

Univerzita Hradec Králové
Přírodovědecká fakulta
Katedra biologie

Screeningové stanovení mykotoxinu
ochratoxinu A ve vzorcích jelit metodou
ELISA

Bakalářská práce

Autor: Janina Ptaková

Studijní program: B1407 Chemie

Studijní obor: Biologie – chemie se zaměřením na vzdělání

Vedoucí práce: doc. RNDr. František Malíř, Ph.D.

Odborný konzultant: Mgr. Darina Picková

Hradec Králové

květen 2023

Obor v rámci kterého má být VŠKP vypracována: Bc. učitelství – všeobecný základ

Podklad pro zadání BAKALÁŘSKÉ práce studenta

Jméno a příjmení: **Janina Ptaková**
Osobní číslo: **S19CH119BP**
Adresa: **17.listopadu 36/1124, Havířov – Podlesí, 73601 Havířov 1, Česká republika**
Téma práce: **Screeningové stanovení mykotoxinu ochratoxinu A ve vzorcích jeliť metodou ELISA**
Téma práce anglicky: **Screening of mycotoxin ochratoxin A in samples of blood meatal pudding by ELISA method**
Jazyk práce: **Čeština**
Vedoucí práce: **doc. RNDr. František Malíř, Ph.D.**
Katedra biologie

Zásady pro vypracování:

V letech 2020 a 2021 byly a budou v obchodní síti v ČR zakoupeny vzorky jeliť. Majoritní složkou jeliť je vepřová krev, která bývá často kontaminovaná ochratoxinem A (OTA). OTA je považován za druhý nejvýznamnější mykotoxin s významnými toxickými účinky pro člověka (např. nefrotoxickými, hepatotoxickými, neurotoxickými, embryotoxickými, teratogenními, imunotoxickými, genotoxickými a karcinogenními účinky).

Z tohoto pohledu bude OTA stanoven screeningově ve vzorcích jeliť s využitím vhodného komerčního ELISA kitu a ELISA spektrometru.

Cílem práce je zjištění úrovně kontaminace OTA ve vzorcích jeliť a posouzení významnosti tohoto zjištění ve vztahu ke zdraví člověka.

Seznam doporučené literatury:

1) MALIR F., OSTRY V., PFOHL-LESZKOWICZ A., MALIR J., TOMAN J. 2016: Ochratoxin A: 50 Years of Research. Toxins 8:191-239. <https://doi.org/10.3390/toxins8070191>

2) PERŠI N., PLEADIN J., KOVAČEVIĆ D., SCORTICINI G., MILONE S. 2014: Ochratoxin A in raw materials and cooked meat products made from OTA-treated pigs. Meat Science 96:203–210. <http://dx.doi.org/10.1016/j.meatsci.2013.07.005>

Podpis studenta:

Ptaková Janina

Datum:

28.3.2023

Podpis vedoucího práce:

Malir František

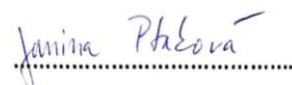
Datum:

29.3.2023

Prohlášení:

Prohlašuji, že jsem bakalářskou práci vypracovala samostatně, a že jsem v seznamu použité literatury uvedla všechny prameny, ze kterých jsem vycházela.

Dne 9. 5. 2023
v Hradci Králové


Janina Ptaková

Poděkování

Na tomto místě bych ráda poděkovala svému školiteli doc. RNDr. Františku Malířovi, Ph.D. za odborné vedení, konzultace, cenné rady a obrovskou trpělivost při řešení mé bakalářské práce. Dále děkuji odborné konzultantce Mgr. Darině Píckové za odborné rady, zkušenosti a příjemně strávený čas při práci v laboratoři.

Můj dík také náleží mé rodině za podporu a trpělivost.

Anotace:

PTAKOVÁ, Janina. *Screeningové stanovení mykotoxinu ochratoxinu A ve vzorcích jelit metodou ELISA*. Hradec Králové, 2023. Bakalářská práce. 41 s. Přírodovědecká fakulta Univerzita Hradec Králové.

V letech 2020 a 2021 byly v obchodní síti v ČR zakoupeny vzorky jelit. Majoritní složkou jelit je vepřová krev, která bývá často kontaminovaná ochratoxinem A (OTA). OTA je považován za druhý nejvýznamnější mykotoxin s významnými toxickými účinky pro člověka (např. nefrotoxickými, hepatotoxickými, neurotoxickými, embryotoxickými, teratogenními, imunotoxickými, genotoxickými a karcinogenními účinky).

Z tohoto pohledu byl OTA stanoven screeningově ve vzorcích jelit s využitím vhodného komerčního ELISA kitu a ELISA spektrometru.

Cílem práce je zjištění úrovně kontaminace OTA ve vzorcích jelit a posouzení významnosti tohoto zjištění ve vztahu ke zdraví člověka.

Klíčová slova:

Ochratoxin A, ELISA, jelita, mykotoxiny

Annotation:

PTAKOVÁ, Janina. *Screening determination of the mycotoxin ochratoxin A in black pudding by the ELISA method*. Hradec Králové, 2023. Bachelor thesis. 41 pp. Faculty of Science Univerzity of Hradec Králové.

In 2020 and 2021, black pudding sausages were purchased in the commercial market in the Czech Republic. The major component of black pudding sausages is pork blood, which is often contaminated with ochratoxin A (OTA). OTA is considered the second most important mycotoxin with significant toxic effects for humans (e.g. nephrotoxic, hepatotoxic, neurotoxic, embryotoxic, teratogenic, immunotoxic, genotoxic and carcinogenic effects).

From this point of view OTA will be determined by screening in samples of black pudding sausages using an appropriate commercial ELISA kit and ELISA spectrometer.

The aim of this work is to determine the level of OTA contamination in black sausage samples and to assess the significance of this finding in relation to human health.

Keywords:

Ochratoxin A, ELISA, black pudding sausages, mycotoxins

Obsah

Úvod.....	9
1 Mykotoxiny.....	10
1.1 Klasifikace mykotoxinů podle monografií IARC/WHO v Lyonu.....	11
1.1.1 Skupina 1 – karcinogenní pro člověka.....	11
1.1.2 Skupina 2A – pravděpodobně karcinogenní pro člověka.....	11
1.1.3 Skupina 2B – možný karcinogen pro člověka.....	11
1.1.4 Skupina 3 – neklasifikované z hlediska karcinogenity pro člověka.....	12
1.2 Kontrola a monitoring mykotoxinů.....	12
2 Ochratoxin A.....	13
2.1 Nomenklatura.....	13
2.2 Fyzikálně-chemické vlastnosti.....	14
2.3 Biosyntéza a biodegradace OTA.....	14
2.4 Produkce OTA.....	15
2.4.1 Producenti rodu <i>Penicillium</i>	15
2.4.2 Producenti rodu <i>Aspergillus</i>	16
2.5 Dekontaminace OTA.....	18
2.5.1 Použití chlornanu sodného.....	18
2.5.2 Dekontaminace za použití detergentu RBS-35 (fy Pierce).....	20
3 ELISA (Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay).....	21
3.1 Typy ELISA.....	22
3.1.1 Přímá ELISA.....	22
3.1.2 Nepřímá ELISA.....	22
3.1.3 Sendvičová ELISA.....	23
3.1.4 Kompetitivní ELISA.....	24
4 Vzorky.....	25
4.1 Chemikálie, použitý materiál a přístroje.....	25
4.1.1 Chemikálie.....	25
4.1.2 Roztoky.....	25
4.1.3 Použitý materiál a laboratorní vybavení.....	25
4.1.4 Přístrojové vybavení.....	26
4.1.5 ELISA souprava – RIDASCREEN Ochratoxin A 30/15.....	26
4.2 Odběr a skladování vzorků.....	26
4.3 Příprava vzorku.....	27
4.4 Postup a stanovení pomocí ELISA.....	29

5	Výsledky	33
	Diskuze	35
	Závěr	36
	Seznam použité literatury:	37

Úvod

V dnešní době se stále častěji setkáváme s patogenními plísněmi či organismy, které ovlivňují náš život. Tyto plísně produkují sekundární metabolity, tzv. mykotoxiny, které jsou všudypřítomné, a proto se také vyskytují na všech úrovních potravního řetězce živočichů. Mohou mít závažný vliv na naše zdraví, jelikož způsobují alergie, mykózy a napadají různé orgány či dokonce orgánové soustavy v našem těle. Byly by vhodné změny v zemědělství, a to jak v oblasti pěstování, tak i skladování a zpracování. Také je nutné zdokonalovat strategie a technologie, aby byla zajištěna co největší bezpečnost potravin a tím i lidského zdraví.

Pozornost této práce je zaměřena na ochratoxin A, který je považován za druhý nejvýznamnější mykotoxin z hlediska účinku na lidské zdraví. Jeho účinky jsou pro lidské tělo velmi závažné. Je produkován některými plísněmi rodu *Aspergillus* a *Penicillium*. Dále je pozornost práce zaměřena na výskyt ochratoxinu A v jelitech, která patří v Evropě k tradičním potravinářským produktům, ale výzkumných prací zaměřených na tuto problematiku je doposud celosvětově málo. Jelita jsou složena především z krve prasat, dále krup, koření a sádla, přičemž všechny tyto složky mohou významně přispívat k výskytu OTA.

1 Mykotoxiny

Mykotoxiny jsou toxické sekundární metabolity produkované toxigenními vláknitými mikroskopickými houbami (plísněmi), které kontaminují celý potravní řetězec, od pěstování na polích až po samotné spotřebitele (Ostrý a kol., 2017). Nejčastěji se jedná o druhy vláknitých mikroskopických hub (tzv. mikromycetů) rodů *Aspergillus*, *Penicillium*, *Fusarium*, *Alternaria*, *Claviceps* nebo *Stachybotrys*, i když mykotoxiny jsou produkovány také ve všech ostatních taxonomických skupinách.

Mykotoxiny vykazují četné toxické účinky, například jsou hepatotoxické, nefrotoxické, neurotoxické, imunosupresivní, teratogenní, mutagenní a karcinogenní, které se projeví především po expozici, např. po dietárním přívodu, který je považován za majoritní a dále také po inhalační (vdechování) či transdermální expozici (tj. přes kůži, velmi často i neporušenou). Tyto účinky mohou způsobovat různé akutní otravy – tzv. mykotoxikózy, či působit dlouhodobě chronicky, což může být mnohdy nebezpečnější např. z hlediska karcinogenity. Chronická expozice opakovanými nižšími dávkami ochratoxinu A je často nebezpečnější než akutní expozice (Pfohl-Leszkowicz a kol., 2007; Pfohl-Leszkowicz, 2009).

Akutní toxicita se projevuje během 24 hodin a má rychlý nástup účinku. Naproti tomu chronická toxicita je způsobená dlouhodobou expozicí, často celoživotní, nízkými či nižšími dávkami mykotoxinů (Ostrý a kol. 2017).

Nejvýznamnějšími skupinami mykotoxinů jsou aflatoxiny B₁, B₂, G₁, a G₂ (AFB₁, AFB₂, AFG₁, a AFG₂), které jsou produkovány plísněmi rodu *Aspergillus*. Druhou nejvýznamnější skupinou jsou ochratoxiny (toxiny plísní rodu *Aspergillus* a *Penicillium*), především ochratoxin A. Další jsou trichotheceny – např. deoxynivalenol (DON), nivalenol (NIV), a např. T-2 a HT-2 toxiny, fumonisiny, např. B₁, B₂, a B₃ (FB₁, FB₂, FB₃), které jsou produkovány rodem *Fusarium* a fuzariové toxiny, kam patří zearalenon (ZEN). Mezi další významné mykotoxiny dále patří citrinin (CIT), námelové alkaloidy (EAs), jež jsou produkty plísně *Claviceps* a např. patulin (PAT), které jsou považovány za velmi významné, jak z hlediska výskytu v zemědělsko-potravinářských komoditách, tak z hlediska toxických účinků a možných dopadů na lidské zdraví (Malíř, Ostrý a kol., 2003; Selvaraj a kol., 2015; Karlovsky a kol., 2016; Ojuri a kol., 2018; Pickova a kol., 2020).

