupresivní	Snížení obranyschopnosti organismu a náchylnosti k řadě onemocnění, zvláště u starších osob a dětí.
In vitro	„Ve skle“- ve zkumavce, v laboratoři, mimo živý organismus.
In vivo	„V živém“ – v živém organismu, lidském nebo zvířecím.
Karcinogenní	Způsobující rakovinové bujení.
Mez detekce	Nejnižší koncentrace analytu, kterou lze danou vyšetřovací metodou prokázat.
Mez Stanovitelnosti	Nejnižší koncentrace analytu, kterou lze vyšetřovací metodou stanovit s požadovanou hodnotou nejistoty měření.
Mobilní fáze	Neboli eluent, je fáze (kapalina) pohybující se chromatografickým systémem. Přivádí vzorek do stacionární fáze.
Nefrotoxiciký	Mít toxický účinek na ledvinovou tkáň a vylučovací systém.
Neurotoxický	Mít toxický účinek na nervovou soustavu.
Screening	Vyhledávání určitých onemocnění. Cílem je onemocnění najít a léčit dříve, než se projeví.
Sekundární metabolit	Organické látky vznikající v těle organismů (především rostlin, hub, bakterií, ale i některých živočichů), které nejsou přímo zahrnuty do procesu růstu, vývoje či rozmnožování daného organismu.
Stacionární fáze	Fáze ukotvená na místě, prochází přes ni mobilní fáze a složky vzorku.
Standard	Vzor, který umožňuje kvalitativní i kvantitativní porovnání
Synergismus	Společné působení, působení stejným směrem, spolupráce.
Toxigenní	Produkující toxin.
Teratogenní	Způsobující narušení vývoje orgánu nebo poruchu funkce během jeho vývoje.
Vialka	Jednorázová skleněná lahvička se šroubovacím uzávěrem a gumovým septem.

Seznam zkratek

ČR	Česká republika
HPLC-FLD	HighPerformance Liquid Chromatography with Fluorescence Detection (Vysokoúčinná kapalinová chromatografie s fluorescenční detekcí)
EFSA	European Food Safety Authority (Evropský úřad pro bezpečnost potravin)
FAO	Food and Agriculture Organization of the United Nations (Organizace pro výživu a zemědělství)
IAC	Imuno Affinity Chromatography (Imunoafinitní chromatografie)
IAK	Imunoafinitní kolonka
IARC	International Agency for Research on Cancer (Mezinárodní agentura pro výzkum rakoviny)
JECFA	(The Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives) Společný výbor expertů FAO/WHO pro potravinářská aditiva
LC-MS/MS	Liquid Chromatograpy Mass Spectroscopy (Kapalinová chromatografie s hmotnostním detektorem).
LOAEL	(Lowest Observed Adverse Effect Level) Nejnižší dávka, při které byl pozorován škodlivý účinek
LOD	Limit of Detection (Mez detekce)
LOQ	Limit of Quantification (Mez stanovitelnosti)
SVS	Státní veterinární správa
SZPI	Státní zemědělská a potravinářská inspekce
OTA	Ochratoxin A
OTB	Ochratoxin B
OTC	Ochratoxin C
OTα	Ochratoxin α
OOVZ	Orgány ochrany veřejného zdraví
PBS	Phosphate Buffered Saline (Fosfátový pufr)
RASFF	Rapid Alert Systém for Food and Feed (Systém rychlého varování pro potraviny a krmiva)
RSD	Relativní směrodatná odchylka
ÚKZÚZ	Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský

1 Úvod a cíle práce

Mykotoxiny jsou produkty sekundárního metabolismu nižších mikroskopických vláknitých hub, tzv. mikromycet, u nás běžně známých jako plísně. Ze zdravotně-hygienického hlediska považujme plísně a mykotoxiny za nejzávažnější kontaminanty přírodního původu, jež velké míře negativně ovlivňují nezávadnost potravin, surovin a krmiv po celém světě (Ostry *et al*., 2017).

V současné době již bylo izolováno přibližně 114 druhů plísní, které mohou způsobovat komplikace v krmivářství a potravinářství. A asi 65 druhů plísní je pak přímo toxigenních, což představuje vážné riziko nejen pro zdraví zvířat, ale i lidských konzumentů (Hajšlová, 2013). Kontaminace krmivářských komodit plísněmi je považována za jeden z hlavních negativních faktorů v produkci kulturních plodin a kvalitě krmiv určených pro výživu zvířat (Suchý *et* Herzig, 2005).

Je důležité si uvědomit, že k přívodu toxinu může dojít i prostřednictvím konzumace masa a vnitřností zvířat, jež byly zaplísněným krmivem krmeny. Na základě mnoha výzkumů bylo zjištěno, že mykotoxin ochratoxin A (OTA) se kumuluje v krvi a orgánech takto krmených prasat (Lusky *et al*., 1993; Persi *et al*.,2014). Jakmile se OTA dostane do žaludku zvířat, rychle se vstřebává do krve, kde se váže na plazmatické proteiny, zejména albumin. Část přijatého toxinu difunduje do tkání, kde je metabolizován a následně vyloučen prostřednictvím moči a žluči. Část přijatého toxinu může přetrvávat i v ledvinách, plicích nebo játrech (Altafini *et al*., 2017; Magan *et* Olsen, 2004; Šimůnek, 2003), avšak za jeden z největších zdrojů kontaminace je považována právě krev (Persi *et al*., 2014; Pleadin *et al*., 2014). Z tohoto důvodu může přídavek krve významně zvyšovat obsah OTA zejména v zabíjačkových produktech a krevních specialitách, které jsou v České republice velmi oblíbené.

Cílem této práce je stanovit OTA u 200 vzorků jelit a porovnat výsledky s národními a mezinárodními studiemi. Stanovení OTA probíhalo analytickou metodou vysokoúčinné kapalinové chromatografie s fluorescenční detekcí (HPLC-FLD) s předúpravou na imunoafinitních kolonkách.

2 Teoretická část

2.1 Mykotoxiny

Mykotoxiny, jejich název vznikl spojením řeckého výrazu „*mykes*“ či „*mycos*“ pro houbu a latinského výrazu „*toxicum*“ pro jed. Mykotoxiny lze tedy volně přeložit jako houbové jedy a první zmínka o nich pochází z roku 1955, kdy tento termín použili ve svém díle Forgatz a Carll (Ostrý, 2000). Intenzivní výzkum mykotoxinů započal až v roce 1960, kdy ve Velké Británii uhynulo přes 100 tisíc vánočních krocanů po zkrmování podzemnicového šrotu. Jako patologické agens byl určen mykotoxin aflatoxin, produkovaný plísní *Aspergillus flavus* (Etzel, 2002; Suchý *et* Herzig, 2005; Malíř, 2010). V dnešní době je známo už více než 400 mykotoxinů a díky moderním technologiím jsou neustále objevovány a popisovány nové složitější skupiny těchto toxinů (Battilani *et al*., 2016).

Jak již bylo uvedeno v předchozím textu, mykotoxiny jsou výsledkem sekundárního metabolismu nižších mikroskopických vláknitých hub (plísní). Jedná se o vysoce stabilní nízkomolekulární látky známými svými akutními, chronickými, ale i pozdními toxickými účinky (Malíř *et al*., 2005; Suchý *et* Herzig, 2005). Akutní intoxikace jsou vyvolány příjmem vysokých dávek, které se projevují rychlým nástupem onemocnění končící mnohdy smrtí. Chronický průběh je vyvolán dlouhodobým příjmem nízkých dávek – dokonce po dobu celého života (Malir *et al*., 2006; Ostrý e*t al*., 2017; Suchý *et* Herzig, 2005).

Pro člověka je významných asi 20 mykotoxinů, které se v lidském okolí vyskytují v nezanedbatelných koncentracích a prokazatelně negativně působí na lidské zdraví (Malíř *et al*., 2005). Onemocnění vyvolané mykotoxiny se nazývají mykotoxikózy. Dochází při nich zejména k poškození jater (hepatotoxicita), ledvin (nefrotoxicita) a genetického materiálu (genotoxicita). Dále také dochází k poškození sleziny, reprodukčních orgánů, krevního a nervového systému. Závažné jsou účinky imunosupresivní (Hajšlová, 2013, Malíř *et al*., 2005, Patočka, 2008). Tzv. pozdní toxické účinky mykotoxinů, se projevují například vznikem nádorových onemocnění (Malir *et al*., 2006; Patočka *et al*., 2004).

Z tohoto důvodu byly klasifikovány Mezinárodní agenturou pro výzkum rakoviny (IARC, 1993) jako lidské karcinogeny nebo potenciální (pravděpodobné a možné) lidské karcinogeny (Malíř *et al*., 2006).

Mykotoxiny jsou nejčastěji členěny podle hlavních producentů, kterými jsou písně rodů *Alternaria*, *Aspergillus*, *Byssochlamys*, *Claviceps, Fusarium* a *Penicillium* (Malíř *et al*., 2005; Pitt, 2000). Plísně obecně řadíme mezi nejstarší organismy na Zemi, jejichž spory se přirozeně vyskytují například v ovzduší, vodě nebo půdě, kde se podílí na rozkladu biologického materiálu. Jejich výskyt během roku kolísá, a to v závislosti na mnoha faktorech, například teplotě prostředí nebo relativní vlhkosti vzduchu (Patočka *et al*., 2004, 2008; Suchý *et* Herzig, 2005).

Přesto, že existují geografické a klimatické rozdíly při výrobě potravin, výskyt mykotoxinů a expozice těmto látkám je celosvětová. Krmné plodiny mohou být infikovány plísněmi v průběhu celého výrobního procesu, tj. pěstování, sklizně, transportu a zejména pak při skladování a konzervaci. Ke kontaminacím dochází přirozeně, nelze jim zamezit nebo je zcela odstranit – ani při dodržování správných zemědělských a technologických výrobních postupů. Za vysoce stabilní z tohoto pohledu lze pokládat mykotoxiny aflatoxiny, ochratoxin A, deoxynivalenol, zearalenon, fumonisiny a další (Magan *et* Olsen, 2004; Suchý *et* Herzig, 2005). Vzhledem k rozmanitým toxickým účinkům mykotoxinů a jejich odolnosti není vůbec pochyb o tom, že se musejí v surovinách a potravinách monitorovat, a to nejen z důvodu globalizace potravinového trhu.

Jak již bylo řečeno, mykotoxiny nelze nikdy zcela odstranit z potravního řetězce, mnoho zemí má proto definované limity v potravinách a krmivech (tolerance, doporučené úrovně, maximální úrovně reziduí), které pravděpodobně nebudou představovat zdravotní riziko (FAO, 2004). Informace o výskytu mykotoxinů v potravinách po celém světě zajišťuje Organizace spojených národů pro výživu a zemědělství (FAO: Food and Agriculture Organization of the United Nations). Na tvorbě vědeckých názorů o závažnosti jednotlivých mykotoxinů, které slouží jako podklady pro evropskou legislativu kontinuálně pracuje Evropský úřad pro bezpečnost potravin (EFSA: European Food Safety Authority).

2.1.1 Mykotoxiny v krmivech

Přítomnost mykotoxinů v krmivech je jedním ze závažných rizik, ohrožující bezpečnost potravinového řetězce, zdraví zvířat a jejich užitkovost. Ze všech původců chorob rostlin mají plísně a mykotoxiny ten nevětší význam.

Při výrobě rostlinných krmiv ne vždy panují příznivé podmínky, tímto jsou dány problémy s kvalitou těchto krmiv určených pro hospodářská zvířata. Ke kontaminacím dochází už před sklizní v průběhu růstu vegetace, dále během skladování, přepravy, zpracování rostlinných produktů a krmení zvířat (Nedělník *et* Moravcová, 2006; Florian, 2013). Mykotoxin OTA, který je předmětem této práce byl v našich klimatických podmínkách zjištěn v obilovinách už dva týdny před sklizní (Kummer *et* Faldíková, 2002).

Složení krmiva je nejdůležitějším faktorem ovlivňujícím produkci mykotoxinů (vysoký obsah tuků a sacharidů). Jedná se o krmiva, která jsou vyráběna z ovsa, ječmene, žita, pšenice, rýže, kukuřice, prosa, čiroku, sóji, fazolí, hrachu, vojtěšky, bobu, slunečnicových či dýňových semen, kokosu, sena či siláže. Mezi další významné abiotické faktory ovlivňující tvorbu mykotoxinů patří teplota prostředí, vlhkost vzduchu, vodní aktivita (a_w), pH, přítomnost kyslíku v době růstu plísní na substrátu nebo poškození celistvosti zrna. Mnoho plísní se může v krmivech rozvíjet ještě při 15% obsahu vody. Kdežto většina bakterií a kvasinek potřebují pro svůj rozvoj minimálně 30% obsah vody (Šilhánová, 2002).

Existují i možnosti, jak přítomnost mykotoxinů omezit, ale prevence plísňové a mykotoxinové kontaminace není snadná, neboť jak již bylo mnohokrát řečeno, přítomnost plísní v krmivech je ovlivňována řadou obtížně kontrolovatelných faktorů (Khalesi *et* Khatib 2011; Pose *et al.* 2010). Je prakticky nemožné toxigenní plísně a jejich spory odstranit z prostředí. Nejideálnějším stavem by bylo tvorbu mykotoxinů v krmivech zcela zamezit, ale už ze samotné biologické podstaty mykotoxinů jde o těžce zvládnutelný problém.

Preventivní opatření by však měla snížit infekci již před sklizní a uskladněním. Mezi nejdůležitější ochranná opatření patří – ošetření osiv fungicidy, a to ve

správnou dobu, výběr vhodných odrůd a hustota výsevu, vhodné zpracování půdy, boj proti škůdcům, boj proti plevelům, důležité je také zabránit mechanickému poškození zrna. Dále je nutno uskladnit krmivo v suchém prostředí pří relativní vlhkosti vzduchu do 65 %, zajistit méně než 14 % vody v krmivu a omezit přístup O_2 (Suchý *et* Herzig, 2005).

2.1.2 Legislativa mykotoxinů v krmivech

DOPORUČENÍ KOMISE č. 2005/187/EC ze dne 2. března 2005 o koordinovaném programu kontrol v oblasti výživy zvířat pro rok 2005 dle směrnice Rady 95/53/ES.

- Doporučení provádět koordinované kontroly (aflatoxinu B1, ochratoxinu A, zearalenonu, deoxynivalenolu a fumonosinů) v krmivech z roku 2005.
- V příloze jsou uvedeny směrné hodnoty některých mykotoxinů v krmivech.

DOPORUČENÍ KOMISE Č. 2005/925/EC ze dne 14. prosince 2005 o koordinovaném programu kontrol v oblasti zvířat pro rok 2006 dle směrnice Rady 95/53/ES.

- Doporučení provádět koordinované kontroly (aflatoxinu B1, ochratoxinu A, zearalenonu, deoxynivalenolu a fumonosinů) v krmivech z roku 2005.
- V příloze jsou uvedeny směrné hodnoty koncentrací některých mykotoxinů v krmivech.

DOPORUČENÍ KOMISE č. 2006/583/ES ze dne 17. srpna 2006 k prevenci a snižování fusariových toxinů v obilovinách a výrobcích z obilovin.

- Majoritními zdroji dietární expozice fusariových toxinů jsou výrobky z obilovin, především z kukuřice a pšenice.
- Příloha obsahuje zásady prevence a snižování kontaminace obilovin fusariovými toxiny.

DOPORUČENÍ KOMISE (ES) č. 2006/576/EC ze dne 17. srpna 2006 o přítomnosti deoxynivaleonu, zearalenonu, ochratoxinu A, T-2 a HT-2 a fumonisinů v produktech určených ke krmení zvířat.

- Jedná se o výzvu členským státům EU, aby prováděly intenzivní monitoring přítomnosti uvedených mykotoxinů (i ve spolupráci s provozovateli krmivářských podniků). Příloha obsahuje směrné hodnoty uvedených mykotoxinů pro produkty určené ke krmení zvířat.
- V příloze jsou uvedeny směrné hodnoty vybraných mykotoxinů pro produkty určené ke krmení zvířat

NAŘÍZENÍ KOMISE (EU) č. 574/2011 ze dne 16. června 2011, kterým se mění příloha i směrnice Evropského parlamentu a Rady 2002/32/ES o nežádoucích látkách v krmivech.

- Toto nařízení legislativně stanovuje limity pro aflatoxin B1 a námel v krmivech.

2.1.3 Limity a směrné hodnoty pro vybrané mykotoxiny v krmivech

Tabulka 1 Limity pro aflatoxin B1 v krmivech, (Florián, 2013).