Se zvyšujícím se globálním oteplováním se mění podmínky pro růst a výskyt toxigenních mikromycetů, producentů mykotoxinů, a tím dochází k mnohem větší expozici lidí mykotoxiny – a to nejen v oblastech rozvojových zemí, kde si lidé pěstují plodiny pro svou vlastní spotřebu, ale také ve vyspělých zemích, které mají diverzifikované zdroje surovin a potravin, do kterých se ale mykotoxiny mohou dostat buď dovozem kontaminovaných potravin i přes maximálně realizovanou kontrolu ze strany dozorových organizací, nebo se právě díky globálnímu oteplování

mohou objevit v surovinách a potravinách vlastní provenience (Marroquín-Cardona a kol., 2014).

Jednou z možností kontroly by mohla být kontrola v oblasti pěstování plodin, kdy by mohly být použity správné pesticidy, které by zredukovaly růst plísní. Bohužel v současné době neexistuje mnoho chemických pesticidů, které by byly takto účinné a použitelné. Navíc jejich časté používání vede ke zbytkovým reziduíům či sekundárním odolnějším kontaminacím. Slibnou alternativou je antimikrobní látka Fusapyron produkovaná mikromycetou *Fusarium semitectum*, která vykazuje antifungální aktivitu vůči některým toxinogenním plísním včetně včetně *A. flavus*, *A. parasiticus*, *A. niger* a *A. fumigatus*. Látka byla aplikována na plísně produkující OTA – *Aspergillus* sekce *Nigri* (*A. carbonarius*, *A. niger* a *A. tubingensis*), přičemž nejvíce citlivý byl *A. carbonarius*. U zbylých dvou druhů došlo ke ztluštění a nepravidelnému růstu hyf (Favilla a kol., 2008).

1.1 Klasifikace mykotoxinů podle monografií IARC/WHO v Lyonu

Od roku 1969 jsou mykotoxiny řazeny do skupin na základě monografií IARC WHO, což je Mezinárodní agentura pro výzkum rakoviny (IARC) při Světové zdravotnické organizaci (WHO), která dělí cizorodé látky (noxy) na základě karcinogenity do čtyř skupin (Ostrý a kol. 2017).

1.1.1 Skupina 1 – karcinogenní pro člověka

Do této skupiny patří všechny látky, pro něž je dostatek výzkumů dokládajících jejich karcinogenitu u lidí. V současné době je do této skupiny řazeno 121 látek. Jedná se například o acetaldehyd, benzen, virus Epstein-Baarové, tabák, uhlí, ethanol, ionizující záření a z mykotoxinů sem patří aflatoxiny (Ostrý a kol. 2017).

1.1.2 Skupina 2A – pravděpodobně karcinogenní pro člověka

Tato skupina se vztahuje na látky, které vykazují karcinogenitu u zvířat a lidí, ale jejich data jsou nedostatečná pro zařazení do skupiny 1. Do této skupiny je řazeno 90 látek, například chloramfenikol, cisplatina, lidský papilomavirus typu 68, aristolochové kyseliny. Rovněž je zde řazena konzumace velmi horkých nápojů a nadměrná konzumace červeného masa (Ostrý a kol. 2017).

1.1.3 Skupina 2B – možný karcinogen pro člověka

Zde jsou zařazeny látky, pro něž jsou nějaké důkazy, že mohou způsobit rakovinu. Tyto důkazy byly prokázány u zvířat, ale u člověka nikoliv. Z těchto důvodů jsou látky řazeny sem, neboť údaje nejsou jednoznačně průkazné. Zde je řazeno 322 látek. Z mykotoxinů sem patří např. fusarin C, fumonisin B1 a B2 a ochratoxin A (Ostrý a kol. 2017).

1.1.4 Skupina 3 – neklasifikované z hlediska karcinogenity pro člověka

V této skupině se nacházejí látky, pro které jsou nedostatečné nebo velmi omezené údaje, co se týče karcinogenity, a proto zatím nejsou hodnoceny jako karcinogeny pro člověka. Zahrnuto je sem 498 látek, z mykotoxinů např. patulin, citrinin a kyselina penicilová (Ostrý a kol. 2017).

1.2 Kontrola a monitoring mykotoxinů

V ČR jsou kontrolní orgány v působnosti Ministerstev zemědělství a zdravotnictví. Pod Ministerstvo zemědělství ČR patří Státní zemědělská a potravinářská inspekce, Veterinární správa, Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský, se kterým se v roce 2014 sloučila původně samostatná Státní rostlinolékařská správa.

V působnosti Ministerstva zdravotnictví ČR pak pracuje Národní referenční centrum pro mikroskopické houby a jejich toxiny na Centru zdraví, výživy a potravin v Brně, Státní zdravotní ústav Praha a dále Národní referenční laboratoř pro biomarkery mykotoxinů a mykotoxiny v potravinách v působnosti Zdravotního ústavu se sídlem v Ústí nad Labem, regionální pracoviště Hradec Králové (Malíř a kol. 2006).

Vzhledem k výskytu a nežádoucím účinkům mykotoxinů, pak Evropská unie nařízením komise č. 1881/2006 ve znění pozdějších předpisů limituje obsahy aflatoxinů B₁, B₂, G₁, G₂, M₁, OTA, deoxynivalenolu, T-2 a HT-2 toxinu, dále zearalenonu a fumonisinů v surovinách a potravinách. Pokud případně limity chybějí, pak přicházejí v úvahu doporučení JECFA FAO/WHO (Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives – mezinárodní vědecký výbor expertů, který je řízen společně Organizací OSN pro výživu a zemědělství (FAO) a Světovou zdravotnickou organizací (WHO)) k potravinářským přídatným látkám, dále pak ze strany EU SCF (Scientific Committee for Food of European Commission – Vědecký výbor pro potraviny Evropské komise) a konečně doporučení EFSA (European Food Safety Authority – Evropský úřad pro bezpečnost potravin).

2 Ochratoxin A

Ochratoxin A, zkráceně OTA, patří svým významem mezi nejvýznamnější mykotoxiny. Dle IARC/WHO je zatím zařazen do skupiny 2B. Má nefrotoxické, hepatotoxické, neurotoxické, imunosupresivní, genotoxické, embryotoxické a teratogenní účinky (Picková a kol. 2020).

V některých případech je OTA doprovázen svým nechlorovaným analogem známým jako ochratoxin B, který se nachází v poměrně malých koncentracích a díky tomu, že nemá v molekule chlor, tak je jeho toxicita nižší ve srovnání s toxicitou OTA (EFSA 2006).

Podle JECFA FAO/WHO (1995) byl doporučený tzv. expoziční limit – PTWI (provisional tolerable daily intake – prozatímní tolerovatelný denní přívod) ve výši $100 \mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ tělesné hmotnosti týdně, což odpovídá denní dávce $14 \mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ tělesné hmotnosti. Podle EU SCF (2006) je stanoven tolerovatelný týdenní přívod ve výši $120 \mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ tělesné hmotnosti týdně, což odpovídá denní dávce $17 \mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ tělesné hmotnosti (EFSA 2006). V souvislosti se stále vzrůstajícím příjmem OTA byla tato hodnota v roce 2020 upravena na $4,73 \mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ tělesné hmotnosti za den pro nenádorový efekt, která byla vypočtena z lézí na ledvinách prasat nebo na hodnotu $14,5 \mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ tělesné hmotnosti za den pro neoplastický efekt, která byla vypočtena z nádorů ledvin u potkanů (Tangni a kol., 2021; EFSA, 2020).

OTA se vyskytuje v produktech rostlinného i živočišného původu. Jedná se zejména o potraviny, jako jsou cereálie, káva, koření, zelený čaj, pivo, víno, luštěniny, sušené ovoce či vepřové maso, krev a vnitřnosti, jako jsou játra, ledviny či výrobky z krve (Malíř & Ostrý, 2003). Selvaraj a kol. (2015) uvádí, že v Číně se mykotoxiny, především aflatoxiny a OTA, vyskytují i v tradičních léčivých rostlinách používaných v čínské medicíně. Takovými rostlinami jsou lékořice uralská (*Glycyrrhiza uralensis*) a cibule rodu řebčík (*Fritillaria*). OTA byl také nalezen v zázvoru, ale pouze tom sušeném a výrobcích z něj, v čerstvém nalezen nebyl, tudíž se předpokládá, že za to může proces sušení, kdy je velká náchylnost k plísním a tudíž i kontaminaci.

2.1 Nomenklatura

Ochratoxin A lze v databázích nalézt pod více jmény nebo pod vlastním registračním číslem.

Registrační číslo CAS (Chemical Abstract Service): 303-47-9

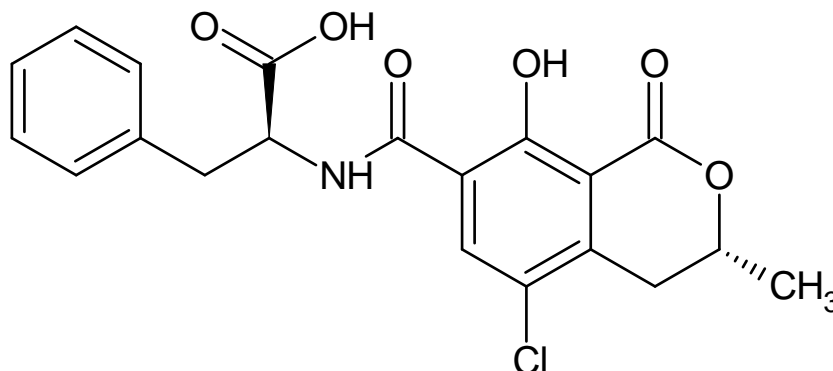
CAS název: L-Phenylalanine, *N*-[[[(3*R*)-5-chloro-3,4-dihydro-8-hydroxy-3-methyl-1-oxo-1*H*-2-benzopyran-7-yl]carbonyl]- (9CI, ACI)

Název dle IUPAC (International Union of Pure and Applied Chemistry):

(*R*)-*N*-[[[5-Chloro-3,4-dihydro-8-hydroxy-3-methyl-1-oxo-1*H*-benzo[*c*]pyran-7-yl) carbonyl]-3-phenylalanine

Sumární vzorec: C₂₀H₁₈ClNO₆

Strukturní vzorec:



2.2 Fyzikálně-chemické vlastnosti

Databáze SciFinder neboli Chemical Abstract Service uvádí tyto fyzikálně-chemické vlastnosti:

Molekulová hmotnost: 403,81 g·mol⁻¹

Teplota tání: 169 °C

Teplota varu: 632,4±55,0 °C při tlaku 760 Torr

Hustota: 1,425±0,06 g·cm⁻³ při teplotě 20 °C a tlaku 760 Torr

OTA je bezbarvá krystalická látka, jejíž maximální absorpance jsou při 216 nm a 333 nm. Má slabě kyselé vlastnosti a hodnoty pK_{A1} 4,2-4,4 pro karboxylovou skupinu a pK_{A2} 7,0-7,3 pro fenolické hydroxyskupiny isokumarinu. Pod UV světlem při vlnové délce 366 nm zeleně fluoreskuje, čehož se využívá pro detekci při tenkovrstvé chromatografii (TLC) a vysokoúčinné kapalinové chromatografii (HPLC) (Abrunhosa a kol. 2010).