Aflatoxin B1	**mg/kg**
Krmné suroviny.	0,020
Doplňková a kompletní krmiva ostatní.	0,010
Doplňková a kompletní krmiva pro dojnice a telata, pro ovce pro produkci mléka a jehňata, pro kozy pro produkci mléka a kůzlata, pro selata a mláďata drůbeže.	0,005
Doplňková a kompletní krmiva pro skot (s výjimkou dojnic a telat), ovce (s výjimkou ovcí pro produkci mléka a jehňat), kozy (s výjimkou koz pro produkci mléka a kůzlat), prasata (s výjimkou selat) a drůbež (s výjimkou mláďat drůbeže).	0,020

Tabulka 2 Směrné hodnoty pro OTA v krmivech, (Florián, 2013).

Ochratoxin A	**mg/kg**
Obiloviny a produkty obilovin.	0,25
Doplňková a kompletní krmiva pro prasata.	0,05
Doplňková a kompletní krmiva pro drůbež.	0,10

Tabulka 3 Směrné hodnoty pro deoxynivalenol v krmivech, (Florián, 2013).

Deoxynivalenol	**mg/kg**
Obiloviny a produkty obilovin s výjimkou vedlejších produktů kukuřice	8,00
Vedlejší produkty kukuřice	12,00
Doplňková a kompletní krmiva pro prasata	0,90
Doplňková a kompletní krmiva pro telata (<4 měsíce), jehňata a kůzlata	2,00
Doplňková a kompletní krmiva	5,00

Tabulka 4 Směrné hodnoty pro fumonisin B1+B2 v krmivech, (Florián, 2013).

Fumonisin B1+B2	**mg/kg**
Kukuřice a produkty kukuřice	60,00
Doplňková a kompletní krmiva pro prasata, koně, králíky a zvířata v zájmovém chovu.	5,00
Doplňková a kompletní krmiva pro ryby.	10,00
Doplňková a kompletní krmiva pro drůbež, telata (<4 měsíce), jehňata a kůzlata	20,00
Doplňková a kompletní krmiva pro přežvýkavce (>4měsíce) a norky.	50,00

Tabulka 5 Směrné hodnoty pro zaralenon v krmivech, (Florián, 2013).

Zearalenon	**mg/kg**
Obiloviny a produkty obilovin s výjimkou vedlejších produktů kukuřice.	2,00
Vedlejší produkty kukuřice	3,00
Doplňková a kompletní krmiva pro selata a mladé prasnice.	0,10
Doplňková a kompletní krmiva pro prasnice a výkrm prasat.	0,25
Doplňková a kompletní krmiva pro telata, dojnice, ovce (včetně jehňat) a kozy (včetně kůzlat).	0,50

Jen v Evropské unii se ztráty způsobené přítomností mykotoxinů při výrobě krmiv odhadují na 5 bilionů EUR ročně. Tento odhad vychází z předpokladu, že roční produkce krmiva je asi 160 milionů tun a mykotoxiny znehodnocují produkci o 25 %. Dá se navíc předpokládat, že ještě větší množství může být kontaminováno mykotoxiny dosud neidentifikovanými (Suchý *et* Herzig, 2005).

K ohlašování rizikových potravin a krmiv slouží Systém rychlého varování pro potraviny a krmiva (RASFF: Rapid Alert Systém for Food and Feed). Strategií systému RASFF je zabránit tomu, aby se komodity kontaminované mykotoxiny nedostaly do potravin a zařízení na zpracování krmiv. Dle systému RASFF je ze společného evropského trhu stahováno kvůli mykotoxinům až 50 % surovin a potravin (RASFF, 2018).

2.1.4 Vliv mykotoxinů na zdraví zvířat

I když má každý mykotoxin své příznačné vlastnosti, lze uvést, že celá řada mykotoxinů kontaminující krmiva má negativní vliv na běžná hospodářská zvířata vedoucí ke snížení přírůstků, poklesu mléčné a masné užitkovosti, snášky (malá vejce) apod. Na snížení užitkovosti se podílí i fakt, že krmivo kontaminované plísněmi má sníženou výživovou hodnotu, jelikož poté, co plísně kontaminují krmivo začnou využívat živiny pro svůj vlastní metabolismus a rozmnožování. Dochází tak k poklesu esenciálních aminokyselin, bílkovin, sacharidů a tuků v krmivu a jeho výraznému snížení energické hodnoty (Suchý *et* Herzig, 2005).

Mykotoxiny mohou u zvířat vyvolat patologické změny na orgánech (ledviny, játra, CNS) nebo vyvolávají sníženou plodnost. Po intoxikaci často dochází k alergickým reakcím, oslabení imunitního systému a snížení efektivity řady metabolických procesů, a tedy zvýšení citlivosti k negativním faktorům prostředí. (CAST, 2003; Malíř *et al*., 2013; Suchý *et* Herzig, 2005). Účinky mykotoxinů na zvířecí organismus jsou velmi rozsáhlé a mohou končit letálně – smrtí (Kummer *et* Faldíková, 2002). Což samozřejmě znamená velké ekonomické ztráty v chovech hospodářských zvířat.

Při intoxikacích sehrává důležitou roli druh, věk a pohlaví exponovaných živočichů. Navíc není neobvyklé, že se v krmivu vyskytuje kombinace dvou i více mykotoxinů, což může zapříčinit ještě větší toxicitu v důsledku jejich synergismu (Kummer *et* Faldíková, 2002; Malíř, 2010). Je známo, že tělo živočichů je ovlivněno alespoň jedním mykotoxinem (CAST, 2003). Kromě toho, citlivost zvířat na mykotoxiny roste se stresem, špatnou zoohygienou nebo zásluhou infekčních a parazitárních onemocnění. Nejcitlivější jsou prasata a drůbež. Větší toleranci můžeme hledat u přežvýkavců, což je pravděpodobně dáno částečným rozkladem mykotoxinů specifickou mikroflórou v bachoru. Například OTA je v bachoru přežvýkavců rozložen na méně toxický α-ochratoxin (Opletal *et* Skřivanová, 2010).

Rozhodujícími faktory pro celkový toxický účinek mykotoxinů jsou však především dávka a délka doby jejich působení (chronická nebo akutní mykotoxikóza).

Při nižších koncentracích v krmivu nemusejí mít mykotoxiny patrný vliv na živočišnou výrobu, ale jejich rezidua se mohou dále pohybovat v potravním řetězci. Nepřímý přívod mykotoxinů z konzumace potravin živočišného původu může tak představovat vážné zdravotní riziko pro člověka (Suchý *et* Herzig, 2005). I když potraviny živočišného původu obecně přispívají k expozici člověka jen z 3 až 10 %, mykotoxiny (tj. aflatoxiny, ochratoxiny), které se přenášejí do poživatelných tkání živočichů vzbuzují vetší obavy (Gilbert *et al*., 2001).

V této souvislosti je potřeba dodat, že existují i obranné mechanismy, které jsou dány přirozenou detoxikační funkcí jater. Po konzumaci a následné absorpci v zažívacím traktu se mykotoxiny dostávají do jater, kde dochází k jejich biotransformaci. Za normálních okolností biotransformace v játrech snižuje toxicitu škodlivých látek, nicméně v případě mykotoxinů někdy dochází paradoxně k jejímu zvýšení a posílení schopnosti těchto látek pronikat do živočišných tkání. (Nedělník *et* Moravcová, 2006).

2.2 Ochratoxin A

Ochratoxin A je nejrozšířenější mykotoxin ze skupiny ochratoxinů, tj. izokumarinových derivátů spojených s fenylalaninem. Z chemického hlediska patří do této skupiny spolu s dalšími typy (B, C, D, α) (Ostrý *et al*., 2005; Ostrý, 2012), ovšem OTA je považován za nejvýznamnější a nejtoxičtější (Šimůnek, 2004; Heussner *et* Bingle, 2015). Hned po aflatoxinech je OTA v současné době vnímán jako druhý nejvýznamnější mykotoxin (Bhat *et al*., 2010).

Na rozdíl od objevu aflatoxinu, jehož podnětem byl úhyn krůt v roce 1960 ve Velké Británii (viz kapitola 2.1), byl OTA objeven na základě laboratorního screeningu, a to v roce 1965 v Jihoafrické republice (Van der Merwe *et al*., 1965a; Van der Merwe *et al*., 1965b). OTA byl izolován z kultury plísně *Aspergillus ochraceus* rostoucí na sterilní navlhčené kukuřičné moučce (IARC, 1983; Malir *et al*., 2016). Nato byl ve stejném roce chemicky charakterizován.

2.2.1 Chemické a fyzikální vlastnosti OTA

Popis: Jedná se o bílou krystalickou látku bez zápachu, rekrystalizovanou z xylenu, intenzivně fluoreskující v ultrafialovém světle, emitující zelenou a modrou (Šimůnek, 2003) při vysokých koncentracích tmavě modrou) fluorescenci v kyselých a alkalických roztocích (IARC, 1983).

Molekulová hmotnost: 403.813 g/mol (Hrdina *et al*., 2004; Ringot *et al*., 2006).

Teplota bodu tání: 169 °C (336 °F; 442 K) (IARC, 1983).

Rozpustnost: Dobře rozpustný v polárních organických rozpouštědlech (chloroformu, etanolu a metanolu), slabě rozpustný ve vodě, rozpustný ve vodném roztoku hydrogenuhličitanu sodného (Ringot *et al*., 2006).

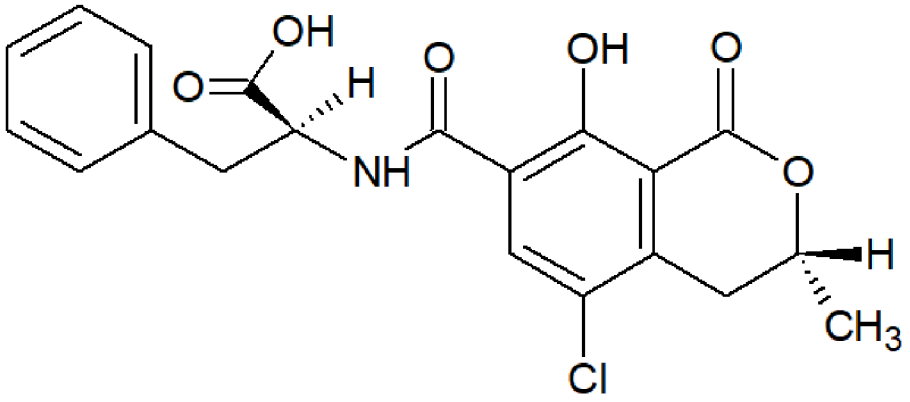
Stabilita: Chemicky vysoce stabilní sloučenina, odolná i vůči dnešnímu modernímu zpracovávaní surovin a potravin (IARC, 1993). Tepelné procesy při běžném vaření jsou schopny částečně koncentraci OTA snížit (Pleadin *et al*., 2014).

Registrační číslo CAS (Chemical Abstracts Services): 303-47-9.

Systematický název dle IUPAC (International Union of Pure and Applied): N-[(3R)-5-Chloro-8-hydroxy-3-methyl-1-oxo-3,4-dihydro-1H-2-benzopyran-7-carbonyl]-L-phenylalanine.

Sumární (molekulový) vzorec: $C_{20}H_{18}ClNO_6$

Strukturní (konstituční) vzorec: Skládá se z para-chlorofenolového zbytku obsahujícího dihydroiso-kumarinovou skupinu, která je amidem spojena s L-β-fenylalaninem (IARC, 1983) (viz obr. 1).



Obrázek 1 Strukturní vzorec OTA (Mikysková, 2022)

Z hlediska způsobu biosyntézy se OTA řadí mezi pentaketidy, obecně ho lze popsat jako derivát 7-izokumarinu vázaný na aminoskupinu L-β-fenylalaninu (Malíř *et* Ostrý, 2003).

Z poměrně velké skupiny ochratoxinů je OTA nejvýznamnějším běžně se vyskytujícím mykotoxinem. Jak již bylo uvedeno, přírodě se dále vyskytují formy jako je např. OTB (analog OTA bez atomu chloru), OTC (fenylalanin etyl ester), OTA metyl ester nebo izokumarinový derivát ochratoxin α (Ostrý, 2012). V testech na kuřatech bylo prokázáno, že OTB je přibližně šestnáctkrát méně toxický než OTA. Naopak OTC působí zhruba stejně toxicky jako OTA, ale v přírodě se vyskytuje jen ojediněle (Malíř *et* Ostrý, 2003). Existují i syntetické formy. Nedávno byly syntetizovány a chemicky charakterizovány čtyři další mykotoxiny analogické k OTA, u kterých ale jiná aminokyselina nahradila fenylalanin – OTA alanin, OTA leucin, OTA serin a OTA tryptofan (Plastina *et al*., 2011).

2.2.2 Producenti OTA

V potravinách rostlinného i živočišného původu je OTA produkován dvěma rody plísní, a to *Aspergillus* a *Penicillium* (Hibi *et al*., 2011; Moss, 2000; Polášková *et al*., 2011; Zain, 2011). Produkce těchto plísní závisí zejména na teplotě a vlhkosti vzduchu. Rod *Aspergillus* je hlavním zdrojem OTA v potravinách a krmivech v tropických a subtropických oblastech. V těchto oblastech potřebují plísně rodu *Aspergillus* pro produkci OTA optimální teplotu okolo 28 °C, ale dokáží tvořit OTA v rozmezí teplot od 15 °C do 37 °C. V chladnějších regionech, například v Evropě, jsou hlavní příčinou kontaminace potravin OTA plísně rodu *Penicillium*, ty jsou schopné produkovat OTA v teplotním rozmezí od 4 °C do 30 °C při 22 % relativní vlhkosti vzduchu (Malíř *et al*., 2002; Ostrý, 2012).

Z rodu *Aspergillus* jsou významní zejména dva hlavní producenti OTA: *Aspergillus ochraceus* a *A. carbonarius.* Z rodu *Penicillium* druhy: *Penicillium nordicum* a *P. verrucosum*. Mnoho těchto plísní produkuje i další ochratoxiny, např. OTB (Malíř *et* Ostrý, 2003).

Tabulka 6 Toxinogenní plísně rodu *Aspergillus* a *Penicillium* produkující OTA (Ostrý *et al*., 2013).

Rod	Sekce	Druh
Aspergillus	*Circumdati*	*A. ochraceus*
		A. steynii
		A. westerdijkiae
	Nigri	*A. carbonarius*
		A. foetidus
		A. lacticoffeatus
		A. niger
		A. sclerotioniger
		A. tubingensis
Penicillum	*Verrucosa*	*P. verrucosum*
		P. nordicum

Z důvodu globálního oteplování a intenzitě klimatických změn v současné době dochází k šíření plísní, a tedy i nárůstu produkce mykotoxinů. Jedná se například o šíření plísně *Aspergillus carbonarius* do mírného klimatického pásu (Ostry *et al*., 2016).

2.2.3 Toxicita OTA

OTA vykazuje významné toxické účinky u člověka a zvířat. U všech dosud zkoušených druhů zvířat je OTA silným nefrotoxinem způsobující nefropatii, a to především u prasat, psů a drůbeže. Bylo prokázáno, že se OTA podílí na patogenezi některých ledvinových onemocnění, jako je např. Balkánská endemická nefropatie (BEN) (Hibi *et al*., 2011) nebo chronická intersticiální nefropatie (CIN) (Malíř *et al*., 2016). OTA je navíc embryotoxický, genotoxický hepatotoxický, imunotoxický a teratogenní. V testech *in vitro* a *in vivo* bylo prokázáno, že je také neurotoxinem (Sava *et al*., 2006). Výzkum rakoviny zařadil OTA do skupiny 2B – možný lidský karcinogen (IARC, 1993).

U laboratorních hlodavců dochází při expozici OTA ke vzniku nádorů v ledvinách. Jako další byly pozorovány histologické abnormality srdce a jater, narušení hemokoagulace vedoucí ke krvácení a vzniku trombóz v játrech, ledvinách mozku, slezině a srdci (O´Brien *et* Dietrich, 2005; Pfohl-Leszkowicz *et* Manderville, 2007; Ringot *et al*., 2006).

Na komplexním toxickém účinku OTA se však podílí více faktorů. L-β-fenylalanin, jedna ze strukturálních složek OTA (viz obr.1), se podílí na inhibici řady reakcí. Akutní i chronická toxicita OTA je odůvodněna schopností L-β-fenylalaninu inhibovat syntézu proteinů (proteosyntézu) na základě kompetice s esenciální aminokyselinou fenylalaninem v reakcích katalyzovaných fenylalanin-t RNA syntázou (Malíř *et* Ostrý, 2007; Šimůnek, 2004; Modrá *et al*., 2014).

Pravděpodobný mechanismus toxicity OTA tedy spočívá v tom, že je jeho fenylalaninová část molekuly zaměněna fenylalanin-t RNA syntázou za aminokyselinu fenylalanin. Ten je však v molekule OTA navázán na kumarinovou část, která brání jeho navázání do proteinového řetězce a tím dochází k zastavení celého procesu proteosyntézy. Z tohoto pohledu může být fenylalanin do určité míry považován za antidotum, jelikož mezi ním a OTA dochází ke kompetici navázání na t-RNA (Šimůnek, 2004).