2.3 Biosyntéza a biodegradace OTA

OTA obsahuje dihydrokumarinovou molekulu, která je spojena peptidickou vazbou k L-fenylalaninu. Je to velmi stabilní sloučenina, kterou nelze degradovat běžnými postupy přípravy jídla. Pro zničení je potřeba vystavení teplotě nad 250 °C a to alespoň po dobu několika minut (EFSA 2006).

Biosyntéza OTA není zcela známa. Je známo, že isokumarin je pentaketid, což znamená, že pochází z polyketidové dráhy, a L-fenylalanin pochází z šikimátové dráhy. Samotný isokumarin je syntetizován z pěti acetátů připojených hlava-pata. Na něj je navázán methionin v poloze 7, který je poté oxidován na karboxyl. Následně je peptidickou vazbou připojena jednotka L-fenylalaninu a nakonec chlór do polohy 5 (Abrunhosa a kol. 2010).

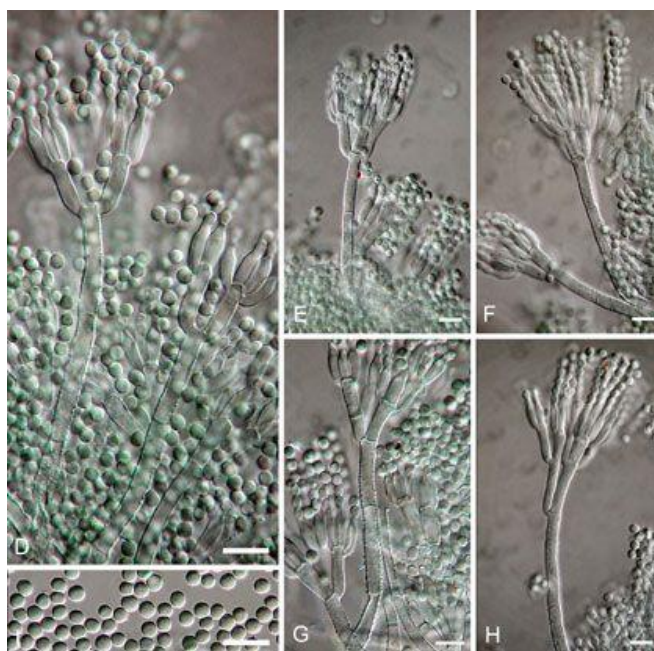
Biodegradace je mikrobiologická a existují dva způsoby degradace OTA. Prvním je degradace OTA hydrolýzou peptidické vazby, čímž vznikne L-fenylalanin a část OTA s isokumarinem, což lze považovat za detoxikační cestu, neboť oba produkty jsou netoxické. Druhým způsobem je degradace laktonového kruhu ochratoxinu hydrolýzou, čímž vznikne otevřená laktonová forma OTA. Tento produkt je však téměř stejně toxický jako původní OTA (Abrunhosa a kol. 2010).

2.4 Produkce OTA

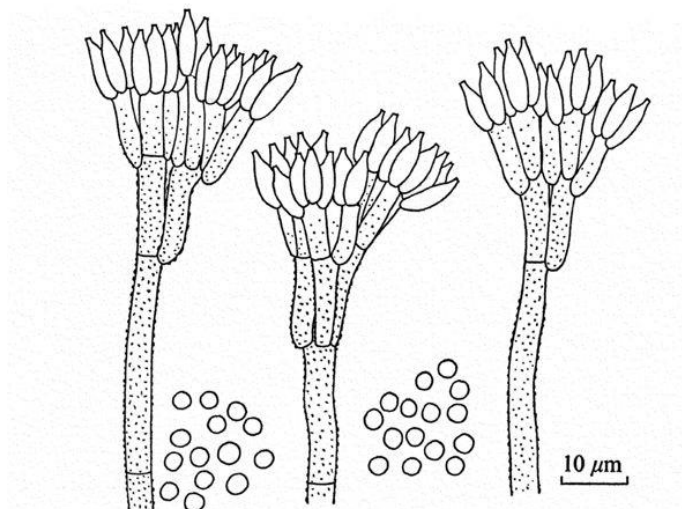
Množství produkovaného OTA je ovlivňováno řadou faktorů, které jsou stejné u všech hub a rostlin. Mezi tyto faktory se řadí vlhkost, teplotní podmínky, složení půdy, délka skladování a v neposlední řadě také mezidruhová konkurence a jiné interakce. Takovými interakcemi jsou interakce rostliny s mikroskopickými houbami, hmyzem či pesticidy (Malíř & Ostrý, 2003).

2.4.1 Producenti rodu *Penicillium*

Plísně rodu *Penicillium* se řadí do říše Fungi (houby), oddělení Ascomycota, řádu Eurotiales a čeledi Trichocomaceae. Jejich název je odvozen od latinského *penicillus*, což v překladu znamená štětec. Jejich český název je štětičkovec nebo plíseň štětičková. Jsou velmi rozmanitým rodem obsahujícím asi 300 druhů, přičemž jsou jedním z nejrozsáhlejších rodů teplého a mírného klimatu. Tvoří velké žlutozelené až modrozelené sametové povlaky. Některé druhy – *P. camemberti*, *P. glaucum* a *P. roqueforti*, jsou hojně využívány při výrobě sýrů. *P. chrysogenum* (dříve znám jako *P. notatum*) je druh produkující antibiotika betalaktamového typu – penicilíny. Podstatnou část rodu však tvoří druhy, které jsou toxigenní a pro člověka či jiné živočichy nebezpečné. (Malíř & Ostrý, 2003).



Obrázek 1: *Penicillium verrucosum* (Převzato z Mycobank Database), [Cit. 2023-05-04], na WWW: <https://www.mycobank.org/page/Name%20details%20page/37124>



Obrázek 2: *Penicillium verrucosum* var. *verrucosum* (převzato z Mycobank Database), [Cit. 2023-05-04], dostupný na WWW: <https://www.mycobank.org/page/Name%20details%20page/37124>

V mírném a chladnějším klimatu se z producentů rodu *Penicillium* vyskytují druhy *P. verrucosum* a *P. nordicum* (Picková a kol. 2020).

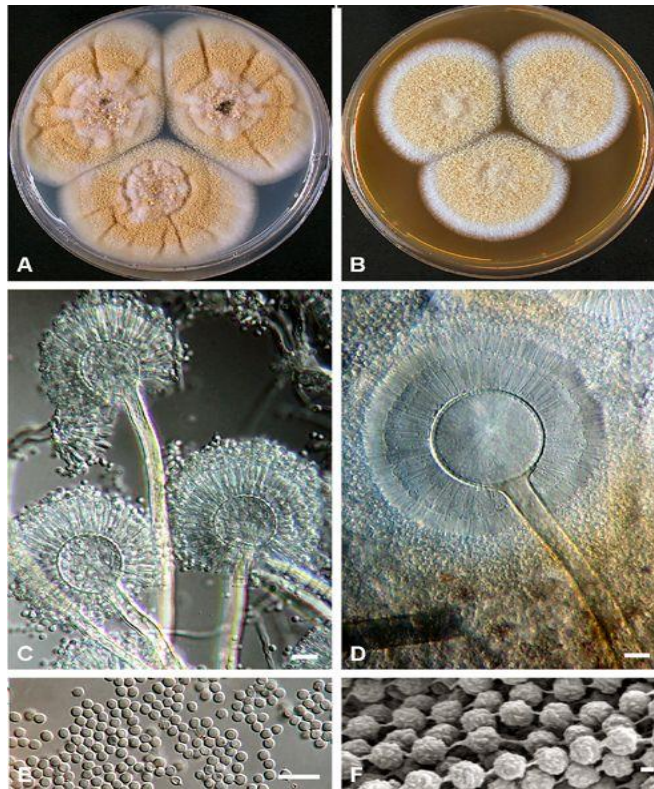
Penicillium verrucosum napadá v severní Evropě především pšenici a ječmen po sklizni, v době sušení a skladování. Ve vlhkých létech je nutné použít účinné metody sušení, aby se zabránilo kontaminacím. OTA kontaminuje pšenici při 23,5–27,5 % vlhkosti a teplotě 10–25 °C. Proto je nutné snížit vlhkost na 17–18 %, ale ne níže, neboť hrozí kontaminace jinými xerofytními druhy (Magan a Aldred, 2006).

2.4.2 Producenti rodu *Aspergillus*

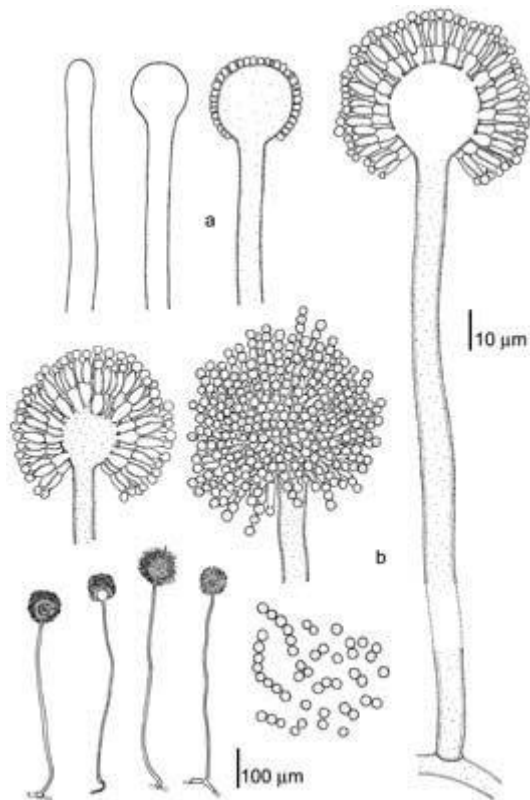
Houby rodu *Aspergillus* se rovněž řadí do říše Fungi (houby), oddělení Ascomycota, řádu Eurotiales a čeledi Trichocomaceae. Český název je kropidlák, jelikož průřez rozmnožovacím orgánem botanikům připomínal kropítko. Plísňe rodu *Aspergillus* tvoří nadýchané, většinou kropenaté povlaky různých barev.

Aspergillus je z fylogenetického hlediska velmi starý rod, který dnes čítá přes 335 druhů. Dnes je známo asi 40 druhů, které jsou patogenní pro člověka a zvířata, přičemž za přibližně 95 % infekcí odpovídají pouze 3 druhy – *A. niger*, *A. flavus* a *A. fumigatus*.

Aby nebyly uváděny pouze druhy s negativním vlivem, existují i takové, které pomohly při izolaci nových léčivých látek, jsou využívány při výrobě potravinářských produktů nebo mají potenciál pro využití v oblastech zasažených industriální činností. Např.: *A. terreus* produkuje lovastatin, což je inhibitor 3-hydroxymethylglutaryl-koenzym A reduktázy a používá se při léčbě hypercholesterolémie, *A. oryzae* pomáhá při fermentaci čaje a saké (japonský alkoholický nápoj) a v neposlední řadě by některé druhy šly použít pro bioremediaci oblastí postižených těžbou nebo těch, kde byla skládka (Malíř & Ostrý, 2003, Rodrigues, 2016 a Gómez, Fernández & Vega, 2016).



Obrázek 3: *Aspergillus westerdijkiae* (Převzato z Mycobank Database) [Cit. 2023-05-04], dostupný na WWW: <https://www.mycobank.org/Basic%20names%20search>



Obrázek 4: *Aspergillus ochraceus* (převzato z Mycobank Database) [Cit. 2023-05-04], dostupný na WWW: <https://www.mycobank.org/Basic%20names%20search>

V tropech a subtropích se vyskytují druhy rodu *Aspergillus*, především *A. carbonarius*, *A. ochraceus* = správně *A. westerdijkiae* (což bylo teprve nedávno potvrzeno molekulární biologii). Dále pak *A. steynii*, *A. lacticoffeatus*, *A. niger*, *A. tubingensis* a *A. sclerotioniger* (Picková a kol., 2020), na rozdíl od producentů *Penicillium*, které se vyskytují především v mírném a chladnějším pásu.