Kromě inhibice proteosyntézy je OTA dáván do souvislosti s inhibicí mitochondriální respirace a tvorby ATP. (Malir *et al*., 2013). Při studiu mechanismů toxicity OTA bylo dále prokázáno zvýšení peroxidace lipidů, narušení metabolismu cukrů a vápníku, apoptóza různých typů buněk nebo tvorba reaktivních druhů kyslíku (ROS) s následným poškozením DNA (Malir *et al*., 2013; Pfohl-Leszkowicz *et* Manderville, 2007).

Pochopení mechanismů toxických účinků mykotoxinů na živé organismy na buněčné a biochemické úrovni je velmi důležité. Cílem je léčit, respektive inhibovat působení mykotoxinů, a tím potenciálně kontrolovat onemocnění a úmrtí jim připisovaných. Je zřejmé, že se jedná o dlouhodobý proces, při kterém nelze očekávat okamžité výsledky bez ohledu na schopnost dnešních moderních technologií odhalit mykotoxiny a diagnostikovat mykotoxikózy, a tím snížit obsah mykotoxinů v krmivech prostřednictvím kontrolních a řídících postupů.

2.2.4 Výskyt OTA v potravinách a jeho regulace

Kontaminace potravin plísněmi a následná produkce OTA je přirozený proces, kterému nelze zamezit nebo ho zcela odstranit. Nicméně dodržováním správné hygienické praxe, technologických a zemědělských postupů lze přirozený proces kontaminace alespoň částečně potlačit. V České republice je kontrola mykotoxinů v potravinách i krmivech zajišťována orgány spadajícími pod Ministerstvo zemědělství, jedná se o Státní zemědělskou a potravinářskou inspekci (SZPI), Státní veterinární správu (SVS) a Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský (ÚKZÚZ). Jako další můžeme uvést orgány ochrany veřejného zdraví (OOVZ) spadající pod Ministerstvo zdravotnictví (Ostry *et al*., 2004).

Expozice populace OTA prostřednictvím dietárního přívodu je v současné době považována za majoritní (i když byla již prokázána také inhalační expozice nebo dermální expozice vzduchem a prachem obsahující mykotoxiny) (Boonen *et al*., 2012; Ostrý *et al.,* 2017). OTA se vyskytuje v celé řadě potravin a krmiv rostlinného i živočišného původu (Ostrý, 2012).

V případě potravin rostlinného původu se jedná zejména o obiloviny a cereálie (ječmen, kukuřice, oves, pšenice, rýže) dále pak o čaj, hroznový džus, kávu, kakaové boby, fíky, dýňová semínka, lékořici, luštěniny, olivy, rozinky, sušené ovoce, pivo, víno a koření, jako je černý pepř, kajenský pepř, kardamom, koriandr, mleté chilli, mletá paprika, kmín a kurkuma (Ostrý, 2012; Ostry *et al*., 2015). V těchto potravinách byly doposud hlášeny průměrné koncentrace OTA v rozmezí od 0,1 do 100 ng/g (European Union, 2002).

Maximální limity pro obsah OTA ve vybraných potravinách definuje nařízení Komise (ES) č. 1881/2006 a pohybují se v rozmezí od 0,5 μg/kg (pro "Obilné příkrmy a ostatní příkrmy určené pro kojence a malé děti") po 80 μg/kg (pro "Výtažek z lékořice pro použití v potravinářských výrobcích, zejména v nápojích a cukrovinkách") (Evropská komise, 2006).

V následující tabulce jsou uvedeny maximální limity pro OTA v potravinách a krmivech rostlinného původu platné pro ČR.

Tabulka 7 Platné maximální limity OTA v potravinách a krmivech pro ČR (Evropská komise, 2006; 2010; 2012; 2015)

Nařízení komise	Položka	Komodita	Maximální limity OTA (µg/kg)
NK (EC) č. 1881/2006.	1	Nezpracované obiloviny.	5,0
	2	Sušené hrozny révy vinné (korintky, rozinky a sultánky).	10,0
	3	Pražená kávová zrna a mletá pražená káva kromě rozpustné kávy.	5,0
	4	Rozpustná káva (instantní káva).	10,0
	5	Víno (včetně šumivého vína, s výjimkou likérového vína a vína s obsahem alkoholu nejméně 15 % objemových) a ovocné víno.	2,0
	6	Aromatizovaná vína, aromatizované vinné nápoje a aromatizované vinné koktejly.	2,0
	7	Hroznová šťáva, rekonstituovaná koncentrovaná hroznová šťáva, hroznový nektar, rekonstituovaný hroznový mošt a rekonstituovaný koncentrovaný hroznový mošt určený pro lidskou spotřebu.	2,0
	8	Obilné příkrmy a ostatní příkrmy určené pro kojence a malé děti.	0,5
	9	Dietní potraviny pro zvláštní léčebné účely, určené speciálně pro kojence.	0,5
NK (EU) č. 105/2010.	10	Kořen lékořice, složka bylinného čaje.	0,20
	11	Výtažek z lékořice pro použití v potravinářských výrobcích, zejména v nápojích a cukrovinkách	80,0
NK (EU) č. 594/2012.	12	Všechny produkty pocházející z nezpracovaných obilovin, včetně zpracovaných výrobků z obilovin a obilovin určených k přímé lidské spotřebě kromě potravin uvedených v bodech 8,9 a 14.	3,0
	13	*Piper* spp. (plody včetně bílého a černého pepře), *Mystica fragans* (muškátový oříšek). *Zingiber officinale* (zázvor*), Curcuma longa* (kurkuma).	15,0
	14	Pšeničný lepek neprodávaný přímo spotřebiteli.	8,0
NK (EU) č. 1137/2015.	15	*Capsicum spp.* (sušené plody, celé nebo mleté, včetně chilli, mletého chilli, kajenského pepře a papriky).	20,0
	16	Směsi koření obsahující jedno z výše uvedených koření.	15,0

(upraveno: Toman, 2019)

Kvůli nedávným zprávám o několika případech vysokých hladin OTA u potravin, u kterých není doposud stanoven maximální limit otevřela v červnu v roce 2021 Evropská komise nová aktuální diskutovaná témata v oblasti kontaminantů v potravinách. U některých komodit (např. sušené hrozny révy vinné, instantní a pražená mletá káva, lékořice) je navržen nový nižší maximální limit oproti stávajícím maximálním limitům. Nicméně nejedná se o schválené limity. Oficiálně jsou v platnosti zatím pouze maximální limity uvedené v předchozí tabulce 7. Diskutované návrhy jsou uvedeny v následující tabulce.

Tabulka 8 Navrhované limity pro OTA v potravinách diskutované Evropskou Komisí (MZe, Odbor bezpečnosti potravin, 2021).

Komodita	Návrh maximálního limitu OTA (µg/kg)
Sušené hrozny révy vinné (korintky, rozinky a sultánky) a sušené fíky	8,0
Ostatní sušené ovoce	2,0
Všechno koření včetně sušeného koření kromě *Capsicum spp.*	15,0
Směsi koření	15,0
Sušené bylinky	10,0
Kořen zázvoru pro použití v bylinných čajích	15,0
Proskurník lékařský, kořeny smetanky lékařské, květy pomerančovníku (orange blossoms) pro použití v čajích nebo náhražkách kávy.	20,0
Slunečnicová, dýňová, melounová, konopná semena, dýňové boby.	5,0
Pistácie umístěné na trh pro konečného spotřebitele nebo jako ingredience v potravinách.	5,0
Pistácie, jež mají být před umístěním na trh pro konečného spotřebitele nebo před použitím jako potravinová složka tříděny nebo jinak fyzikálně ošetřeny.	10,0
Kořen lékořice umístěný na trh pro konečného spotřebitele	20,0
Lékořicové cukrovinky obsahující více než 97 % lékořicového extraktu na sušinu.	50,0
Ostatní lékořicové cukrovinky	10,0
Kakaový prášek.	3,0
Pražená kávová zrna a mletá pražená káva kromě rozpustné kávy.	3,0
Rozpustná káva (instantní káva)	5,0

Poznámka: Dále se zvažuje nastavení maximálního limitu pro datlovou šťávu.

Přítomnost OTA v potravinách živočišného původu byla hlášena ve většině zemí světa. Nicméně Evropská unie zavedla od roku 2006 maximální limity pro OTA jen v některých komoditách (viz tabulka 7), nikoli však pro maso a masné výrobky nebo pro jiné potraviny živočišného původu (Evropská komise, 2006). Expozice zvířat, určených k produkci potravin, v důsledku nepřímého přenosu z přirozeně kontaminovaného krmiva mohou vést k nežádoucím reziduím OTA v produktech jako je maso, vejce nebo mléko (Zhao *et al*., 2015). Některé studie provedené v různých zemích odhalily, že vepřové maso, výrobky z krve a vnitřnosti mohou být významnými zdroji chronické dietární expozice OTA u lidí (Persi *et al*., 2014; Pleadin *et al*., 2014, 2016; Zhao *et al*., 2015).

Prasata jsou nejvnímavějšími zvířaty k expozici OTA ve srovnání s jinými běžnými hospodářskými zvířaty. OTA se kumuluje v několika poživatelných tkáních prasat, přičemž nejvyšší koncentrace se nacházejí v krvi, následně v ledvinách a játrech. Naopak nejméně toxinu lze obvykle hledat ve svalech a tuku (Altafini *et al*., 2017; Battacone *et* a*l*., 2010; Hort *et al*., 2018 Persi *et al*., 2014; Pleadin, 2014, 2016).

V krevním oběhu se OTA váže na plazmatické proteiny, zejména albumin, což pravděpodobně významně ovlivňuje jeho biologický poločas rozpadu, který u prasat činí 72-120 hodin. Na základě toho může přídavek vepřové krve, ale i vnitřností významně zvyšovat obsah OTA v konečných živočišných produktech (Lusky *et al*., 1993; Persi *et al*., 2014).

Jelita, kterými se zabývá tato práce mohou být na základě předchozího textu považována za nejvíce kontaminovaný konečný produkt prasat krmených zaplísněným krmivem (Persi *et al*., 2014; Pleadin *et al*., 2014). Kromě toho by přítomnost OTA v těchto produktech mohla být odvozena z přímého růstu plísní produkujících OTA nebo přidáním kontaminovaných komodit, jako je například koření (Pickova *et al*, 2020).

Některé evropské země přijaly předpisy nebo směrnice o koncentracích OTA ve vepřovém mase či vnitřnostech, jako např. Dánsko, Estonsko, Itálie Rumunsko, a Slovensko (viz tabulka 9) (Vila-Donat *et al*., 2018). Evropská komise dále stanovila orientační hodnoty pro OTA týkající se doplňkových a kompletních krmiv s doporučenou maximální koncentrací 50 µg/kg pro prasata (viz tabulka 2).

Tabulka 9 Jednotlivé národní maximální limity OTA v potravinách živočišného původu v zemích EU (Vila-Donat *et al.*, 2018).

Země	Potravina	Maximální limit (ng/g)
Dánsko	Vepřové ledviny	10
Estonsko	Vepřové játra	10
Itálie	Vepřové maso a odvozené produkty	1
Rumunsko	Vepřové maso, ledviny a játra	5
Slovensko	Vepřové maso	5

2.2.5 Posouzení rizika expozice člověka OTA při konzumaci potravin

JECFA společný výbor expertů FAO/WHO pro potravinářská aditiva stanovil prozatímní tolerovatelný týdenní přívod (PTWI) 100 ng/kg (tj. 14,3 ng/kg tělesné hmotnosti/den), a to na základě nejnižší hladiny pozorovaného nepříznivého účinku (LOAEL) pro poškození ledvin u prasat (JECFA, 2008).

Evropský úřad pro bezpečnost potravin (EFSA) toto doporučení expertů přijal a stanovil tolerovanou týdenní dávku (TDI) na 120 ng/kg tělesné hmotnosti za týden (tj. 17 ng/kg tělesné hmotnosti/den). Toto bylo také znovu potvrzeno v roce 2010 (EFSA, 2010). Avšak nový výzkum zaměřený na karcinogenitu OTA vedl k tomu, že při novém hodnocení z jara 2020 byla týdenní přijatelná dávka OTA zrušena z důvodu toho, že bezpečné množství přijatého toxinu nelze spolehlivě určit.

Prozatím byla vypočítána tzv. hranice expozice (margin of exposure), podle které došli odborníci k závěru, že OTA představuje riziko pro zdraví většiny populace. Tyto závěry EFSA budou předloženy Evropské komisi a měly by být zohledněny v diskusi o stanovení nových maximálních limitů pro OTA v potravinách (EFSA, 2020).

2.3 Jelita a související krevní produkty

U nás v České republice si pod pojmem „jelito“ představujeme masný výrobek, jehož hlavními složkami jsou maso a krev. Obecně se používá méně hodnotné maso – hlava, vepřový bok, kůže, vepřový jazyk, vnitřnosti (vepřové nebo telecí plíce, vepřová játra, hovězí a jehněčí játra, vepřové žaludky nebo vepřové srdce) a samozřejmě krev. Krev se používá zejména prasečí, ovčí, hovězí, jehněčí nebo husí. Tímto způsobem se využijí a zpracují jakékoliv části zvířete a následně se vyrobí vysoce výživný produkt. Ve válečných a jiných těžkých dobách, kdy bylo masa málo, se začaly přidávat další plniva, aby se objem jelit zvětšil (Jandásek, 2014; Meatsandsausages, 2020).

Krev se vždy tepelně upravuje nebo suší a míchá s plnivem, dokud není dostatečně hustá, aby po ochlazení ztuhla. Mezi nejčastější plniva patří kroupy, ječmen, pohanka, ovesné vločky nebo drobné kousky pečiva. Dalšími ingrediencemi a dochucovadly bývá osmažená cibule, česnek, sůl a aromatická koření, mezi které patří zejména černý pepř, majoránka, kmín a nové koření (Jandásek, 2014). Celá náplň je pak naplněna do zvířecího nebo umělého střívka (AtlasMedia Ltd., 2022). Složení jelit se může samozřejmě nepatrně měnit, jelikož každý výrobce se liší svou původní recepturou.

Krev může být použita z jakéhokoliv zvířete, včetně drůbeže. Nejčastěji se však používá krev prasat nebo hovězího dobytka. Krev je produktem, který se rychle kazí a po odebrání musí být okamžitě zchlazena na přibližně 3 °C. Krev se doporučuje skladovat maximálně dva dny, poté se musí zpracovat. Množství krve v jelitech se může lišit od 5 % do 60 % (AtlasMedia Ltd., 2022; Meatsandsausages, 2020).

2.3.1 Obecný proces výroby jelit

Obecný proces výroby jelit zahrnuje asi 6 kroků:

- Výběr a vážení surovin
- Předvaření, krájení, mletí – Maso je vždy předvařeno, poté se mele nebo krájí a teprve pak se míchá s plnivem. Krev nikdy neprochází varem. Některé suroviny lze opékat (cibule) nebo nakládat.

- Míchání celé směsi – Přidá se nakrájený tuk, sůl, cukr a koření a vše se dobře promíchá.
- Plnění směsi do střívek – Připravená směs se tzv. naráží do střívek ručně nebo pomocí plničky. Po naplnění se střívko uzluje nebo špejluje.
- Vaření – Voda se nechá přejít varem a pak se odstaví. Do horké vody se vkládají připravená jelita, která se jen ohřívají, nevaří. Zvolna se zahřívají při 90 °C cca 15 minut, dokud nevyplavou na povrch.
- Chlazení – Jelita se vloží do nádoby se studenou vodou a chladí se cca 15 minut (Jandásek, 2014; Meatsandsausages, 2020).

Jelita se v ČR podávají nejčastěji smažená nebo pečená, podstatně méně se konzumují studená. Mohou být po nakrájení na plátky součástí i jiných pokrmů.

2.3.2 Mezinárodní složení jelit

Jak již bylo zmíněno v předchozím textu, složení jelit se může lišit, záleží na preferencích lokálních výrobců, oblíbených lokálních surovina a receptuře. Je ale potřeba zdůraznit, že krev, která patří k nejvýznamnějšímu zdroji kontaminace tvoří vždy hlavní přísadu. U mnoha národů, včetně toho našeho, jsou jelita a související produkty fenoménem. V Evropě a Americe patří mezi typická plniva maso, tuk, vnitřnosti, bílý chléb, kukuřičná mouka, cibule, jedlé kaštany, ječmen, ovesné vločky a pohanka. Na Pyrenejském poloostrově a v Latinské Americe a Asii je plnivem často rýže. Regionální specialitou jsou i sladké varianty s cukrem, medem, pomerančovou kůrou a jablky. Při pohledu na předchozí text vyplývá, že výběr ingrediencí je nejen velmi ekonomicky nenáročný, ale počet receptur, které lze vytvořit, je omezen pouze představivostí výrobce. (Meatsandsausages, 2020).