Aspergillus sekce *nigri*, především *Aspergillus carbonarius* napadá hrozny vinné révy, hlavně červené odrůdy. Tento druh se běžně vyskytuje v půdě a napadá plodiny především v tropech a subtropích. Ukázalo se však, že jeho hladiny klesají cca o 90 % při oddělení čisté šťávy z macerátu, jelikož se OTA adsorbuje na zbytky slupek a dalších zbytků z macerátu. I přes to však přesahuje povolené limity.

Aspergillus ochraceus napadá kávu a kakaové boby, které jsou vysoce hygroskopické, což zvyšuje riziko kontaminace při skladování a přepravě (Magan & Aldred, 2006 a Favilla a kol., 2008).

2.5 Dekontaminace OTA

Vzhledem k toxicitě OTA musí být nádobí dekontaminováno. Dekontaminace je soubor metod, postupů a prostředků, kterými dojde k účinnému odstranění kontaminantů. Dělá se, aby se snížila koncentrace těchto kontaminantů na co nejnižší a bezpečnou úroveň, a to buď přeměnou na netoxické či méně toxické produkty, anebo na takovou formu sloučeniny, kterou lze lépe zlikvidovat (Kotinský, 2003).

2.5.1 Použití chlornanu sodného

Ostrý V. a kol. (2021) uvádí, že touto metodou je degradováno více než 99 % OTA, což bylo ověřeno testem na mutagenní aktivitu, který vyšel negativní. Testovaným vzorkem bylo 400 µg OTA v 500 µl ethanolu.

S touto metodou se pojí také jistá rizika a je nutné být s těmito riziky obeznámen. První rizika se týkají OTA. Jak již bylo zmíněno ve vyšších odstavcích, OTA je potenciální karcinogen pro člověka. Musí se s ním pracovat v ochranných pomůckách, a pokud náhodou dojde k potřísnění latexových rukavic roztokem OTA v chloroformu, je potřeba je okamžitě vyměnit, neboť chloroform přes rukavice proniká a došlo by tak ke kontaktu OTA s pokožkou. Další rizika se pojí s chlornanem sodným, který je velmi silné oxidační činidlo, tudíž nesmí dojít ke smísení s jinými oxidačními a redukčními činidly. V neposlední řadě jsou rizika spojená s použitím methanolu, který je toxický a musí být uskladněn v uzamykatelné skříni. Smrtelná dávka je v rozmezí 30–100 g, kdy smrt nastává po 2–3 dnech a příznaky se mohou projevit se zpožděním několika hodin až dnů od požití. Příznaky mohou být bolest hlavy, třes, hučení v uších, mlhavé vidění až slepota.

V případě kontaminace OTA či chlornanem sodným se první pomoc poskytuje stejně jako při jakémkoli jiném potřísnění. Vše důkladně a dlouho omývat vodou, v případě přetrvávajících obtíží či horších příznaků kontaktovat Toxikologické informační středisko (TIS) nebo lékaře.

Vážnější je kontaminace methanolem. V případě zasažení kůže se postupuje stejně jako v předchozím případě. V případě požití je nutné vypít zhruba půl litru vody s dvěma lžičkami jedlé sody (hydrogenuhličitan sodný) a snažit se vyvolat zvracení i dlouho po době od požití. Dále se podá cca 20 ml ethanolu ve formě dobré lihoviny (ethanol má mnohem větší afinitu k alkoholdehydrogenáze než methanol). Toto podávání je možné opakovat do známek mírné opilosti a udržovat tento stav dokud postiženého nepředáme do péče lékaři. V případě horších příznaků či požití většího množství je nutné kontaktovat TIS.

Roztok 400 µg OTA je degradován ponecháním 30 minut v 10 ml 1,3% roztoku chlornanu sodného. Je zde však možná interference chlornanu sodného se zbylými komponentami v odpadu, proto by se měla účinnost ověřit.

Postup provedení dekontaminace je až na pár odchylek pro všechny typy roztoků či pevných látek stejný.

U pevných látek musí být nejprve odhadnuto, kolik chlornanu sodného bude potřeba. Na každých 400 µg OTA se přidá ekvivalentní množství ethanolu (400 µl). Poté se přidá alespoň dvojnásobek odhadnutého množství chlornanu, to je asi 20 ml na 400 µg OTA. Nechá se působit a poté se zkontroluje, zda byla degradace úspěšná. Nakonec se vše zředí a odstraní do odpadu.

Vodné roztoky se nejprve zneutralizují či zalkalizují, pokud je to vyžadováno, a následně se postupuje stejně jako u pevných látek.

Roztoky s těkavými rozpouštědly se nejprve odpaří na vakuové odparce a poté se odhadne množství OTA a přidá se dostatek ethanolu. Následně se postupuje stejně jako u pevných látek.

V případě roztoků v dimethylsulfoxidu či dimethylformamidu se nejprve přidá dvojnásobek vody, než jaký je objem roztoku pro dekontaminaci. Poté se třikrát extrahuje ekvivalentním množstvím dichlormethanu. Extrakty dichlormethanu se spojí, vysuší bezvodým síranem sodným, přefiltrují a promyjí dalším dichlormethanem. Nakonec se rozpouštědlo odpaří na vakuové odparce a pokračuje se stejně jako u roztoků s těkavými rozpouštědly.

Použité laboratorní sklo a ochranné pomůcky se dekontaminují přidáním takového množství methanolu či ethanolu, které je navlhčí. Následně se vloží do 1,3% roztoku chlornanu sodného tak, aby byly kompletně ponořeny, a roztok se nechá 30 minut působit. Roztok se poté naředí a zlikviduje v souladu s provozním řádem laboratoře.

Občas se stane, že se látky rozlijí či rozsypou. V takovém případě se poškozená plocha ohraničí a použije se ochranný oděv. Kapaliny se setrou vhodným savým textilem, který se poté ponoří do připravené lázně s 1,3% chlornanem sodným. Zasažený a utřený povrch se přetře textilií namočenou v hydrogenuhličitanu sodném, která se poté také ponoří do lázně s chlornanem. Nakonec se povrch polije roztokem chlornanu, o stejné koncentraci jaká je v lázni, nechá se působit minimálně 30 min, poté se setře savou textilií a ta se vyhodí. V poslední řadě se provede

kontrola úplné degradace, kdy se povrch potře adsorbentem navlhčeným v methanolu, který se následně podrobí analýze.

Při tenkovrstvé chromatografii se desky postříkají 1,3% chlornanem sodným, nechá se působit 30 minut a poté se deska oškrábe a promyje vhodným rozpouštědlem pro kontrolu, zda byla degradace úspěšná.

2.5.2 Dekontaminace za použití detergentu RBS-35 (fy Pierce)

Tento typ dekontaminace byl otestován pro dekontaminaci laboratorního skla, které bylo kontaminováno 400 µg OTA. Podle Ostrého V. a kol. (2021) tato metoda zničí 99,99 % OTA, ale vzorky po použití metody nebyly testovány Amesovým testem mutagenity.

Kontaminované sklo se ponoří do lázně 2% roztoku detergentu RBS-35 o 50 °C a nechá se v něm minimálně 30 minut. Roztok po dekontaminaci se poté zlikviduje v souladu s provozním řádem laboratoře.

3 ELISA (Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay)

Podle článku na webu společnosti Baria (2019), je ELISA jednou z nejčastěji používaných imunoanalytických metod pro kvantitativní stanovení antigenů látek. Metoda vznikla v sedmdesátých letech minulého století jako náhrada imunochemických testů, které využívaly radionuklidy pro značení protilátek. Principem je specifická interakce antigenu a protilátky, přičemž na jednom z nich je kovalentní vazbou navázán enzym. Nejčastěji se jedná o křenové peroxidazy či alkalické fosfatasy. Enzym katalyzuje chemickou přeměnu substrátu na barevný produkt a produkt je poté stanoven spektrofotometricky nebo na základě fluorescence.

Existuje velké množství jamkových mikrotitračních destiček, ale k měření jsou nejčastěji využívány 96-jamkové mikrotitrační destičky. Na nich lze snadno imobilizovat reagenty, což je velkou výhodou této metody, neboť umožňuje separaci navázaného a nenavázaného materiálu.

Antigen

Antigen je látka, kterou náš imunitní systém detekuje jako cizorodou a nebezpečnou pro náš organismus. Pokud se dostane do těla, dojde k jeho rozpoznání a navození imunitní odpovědi s tvorbou protilátek. Z chemického hlediska se jedná o proteiny (glyko- i lipoproteiny), nukleové kyseliny či polysacharidy. Na povrchu antigenu se vyskytují epitopy, což jsou malé oblasti, které reagují s příslušnou protilátkou.

Protilátka

Látka bílkovinné povahy patřící mezi imunoglobuliny, která váže antigen. Je produkována B-lymfocyty jako obranná reakce imunitního systému. Jsou trojího typu – monoklonální, polyklonální a rekombinantní. Monoklonální protilátky jsou namířeny proti jednomu specifickému epitopu antigenu. Polyklonální protilátky jsou namířeny proti více epitopům antigenu a rekombinantní protilátky kombinují oba předchozí typy.

Konjugát

Jedná se o sekundární protilátku, na níž je navázán enzym a reaguje s primární protilátkou, která se v tuto chvíli chová jako antigen (Habuštová, 2011).

Substrát

Jedná se o chemickou látku, která reaguje s enzymem za vzniku barevného produktu. Pokud ale jamky neobsahují konjugát, tak k barevné změně nedojde. Největší intenzitu zbarvení má negativní roztok, tudíž má i největší absorbanci. Proto je nutné pro zjištění koncentrace proměřit kalibrační závislost pomocí proměření absorbance standardních roztoků. Výsledný komplex se měří pomocí spektrofotometru.

Stop (zastavovací) roztok

Jedná se o roztok kyseliny, který zastaví enzymatickou reakci a tím dojde ke změně zbarvení. Tato změna je poté měřitelná na spektrofotometru při vlnové délce 450 nm.

3.1 Typy ELISA

3.1.1 Přímá ELISA

Základní a nejjednodušší ze všech typů. Je časově i cenově nejdostupnější, neboť je použita jen jedna protilátka. Imobilizovaný antigen na pevném povrchu reaguje s protilátkou, která je značena enzymem. Následně enzym reaguje se substrátem a vzniká výsledný produkt. Pro příklad: enzym reaguje s chromogenním substrátem a vzniká barevný produkt, který se následně vyhodnocuje.



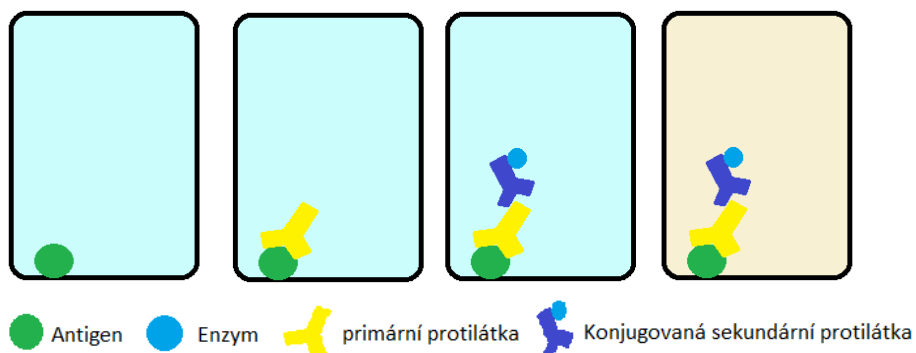
Obrázek 1: Schématické znázornění přímé ELISA: vazba antigenu na jamku (vlevo), přidání enzymem značené protilátky (uprostřed), přidání substrátu (vpravo).

Celá tato metoda se dá shrnout do šesti kroků. Prvním krokem je inkubace, kdy dochází k navázání antigenu na pevný povrch jamky. Poté se jamka promyje a dochází k druhé inkubaci, kdy se enzymaticky vázaná protilátka váže na antigen. Následuje druhé promytí, kdy se odstraňuje nenavázaná protilátka. Předposledním krokem je třetí inkubace, při níž reaguje enzym s přidaným substrátem. Posledním krokem je samotná detekce vzniklého produktu.

Tento typ ELISA lze využít pro kvalitativní i kvantitativní stanovení antigenu nebo protilátky ve vzorku a dále tak lze použít pro mapování epitopů. Nejčastěji se používá pro analýzu imunitní odpovědi na antigen.

3.1.2 Nepřímá ELISA

Tato metoda je druhou nejčastěji využívanou. V ní je kromě primární protilátky navíc přidána sekundární protilátka, přičemž oproti přímé ELISA je s enzymem konjugovaná až sekundární protilátka nikoli primární.



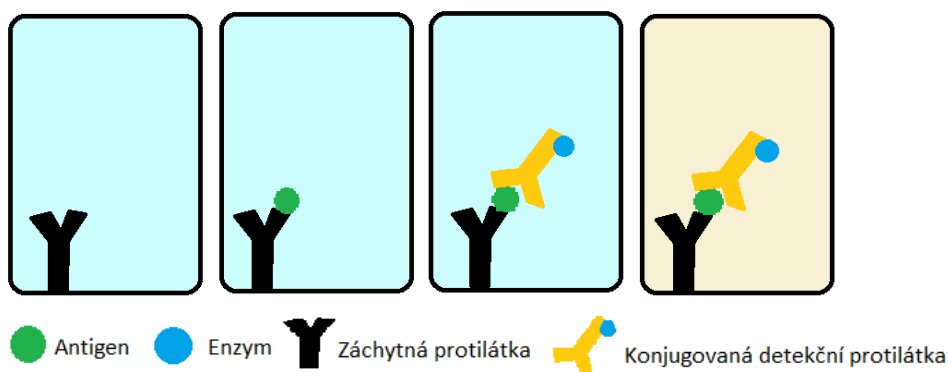
Obrázek 2: Schématické znázornění nepřímé ELISA. Nejprve se naváže antigen na jamku (vlevo), poté se přidá primární protilátka (vlevo uprostřed), následuje přidání enzymem značené sekundární protilátky (uprostřed vpravo), přidání substrátu (vpravo).

Postup metody je v prvních čtyřech krocích shodný s metodou přímou. Změna nastává v pátém kroku, kdy opět dochází k inkubaci, ale tentokrát se jedná o navázání enzymaticky značené sekundární protilátky. Následuje promytí a odstranění nenavázané protilátky. V předposledním kroku je přidán substrát a dochází k inkubační reakci s enzymem. Výsledný produkt je detekován příslušným detektorem.

Výhodou metody je její vyšší citlivost, neboť se na primární protilátku může vázat více enzymaticky značených protilátek, a vyšší flexibilita, kdy se jedna značená sekundární protilátka může vázat na více typů primárních protilátek. Nevýhodou je větší časová náročnost, neboť je potřeba dalšího inkubačního kroku. Využívá se nejčastěji pro stanovení celkové koncentrace protilátek ve vzorku.

3.1.3 Sendvičová ELISA

Pro tento typ ELISA je typické použití dvou protilátek, přičemž každá je specifická na různé epitopy jednoho antigenu. Jedna protilátka je vázána na povrch jamky a vychytává antigen ze vzorku. Druhá protilátka je enzymaticky značena a slouží k detekci zachyceného antigenu.



Obrázek 3: Schéma sendvičového typu ELISA. Vazba záchytné protilátky na jamku (vlevo), vazba antigenu na protilátku (vlevo uprostřed), přidání enzymem značené protilátky (vpravo uprostřed), přidání substrátu (vpravo).

Nejprve dojde k inkubaci, přičemž se jedna z protilátek váže na povrch jamky. Následuje promytí a reakce přidaného antigenu s vázanou protilátkou. Jamka se

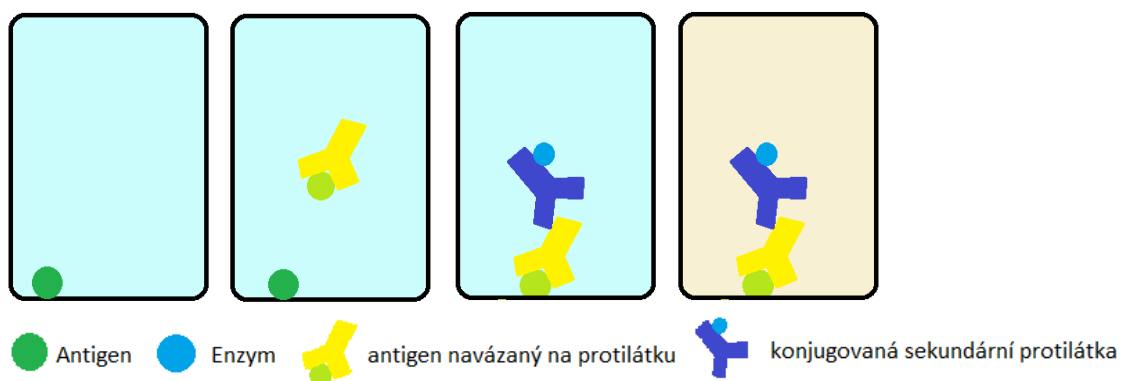
promyje, přidá se značená protilátka, která se váže na antigen a vytváří tzv. sendvič. Sendvič je promyt a je k němu přidán substrát, s nímž tvoří výsledný produkt, který je detekován.

Sendvičová ELISA může existovat ve dvou formách a to jako přímá, kdy je enzymem značená pouze primární protilátka, nebo jako nepřímá, kdy je značená až sekundární protilátka.

Tato metoda je nejcitlivější ze všech typů. Také je vysoce specifická, jelikož se užívají dvě protilátky a nikoli pouze jedna. Její využití spočívá v analýze komplexních vzorků bez nutnosti náročné purifikace.

3.1.4 Kompetitivní ELISA

Na tento typ ELISA může být přeměněn kterýkoli z předchozích typů. Principem metody je kompetice antigenu a referenčního antigenu o vazebné místo na primární protilátce. Referenční antigen je imobilizován v jamce, poté je vzorek smíchán s protilátkou a následně přidán k referenčnímu antigenu. Antigeny spolu soupeří o místo na protilátce, než se ustálí rovnováha. Poté je celý vzorek promyt a dále se postupuje jako v předchozích typech.



Obrázek 4: Schematicky znázorněná kompetitivní nepřímá ELISA. Vazba referenčního antigenu (vlevo), přidání směsi antigenu vzorku s primární protilátkou (vlevo uprostřed), přidání enzymem značené sekundární protilátky (vpravo uprostřed), přidání substrátu (vpravo).

Jelikož metoda existuje v kombinaci s výše uvedenými typy, tak je postup téměř totožný jako u předchozích typů. Výjimkou je krok tři, kdy je nutná preinkubace, jelikož se v tomto kroku míchá antigen vzorku s primární protilátkou. Směs je poté přidána do jamky k referenčnímu antigenu a zbylý postup je proveden podle vybrané metody.

U této metody není potřeba purifikace a ředění, a proto jsou používány surové vzorky. Využívá se pro stanovení antigenu s jednou protilátkou, kdy je antigen příliš malý pro dvě protilátky. Dále se využívá pro měření koncentrace antigenu ve směsích, kdy se neznámý vzorek porovnává s podobnými vzorky, které mají známé antigeny.

4 Vzorky

Jelita se řadí mezi masné výrobky a jsou vyráběna především ve střední Evropě. Postup, ačkoli je různý výrobce od výrobce, musí obsahovat stejné hlavní komponenty a tento postup je v nezměněné podobě znám více než 110 let.

Hlavní část surovin pro výrobu je získána při zabíjačce, ať už domácí, která probíhá nejčastěji v únoru, nebo v běžné výrobě. Jedná se o vepřovou krev a méně hodnotné vepřové maso (hlava s lalokem, slezina, srdce, játra, bůček, plíce, kůže).

Dalšími surovinami jsou kroupy – zrna obilovin zbavená obalů, nebo žemle, záleží na typu jelit. Dále se přidá tučný vývar získaný ze zabíjačkové polévky, sádlo, škvarky a koření – majoránka, pepř, sůl, kmín, nové koření, česnek a cibule. Celá tato směs se pořádně promíchá, poté se naplní do vepřového střívka, zauzluje na koncích a celé střívko se povaří, aby se krev uvařila.

4.1 Chemikálie, použitý materiál a přístroje

4.1.1 Chemikálie

- Chloroform, HiPerSolv CHROMANORM for HPLC, 2,5 l, VWR, katalog. č. 83626.320 (CHCl₃)
- Dichlormethan, HiPerSolv CHROMANORM for HPLC, 2,5 l, VWR, katalog. č. 23373.320 (CH₂Cl₂)
- Hydrogenuhličitan sodný (NaHCO₃)
- Kyselina chlorovodíková (HCl)
- Methanol (CH₃OH)
- Chlornan sodný (NaClO)
- Ultračistá voda ze zařízení Milli Q plus, Millipore

4.1.2 Roztoky

- roztok kyseliny chlorovodíkové o molární koncentraci 1 mol·dm⁻³
 - Do 250ml odměrné baňky bylo napipetováno 7,73 ml 35% HCl a po rysku bylo doplněno ultračistou vodou Milli Q plus.
- hydrogenuhličitanový pufr o pH 8,1 o molární koncentraci 0,13 mol·dm⁻³
 - V kádince byla rozpuštěna navážka hydrogenuhličitanu sodného, která je 10,92 g. Následně byla kvantitativně převedena do 1 000ml baňky a doplněna ultračistou vodou Milli Q plus po rysku.
- 10% roztok chlornanu sodného

4.1.3 Použitý materiál a laboratorní vybavení

- centrifugační nádoby
- mikropipety s proměnným objemem 20–200 μl a 200–1000 μl
- špičky na pipety
- ependorfy
- kádinka

- odměrné válce
- filtrační papíry 150 mm pro kvalitativní analýzu KA 2-M, Papírny Pernštejn
- nálevky
- Pasteurovy pipety (kapátka)
- laboratorní sklo

4.1.4 Přístrojové vybavení

- Spektrofotometr Epoch BioTek
- Promývačka BioTek ELx50
- Laboratorní centrifuga MPW – 351e
- Třepačka ReaxMulti
- Analytické váhy KERN EW PCB 2000
- Mrazicí box Vestfrost SE 325
- Inteligentní digestoř MERCI N s odtahem
- Ultra-Turrax Janke&Kunkel IKA-WERK TP 18/10 170W 20000 RPM 220V

4.1.5 ELISA souprava – RIDASCREEN Ochratoxin A 30/15

Sada obsahovala:

- Mikrotitrační destičku s 96 jamkami pokrytými protilátkami proti OTA
- 6 standardů s OTA o objemu 1,3 ml a o koncentracích 0, 50, 100, 300, 900, 1800 ppt
- Konjugát o objemu 0,7 ml
- Konjugátový pufr o objemu 7 ml
- Substrát/chromogen o objemu 10 ml
- Stop roztok o objemu 14 ml
- Promývací solný roztok Tween k rozpuštění solí

Sada byla skladována při teplotě 2–8 °C a ve tmě. OTA a roztok chromogen substrát jsou citlivé na světlo. Nutností je použití rukavic, protože jamky obsahují OTA (jeho toxicita byla zmíněna výše). Dekontaminace použitého skleněného nádobí byla provedena přes noc pomocí 10% roztoku chlornanu sodného.