Jelita se vyrábějí tisíce let a mnoho zemí pro ně má obecný termín – krevní klobása (blood sausage), který označuje všechny produkty s obsahem krve, bez ohledu na ostatní ingredience. Některé země však mají své konkrétnější termíny, jako je například black pudding v Anglii. V následující tabulce jsou uvedeny lokální názvy a hlavní složení jelit v některých zemích (Guise Bule, 2019).

Tabulka 10 Lokální název a složení jelit v některých zemích (AtlasMedia Ltd., 2022; Meatsandsausages, 2020; Guise Bule, 2019).

Země	Lokílní název	Složení
Anglie	Black pudding	Vepřová krev, tuk, ovesné vločky, vepřové střívko.
Brazílie	Morcilla	Vepřové maso, krev a tuk, vařená rýže, vepřové střívko.
Česká republika	Jelito	Vepřová krev, maso, bůček, vnitřnosti, kroupy nebo kousky pečiva, koření (majoránka, kmín), vepřové střívko.
Chile	Prieta	Vepřové maso, krev, tuk, zelí, paprika, řeřicha, vařená rýže, koření nebo sušené ovoce nebo ořechy, vepřové střívko.
Chorvatsko/Slovinsko	Krvavica	Vepřová krev, kůže, vnitřnosti, pohanka, ječmen, rýže, kukuřičná mouka, vepřové střívko.
Dánsko	Blodpølse	Vepřová krev, tuk, žitná mouka, hnědý cukr, rozinky, koření (sůl, skořice, kardamom), vepřové nebo skopové střívko.
Francie	Boudin noir	Vepřové maso, krev a vepřová kůže, smetana, špenát, jedlé kaštany, jablka, vepřové nebo skopové střívko.
Itálie	Sanguinaccio	Vepřové maso, krev, vnitřnosti a tuk, bílý chléb, polenta, piniové oříšky, koření, vepřové střívko.
Německo	Blutwurst	Vepřová krev, maso a tuk, vnitřnosti, oves, chléb, slanina, koření (tymián, majoránka, nové koření), vepřové střívko.
Německo	Zungenwurst	Vepřová krev, tuk, strouhanka, ovesné vločky, nakládaný vepřový jazyk, vepřové střívko.
Německo	Rotwurs	Vepřové maso, krev a tuk, mouka, pikantní koření, vepřové nebo skopové střívko.
Německo	Thüringer blutwurst	Vepřová krev, předvařený vepřová bůček, kůže, játra, koření (majoránka, hřebíček, kmín), vepřové nebo skopové střívko.
Polsko	Kaszanka	Vepřová krev, vnitřnosti, pohanka, ječmen, cibule, koření (černý pepř, majoránka), vepřové střívko.
Polsko	Krupnioki śląskie	Vepřová krev, uzené vepřové maso, pohanka, cibule, česnek, koření (sůl, černý pepř, nové koření, majoránka), vepřové střívko.
Polsko	Żymlok	Vepřová krev, vnitřnosti, rohlíky namočené ve vývaru, cibule, koření (majoránka, černý pepř, bobkový list, jalovec, nové koření, muškátový oříšek), vepřové střívko.
Rumunsko	Sângerete	Vepřová krev, vepřové maso, tuk, vařená rýže, česnek, koření (tymián, muškátový oříšek, koriandr, nové koření), vepřové střívko.

3 Metodika

3.1 Základní chemikálie

- Acetonitril (C_2H_3N)
- Metanol (CH_3OH)
- Kyselina chlorovodíková (HCl)
- Ledová kyselina octová (CH_3COOH)
- Chlorid sodný (NaCl)
- Hydrogenfosforečnan sodný (Na_2HPO_4)
- Dihydrogenfosforečnan sodný dihydrát ($NaH_2PO_4 \cdot 2H_2O$)
- Hydrogenfosforečnan disodný dodekahydrát ($Na_2HPO_4 \cdot 12H_2O$)
- Ultračistá voda ze zařízení Milli Q plus, MILLIPORE, odpor vody byl >18,2 MΩ·cm při 25 °C.
- Standard OTA (*Petromyces albertensis*, ≥98 %, HPLC)

Uvedené chemikálie byly vždy v čistotě UltraPure nebo HipersolfChromanorm.

Všechny chemikálie včetně standardu OTA byly zakoupeny od VWR (Stříbrná Skalice, Česká republika). Standard OTA byl vyroben společností Sigma-Aldrich spol. s r.o. (Praha, Česká republika).

3.2 Roztoky

- PBS pufr (0.62 g $NaH_2PO_4 \cdot 2H_2O$ + 5.73 g $Na_2HPO_4 \cdot 12H_2O$ + 9 g NaCl do 1000 ml H_2O)
- Mobilní fáze: A (C_2H_3N : CH_3COOH 99:1) : B (H_2O: CH_3COOH 99:1) 40:60.
- Acetonitril : voda (C_2H_3N : H_2O (60 : 40 v/v)
- RBS-35

Všechny roztoky byly připraveny v ultračisté vodě pomocí systému Milli-Q (Millipore, Milford, MA, USA). RBS-35 byl zakoupen od P-LAB a.s. (Praha, Česká republika).

3.3 Spotřební materiál

- Ochraprep®, imunoafinitní kolonky ke kvantitativnímu stanovení OTA HPLC, zakoupeny od Jemo Trading s.r.o., Bratislava, vyrábí R-Biopharm (Darmstadt, Německo).
- Filtrační papíry KA-2M, zakoupeny od papírny Pernštejn spol. s r.o. (Pernštejn, Česká republika).
- Nylonové injekční filtry (13 mm, 0,22 µm) vyrobeny firmou Labstore (Inverness, Highland, Spojené království) a zakoupeny od HPST s.r.o. (Praha, Česká republika).
- Špičky na pipety (200 µl, 1000 µl a 10 ml)
- Konické plastové zkumavky se šroubovacím uzávěrem (50 ml)
- Injekční stříkačka (5 ml)
- Kuchyňská odměrka (1000 ml)
- Uzavíratelné plastové krabičky
- Vialky (4 ml)
- Laboratorní sklo

3.4 Přístroje a pomocná zařízení

- Kapalinový chromatograf v sestavě Agilent 1260 Infinity II spojený s 1260 Infinity II fluorescenčním detektorem, výrobce Agilent (Santa Clara, CA, USA), zakoupen od společnosti HPST s.r.o. (Praha, Česká republika).
- Analytická kolona (Kinetex C18, 2,6 µm, 100 Å, 50x21 mm) spojená s předkolonou Security GuardTM (Phenomenex C18, 4x2,0 mm), zakoupena od Chromservis s.r.o. (Praha, Česká republika).
- Homogenizátor A – Ultra-Turrax T 50 digital výrobce IKA®-Werke GmbH & Co. KG (Staufen, Německo), zakoupeno od Fisher Scientific, spol. s r.o. (Pardubice, Česká republika)
- Homogenizátor B – Ultra-Turrax T 10 basic výrobce IKA®-Werke GmbH & Co. KG (Staufen, Německo) zakoupeno od Fisher Scientific, spol. s r.o. (Pardubice, Česká republika)

- Analytická váha KERN EW1500- 2 vyrobená společností KERN & SOHN GmbH (Balingen, Německo), zakoupeno od Fisher Scientific, spol. s r.o. (Pardubice, Česká republika).
- Reax Multi třepačka vyrobená společností Heidolph Instruments GmbH & Co. KG (Schwabach, Německo), zakoupena od společnosti Fisher Scientific, spol. s r.o. (Pardubice, Česká republika).
- Filtrační zařízení Morton frita S3, průměr frity 40 mm, výrobce KAVALIERGLASS, a.s., (Praha 5, Česká republika).
- Ultrazvuková lázeň FB15048, zakoupeno od Fisher Scientific, spol. s r.o. (Pardubice, Česká republika).
- Zařízení pro řízený průtok imunoafinitní kolonkou Bakerbond, zakoupeno od VWR (Stříbrná Skalice, Česká republika).
- Zařízení pro odpařování pod dusíkem (tj. koncentrátor vzorků) EVATERM, výrobce Ing. V. Hanuš, (Brno, Česká republika).
- Automatická pipeta Gilson PIPETMAN, 100-1000 µl, zakoupeno od Fisher Scientific, spol. s r.o. (Pardubice, Česká republika).
- Automatická pipeta Gilson PIPETMAN, 10-100 µl, zakoupeno od Fisher Scientific, spol. s r.o. (Pardubice, Česká republika).
- Automatická pipeta Gilson PIPETMAN, 1-10 ml, zakoupeno od Fisher Scientific, spol. s r.o. (Pardubice, Česká republika).
- Mrazící box
- Chladnička
- Horkovzdušná sušárna

3.5 Použité programy a software

- Microsoft® Excel®, verze 2016, součást sady Microsoft 365®, Microsoft Corporation, Redmond, Washington, USA
- Microsoft® Word®, verze 2016, součást sady Microsoft 365®, Microsoft Corporation, Redmond, Washington, USA
- Software Agilent OpenLab data. (Santa Clara, CA, USA), zakoupen od společnosti HPST s.r.o. (Praha, Česká republika).

3.6 Požadavky na pracovní techniku

Při manipulaci se vzorky před samotným laboratorním zpracováním je nutno použitím vhodných obalových materiálů a zajištěním skladovacích podmínek zamezit sekundární kontaminaci vzorků a růstu mikroskopických hub produkujících stanovovaný OTA. Velmi důležité je důkladně očistit a opláchnout metanolem zařízení pro mechanické zpracovávání (homogenizátor) vždy před prací s novým následujícím vzorkem s cílem zamezit vzájemnou nežádoucí kontaminaci jednotlivých vzorků. Z důvodů zamezení kontaminace prostředí laboratoře a laboratorních pomůcek se proces homogenizace provádí zásadně v digestoři se zapnutým odsáváním. Po práci je nutno digestoř dokonale vyčistit (Škarková, 2011).

Připravené zásobní roztoky a chemikálie je nutno skladovat tak, aby nedocházelo k jejich znehodnocení zejména odparem rozpouštědla. Všechny výše uvedené chemikálie a roztoky (viz podkapitoly 3.1., 3.2.) jsou skladovány v chladničce při teplotě 4 °C. Primární standard OTA je skladován v mrazícím boxu při teplotě -25 °C. Před použitím je třeba roztoky a standard vytemperovat na běžnou laboratorní teplotu 21±0,5 °C.

Při práci se standardy je nutno dodržet bezpečnostní pravidla pro práci s toxickými látkami a karcinogeny. Je nutno: nebezpečné látky používat pouze k předepsanému účelu, dodržovat pokyny výrobce (návod k použití, bezpečnostní listy), nebezpečné látky uchovávat v originálních obalech (hrozí nebezpečí záměny) (Skřehot, 2020). Je třeba zabránit jejich požití, vdechování a styku s pokožkou. Se standardy uchovávanými pod víčky se silikonovým septem je zapotřebí manipulovat tak, aby nedocházelo k přímému dotyku roztoku a septa. Tato pravidla platí rovněž při práci s dalšími látkami zařazenými mezi jedy a žíraviny.

3.7 Princip metody

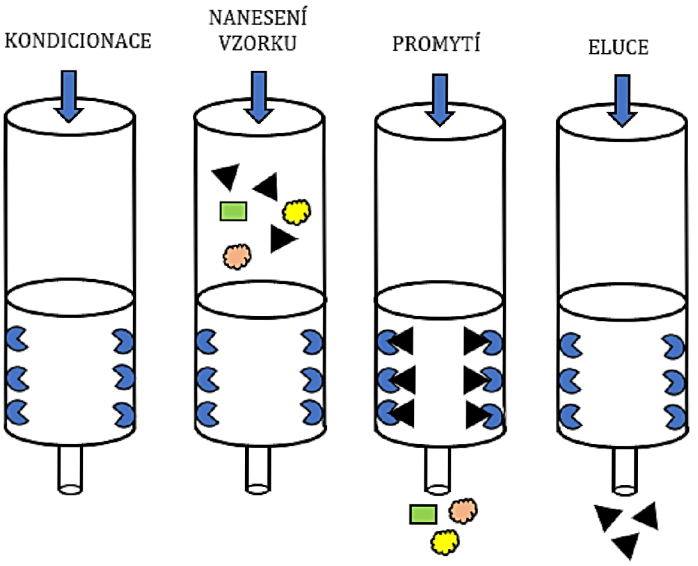
Celkové testování na mykotoxiny zahrnuje získání adekvátního vzorku, přípravu vzorku, a nakonec provedení analytického postupu. Vybraný vzorek musí být podroben extrakci toxinu a čištění, aby se extrakt zbavil co největšího množství cizích, rušivých látek. Poté musí být čistý extrakt podroben jednomu z více možných detekčních systémů ke zjištění přítomnosti a množství mykotoxinu přítomného ve vzorku. V tomto případě byla použita metoda HPLC-FLD (vysokoúčinná kapalinová chromatografie s fluorescenční detekcí).

3.7.1 HPLC-FLD

Metoda HPLC-FLD je použitelná pro kvantitativní stanovení OTA v krevních produktech (Pleadin *et al*., 2014, 2016).

Fluorescenční detektor má vysokou citlivost, a proto je vhodný pro stanovení analytů s velmi nízkými koncentracemi. OTA je zachycen ze vzorku pomocí imunoafinitních kolonek (IAC), které jsou založeny na biospecifické vazbě protilátky a antigenu. Při stanovení OTA se mohou rušivě projevit látky, které vykazují fluorescenci při stejných vlnových délkách, použitím IAC jako čistícího postupu jsou však tyto látky obvykle odděleny a k interferencím – vzájemnému ovlivňování nedochází (Škarková, 2011).

IAC obsahují suspenzi gelu, na kterém jsou navázány monoklonální protilátky. Na tyto protilátky se naváže antigen (v tomto případě OTA), jestli že je ve vzorku přítomen. Ostatní nenavázané látky jsou odstraněny promývacím roztokem – fosfátovým pufrem (PBS). Následuje tzv. eluce (vymývání) hledaného analytu. Použitím 1,5 ml metanolu okyseleného kyselinou octovou (98 : 2 v/v) jako elučního činidla se OTA uvolní z komplexu antigen-protilátka. Vzniklý eluát je jímán do malé skleněné vialky (4 ml) se šroubovacím uzávěrem. Poté je odpařen dusíkem na koncentrátoru vzorků (EVATERM) (Škarková, 2011). Obecný princip IAC je zobrazen na obrázku č. 2.



Obrázek 2 Obecný princip imunoafinitní chromatografie (Mikysková, 2022).

4 Pracovní postup

4.1 Odběr, doprava a skladování vzorků

Na českém trhu v období 2020/2021v běžných veřejnosti dostupných obchodních řetězcích, maloobchodech a řeznictvích v 18 různých městech po celé oblasti východních Čech bylo zakoupeno celkem 200 vzorků jelit. Jednalo o města Chlumec nad Cidlinou, Chotovice, Dvůr Králové, Hořice, Hradec Králové, Jaroměř, Jičín, Kosmonosy, Městec Králové, Mladá Boleslav, Mnichovo Hradiště, Nová Paka, Nový Bydžov, Pardubice, Praha, Smiřice, Sobotka a Třebechovice pod Orebem.

Zakoupené masné výrobky byly řádně zaevidovány, označeny a roztříděny dle výrobce, data, místa nákupu a šarže. Všech 200 vzorků bylo dopraveno do laboratoře a uskladněno v mrazícím boxu při teplotě – 25 °C.

4.2 Úprava a homogenizace

V první fázi práce bylo stěžejní vytvořit homogenní směs z každého zakoupeného výrobku a získat tak primární laboratorní vzorek pro budoucí práci a konečné stanovení přítomnosti sledovaného OTA. Homogenizace je klíčový proces přípravy reprezentativního vzorku k samotné analýze. Proces zajišťuje řádné promíchání všech částí vzorku včetně potencionální kontaminace v celém objemu.

Každý kus byl nejprve nařezán na menší části a poté důkladně mechanicky zpracován pomocí homogenizátoru A ve větších plastových odměrkách do hladka. Takto připravená homogenní směs byla navážena do dvou konických plastových nádobek se šroubovacím uzávěrem vždy po 5 gramech. Obě nádobky byly označeny číslem vzorku a písmenem dle abecedního pořadí (105B a 105C). Pečlivě označené nádobky byly vloženy do jednoho mikrotenového sáčku a uloženy do mrazničky. Nádobka s označením C vždy sloužila jako náhradní vzorek pro případ nutnosti opakování extrakce.

Pro naprostou jistotu bylo naváženo dalších cca 130 g od každého vzorku. Tento rezervní materiál byl uložen do uzavíratelných plastových krabiček, nadepsán číslem vzorku a písmenem D (105D). Takto připravený záložní vzorek je nutno skladovat minimálně jeden rok z důvodu případné kontroly.