4.2 Odběr a skladování vzorků

Ve čtrnácti městech (Hradec Králové, Jičín, Dvůr Králové, Městec Králové, Jaroměř, Pardubice, Praha, Hořice, Nová Paka, Nový Bydžov, Choťovice, Žehuň, Smiřice, Třebechovice pod Orebem), především Královéhradeckého kraje, bylo nakoupeno 100 vzorků jelit či prejtů různých značek a dodavatelů, přičemž všechny byly vyrobeny v České republice.

Jelita byla řádně označena, zabalena do polyethylenového sáčku a uložena do mrazicího boxu o teplotě -25 °C. Před použitím byly nejprve kondicionovány na laboratorní teplotu.

Jelikož jelito či prejt není homogenní směs, bylo potřeba jelita nejprve zhomogenizovat, a teprve poté z nich odebírat vzorky. Homogenizace byla provedena pomocí zařízení Ultra-Turrax, kterým byli rozmixovány

a zhomogenizovány předem nakrájené vzorky jeli. Z takto připraveného vzorku bylo odebráno laboratorní lžičkou navážku 5 g, přičemž lžička i miska, použité pro vzorek, byly následně omyty methanolem, aby nedošlo ke kontaminaci vzorků.

Triplety se vzorky byly také řádně označeny, zabaleny do PE sáčku a následně uskladněny v mrazicím boxu.



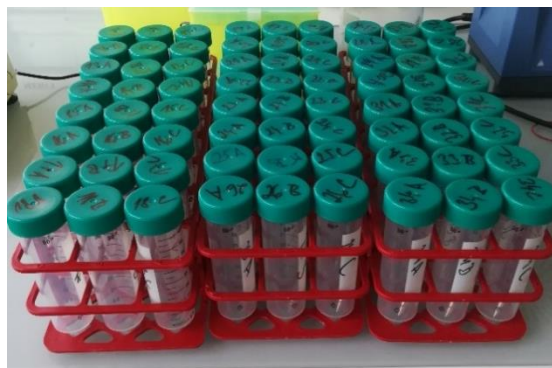
Obrázek 5: Vzorek syrových jeli



Obrázek 6: Zhomogenizovaný vzorek



Obrázek 8: Homogenizátor Ultra-Turrax, pomocí nějž byly vzorky zhomogenizovány.



Obrázek 7: Očíslované prázdné triplety připravené pro naplnění

4.3 Příprava vzorku

Příprava vzorků probíhala podle návodu přiloženého v ELISA sadě.

Z předem odebraných a uskladněných vzorků byly odebrány 2 g do polypropylenové nádoby. K nim bylo přidáno 5 ml kyseliny chlorovodíkové. Po dobu pěti minut byla směs intenzivně protřepávána na třepače ReaxMulti. Pro eliminování rizika hromadění plynu uvnitř nádoby byla nádoba nejprve protřepána v ruce a plyn byl odpuštěn, načež byla nádoba znovu pevně uzavřena.



Obrázek 13: Třepání vzorků s HCl na třepačce ReaxMulti

Následným krokem bylo přidání 10 ml dichlormethanu a protřepávání po dobu 15 minut na třepačce ReaxMulti. Nádobky byly umístěny na dobu 15 minut do centrifugy s rychlostí 3 500 otáček za minutu. Následně byla pomocí Pasteurovy pipety opatrně odpipetována vodná horní vrstva, až v nádobce zůstal jen koláč vzorku a spodní dichlormethanová vrstva. Zbytek po odpipetování byl zfiltrován přes filtrační papír.



Obrázek 14: Vzorky v centrifuze



Obrázek 15: Zcentrifugované vzorky se třemi viditelnými vrstvami



Obrázek 16: Filtrační aparatura s odděleným koláčem vzorku a organickou fází jako filtrátem

K filtrátu, kterým byla dichlormethanová vrstva, bylo do nové nádobky přidáno ekvivalentní množství hydrogenuhličitanového pufru a nádobka byla protřepána na třepačce 15 minut. Následně byla nádobka umístěna na dobu 15 minut do centrifugy při 3 500 otáčkách za minutu. Z takto upraveného vzorku bylo odebráno 100 μl vodné fáze do ependorfky a k ní bylo přidáno 400 μl hydrogenuhličitanového pufru.



Obrázek 17: Konečný vzorek, který byl použit pro ELISA

4.4 Postup a stanovení pomocí ELISA

Pro stanovení OTA byla použita sada RIDASCREEN. Ta umožňuje získat přesnou koncentraci v jednotkách $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$. Postup práce zahrnuje přípravu konjugátu, přípravu promývacího pufru, který se využije při promývání. Po přípravě následuje samotné pipetování standardů a vzorků, pipetování konjugátu, inkubace a pipetování chromogen substrátu a STOP substrátu. Nakonec se vyhodnotí koncentrace pomocí ELISA readeru (RIDASCREEN, 2018). Celý tento proces je totožný s postupem pro kompetitivní ELISA metodu.

Pro promývání byla použita automatická promývačka BioTek ELx50, přičemž celý pracovní postup byl proveden podle uživatelské příručky dodávané s přístrojem. Jako ELISA reader byl použit spektrofotometr Epoch BioTek. Pro samotnou analýzu byly použity vzorky, které byly předem vyndány z lednice a vytemperovány na laboratorní teplotu.

1. Příprava konjugátu

Konjugát je obsažen v červeně označené lahvičce. Pro jeho použití musí být nejprve nařazen do zkumavky v poměru 1:11 zředovacím pufrům pro konjugát (obojí je součástí sady). Množství se použije podle toho, kolik bude měřeno vzorků. Například 2 ml pufru a 200 µl konjugátu vystačí na stanovení 4 stripů (= 32 jamek).

2. Pipetování standardů a vzorků

Do držáku na stripů se umístí požadovaný počet stripů. Pro každý standard a vzorek je nutné mít vlastní jamku. Podle předem vytvořeného schématu (Tabulka 1) se poté pipetují standardy a vzorky. Do jamky je odpipetováno 50 µl standardu či vzorku. Pro každou jamku je nutné použít novou pipetovací špičku, aby nedošlo ke vzájemné kontaminaci vzorků. Standardy jsou dodané v šesti lahvičkách o koncentracích 0, 50, 100, 300, 900, 1800 ppt.

	1	2	3	4	5	6
A	Standard 0	Vzorek 3	Vzorek 11	Std. 0	Vzorek 21	Vzorek 29
B	Standard 50	Vzorek 4	Vzorek 12	Std. 50	Vzorek 22	Vzorek 30
C	Standard 100	Vzorek 5	Vzorek 13	Std. 100	Vzorek 23	Vzorek 31
D	Standard 300	Vzorek 6	Vzorek 14	Std. 300	Vzorek 24	Vzorek 32
E	Standard 900	Vzorek 7	Vzorek 15	Std. 900	Vzorek 25	Vzorek 33
F	Standard 1800	Vzorek 8	Vzorek 16	Std. 1800	Vzorek 26	Vzorek 34
G	Vzorek 1	Vzorek 9	Vzorek 17	Vzorek 19	Vzorek 27	Vzorek 35
H	Vzorek 2	Vzorek 10	Vzorek 18	Vzorek 20	Vzorek 28	Vzorek 36

Tabulka 1: Schéma standardů a vzorků na mikrotitrační destičce

Při posledním měření byly do poledního šestého stripu umístěny dva slepé vzorky a šest spiked vzorků – dva byly při 250 ppt, další při 500 ppt, 1000 ppt, 1500 ppt a 2000 ppt.

	1	2	3	4	5	6
A	Std. 0	Vzorek 75	Vzorek 83	Std. 0	Vzorek 93	Slepý vzorek 1
B	Std. 50	Vzorek 76	Vzorek 84	Std. 50	Vzorek 94	Slepý vzorek 2
C	Std. 100	Vzorek 77	Vzorek 85	Std. 100	Vzorek 95	Spiked 250 ppt A
D	Std. 300	Vzorek 78	Vzorek 86	Std. 300	Vzorek 96	Spiked 250 ppt B
E	Std. 900	Vzorek 79	Vzorek 87	Std. 900	Vzorek 97	Spiked 500 ppt
F	Std. 1800	Vzorek 80	Vzorek 88	Std. 1800	Vzorek 98	Spiked 1000 ppt
G	Vzorek 73	Vzorek 81	Vzorek 89	Vzorek 91	Vzorek 99	Spiked 1500 ppt
H	Vzorek 74	Vzorek 82	Vzorek 90	Vzorek 92	Vzorek 100	Spiked 2000 ppt

Tabulka 2: Schéma standardů a vzorků se slepými a spiked vzorky na mikrotitrační destičce

3. Přidání konjugátu a inkubace

Do každé jamky bylo napipetováno 50 μ l naředěného konjugátu. Po přidání konjugátu do všech jamek byl obsah v nich promíchán opatrným krouživým pohybem destičky na podložce. Rámeček se stripy byl následně umístěn do temna při pokojové teplotě a ponechán zde 30 minut k inkubaci.

4. Příprava promývacího roztoku a fáze promývání

Sůl promývacího pufru PBS-tween byla součástí balení, jen bylo nutné ji rozpustit a připravit z ní roztok. Sůl byla rozpuštěna v litru destilované vody a poté byla přelita do nádoby u promývačky. V případě, že by roztok nebyl celý spotřebován, je možné jej uchovávat v chladničce 4–6 týdnů při teplotě 2–8 °C.

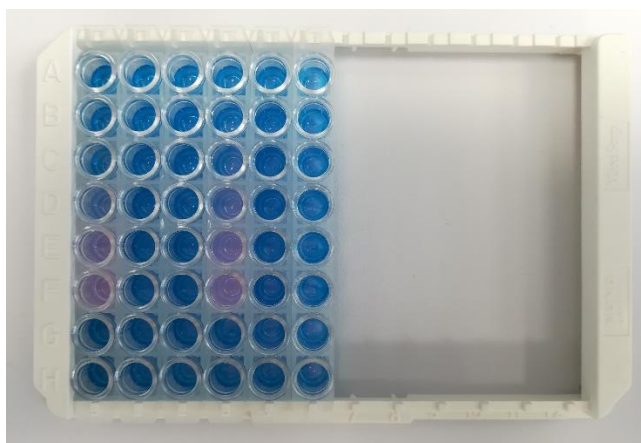
Na pracovní plochu byla nachystána buničitá vata nebo filtrační papír, na niž po 30 minutách byly rychlým pohybem dnem vzhůru vyprázdněny inkubované stripy. Takto obrácené se nechají, aby se pořádně vysušily. Následně byly umístěny do automatické promývačky, kde byly 3x promyty promývacím roztokem. Po promývání byly opět přetočeny dnem vzhůru na buničité vatě či filtračním papíře, aby mohl odtéci přebytečný promývací roztok.



Obrázek 18: Automatická promývačka BioTek ELx50

5. Pipetování chromogen substrátu

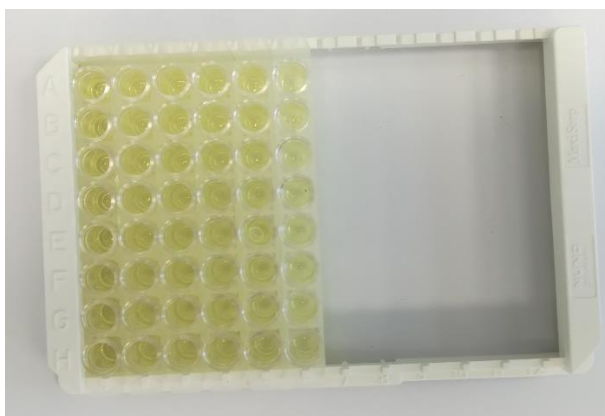
Do promytých stripů byl pipetován chromogen substrát o objemu 100 μ l, který se nacházel v hnědě označené lahvičce. Rámeček s jamkami byl následně krouživým pohybem po podložce promíchán a uložen do tmy při laboratorní teplotě, kde se nechal 15 minut inkubovat.