Pozn: Jako vzorek A uvažujeme původní masný výrobek. Schéma označování vzorků je tedy: 105A – vzorek původní, 105B – vzorek k analýze, 105C – náhradní vzorek, 105D – rezervní materiál.

4.3 Extrakce a příprava vzorků k analýze

Před začátkem samotné práce byly vzorky vždy rozmrazeny a vytemperovány na laboratorní teplotu. Ke každé navážce vzorku (5 g), bylo přidáno 20 ml roztoku acetonitril:voda (60:40 v/v). Poté byly vzorky opět homogenizovány, a to přímo v konických plastových nádobkách pomocí homogenizátoru B minimálně 2 minuty při 11.000 ot/min., tak aby došlo k dokonalému promísení vzorku s roztokem v celém objemu. Všechny nádobky byly umístěny do laboratorní třepačky a třepány 10 min., tento krok zaručoval oddělení tukových částic, které by stěžovaly následnou extrakci na IAK. Vzorky byly postupně z třepačky odebírány a veškerý obsah byl zfiltrován na filtračním zařízení Morton s fritou S3 s vloženou patronou z filtračního papíru KA-2M. Získaný filtrát by měl být především čirý, bez kalu. V případě vzniku zákalu se vzorek znovu přefiltroval.

IAK byly před začátkem práce vyjmuty z chladničky a vytemperovány na laboratorní teplotu. Po vytemperování byly nasazeny na vakuové prosávací zařízení, pomocí kterého došlo k rychlému, a především regulovanému vykapání pufru obsaženého v kolonce. Pufr se nechal vykapat tak, aby jeho hladina neklesla pod horní úroveň filtru s gelem a nedošlo tak k jeho vyschnutí.

Do takto připravené IAK se do zásobníku nad kolonkou pipetou nadávkují 4 ml získaného filtrátu, který se zředí 44 ml PBS pufru (4 ml filtrátu odpovídá 1 g vzorku + 44 ml PBS pufru pH 7,4.). Takto zředěný filtrát se nechá velice pomalu prokapat do skleněné odpadní vany – minimálně 80 min., tj. rychlost cca 10 kapek/min. Filtrát nesmí v žádném případě kolonkou rychle protéct a kapalina opět nesmí klesnout pod horní úroveň filtru s gelem. Rychlost prokapávání byla regulována vytvářením podtlaku ve skleněné odpadní vaně. Po prokapání celého objemu byla IAC promyta 20 ml PBS pufru. Díky promytí PBS pufrem byly z kolonky odstraněny ostatní látky, které se v gelu zachytily. Zbytky PBS byly vytlačeny krátkým prosátím vzduchu.

Následuje uvolnění OTA z komplexu antigen-protilátka. Použitím okyseleného metanolu jako elučního činidla o celkovém objemu 1,5 ml: metanol : kyselina octová (98 : 2 v/v) je OTA uvolněn z gelu. Eluční činidlo (1 ml) se nechá pomalu procházet přes IAC, přičemž rychlost průtoku by měla být stejná jako u předcházející filtrace. Eluční směs byla jímána do předem popsané vialky (4 ml) se šroubovacím uzávěrem.

Prokapaná eluční směs byla z vialky znovu přelita do IAC, kde se nechala asi 1 minutu odstát. Poté se opět nechala pomalu překapat do připravené vialky. Takto se eluce OTA opakovala a byla provedena celkem pětkrát. Na závěr byla eluce provedena dalšími 0,5 ml elučního činidla. Po vytlačení zbytků směsi z kolonky bylo získáno 1,5 ml eluátu.

Následně byla vialka s eluátem vložena do koncentrátoru vzorků EVATERM, kde byl eluát odpařen pod proudem dusíku do sucha při teplotě 50 °C. Zkoncentrování vzorků při této teplotě trvalo cca 45 minut. Odparek byl poté uložen do chladničky při teplotě 4 °C do doby před zpracováním.

Pozn: Celý postup uvedený výše byl v rámci práce a omezení kapacity na vakuovém prosávacím zařízení prováděn v sériích po 12 vzorcích. Při počtu 200 vzorků byl postup proveden celkem v 16 sériích po 12 vzorcích a jednou po 8 vzorcích.

4.4 Dekontaminace laboratorního skla

Sklo a ostatní laboratorní pomůcky jsou dekontaminovány ponořením do 2% roztoku přípravku RBS 35 při teplotě 55 °C po dobu alespoň 30 minut. Po mechanickém odstranění nečistot a zbytků nálepek a štítků je nádobí ponořeno do horké vody s přídavkem saponátu, opláchnuto a dále vloženo do lázně destilované vody. Nakonec je nádobí sušeno při teplotě 70 °C po dobu 30 min a následně opláchnuto metanolem. Po odpaření metanolu je uloženo do uzavíratelných skříněk pro budoucí použití.

Tato dekontaminační metoda je ověřena a účinně dekontaminuje 99,99 % obsahu OTA (Ostrý *et al*. 2021).

4.5 Chromatografický postup a analýza OTA na HPLC-FLD

Stanovení OTA ve vzorcích jelit bylo provedeno v souladu se standardním operačním postupem SOP: T_78 (Škarková, 2011). Akreditovaná metoda používaná ke stanovení OTA v potravinách a krmivech vychází z norem ČSN EN 14133. ČSN EN 14132 a ČSN EN 15829.

Před zpracováním na HPLC-FLD byl odparek vyndán z chladničky, vytemperován na laboratorní tepotu a poté rozpuštěn za působení třepačky a ultrazvuku v mobilní fázi v poměru A (acetonitril : kyselina octová 99:1) : B (voda : kyselina octová 99:1) 40:60. Obnovený extrakt byl protlačen přes membránový filtr do nové čisté vialky se šroubovacím uzávěrem. Vialky s extraktem jsou následně umístěny na HPLC-FLD s automatickým dávkovačem – tzv. autosamplerem.

4.5.1 Podmínky stanovení

Při obsluze kapalinového chromatografu se postupuje dle návodu výrobce. Před zahájením samotné analýzy musí chromatografická aparatura pracovat alespoň 60 minut na „naprázdno“, aby došlo k ustálení podmínek na chromatografické koloně a detektoru – tzv. ekvilibrace.

Tabulka 11 HPLC-FLD podmínky

Analytická kolona	Kinetex C18, 2.6 µm, 100 Å, 50x21 mm,
Předkolona	GuardTM Phenomenex C18, 4x2,0 mm
HPLC pumpa	Kvartérní pumpa G7104
Fluorescenční detektor	FLD G1364F: Excitační vlnová délka: 333 nm, emisní vlnová délka: 465 nm, zisk PMT 18, fluorescence attenuation 100 LU.
Mobilní fáze	A (acetonitril : kyselina octová 99:1) : B (voda : kyselina octová 99:1) 40:60, připravovaná každý pracovní den čerstvá.
Průtok	0,2 ml/min.
Teplota kolony	30 °C.
Systém kontroly dat	Agilent OpenLab data.
Dávkovač	Dávkovač G7129C.
Objem nástřiku	8 µl

Vzorky ve vialkách se umístí podle vytvořené sekvence do autosampleru a pomocí softwaru se sekvence spustí.

4.6 Kalibrace

4.6.1 Kalibrační křivka

Pro sestrojení kalibrační křivky je z pracovního standardu připravena šestibodová kalibrační řada o koncentraci OTA 0,1; 0,25; 0,5; 1,0; 2,0; 4,0 ng/ml naředěním v mobilní fázi. Mobilní fáze a všechny kalibrační roztoky byly připravovány každý pracovní den čerstvé.

4.6.2 Slepý vzorek

Slepý vzorek – tzv. blank, slouží ke kontrole čistoty chemikálií a postupu zpracování před nadávkováním vzorků, čímž je zabráněno vzniku falešné pozitivity.

4.7 Validované parametry

4.7.1 Opakovatelnost retenčního času

Retenční čas byl stanoven na 5,2 ± 0,06 min. Rozptyl činí 1,2 %.

4.7.2 Linearita

Linearita je chápána jako lineární vztah mezi dvěma náhodnými veličinami, konkrétně odezvou přístroje (analytický signál) a koncentrací analytu. V současné době se pro posouzení linearity používají téměř výhradně korelační koeficient. Korelační koeficient R^2 však vykazuje spíše stupeň korelace než linearitu. Záleží na rozložení bodů na přímce. Proto lze použít jiné testy, které více vypovídají o linearitě (Van Loco *et al*., 2002).

Pro kontrolu linearity byl tedy dodatečně ještě použit QC koeficient. „*QC koeficient se používá v kombinaci s korelačním koeficientem a linearita se obecně považuje za prokázanou, když* $R^2 > 0.99$ *a QC <5 %*“ (Van Loco *et al*., 2002).

Při validaci byl korelační koeficient R^2 = 0,999 a QC = 1,329 %, tedy lze předpokládat, že kalibrační křivka byla lineární.

4.7.3 Mez detekce a mez stanovitelnosti

Mez detekce byla stanovena na 0,03 ng/g (LOD – limit of detection) a mez stanovitelnosti (LOQ – limit of quantification) byla 0,10 ng/g, na základě metodiky IUPAC, kde LOD= $\frac{3*\sigma}{b}$ a LOQ je $\frac{10*\sigma}{b}$ (kde σ = směrodatná odchylka při desetinásobném měření nejnižšího standardu a b = směrnice kalibrační křivky).

4.7.4 Opakovatelnost stanovení

Relativní směrodatná odchylka (RSD) měření byla stanovena na 2,05 % na základě časově nezávislého měření 4 vybraných vzorků v šesti opakováních.

4.7.5 Výtěžnost metody

Výtěžnost metody byla stanovena na 71,6 % pomocí spikovaných vzorků o koncentracích 0,5;1,0 a 2,0 ng/g v šesti opakováních s přihlédnutím k matricovému efektu, což splňuje Nařízení Komise z roku 2006 (Evropská komise, 2006) pro stanovení mykotoxinů v potravinách. Nebyl použit žádný certifikovaný referenční materiál z důvodu jeho neexistence.

4.8 Způsob zapisování primárních dat

Ke sběru chromatografických údajů byl použit software Agilent OpenLab data a následně Microsoft Excel verze 2016 a Microsoft Word verze 16. Data byla evidována dle čísla vzorků a data zpracování.

5 Výsledky

Všech 200 vzorků jelit bylo shledáno jako pozitivní, překračující LOQ 0,1 ng/g, Nejnižší zaznamenaná koncentrace OTA ze všech vzorků jelit byla 0,15 ng/g a nejvyšší 5,68 ng/g. Všechny získané koncentrace jsou uvedeny v následující tabulce.

Tabulka 12 Koncentrace OTA ve vzorcích jelit.

no.	OTA (ng/g)	no.	OTA (ng/g)	no.	OTA (ng/g)	no.	OTA (ng/g)	no.	OTA (ng/g)
1	0,21	**41**	1,51	**81**	0,56	**121**	1,23	**161**	0,52
2	0,30	**42**	1,26	**82**	1,42	**122**	2,81	**162**	1,82
3	**0,15**	**43**	1,43	**83**	0,97	**123**	1,91	**163**	0,80
4	1,00	**44**	1,10	**84**	0,95	**124**	3,69	**164**	0,79
5	0,16	**45**	0,86	**85**	2,04	**125**	5,62	**165**	0,92
6	0,62	**46**	1,41	**86**	2,40	**126**	**5,68**	**166**	0,68
7	0,90	**47**	1,00	**87**	0,50	**127**	3,51	**167**	1,17
8	0,74	**48**	0,57	**88**	0,86	**128**	2,61	**168**	1,08
9	0,35	**49**	0,79	**89**	1,31	**129**	2,08	**169**	2,10
10	0,80	**50**	1,12	**90**	0,81	**130**	1,92	**170**	2,29
11	0,38	**51**	0,72	**91**	0,79	**131**	3,03	**171**	2,78
12	0,35	**52**	0,84	**92**	1,51	**132**	2,53	**172**	0,48
13	0,67	**53**	0,92	**93**	0,61	**133**	2,37	**173**	1,52
14	1,29	**54**	1,45	**94**	1,53	**134**	2,87	**174**	1,48
15	1,02	**55**	1,45	**95**	1,72	**135**	1,63	**175**	1,16
16	2,04	**56**	1,90	**96**	2,96	**136**	1,27	**176**	1,02
17	1,42	**57**	0,95	**97**	3,25	**137**	2,03	**177**	1,71
18	1,84	**58**	1,73	**98**	0,91	**138**	1,13	**178**	1,07
19	3,70	**59**	0,95	**99**	0,73	**139**	4,17	**179**	1,17
20	1,66	**60**	1,01	**100**	1,08	**140**	3,03	**180**	0,90
21	1,19	**61**	0,96	**101**	0,31	**141**	2,30	**181**	2,03
22	0,63	**62**	1,77	**102**	0,89	**142**	3,39	**182**	1,36
23	1,07	**63**	1,04	**103**	1,30	**143**	1,32	**183**	1,55
24	1,78	**64**	1,55	**104**	2,00	**144**	1,97	**184**	1,31
25	0,18	**65**	0,78	**105**	0,91	**145**	1,15	**185**	1,74
26	0,73	**66**	1,76	**106**	1,59	**146**	1,24	**186**	1,49
27.	0,84	**67**	1,03	**107**	1,51	**147**	0,88	**187**	1,94
28.	0,52	**68**	0,48	**108**	0,75	**148**	1,03	**188**	1,85
29.	0,68	**69**	2,43	**109**	1,08	**149**	0,78	**189**	2,60
30.	0,35	**70**	2,76	**110**	0,92	**150**	3,09	**190**	1,20
31.	0,80	**71**	2,20	**111**	1,88	**151**	1,59	**191**	1,02
32.	0,73	**72**	2,93	**112**	2,39	**152**	1,15	**192**	1,56
33.	0,85	**73**	0,57	**113**	2,14	**153**	1,67	**193**	1,35
34.	1,11	**74**	2,30	**114**	1,66	**154**	0,83	**194**	1,48
35.	0,38	**75**	1,86	**115**	4,56	**155**	3,31	**195**	1,51
36.	0,84	**76**	1,93	**116**	3,03	**156**	0,93	**196**	0,68
37.	1,26	**77**	0,66	**117**	2,22	**157**	0,21	**197**	1,33
38.	1,26	**78**	1,21	**118**	1,64	**158**	0,73	**198**	1,30
39.	1,19	**79**	1,27	**119**	1,46	**159**	1,02	**199**	1,06
40.	1,02	**80**	3,29	**120**	2,20	**160**	1,67	**200**	0,54

V současné době existuje jen málo výzkumů zabývající se přirozeným výskytem OTA v jelitech a souvisejících krevních produktech. Stávající výzkumy se věnují jen relativně nízkému počtu vzorků čítajícím od 12 do 57 vzorků (Gareis *et* Scheuer, 1999, 2000; Ostry *et al*., 2011; Tangni *et al*., 2021). Tato diplomová práce je výjimečná v tom, že se zabývá vysokým počtem vzorků, které byly navíc všechny shledány jako pozitivní, s úrovní koncentrace OTA nad LOQ 0,1(ng/g).

Statistické zpracování dat přirozeného výskytu OTA ve vzorcích jelit je uvedeno v následující tabulce.

Tabulka 13 Statistické zpracování dat ve vzorcích jelit

N	n+%	Aritmetický průměr(ng/g)	Median (ng/g)	90^{Th}percentil (ng/g)	Rozsah (ng/g)
200	100	1.47	1.26	2.77	0.15-5.68

n = celkový počet vzorků

6 Diskuse

V následujícím textu jsou porovnány výsledky této práce s národními i mezinárodními studiemi zabývajícími se problematikou OTA a jeho přirozeného výskytu v jelitech a souvisejících krevních produktech. V současné době existuje jen málo prací zabývajících se přímo touto problematikou.

Studie pocházející z Belgie zveřejnila výsledky, které nepotvrzují žádný výskyt OTA v celkem 20 zkoumaných vzorcích jelit (Tangni *et al.*, 2021). Tento výsledek může souviset s použitou analytickou metodou LC-MS/MS, která nezahrnuje krok čištění filtrátu na IAK.

Obdobné výsledky byly hlášeny i ve studii pocházející z České republiky. V této studii bylo zkoumáno celkem 12 vzorků, u kterých taktéž nebyl výskyt OTA potvrzen. V tomto případě probíhalo stanovení OTA analytickou metodou HPLC-FLD ve spojení s krokem čištění na IAK, jako v této práci (Ostry *et al.*, 2011), avšak příčinou negativního výsledku u všech vzorků může být stanovení relativně vysokého LOQ 0,3 ng/g. Stejně tak v belgické studii, kde byl LOQ 0,4 ng/g. (Resp. ve srovnání s LOQ 0,1 ng/g stanovené v této práci).