Obrázek 19: Vzorek po inkubaci s chromogen substrátem

6. Pipetování STOP roztoku

Do inkubovaných stripů byl napipetován STOP roztok o objemu 100 μl . Nacházel se ve žlutě označené lahvičce. Po jeho napipetování došlo k barevné změně z modré na žlutou.



Obrázek 20: Změna zbarvení po přidání STOP roztoku

7. Vyhodnocení pomocí ELISA readeru

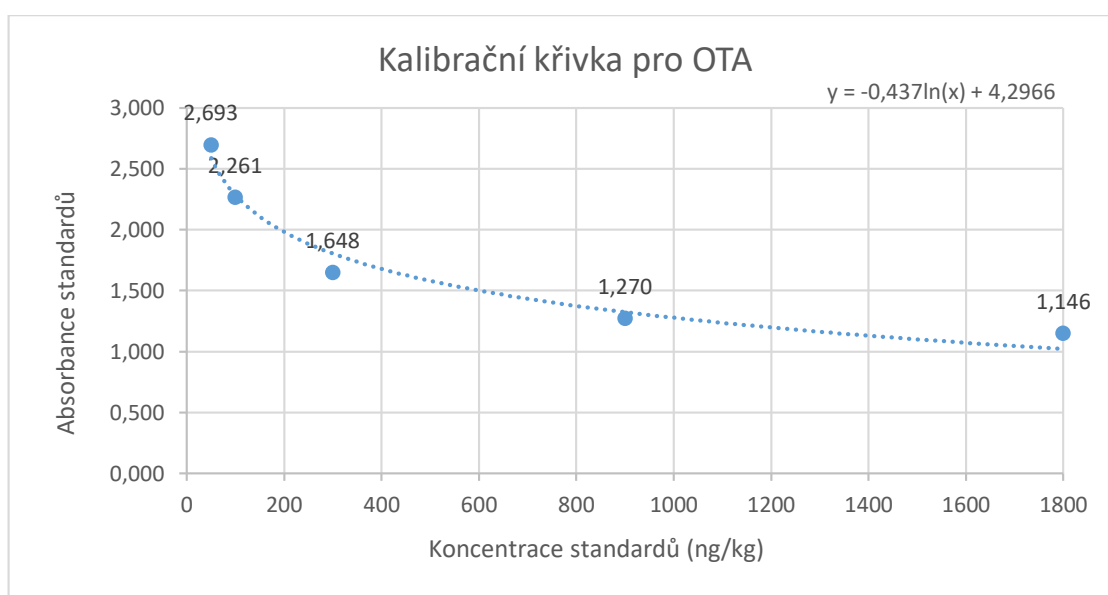
K vyhodnocení byl použit ELISA reader, přesněji spektrofotometr Epoch BioTek. Na tomto spektrofotometru bylo možné měřit vzorky při vlnové délce 450 nm a koncentraci v jednotkách $\text{ng}\cdot\text{kg}^{-1}$ (ppt) nebo $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ (ppb) a to až 30 minut po přidání STOP roztoku. Spektrofotometr je zároveň propojen s počítačem, do kterého byly zaznamenány výsledky měření pomocí softwarového programu Gen 5. Do programu se zadá počet a umístění vzorků na mikrotitrační destičce a přístroj výsledky sám změní v odpovídající koncentraci v $\text{ng}\cdot\text{kg}^{-1}$.

5 Výsledky

Standardní vzorky byly měřeny pro kalibraci přístroje ELISA. Pro stanovení ochratoxinu A byly použity standardy o koncentraci 0, 50, 100, 300, 900, 1800 ppt z testovací sady. Jejich absorbance byly změřeny při vlnové délce 450 nm (Tabulka 3) a následně z nich byla získána kalibrační křivka, což je závislost koncentrace na absorbanci (Graf 1).

Koncentrace standardů (ppt)	Absorbance
Standard 0	2,951
Standard 50	2,693
Standard 100	2,261
Standard 300	1,648
Standard 900	1,270
Standard 1800	1,146

Tabulka 3: Koncentrace standardů a jejich absorbance při 450 nm



Graf 1: Výsledky měření standardů pomocí ELISA při 450 nm

Měření každého rámečku bylo provedeno 3x (tzn. v tripletu) a z jednotlivých hodnot byly vytvořeny průměry, které jsou uvedeny v tabulce a byly použity pro kalibrační křivku. Výrobce v manuálu pro ELISA metodu uvádí parametry pro 100% výtěžnost, přičemž specifita k OTA je také 100%.

Z koncentrací vzorků byl vypočítán aritmetický průměr, medián, rozsah a směrodatná odchylka. Pro aritmetický průměr, medián a směrodatnou odchylku byly použity pouze koncentrace pozitivních vzorků. Tyto hodnoty jsou uvedeny v Tabulce 4.

Aritmetický průměr	5,0
Medián	4,8
Rozsah	<LOD; 10,3
Směrodatná odchylka	1,3

Tabulka 4: Statistika vzorků

Mez detekce (LOD = limit of detection) pro cereálie a krmiva je dle výrobce 1,25 ppb ($\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$).

Z celkových 100 vzorků jelít a prejtů jich bylo 35 (35 %) pozitivních. Tyto vzorky překročily detekční mez danou výrobcem a jejich výsledné koncentrace jsou zapsány v Tabulce 5.

Název vzorku	Číslo vzorku	Koncentrace OTA v ($\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$)
Jelítka	3	3,9
Jelítka přeláčená	5	4,0
Jelítka	8	3,5
Jelítka	10	4,6
Jelítka žemlová	11	4,4
Jelítka kroupová	18	4,9
Jelita	19	3,9
Jelítka	20	4,9
Prejt jelítkový	21	3,8
Žemlové jelito	27	6,8
Jelítkový prejt	28	5,8
Prejt jelítkový - bez lepku	29	6,4
Jelítka špejlovaná	30	3,8
Jelítka bez lepku	31	4,4
Jelítka bez lepku	32	3,8
Jelítka přeláčená	35	6,2
Jelítka špejlovaná	36	5,9
Jelítkový prejt	73	3,9
Kroupák	74	4,6
Jelítka	75	4,2
Jelita kroupovaná	79	4,2
Kroupy vařené	80	4,9
Jelítka špejlovaná	81	4,8
Jelítka bez lepku	82	5,4
Jelítkový prejt bez lepku	83	5,1
Jelítka	84	4,9
Jelítkový prejt	89	4,4
Kroupová jelítka	90	4,9
Jelítkový prejt	91	5,3
Jelita špejlovaná	92	5,9
Jelítkový prejt	93	7,8
Jelítkový prejt	94	4,2
Jelítkový prejt	98	5,2
Kroupová jelita	99	4,7
Jelita	100	10,3

Tabulka 5: Konečné koncentrace OTA v pozitivních vzorcích

Diskuze

Vzorky jeliť a prejtů byly analyzovány za použití testovací sady RIDASCREEN. Hypotéza předpokládala výrazně vyšší množství ochratoxinu A ve vzorcích, než jaké byly reálně naměřené hodnoty metodou ELISA. Ve skutečnosti mohl být výsledek způsoben nedostatečnou citlivostí metody k velmi malým množstvím OTA.

Nařízení komise EU 2022/1370, které mění staré nařízení komise EU č. 1881/2006 ohledně obsahu OTA v potravinách, udává hodnoty OTA a dalších mykotoxinů v potravinách. Bohužel tyto hodnoty nejsou stanoveny pro maso, vnitřnosti a masné výrobky, což jsou potraviny, které mohou obsahovat nejvíce OTA. Tato oblast regulace by se dala upravit národní legislativou, bohužel ve většině zemí chybí. Výjimkami jsou Dánsko, Estonsko, Rumunsko a Slovensko, které alespoň regulují množství OTA v mase a vnitřnostech. Jediná Itálie přijala omezení množství OTA, které platí pouze pro vepřové maso a jeho výrobky, jelikož právě vepřové je na OTA nejvíce citlivé (Nařízení komise EU 2022/1370; Pleadin a kol., 2021).

Markov a kol. (2013) zkoumali mykotoxiny v 90 vzorcích masných produktů zakoupených na chorvatském trhu. Mykotoxiny byly nalezeny v 64,44 % všech vzorků, přičemž dominantní byl právě OTA. Podobnou studii dělal i Pleadin a kol. (2015), kde zakoupili 410 vzorků masných výrobků. Vzorky fermentovaných párků měly koncentraci OTA v rozmezí 0,95-5,10 $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ a vzorky vařených párků 1,12-3,13 $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$.

Altafini a kol. (2018) testovali 172 salámů nakoupených ve čtyřech italských provinciích. Zjistili, že 22 vzorků bylo pozitivních na OTA, přičemž 3 z těchto pozitivních vzorků překročily 1 $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$, což je mez pro obsah OTA v masných výrobcích stanovená italským ministerstvem zdravotnictví.

Na čínském trhu provedli výzkum OTA v klobásách Zhao a kol. (2015), kteří zjistili, že v 10 % vzorků byl nalezen OTA v koncentraci do 0,5 $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$.

Rodrigues a kol. (2019) provedli výzkum v Portugalsku, kde v 40 % vzorků čerstvého vepřového masa byl detekován OTA, ale pod hranici kvantifikace (0,9 $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$). Naopak čím déle se nechaly vzorky dozrát, tím více OTA bylo nalezeno. Byl nalezen ve 29 % všech vzorků vepřového, z nichž 21 % bylo kontaminováno nad 1 $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$.

Pietruszka a kol. (2017) ve své studii zkoumali 430 vzorků tkání, přičemž 101 z nich bylo kontaminováno OTA. Z těchto 101 pozitivních vzorků jich 7 překročilo mez stanovenou v Polsku na 5 $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$.

Pokud by bylo aplikováno italské omezení pro OTA na naše pozitivní vzorky, tak by všechny vzorky překročily tuto stanovenou mez. Poslední vzorek by ji překročil dokonce desetinásobně.

Závěr

Jelita a případně i jiné masné výrobky mohou představovat poměrně významný zdroj expozice OTA. Jsou to potraviny, které se v některých oblastech jí téměř denně.

V jelitech i jiných masných výrobcích není maso jediným zdrojem. Dalším zdrojem OTA v nich může být i koření, případně kroupy, které pocházejí z obilovin. Produkty jsou často dovážené i z jiných států, ve kterých mohou platit jiné povolené hodnoty a je důležité kontrolovat jejich kvalitu, ale samozřejmě i kvalitu domácích produktů. Tato kontrola je částečně znemožněna právě chybějící legislativou, jak národní, tak evropskou. Dále by byla vhodná kontrola uskladnění výrobků i krmiv, která jsou určena prasatům a jiným zvířatům, jelikož špatným skladováním můžou vyrůst na krmivu toxigenní plísně a ty se následně pozřením dostanou do masa, krve a orgánů zvířat, čímž se po porážce a zpracování mohou dostat až ke spotřebitelům, což může v nejhorších případech vyvolat mykotoxikózy.

Bylo analyzováno 100 vzorků jelit pomocí imunochemické metody ELISA. V některých z těchto vzorků byly zjištěny pozitivní koncentrace OTA. Z tohoto důvodu je důležité se zabývat obsahem OTA v těchto potravinách a to modernějšími a citlivějšími metodami než je ELISA. Vzhledem k toxickým účinkům OTA a jeho řazení do kategorie 2B: potenciální karcinogen by bylo vhodné zavést alespoň národní omezení obsahu OTA v těchto výrobcích.