Nejlépe lze porovnat výsledky této práce se studií pocházející z Německa. Oproti předchozím studiím se tato studie zabývala největším počtem vzorků jelit, a to celkem 57. Stanovení OTA ve vzorcích probíhalo analytickou metodou HPLC-FLD ve spojení s krokem čištění na IAK a LOQ byl 0,1 ng/g, přesně jako v této práci. Celkem 44 vzorků z 57 tj. 77 % vzorků jelit bylo shledáno jako pozitivní překračující LOQ 0,1 ng/g (Gareis *et* Scheuer, 1999, 2000). Průměrná koncentrace OTA ze všech vzorků jelit činí v německé studii 0,16 ng/g vs. 1,47 ng/g v této práci. Nejvyšší zaznamenaná koncentrace OTA ze všech analyzovaných vzorků byla v německé studii 3,16 ng/g vs. 5,68 ng/g v této práci.

Jako další je potřeba zmínit výzkum, který probíhal v Itálii. Nejedná se však přímo o studii zabývající se jelity a krevními produkty, ale různými druhy salámů, které se svým složením mohou lišit. Nicméně Itálie jako jediná země EU reguluje množství OTA ve vepřovém mase, a i v produktech vyrobených z něj. V této studii bylo analyzováno celkem 172 druhů salámů, stanovení OTA probíhalo metodou HPLC-FLD a LOQ byl stanoven 0,2 µg/kg. Přítomnost OTA byla zjištěna u 22 salámů, z toho 3 vzorky překročily zmíněnou italskou směrnou hodnotu pro OTA ve vepřovém mase (1 µg/kg) (Altafini *et al*., 2019). Autoři však dospěli k závěru, že vysoké hladiny OTA v těchto vzorcích byly odvozeny od kořenící směsi obsahující chilli kontaminované OTA, což na druhou stranu potvrzuje zvýšení obsahu OTA v konečných produktech přidáním kontaminovaného koření.

Je všeobecně známo, že OTA je stabilní vůči tepelným úpravám a podmínkám nízkého pH. Typické tepelné úpravy potravin jako je vaření, pečení, smažení a pražení nezpůsobují žádný významný pokles OTA v potravinách (Pleadin *et al.*, 2021). Bylo však prokázáno, že koncentraci OTA lze v jelitech snížit o 9,1 % vařením při 100 °C po dobu 30 minut, o 13,8 % smažením při 170 °C po dobu 30 minut, o 70,9 % pečením při 190 °C po dobu 60 minut, o 76,6 % pečením při 200 °C po dobu 60 minut a o 85,9 % pečením při 220 °C po dobu 60 minut (Pleadin *et al*., 2014). Tyto výsledky jsou významné z pohledu snížení OTA v těchto rizikových produktech metodami běžné přípravy potravin, nicméně bohužel uvedené časy a teploty zcela neodpovídají běžné praxi spotřebitele.

7 Závěr

V této diplomové práci jsou prezentovány výsledky získané při stanovení OTA ve 200 vzorcích jelit analytickou metodou HPLC-FLD. Výtěžnost metody byla stanovena na 71,6 %, což vyhovuje nařízení Evropské komise z roku 2006 o stanovení mykotoxinů v potravinách (Evropská komise, 2006). Všech 200 zkoumaných vzorků, které byly zakoupeny na českém trhu v roce 2020/2021, bylo shledáno pozitivními, tedy s hodnotami nad LOQ. Navíc celkem 66 %, tedy více jak polovina těchto vzorků, obsahovalo koncentraci překračující zavedený maximální limit v Itálii, která jako jediná reguluje OTA v živočišných produktech tohoto typu.

OTA je mykotoxin, který představuje významný sekundární metabolit produkovaný plísněmi patřící zejména k druhům *Aspergillus* a *Penicillium.* Kvůli rozšíření jeho výskytu, které je připisováno současnému globálnímu oteplování, a zapojení OTA ve vývoji lidských nemocí, stoupá zájem o jeho studium. Jeho přirozený výskyt v potravinách živočišného původu neustále přibývá. Obecně ale živočišné produkty, na rozdíl od obilovin a cereálních produktů, nejsou hlavním problémem veřejného zdraví.

Vzhledem k výsledkům této práce by bylo žádoucí věnovat se více kontaminacím OTA v potravinách živočišného původu, zejména pak v konečných produktech obsahující krev, vnitřnosti a maso prasat a zvážit nastavení maximálního limitu OTA pro tyto potraviny v EU. K řešení tohoto problému jsou však zapotřebí další studie, nicméně odborná literatura o přirozeném výskytu OTA v těchto produktech je prozatím omezená.

V neposlední řadě je pro snížení přítomnosti OTA v živočišných produktech nutné věnovat zvýšenou pozornost i kvalitě krmiv určených pro hospodářská zvířata, jelikož kontaminované krmivo hraje zásadní roli v přenosu mykotoxinu do tkáních živočichů.

8 Seznam literatury

ALTAFINI, A., ARMORINI, S., ZAGHINI, A., SARDI, L., & RONCADA, P., 2017: Tissue distribution of ochratoxin A in pigs after administration of two-levels contaminated diets. World Mycotoxin Journal, 10(3), 263–272. https://doi.org/10.3920/WMJ2016.2152

ATLASMEDIA LTD., 2022: Blood Sausages. Tasteatlas [online]. (Cit. 27.4.2022). Dostupné z: https://www.tasteatlas.com/blood-sausages.

BATTACONE, G.; NUDDA, A.; PULINA, G., 2010: Effects of ochratoxin A on livestock production. Toxins, 2, 1796–1824.

BATTILANI, P., TOSCANO, P., VAN DER FELS-KLERX, H.J., MORETTI, A., CAMARDO, LEGGIERI M., BRERA, C., RORTAIS, A., GOUMPERIS, T. & ROBINSON T., 2016: Aflatoxin B1 contamination in maize in Europe increases due to climate change. Sci Rep, 6, doi: 10.1038/srep24328.

BHAT, R., RAI, R.V., KARIM, A.A., 2010: Mycotoxins in Food and Feed: Present Status and Future Concerns. Compr Rev Food Sci F, 9: 57–81. Doi:10.1111/j.1541–4337.2009.00094.x.

BULE G., 2019: A guide to traditional black pudding [online]. (Cit. 28.4.2022). Dostupné z: https://englishbreakfastsociety.com/black-pudding.html.

BOONEN, J., MALYSHEVA, S., V., TAEVERNIER, L., DI MAVUNGU, J., D., DE SAEGER, S., DE SPIEGELEER, B., 2012: Human skin penetration of selected model mycotoxins. Toxicology 301: 21–32.

CAST, 2003: Mycotoxins: Risks in Plant, Animal, and Human Systems [online]. (Cit. 11.4.2022). ISBN 1-887383-22-0, 199. Dostupné z: https://www.cast-science.org/publication/mycotoxins-risks-in-plant-animal-and-human-systems/.

GILBERT, J., BRERETON, P., MACDONALD, S., 2001: Assessment of dietary exposure to Ochratoxin A in the UK using a duplicate diet approach and analysis of urine and plasma samples. Food Addit Contam, 18: 1088–1093. Doi:10.1080/02652030110070030.

GAREIS, M., *et* SCHEUER, R., 1999:. Prevention of Mycotoxin Contamination of Meat and Meat Products. JSM Mycotoxins, 1999(Suppl2), 101–108. https://doi.org/10.2520/myco1975.1999.Suppl2_101

GAREIS, M., *et* SCHEUER, R., 2000: Ochratoxin A in meat and meat products. Archiv Für Lebensmittelhygiene, 51(4/5), 102–104.

EFSA, 2004: Opinion of the Scientific Panel on Contaminants in Food Chain on a request from the Commission related to ochratoxin A (OTA) as undesirable substance in animal feed. Request No EFSA-Q-2003-039. EFSA Journal, 2(10), 1–36. https://doi.org/10.2903/j.efsa.2004.101.

EFSA., 2006: Opinion of the scientific panel on contaminants in the food chain on request from the commission related to ochratoxin A in food. EFSA J. 2006. 365: 1–56.

EFSA, 2010: Scientific Opinion Statement on Recent Scientific Information on the Toxicity of Ochratoxin A. EFSA J. 2010, 8, 162.

EFSA. (2020). Risk assessment of ochratoxin A in food. EFSA Journal, 18(5), 1–150. https://doi.org/10.2903/j.efsa.2020.6113.

ETZEL, R., 2002: Mycotoxins. J. Am. Med. Assoc., vol. 287, no. 4, s. 425–427.

EUROPEAN UNION., 2002: Assessment of dietary intake of Ochratoxin A by the population of EU member states. Report of experts participating in Task 3.2.7 Reports on Tasks for Scientific Cooperation [online]. (Cit. 11.4.2022). Dostupné z: http://ec.europa.eu/food/fs/scoop/ index_en.html.

EVROPSKÁ KOMISE, 2006: Nařízení komise (EU) 1881/2006 ze dne 19. prosince 2006, kterým se stanoví maximální limity některých kontaminujících látek v potravinách [online]. (Cit. 25.4.2022). Dostupné z WWW: http://eurlex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=OJ:L:2006:364:0005:0024:CS:PDF.

EVROPSKÁ KOMISE, 2010: Nařízení komise (EU) 105/2010 ze dne 5. února 2010, kterým se mění nařízení (ES) č. 1881/2006, kterým se stanoví maximální limityněkterých kontaminujících látek v potravinách, pokud jde o ochratoxin A [online]. 2010 (Cit. 2.5.2022). Dostupné z: https://eurlex.europa.eu/legalcontent/CS/TXT/PDF/?uri=CELEX:32010R0105&from=CS.

EVROPSKÁ KOMISE, 2012: Nařízení komise (EU) 594/2012 ze dne 6. července 2012, kterým se mění nařízení (ES) č. 1881/2006, kterým se stanoví maximální limity některých kontaminujících látek v potravinách, pokud jde o ochratoxin A, PCB bezdioxinového efektu a melaminu v potravinách [online]. 2012. (Cit. 3. 5. 2022). Dostupné z: https://eurlex.europa.eu/legalcontent/CS/TXT/PDF/?uri=CELEX:32010R0105&from=CS.

EVROPSKÁ KOMISE, 2015: Nařízení komise (EU) 2015/1137 ze dne 13. července 2015, kterým se mění nařízení (ES) č. 1881/2006, pokud jde o maximální limit ochratoxinu A v koření Capsicum spp. [online]. 2015. (Cit. 9. 4. 2018). Dostupné z: http://eurlex.europa.eu/legalcontent/CS/TXT/PDF/?uri=CELEX:32015R1137&from=CS.

FAO, 2004: Assessing quality and safety of animal feeds. FAO Rome. 152 s. ISBN 92-5–105046-5. ISSN 0254-6019.

FLORIÁN M., 2013: Systém kontroly a monitoringu mykotoxinů v krmivářské praxi. In:EAGRI: Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský [online]. (Cit. 20.4.2022). Dostupné z: http://eagri.cz/public/web/ukzuz/tiskovy-servis/tiskove-zpravy/x2013_seminar-mykotoxiny-azemedelska-produkce.html.

HAJŠLOVÁ, J.,2013: Mykotoxiny: bezpečnost krmiv a krmných doplňků [online]. (Cit. 20.4.2022). VŠCHT Praha. Dostupné z: http://www.phytosanitary.org.

HEUSSNER, A.H. et BINGLE, L.E.H., 2015: Comparative ochratoxin toxicity: a review of the available data. Toxins, vol. 7, no. 10, s. 4253–4282. ISSN 2072-6651.

HIBI, D., SUZUKI, Y., ISHII, Y., JIN, M., WATANABE, M., SUGITA-KONISHI, Y., YANAI, T., NOHMI, T., NISHIKAWA, A., UMEMURA, T., 2011: Site-Specific In Vivo.Mutagenicity in the Kidney of gpt Delta Rats Given a Carcinogenic Dose of Ochratoxin A. Toxicological Sciences, 122(2): 406–414.

HORT, V.; NIKOLAS, M.; MINVILLE, B.; MALEIX, C.; DESBOURDES, C.; HOMMET, F.; DRAGGACI, S.; DERVILLY-PINEL, G.; ENGEL, E.; GUÉRIN, T., 2018: Ochratoxin A determination in swine muscle and liver from French conventional or organic farming production systems. J. Chromatogr. B Analyt. Technol. Biomed. Life Sci.1092, 131–137.

HRDINA, V., HRDINA, R., JAHODÁŘ, L., MARTINEC, Z., MĚRKA, V., 2004: Přírodní toxiny a jedy. Praha: Galén. ISBN 80-7262-256-0.

IARC., 1983: IARC Monographs on the evaluation of the carcinogenic risk od chemicals to humans: Some food additives, feed additives and naturally occurring substances. Lyon, France. ISBN 92-832-1231-2.

IARC., 1993: IARC Monographs on the evaluation on of carcinogenic risk in human: Some naturally occurring substances: Food items and constituents, heterocyclic aromatic amines and mycotoxins. Lyon, France: IARC. ISBN 92-832-1256-8.

INGR, I., 1986: Mlékařství a hodnocení živočišných výrobků II. Brno: Vysoká škola zemědělská v Brně, agronomická fakulta, 135 s.

JANDÁSEK, J., 2014: Seasonings in the production of cooked meat products. Maso, 2014(1), 137–145

JECFA., 2008: Ochratoxin A (addendum). In Safety evaluation of certain food additives and contaminants. Prepared by the sixty – eight meeting of the joint

FAO/WHO expert committee on food additives, June 19-28, 2007, Geneva, Switz. WHO food additive series, Vol. 59. Geneva, Switz.: Food and Agriculture Organisation of the United Nations (FAO), World Health Organization (WHO). 169-180, 357–429, 454.

KHALESI M., KHATIB N., 2011: The effects of different ecophysiological factors on ochratoxin A production. Environ Toxicol Pharmacol. 32:113–121.

KUMMER V., *et* FALDÍKOVÁ L., 2002: Účinky mykotoxinů na zdraví a reprodukci hospodářských zvířat [online]. (Cit. 25.3.2022), VÚVeL Brno. Dostupné z: https://naschov.cz/ucinky-mykotoxinu-na-zdravi-a-reprodukci-hospodarskych-zvirat/.

LUSKY, K., TESCH, D., GOBEL, R., 1993: Influence of the mycotoxin ochratoxin-A on animal health and formation of residues in pigs and different types of sausages derived from these animals. Archiv Fur Lebensmittelhygiene, 44(6), 131–134.

MAGAN, N. et OLSEN, M., 2004: Mycotoxins in food. Detection and control. Cambridge England, Woodhead Publishing Ltd and CRC Press LLC. ISBN 0-8493-2557-9.

MALÍŘ, F., et OSTRÝ, V., (Eds), 2003: Vláknité mikromycety (plísně), mykotoxiny a zdraví člověka. NCONZO, Brno.

MALIR, F., OSTRY, V., GROSSE, Y., ROUBAL, T., SKARKOVA, J., RUPRICH, J., 2006: Monitoring the mycotoxins in food and their biomarkers in the Czech Republic. Molecular nutrition & food research, vol. 50, no. 6, s. 513–518.

MALÍŘ, F., ROUBAL, T., SEVERA, J., ŘIČAŘOVÁ, B., ROLEČKOVÁ, E., MAREŠOVÁ, H., 2005: Některé toxikologicky významné mykotoxiny a možné zdravotní riziko. Sborník přednášek, vol. 16, no. 1, s. 75–78.

MALÍŘ, F., ROUBAL, T., SEVERA, J., ČERNÁ, M., BRNDIAR, M., 2002: Stanovení ochratoxinu A (OTA) v lidských ledvinách. Vojenské zdrvotnické listy, vol. LXXI, no. 1, s. 33–36.

MALÍŘ, F., 2010: Aktuální informace v oblasti mykotoxinů v surovinách, potravinách ve vztahu ke zdraví člověka [online]. Praha, Brno.

MALÍŘ, F., OSTRÝ, V., NOVOTNÁ, E., 2013: Toxicity of the mycotoxin ochratoxin A in the light of recent data. Toxin Reviews, 2013, vol. 32, no. 2, s. 19–33. ISSN 1556-9543.

MALIR, F., OSTRY, V., PFOHL-LESZKOWICZ, A., MALIR, J., TOMAN, J., 2016: Ochratoxin A: 50 years of research. Toxins, vol. 8, no. 7, s. 191.

MARIN, D. E., TARANU, I., TABUC, C., BURGEHELEA, M., 2009: Ochratoxin: Nature, origin, metabolism and toxic effects in pigs. Archiva Zootechnica, 12(1), 5–17.

MEATANDSAUSAGES, 2020: Bloodsausages [online]. (Cit. 28.4.2022). Dostupné z: https://www.meatsandsausages.com/sausage-types/blood-sausage.