Seznam použité literatury:

- 1) ABRUNHOSA, L., R. PATERSON a A. VENÂNCIO. *Biodegradation of Ochratoxin A for Food and Feed Decontamination*. *Toxins* [online]. 2010, **2**(5), 1078-1099 [cit. 2023-05-01]. ISSN 2072-6651. Dostupné z: doi:10.3390/toxins2051078
- 2) ALTAFINI, A., G. FEDRIZZI a P. RONCADA. *Occurrence of ochratoxin A in typical salami produced in different regions of Italy*. *Mycotoxin Research* [online]. 2019, **35**(2), 141-148 [cit. 2023-05-01]. ISSN 0178-7888. Dostupné z: doi:10.1007/s12550-018-0338-x
- 3) BARIA. *Metoda ELISA - aspekty jednotlivých uspořádání*. In: *Baria* [online]. Praha, 2019 [cit. 2023-05-01]. Dostupné z: <https://www.baria.cz/rsc6186731-metoda-elisa-aspekty-jednotlivych-usporadani>
- 4) COMMISSION REGULATION (EU) 2022/1370: *amending Regulation (EC) No 1881/2006 as regards maximum levels of ochratoxin A in certain foodstuffs*. In: Brusel, Belgie: EUR-Lex, 2022, ročník 64, L 206/11 [cit. 2023-05-01].
- 5) FAO 1999: *Joint FAO/WHO Food standards programme: codex committee on food additives and contaminants. Thirty-first session*. The Hague, the Netherlands [cit. 2023-05-01].
- 6) FAVILLA, M., M. PASCALE, A. RICELLI, A. EVIDENTE, C. AMALFITANO a C. ALTOMARE. *Inhibition of Species of the Aspergillus Section Nigri and Ochratoxin A Production in Grapes by Fusapyrone*. *Applied and Environmental Microbiology* [online]. 2008, **74**(7), 2248-2253 [cit. 2023-05-01]. ISSN 0099-2240. Dostupné z: doi:10.1128/AEM.01998-07
- 7) GÓMEZ, S., F. J. FERNÁNDEZ a M. C. VEGA. *Heterologous Expression of Proteins in Aspergillus. New and Future Developments in Microbial Biotechnology and Bioengineering* [online]. Elsevier, 2016, 2016, 55-68 [cit. 2023-05-01]. ISBN 9780444635051. Dostupné z: doi:10.1016/B978-0-444-63505-1.00004-X
- 8) HABUŠTOVÁ, O. *Optimalizace metodiky ELISA pro stanovení obsahu Cry3Bb1 toxinu v různých částech kukuřice pomocí komerčního kitu: uplatněná metodika*. České Budějovice: Biologické centrum AV ČR, Entomologický ústav, 2011 [cit. 2023-05-01]. ISBN 978-80-86668-11-6.
- 9) IARC 1993: *IARC Monographs on the evaluation on of carcinogenic risk to humans: Volume 56 Some naturally occurring substances: Food items and constituents, heterocyclic aromatic amines and mycotoxins*. Lyon, France [cit. 2023-05-01]. ISBN 92-832-1256-8.
- 10) IARC 1999: *IARC Monographs on the evaluation of carcinogenic risk to humans: Volume 71 Re-evaluation of some organic chemicals, hydrazine and hydrogen peroxide*. Lyon, France [cit. 2023-05-01]. ISBN 92-832-1271-1.

- 11) JECFA 2008: *Ochratoxin A (addendum)*. In *Safety evaluation of certain food additives and contaminants. Prepared by the 68th meeting of the joint FAO/WHO expert committee on food additives*, June 19-28, 2007, Geneva, Switz. *WHO food additive series*, Vol. 59, 169-180, 357-429, 454 [cit. 2023-05-01].
- 12) KARLOVSKY, P., M. SUMAN, F. BERTHILLER, et al. *Impact of food processing and detoxification treatments on mycotoxin contamination*. *Mycotoxin Research* [online]. 2016, **32**(4), 179-205 [cit. 2023-05-01]. ISSN 0178-7888. Dostupné z: doi:10.1007/s12550-016-0257-7
- 13) KOTINSKÝ, P. Dekontaminace. In: *BOZP info* [online]. Praha, 2003, 06. 01. 2003 [cit. 2023-05-04]. Dostupné z: <https://www.bozpinfo.cz/dekontaminace>
- 14) MAGAN, N. a D. ALDRED. *Conditions of formation of ochratoxin A in drying, transport and in different commodities* [online]. 2006, **22**(sup1), 10-16 [cit. 2023-05-01]. ISSN 0265-203X. Dostupné z: doi:10.1080/02652030500412154
- 15) MALÍŘ F. & OSTRÝ V. (Eds.) 2003: *Vláknité mikromycety (plísňe), mykotoxiny a zdraví člověka*. Národní centrum ošetrovatelství a nelékařských zdravotních oborů, Brno 2003 [cit. 2023-05-01].
- 16) MARKOV, K., J. PLEADIN, M. BEVARDI, N. VAHČIĆ, D. SOKOLIĆ-MIHALAK a J. FRECE. *Natural occurrence of aflatoxin B1, ochratoxin A and citrinin in Croatian fermented meat products*. *Food Control* [online]. 2013, **34**(2), 312-317 [cit. 2023-05-01]. ISSN 09567135. Dostupné z: doi:10.1016/j.foodcont.2013.05.002
- 17) MARROQUÍN-CARDONA, A. G., N. M. JOHNSON, T. D. PHILLIPS a A. W. HAYES. *Mycotoxins in a changing global environment – A review*. *Food and Chemical Toxicology* [online]. 2014, **69**, 220-230 [cit. 2023-05-01]. ISSN 02786915. Dostupné z: doi:10.1016/j.fct.2014.04.025
- 18) OJURI, O. T., C. N. EZEKIEL, M. SULYOK, et al. *Assessing the mycotoxicological risk from consumption of complementary foods by infants and young children in Nigeria*. *Food and Chemical Toxicology* [online]. 2018, **121**, 37-50 [cit. 2023-05-01]. ISSN 02786915. Dostupné z: doi:10.1016/j.fct.2018.08.025
- 19) *Opinion of the Scientific Panel on contaminants in the food chain [CONTAM] related to ochratoxin A in food*. *EFSA Journal* [online]. 2006, **4**(6) [cit. 2023-05-01]. ISSN 18314732. Dostupné z: doi:10.2903/j.efsa.2006.365
- 20) Ostrý V., Šmoldas J., Řeháková J., Ruprich J. *Metodický návod pro dekontaminaci vybraných mykotoxinů v laboratořích*. *Acta Hyg Epidemiol Microbiol*. 2021;(5):1-45 [cit. 2023-05-01].
- 21) OSTRY, V., F. MALIR, J. TOMAN a Y. GROSSE. *Mycotoxins as human carcinogens—the IARC Monographs classification*. *Mycotoxin Research* [online]. 2017, **33**(1), 65-73 [cit. 2023-05-01]. ISSN 0178-7888. Dostupné z: doi:10.1007/s12550-016-0265-7
- 22) PFOHL-LESZKOWICZ A. 2009: *Ochratoxin A and aristolochic acid involvement in nephropathies and associated urothelial tract tumours*. *Arhiv za higijenu rada i toksikologiju*, 60(4), 465-482 [cit. 2023-05-01].

- 23) PFOHL-LESZKOWICZ, A., & MANDERVILLE, R. A., 2007: *Ochratoxin A: an overview on toxicity and carcinogenicity in animals and humans. Molecular Nutrition & Food Research*, 51, 61–99 [cit. 2023-05-01].
- 24) PICKOVA, D., V. OSTRY, J. MALIR, J. TOMAN a F. MALIR. *A Review on Mycotoxins and Microfungi in Spices in the Light of the Last Five Years. Toxins* [online]. 2020, **12**(12) [cit. 2023-05-01]. ISSN 2072-6651. Dostupné z: doi:10.3390/toxins12120789
- 25) PIETRUSZKA, K., M. PIĄTKOWSKA a P. JEDZINIAK. *Occurrence of ochratoxin A in animal tissues and feeds in Poland in 2014–2016. Journal of Veterinary Research* [online]. 2017, **61**(4), 483-487 [cit. 2023-05-01]. ISSN 2450-8608. Dostupné z: doi:10.1515/jvetres-2017-0071
- 26) PLEADIN, J., M. M. STAVAR, N. VAHČIĆ, D. KOVAČEVIĆ, S. MILONE, L. SAFTIĆ a G. SCORTICHINI. *Survey of aflatoxin B 1 and ochratoxin A occurrence in traditional meat products coming from Croatian households and markets. Food Control* [online]. 2015, **52**, 71-77 [cit. 2023-05-01]. ISSN 09567135. Dostupné z: doi:10.1016/j.foodcont.2014.12.027
- 27) PLEADIN, J., T. LEŠIĆ, D. MILIĆEVIĆ, K. MARKOV, B. ŠARKANJ, N. VAHČIĆ, I. KMETIČ a M. ZADRAVEC. *Pathways of Mycotoxin Occurrence in Meat Products: A Review. Processes* [online]. 2021, **9**(12) [cit. 2023-05-01]. ISSN 2227-9717. Dostupné z: doi:10.3390/pr9122122
- 28) RIDASCREEN Ochratoxin A 30/15. *Enzyme immunoassay for the quantitative analysis of ochratoxin A*. Darmstadt. R. Biopharm AG, 2018. 20 s. [cit. 2023-05-01].
- 29) RODRIGUES, A. G. *Secondary Metabolism and Antimicrobial Metabolites of Aspergillus. In: New and Future Developments in Microbial Biotechnology and Bioengineering* [online]. Elsevier, 2016, 2016, s. 81-93 [cit. 2023-05-01]. ISBN 9780444635051. Dostupné z: doi:10.1016/B978-0-444-63505-1.00006-3
- 30) RODRIGUES, P., D. SILVA, P. COSTA, L. ABRUNHOSA, A. VENÂNCIO a A. TEIXEIRA. *Mycobiota and mycotoxins in Portuguese pork, goat and sheep dry-cured hams. Mycotoxin Research* [online]. 2019, **35**(4), 405-412 [cit. 2023-05-01]. ISSN 0178-7888. Dostupné z: doi:10.1007/s12550-019-00374-8
- 31) SELVARAJ, J. N., Y. WANG, L. ZHOU, Y. ZHAO, F. XING, X. DAI a Y. LIU. *Recent mycotoxin survey data and advanced mycotoxin detection techniques reported from China: a review* [online]. 2014, **32**(4), 440-452 [cit. 2023-05-01]. ISSN 1944-0049. Dostupné z: doi:10.1080/19440049.2015.1010185
- 32) SCHRENK, D., L. BODIN, J. K. CHIPMAN, et al. *Risk assessment of ochratoxin A in food. EFSA Journal* [online]. 2020, **18**(5) [cit. 2023-05-01]. ISSN 18314732. Dostupné z: doi:10.2903/j.efsa.2020.6113

33) TANGNI, E. K., J. MASQUELIER a E. VAN HOECK. *Determination of ochratoxin A in edible pork offal: intra-laboratory validation study and estimation of the daily intake via kidney consumption in Belgium*. *Mycotoxin Research* [online]. 2021, **37**(1), 79-87 [cit. 2023-05-01]. ISSN 0178-7888. Dostupné z: doi:10.1007/s12550-020-00415-7

34) ZHAO, Z., N. LIU, L. YANG, et al. *Multi-mycotoxin analysis of animal feed and animal-derived food using LC-MS/MS system with timed and highly selective reaction monitoring*. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* [online]. 2015, **407**(24), 7359-7368 [cit. 2023-05-01]. ISSN 1618-2642. Dostupné z: doi:10.1007/s00216-015-8898-5