MITCHELL, N.J.; CHEN, C.; PALUMBO, J.D.; BIANCHINI, A.; CAPPOZZO, J.; STRATTON, J.; RYU, D.; WU, F., 2017: A risk assessment of dietary Ochratoxin a in the United States. Food Chem. Toxicol., 100, 265–273.

MODRÁ, H., SVOBODOVÁ, Z., ŠIROKÁ, Z., BLÁHOVÁ, J., 2014: Toxikologie potravin – vybrané kapitoly [online]. (Cit. 11.4.2022). Veterinární a farmaceutická univerzita Brno, Fakulta veterinární hygieny a ekologie. Dostupné z: http://www.vfu.cz/inovace-bc-a-navmgr/realizovane-klicove-aktivity/skripta/ls2013-2014/toxikologie-potravin---vybrane-kapitoly.pdf.

MOSS MO., 2000: Toxigenic fungi and mycotoxins. In: Lund BM, Baird-Parker TC, Gould GW, editors. The microbiological safety and quality of foods. Volume 1. Frederick (MD): Aspen Publishers Inc.; p. 281–304.

MZe., ODBOR BEZPEČNOSTI POTRAVIN, 2021: Kontaminanty v potravinách – přehledhlavních témat diskutovaných v EK. [online]. (Cit.3.5.2022. Informační centrum bezpečnosti potravin. Dostupné z: https://www.bezpecnostpotravin.cz/aktualni-diskutovana-temata-v-oblasti-kontaminantu-v-potravinach-cervenec-2021.aspx.

NEDĚLNÍK, J. et MORAVCOVÁ, H., 2006: Problematika výskytu mykotoxinů v krmivech pro zvířata [online]. (Cit. 20.4.2022). Troubsko: Výzkumný ústav pícninářský. Dostupné z: http://www.isfc.eu/.

O´BRIEN, E. et DIETRICH, D.R., 2005: Ochratoxin A: The continuing enigma. Crit Rev Toxicol, 35: 33–60. doi: 10.1080/10408440590905948.

OPLETAL, L. et SKŘIVANOVÁ, V., 2010: Přírodní látky a jejich biologická hodnota. Praha: Karolinum.

OSTRÝ, V., ŠKARKOVÁ, J., HAJŠLOVÁ, J., 2005: Výskyt mykotoxinu ochratoxinu A ve víně [online]. (Cit. 10.4.2022). Informace vědeckého výboru pro potraviny. Dostupné z: <http://czvp.szu.cz/vedvybor/dokumenty>.

OSTRÝ, V., 2012: Ochratoxin A Mykotoxin v potravinových surovinách rostlinného původu ve světle nejnovějších poznatků. Česká společnost rostlinolékařská, s. 1–5.

OSTRY, V., MALIR, F., DOFKOVA, M., SKARKOVA, J., PFOHL-LESZKOWICZ, A., RUPRICH, J., 2015: Ochratoxin A Dietary Exposure of Ten Population Groups in the Czech Republic: Comparison with Data over the World. Toxins, vol. 7, no. 9, s. 3608–3635. ISSN 2072-6651.

OSTRY, V., MALIR, F., TOMAN, J., GROSSE, Y., 2017: Mycotoxins as human carcinogens – the IARC Monographs classification. Mycotoxin research, vol. 33, no. 1, s. 65–73.

PATOČKA, J., BAJGAR, J., CABAL, J., FUSEK, J., HERINK, J., KASSA, J. ŠTĚTINA, R., 2004: Vojenská toxikologie. Praha: Grada Publishing a.s. ISBN 978-80-247-6353-8.

PATOČKA, J., 2008: Zaplísněné potraviny a potravinářské suroviny [online]. (Cit. 26.3.2022). Zdravotně sociální fakulta Jihočeské Univerzity České Budějovice, Dostupné z: http://www.toxicology.cz/index.php.

PERSI, N., PLEADIN, J., KOVACEVIC, D., SCORTICHINI, G., MILONE, S., 2014: Ochratoxin A in raw materials and cooked meat products made from OTA-treated pigs. Meat Science, 96(1), 203–210. https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2013.07.005.

PFOHL-LESZKOWICZ, A., MANDERVILLE, R.A. Ochratoxin A, 2007: An Overview onToxicity and Carcinogenicity in Animals and Humans. Molecular Nutrition & FoodResearch, vol. 51, no. 1, s. 61–99. ISSN 16134125, 16134133.

PLEADIN, J., PERŠI, N., KOVANČEVIĆ, D., VULIĆ, A., FRECE, J., MARKOV, K., 2014: Ochratoxin A reduction in meat sausages using processing methods practiced in households. Food Additives & Contaminants: Part B, 7(4), 239–246. https://doi.org/10.1080/19393210.2014.900119.

PLEADIN, J., KUDUMIJA, N., KOVAČEVIC, D., SCORTICHINY, G., MILONE, S., KMETIČ, I., 2016: Comparison of ochratoxin A levels in edible pig tissues and in biological fluids after exposure to a contaminated diet. Mycotoxin Research, 32(3), 145–151. https://doi.org/10.1007/s12550-016-0249-7

PLEADIN, J., LEŠIĆ, T., MILIĆÉVIĆ, D., MARKOV, K., ŠARKANJ, B., VAHČIĆ, N., KMETIČ, I., ZADRAVEC, M., 2021: Pathways of Mycotoxin Occurrence in Meat Products: A Review. Processes, 9(12), 2122. https://doi.org/10.3390/pr9122122

PICKOVA, D., OSTRY, V., MALIR, J., TOMAN, J., MALIR, F., 2020: A Review on Mycotoxins and Microfungi in Spices in the Light of the Last Five Years. Toxins, 12(12), 1–33. https://doi.org/10.3390/toxins12120789.

PITT, J.I., 2000: Toxigenic fungi and mycotoxins. Br Med Bull, 56(1): 184-192.

POLÁŠKOVÁ, A. et al., 2011: Úvod do ekologie a ochrany životního prostředí. Karolinum. Univerzita Karlova v Praze, 283 s. ISBN 978-80-246-1927-9.

POSE G., PATRIARCA A., KYANKO V., PARDO A., FERNÁNDEZ V., 2010: Water activity and temperature effects on mycotoxin production by Alternaria alternata on a synthetic tomato medium. Int J Food Microbiol. 142:348–353.

PLEADIN, J., KUDUMIJA, N., KOVAČEVIĆ, D., SCORTICHINI, G., MILONE, S., KMETIČ, I., 2016: Comparison of ochratoxin A levels in edible pig tissues and in biological fluids after exposure to a contaminated diet. Mycotoxin Research, 32(3), 145–151. https://doi.org/10.1007/s12550-016-0249-7.

RINGOT, D., CHANGO, A., SCHNEIDER, Y.J. LARONDELLE, Y., 2006: Toxicokinetics andtoxicodynamics of ochratoxin A, an update. Chemico-biological interactions, vol. 159, no. 1, s. 18–46.

SAVA, V., VELASQUEZ, A., SONG, S. SANCHEZ-RAMOZ, J., 2007: Adult hippocampal neuralstem/progenitor cells in vitro are vulnerable to the mycotoxin Ochratoxin A. ToxicolSci, 98: 187–197. doi: 10.1093/toxsci/kfm093.

SUCHÝ, P. et HERZIG, I., 2005: Plísně a mykotoxiny, prevence jejich vzniku a dekontaminace v krmivech [online]. (Cit. 5.4.9.2022). Výzkumný ústav živočišné výroby. Dostupné z: https://vuzv.cz/wp-content/uploads/2018/04/Hezig-Such%C3%BD-Plisne-a-mykotoxiny-2005.pdf.

ŠIMŮNEK, J., 2003: Mykotoxiny [online]. (Cit. 25.3.2022). Dostupné z: http://www.med.muni.cz/predmety/preventivni/MYKOTW/metody/mt_tox.htm.

ŠIMŮNEK, J., 2004: Plísně a mykotoxiny [online]. (Cit. 6.4.2022). Dostupné z: http://www.med.muni.cz/dokumenty/pdf/plisne_a_mykotoxiny.pdf.

ŠKARKOVÁ J., 2011: SOP: Stanovení ochratoxinu A v potravinách z obilovin metodou HPLC-FLD. Státní zdravotní ústav v Brně, laboratoře aplikované toxikologie Brno.

VAN DER MERWE, K.J., STEYN, P.S., FOURIE, L., 1965a: Mycotoxins Part II. The constitutionof Ochratoxins A, B and C, metabolites of Aspergillus ochraceus Wilh. Journal of the Chemical Society (Resumed), vol. 204, s. 7083–7088.

VAN DER MERWE, K.J., STEYN, P.S., FOURIE, L., SCOTT, D.B., THREON, J.J., 1965b: Ochratoxin A, a toxic metabolite produced by Aspergillus ochraceus Wilh. Nature, vol. 205, s. 1112–1113.

VAN LOCO, M. ELSKENS, Ch. CROUX, H. BEERNAERT, 2002: Linearity of calibration curves: use and misuse of the correlation coefficient. Accredit. Qual. Assur. 7281-285. DOI:10.1007/S00769-002-0487-6.

VILA-DONAT, P.; MARÍN, S.; SANCHIS, V.; RAMOS, A.J., 2018: A review of the mycotoxin adsorbing agents, with an emphasis on their multi-binding capacity, for animal feed decontamination. Food Chem. Toxicol. 2018, 114, 246–259.

ZAIN, M., E., 2011: Impact of mycotoxins on humans and animals. Journal of Saudi Chemical Society 15: 129–144.

ZHAO, Z.; LIU, N.; YANG, L.; DENG, Y.; WANG, J.; SONG, S.; LIN, S.; WU, A.; ZHOU, Z.; HOU, J., 2015: Multi-mycotoxin analysis of animal feed and animal-derived food using LC-MS/MS system with timed and highly selective reaction monitoring. Anal. Bioanal. Chem. 407, 7359–7368.

9 Přílohy

Obrázek 3 Rozmražené jelito připravené na nařezání na menší kusy

Obrázek 4 Kusy jelita připravené k homogenizaci

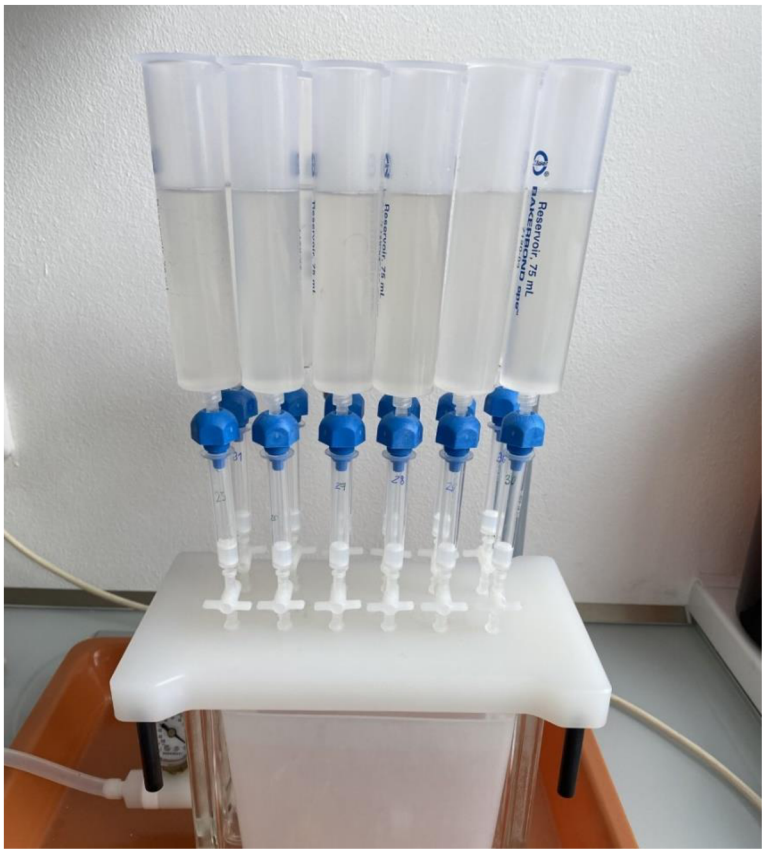
Obrázek 5 Homogenizátor A a B

Obrázek 6 Jelito po procesu homogenizace

Obrázek 7 5 g vzorku navážených do konických plastových nádobkách

Obrázek 8 Filtrace vzorku na filtračním zařízení Morton s fritou S3

Obrázek 9 Filtráty jednotlivých vzorků



Obrázek 10 Filtráty zředěné PBS na vakuovém prosávacím zařízení

Obrázek 11 Eluce okyseleným metanolem

Obrázek 12 Odpařování eluátu dusíkem pomocí koncentrátoru vzorků EVATERM

Obrázek 13 Rozpouštění odparku v mobilní fázi pomocí ultrazvuku

Obrázek 14 Filtrace vzorku přes membránový filtr a příprava kalibrační řady

Obrázek 15 Sekvence vzorků včetně kalibrační řady a blanku

Obrázek 16 HPLC

Tabulka 6 Souhrnné informace o vzorcích

Vzorek	Šarže	Datum spotřeby	Město	Zakoupeno dne	Maso (%)	Krev (%)	Hmotnost (g)
1	LE43-4506	22.10.2020	Jičín	11.10.2020	46	ano	320
2	2513326	17.10.2020	Jičín	11.10.2020	40	15	250
3	L: 4431	12.10.2020	Jičín	11.10.2020	31	ano	360
4	1201007	11.10.2020	Pardubice	09.10.2020	56	ano	387
5		16.10.2020	Hradec Králové - Brněnská	15.10.2020	31	ano	174
6	L: 4507	29.10.2020	Hradec Králové - Brněnská	15.10.2020	31	ano	360
7	L: 0540087896	19.10.2020	Hradec Králové - Benešovská	15.10.2020	50	ano/ sušená	300
8	-	16.10.2020	Hradec Králové - Benešovská	15.10.2020	46	ano/ sušená	156
9	L: 4507	29.10.2020	Hradec Králové - Benešovská	15.10.2020	44	14	400
10	L: 4506	22.10.2020	Hradec Králové - Benešovská	15.10.2020	31	ano	360
11	-	15.10.2020	Hradec Králové	15.10.2020	-	ano	184
12	L: 4506	04.11.2020	Hradec Králové	15.10.2020	44	14	400
13	-	17.10.2020	Hradec Králové	15.10.2020	40	10/sušená	210
14	L: 4505	27.10.2020	Hradec Králové	15.10.2020	47	ano	400
15	-	16.10.2020	Hradec Králové - Březhrad	15.10.2020	44	14	130
16	L: 0560052716	16.10.2020	Hradec Králové - OC Orlice Park	15.10.2020	35	Ano	450

Vzorek	Šarže	Datum spotřeby	Město	Zakoupeno dne	Maso (%)	Krev (%)	Hmotnost (g)
17	-	16.10.2020	Hradec Králové - OC Orlice Park	15.10.2020	46	ano	146
18	L: 0540088011	25.10.2020	Hradec Králové - OC Orlice Park	15.10.2020	50	ano	300
19	-	16.10.2020	Hradec Králové	15.10.2020	-	-	218
20	L: 4512	27.10.2020	Hradec Králové - Puškinova	15.10.2020	31	ano	360
21	L: 4430	22.10.2020	Hradec Králové - Puškinova	15.10.2020	44	14	400
22	-	27.10.2020	Hradec Králové - OBI	15.10.2020	45	ano	500
23	-	16.10.2020	Hradec Králové - OBI	15.10.2020	-	-	163
24	-	16.10.2020	Hradec Králové	15.10.2020	22	13	227
25	-	15.10.2020	Hradec Králové	15.10.2020	-	-	194
26	-	15.10.2020	Hradec Králové - Popíšilova	15.10.2020	-	-	169
27	-	17.10.2020	Hradec Králové - Třída SNP	16.10.2020	-	-	150
28	-	30.10.2020	Hradec Králové - Pospíšilova	16.10.2020	45	-	500
29	L: 4511	06.11.2020	Dvůr Králové	17.10.2020	47	ano	400
30	-	24.10.2020	Dvůr Králové	17.10.2020	40	15	250
31	LE13-4509	22.10.2020	Dvůr Králové	17.10.2020	46	ano	360
32	-	18.10.2020	Dvůr Králové	17.10.2020	46	ano	156
33	L: 4430	19.10.2020	Jaroměř	17.10.2020	44	14	400
34	L: 4507	29.10.2020	Jaroměř	17.10.2020	31	ano	360

Vzorek	Šarže	Datum spotřeby	Město	Zakoupeno dne	Maso (%)	Krev (%)	Hmotnost (g)
35	-	18.10.2020	Jaroměř	17.10.2020	31	ano	170
36	25133267	27.10.2020	Jaroměř	17.10.2020	40	15	250
37	LE13-4509	22.10.2020	Jaroměř	17.10.2020	46	ano	360
38	L: 4505	27.10.2020	Jaroměř	17.10.2020	47	ano	400
39	L: 4430	22.10.2020	Hořice	17.10.2020	44	14	400
40	L: 4512	03.11.2020	Hořice	17.10.2020	44	14	400
41	-	18.10.2020	Dvůr Králové	17.10.2020	31	ano	176
42	L: 4507	29.10.2020	Dvůr Králové	17.10.2020	31	ano	360
43	L: 4507	31.10.2020	Dvůr Králové	17.10.2020	44	14	400
44	L: 4430	22.10.2020	Dvůr Králové	17.10.2020	44	14	400
45	L: 4507	29.10.2020	Dvůr Králové	17.10.2020	44	14	400
46	L: 4506	22.10.2020	Dvůr Králové	17.10.2020	31	ano	360
47	-	18.10.2020	Dvůr Králové – Kaufland	17.10.2020	-	-	178
48	-	05.11.2020	Jaroměř – Na Kameni	17.10.2020	45	ano	500
49	-	23.10.2020	Dvůr Králové - 17. listopadu	17.10.2020	45	ano	500
50	-	05.11.2020	Dvůr Králové - nábř. Benešovo	17.10.2020	45	ano	500
51	-	05.11.2020	Nová Paka	17.10.2020	45	ano	500
52	-	19.10.2020	Jičín	18.10.2020	46	ano	164
53	Id234509	27.10.2020	Jičín	18.10.2020	46	ano	360
54	L: 4511	07.11.2020	Jičín	18.10.2020	47	ano	400
55	L: 4512	05.11.2020	Jičín	18.10.2020	44	14	400
56	L: 4507	29.10.2020	Jičín	18.10.2020	31	ano	360
57	L: 4507	26.10.2020	Jičín	18.10.2020	44	14	400
58	-	19.10.2020	Jičín	18.10.2020	31	ano	174

Vzorek	Šarže	Datum spotřeby	Město	Zakoupeno dne	Maso (%)	Krev (%)	Hmotnost (g)
59	-	04.11.2020	Jičín	18.10.2020	45	ano	500
60	L: 4410	22.10.2020	Jičín	18.10.2020	44	14	400
61	L: 4514	05.11.2020	Jičín	18.10.2020	44	14	400
62	L: 4519	29.10.2020	Jičín	18.10.2020	31	ano	360
63	-	20.10.2020	Hradec Králové – Kukleny	19.10.2020	46	ano/ sušená	114
64	L: 0540088011	25.10.2020	Hradec Králové – Kukleny	19.10.2020	50	ano/ sušená	300
65	L:4503	06.11.2020	Praha-Modřany	27.10.2020	47	ano	400
66	2513326	31.10.2020	Praha-Modřany	27.10.2020	40	15	250
67	L: 4522	14.11.2020	Hradec Králové	29.10.2020	44	14	400
68	L: 257315	04.11.2020	Hradec Králové	30.10.2020	70	20	360
69	L:201015	10.11.2020	Hradec Králové	30.10.2020	-	30	500
70	-	-	Hořice	23.10.2020	57	ano	442
71	L: 4604	17.11.2020	Hradec Králové	05.11.2020	31	ano	360
72	-	07.11.2020	Hradec Králové, Věkoše	06.11.2020	-	ano	175
73	-	18.11.2020	Hradec Králové, Pospíšilova	06.11.2020	45	ano	500
74	-	06.11.2020	Hradec Králové, Věkoše	06.11.2020	-	ano	149
75	-	07.11.2020	Hradec Králové, Milady Horákové	06.11.2020	46	ano/sušená	144

Vzorek	Šarže	Datum spotřeby	Město	Zakoupeno dne	Maso (%)	Krev (%)	Hmotnost (g)
76	560053302	10.11.2020	Hradec Králové, Milady Horákové	06.11.2020	35	ano/sušená	450
77	-	18.11.2020	Třebechovice pod Orebem	06.11.2020	45	ano	500
78	-	07.11.2020	Třebechovice pod Orebem	06.11.2020	-	ano	166
79	-	06.11.2020	Smiřice	06.11.2020	-	ano	124
80	201021	12.11.2020	Smiřice	06.11.2020	ne	30	518
81	2513326	10.11.2020	Hradec Králové, Pilnáčkova	06.11.2020	40	15	250
82	Id114521	13.11.2020	Hradec Králové, Pilnáčkova	06.11.2020	46	ano	360
83	L: 4511	22.11.2020	Hradec Králové, Pilnáčkova	06.11.2020	47	ano	400
84	L: 544297	06.11.2020	Hradec Králoévé, Svinary	06.11.2020	30	ano	158
85	-	07.11.2020	Třebechovice pod Orebem	06.11.2020	-	ano	166
86	-	07.11.2020	Jičín	06.11.2020	-	ano	199
87	-	07.11.2020	Jičín	06.11.2020	-	ano	194
88	-	07.11.2020	Nová Paka	06.11.2020	-	ano	124
89	L: 0560053897	01.12.2020	Jičín	12.11.2020	50	ano/ sušená	500
90	-	21.11.2020	Jičín	12.11.2020	50	15	250
91	-	26.11.2020	Nový Bydžov, Revoluční tř.	12.11.2020	45	ano	500
92	-	13.11.2020	Nový Bydžov, Revoluční tř.	12.11.2020	-	ano	182

Vzorek	Šarže	Datum spotřeby	Město	Zakoupeno dne	Maso (%)	Krev (%)	Hmotnost (g)
93	-	24.11.2020	Nový Bydžov, Jana Maláta	12.11.2020	45	ano	500
94	L: 0560053897	02.12.2020	Nový Bydžov, Revoluční tř.	12.11.2020	50	ano/ sušená	500
95	-	13.11.2020	Nový Bydžov	12.11.2020	-	ano	208
96	-	13.11.2020	Městec Králové	12.11.2020	-	ano	202
97	-	13.11.2020	Městec Králové	12.11.2020	-	ano	214
98	-	24.11.2020	Městec Králové	12.11.2020	45	ano	500
99	-	13.11.2020	Městec Králové	12.11.2020	-	ano	158
100	-	13.11.2020	Choťovice, Žehuň	12.11.2020	-	ano	116
101	-	13.11.2020	Chlumec nad Cidlinou	12.11.2020	-	ano	214
102	-	16.11.2020	Chlumec nad Cidlinou	12.11.2020	45	ano	500
103	-	21.11.2020	Hradec Králové, Na Okrouhlíku	12.11.2020	50	15	250
104	L: 0560053897	02.12.2020	Hradec Králové, Na Okrouhlíku	12.11.2020	50	ano/ sušená	500
105	-	21.11.2020	Hradec Králové, Víta Nejedlého	12.11.2020	50	15	250
106	L: 0560053897	02.12.2020	Hradec Králové, Víta Nejedlého	12.11.2020	50	ano/ sušená	500
107	L: 0560053968	02.12.2020	Chlumec nad Cidlinou	12.11.2020	50	ano/ sušená	500
108	-	21.11.2020	Hradec Králové, Brněnská	12.11.2020	50	15	250

Vzorek	Šarže	Datum spotřeby	Město	Zakoupeno dne	Maso (%)	Krev (%)	Hmotnost (g)
109	-	13.11.2020	Chlumec nad Cidlinou	12.11.2020	-	ano	180
110		14.11.2020	Jičín	13.11.2020	-	ano	150
111		14.11.2020	Jičín	13.11.2020	-	ano	308
112		14.11.2020	Jičín	13.11.2020	-	ano	227
113	-	14.11.2020	Kosmonosy, Tesařská	13.11.2020	-	ano	450
114	L: 4529	19.11.2020	Mladá Boleslav	13.11.2020	44	14	400
115	L: 4612	25.11.2020	Mladá Boleslav	13.11.2020	31	ano	360
116	-	14.11.2020	Mladá Boleslav	13.11.2020	31	ano	109
117	L: 0540088988	22.11.2020	Mladá Boleslav, Kosmonosy	13.11.2020	50	ano/ sušená	300
118	L: 0560053612	20.11.2020	Mladá Boleslav, Kosmonosy	13.11.2020	35	ano/ sušená	450
119	-	14.11.2020	Mladá Boleslav, Kosmonosy	13.11.2020	46	ano/ sušená	148
120	-	14.11.2020	Mladá Boleslav	13.11.2020	-	ano	155
121	-	14.11.2020	Mladá Boleslav	13.11.2020	-	ano	195
122	-	14.11.2020	Mladá Boleslav	13.11.2020	-	ano	193
123	-	14.11.2020	Mnichovo Hradiště, K Vořechu	13.11.2020	50	ano/ sušená	500
124	-	14.11.2020	Mnichovo Hradiště	13.11.2020	-	ano	71
125	-	14.11.2020	Mladá Boleslav	13.11.2020	55	ano	227
126	-	14.11.2020	Mladá Boleslav	13.11.2020	55	ano	155

Vzorek	Šarže	Datum spotřeby	Město	Zakoupeno dne	Maso (%)	Krev (%)	Hmotnost (g)
127	L: 0540088988	22.11.2020	Mladá Boleslav, Jičínská	13.11.2020	50	ano/ sušená	300
128	L: 0540088648	13.11.2020	Mladá Boleslav, Jičínská	13.11.2020	50	ano/ sušená	300
129	L: 0560053612	20.11.2020	Mladá Boleslav, Kosmonosy	13.11.2020	35	ano/ sušená	450
130	-	14.11.2020	Mladá Boleslav, Jičínská	13.11.2020	46	ano/ sušená	142
131	-	14.11.2020	Mladá Boleslav, Klaudianova	13.11.2020	-	ano	217
132	21940556	23.11.2020	Mladá Boleslav, Klaudianova	13.11.2020	ne	ano	457
133	L: 4604	19.11.2020	Mladá Boleslav, Havlíčkova	13.11.2020	31	ano	360
134	L: 4609	24.11.2020	Mladá Boleslav, Havlíčkova	13.11.2020	31	ano	360
135	L: 4529	24.11.2020	Mladá Boleslav, Havlíčkova	13.11.2020	44	14	400
136	-	19.11.2020	Mladá Boleslav, Jičínská	13.11.2020	45	ano	500
137	-	14.11.2020	Mladá Boleslav, Jičínská	13.11.2020	-	ano	152
138	-	14.11.2020	Mladá Boleslav, Havlíčkova	13.11.2020	-	ano	200
139	-	25.11.2020	Mladá Boleslav, Havlíčkova	13.11.2020	45	ano	500
140	-	14.11.2020	Sobotka	13.11.2020	63	ano/ sušená	152

Vzorek	Šarže	Datum spotřeby	Město	Zakoupeno dne	Maso (%)	Krev (%)	Hmotnost (g)
141	-	13.11.2020	Mladá Boleslav, nám. Míru	13.11.2020	31	ano	170
142	-	14.11.2020	Jičín, Prachovsá	13.11.2020	63	ano/ sušená	182
143	-	24.11.2020	Mladá Boleslav, Jičínská	13.11.2020	50	15	250
144	L: 0560053897	02.12.2020	Mladá Boleslav, Jičínská	13.11.2020	50	ano/ sušená	500
145	L: 4522	03.12.2020	Mladá Boleslav, U Stadionu	13.11.2020	47	ano	400
146	L: 4511	17.11.2020	Mladá Boleslav, U Stadionu	13.11.2020	47	ano	400
147	-	21.11.2020	Mladá Boleslav, U Stadionu	13.11.2020	40	15	250
148	Id224521	12.11.2020	Mladá Boleslav, U Stadionu	13.11.2020	46	ano	360
149	-	14.11.2020	Mladá Boleslav, U Stadionu	13.11.2020	46	ano	174
150	-	14.11.2020	Mladá Boleslav	13.11.2020	-	ano	149
151	-	21.11.2020	Pardubice, Palackého	12.11.2020	50	15	250
152	-	21.11.2020	Pardubice, Bělehradská	12.11.2020	50	15	250
153	L: 0560053897	02.12.2020	Pardubice, Bělehradská	12.11.2020	50	ano/ sušená	500
154	-	01.12.2020	Hořice	12.11.2020	?	?	343
155	ld214922	17.03.2021	Hradec Králové	05.03.2021	46	ano	360
156	L: 4909	14.03.2021	Hradec Králové	05.03.2021	47	ano	400

Vzorek	Šarže	Datum spotřeby	Město	Zakoupeno dne	Maso (%)	Krev (%)	Hmotnost (g)
157	2513326	13.03.2021	Hradec Králové	05.03.2021	40	15	250
158	-	06.03.2021	Hradec Králové	05.03.2021	46	ano	179
159	L: 0540092595	12.03.2021	Hradec Králové, Svitavská	05.03.2021	50	ano	300
160	-	06.03.2021	Hradec Králové, Štefánikova	05.03.2021	-	ano	148
161	-	08.03.2021	Hradec Králové – Pospíšilova	05.03.2021	45	ano	500
162	L: 4924	18.03.2021	Hradec Králové – Benešovská	05.03.2021	31	ano	360
163	L: 4909	25.03.2021	Hradec Králové – Benešovská	05.03.2021	44	14	400
164	L: 210210	21.03.2021	Hradec Králové	06.03.2021	-	30	500
165	L: 4907	14.03.2021	Hradec Králové – Březhrad	06.03.2021	44	14	400
166	L: 4909	25.03.2021	Hradec Králové – Březhrad	06.03.2021	14	14	400
167	L: 4914	12.03.2021	Hradec Králové – Březhrad	06.03.2021	31	ano	360
168	-	10.03.2021	Hradec Králové – Orlice Park	09.03.2021	46	ano	152
169	L0560056482	24.03.2021	Hradec Králové – Orlice Park	09.03.2021	35	ano/ sušená	450
170	-	12.03.2021	Hradec Králové, Věkoše	11.03.2021	-	ano	170
171	-	12.03.2021	Hradec Králové – Třída SNP	11.03.2021	-	-	126

Vzorek	Šarže	Datum spotřeby	Město	Zakoupeno dne	Maso (%)	Krev (%)	Hmotnost (g)
172	-	12.03.2021	Hradec Králové – Třída SNP	11.03.2021	-	-	238
173	-	12.03.2021	Hradec Králové, Věkoše	11.03.2021	-	ano	254
174	L: 4931	28.03.2021	Hradec Králové	11.03.2021	47	ano	400
175	-	17.03.2021	Hradec Králové – OBI	11.03.2021	45	ano	500
176	-	12.03.2021	Hradec Králové - OBI	11.03.2021	-	ano	170
177	-	12.03.2021	Hradec Králové - OBI	11.03.2021	45	ano	173
178	L: 4909	24.03.2021	Hradec Králové	13.03.2021	44	14	400
179	L: 4903	19.03.2021	Hradec Králové	13.03.2021	44	14	400
180	L: 4909	30.03.2021	Hradec Králové - Puškinova	13.03.2021	44	14	400
181	L: 4924	23.03.2021	Hradec Králové – Puškinova	13.03.2021	31	ano	360
182	-	14.03.2021	Hradec Králové – Kukleny	13.03.2021	46	ano/ sušená	148
183	L0560056423	20.03.2021	Hradec Králové – Kukleny	13.03.2021	35	ano/ sušená	450
184	-	-	Hořice	23.10.2020	57	ano	351
185	-	22.03.2021	Hradec Králové – Futurum	21.03.2021	31	ano	188
186	-	01.04.2021	Hradec Králové – Popíšilova	31.03.2021	45	ano	295
187	-	01.04.2021	Hradec Králové – OBI	31.03.2021	45	ano	222

Vzorek	Šarže	Datum spotřeby	Město	Zakoupeno dne	Maso (%)	Krev (%)	Hmotnost (g)
188	-	01.04.2021	Hradec Králové, Věkoše	31.03.2021	-	ano	204
189	-	01.04.2021	Hradec Králové, Věkoše	31.03.2021	-	ano	205
190	L: 5105	23.04.2021	Jičín	06.04.2021	47	ano	400
191	L: 4922	13.04.2021	Jičín	06.04.2021	44	14	400
192	L: 5131	13.04.2021	Jičín	06.04.2021	31	ano	362
193	-	07.04.2021	Jičín	06.04.2021	-	ano	181
194	-	07.04.2021	Hradec Králové - Popíšilova	06.04.2021	-	ano	164
195	-	07.04.2021	Hradec Králové - Popíšilova	06.04.2021	-	ano	168
196	-	18.04.2021	Hradec Králové - Brněnská	08.04.2021	50	15	250
197	-	18.04.2021	Hradec Králové Víta Nejedlého	08.04.2021	50	15	250
198	-	18.04.2021	Hradec Králové - Na Okrouhlíku	08.04.2021	50	15	250
199	-	22.04.2021	Hradec Králové - OBI	21.04.2021	-	ano	175
200	-	22.04.2021	Hradec Králové - Třída SNP	21.04.2021	-	-	200