

VÝSKYT OCHRATOXINU A V ČESKÝCH REGIONECH

¹Helena ŠULTESOVÁ, ¹Miroslav BRNDIAR, ¹Jaroslav KAČEROVSKÝ, ²František MALÍŘ, ³Jiří KNÍŽEK, ¹Ladislav JEBAVÝ,
¹Jan M. HORÁČEK

¹Univerzita obrany, katedra válečného vnitřního lékařství Fakulty vojenského zdravotnictví, Hradec Králové

²Oddělení xenobiochemie Zdravotního ústavu, Hradec Králové

³Univerzita Karlova, Ústav lékařské biofyziky Lékařské fakulty v Hradci Králové

Souhrn

Katedra válečného vnitřního lékařství Fakulty vojenského zdravotnictví Univerzity obrany pracuje již několik let ve spolupráci se Zdravotním ústavem v Hradci Králové na zkoumání ochratoxinu A (OTA). OTA patří mezi mykotoxiny a je produkován plísněmi rodu *Aspergillus* a *Penicillium*. Vyskytuje se v běžně konzumovaných potravinách a jeho přítomnost byla prokázána v séru zcela zdravých osob. K experimentálně prokázaným nežádoucím účinkům OTA na organismus patří nefrotoxicita, genotoxicita, teratogenita, imunosupresivní účinky a také možnost akutní intoxikace.

V práci byl sledován vývoj hladiny OTA v séru zdravých dárců krve v České republice v průběhu několika let. Nalezené hodnoty byly porovnány s hodnotami v jiných zemích. Bylo konstatováno, že hladina OTA má v ČR od roku 1994 vzestupnou tendenci, přičemž bavorský region již v polovině 80. let minulého století dosahoval osmkrát vyšší hodnoty OTA než Česká republika v polovině 90. let. Tyto skutečnosti jsou pravděpodobně důsledkem globalizace potravinového řetězce. Při porovnání hladin OTA ve dvou českých regionech (Praha a Ústí nad Labem) byla zjištěna vyšší koncentrace OTA v Severočeském regionu, pravděpodobně v důsledku odlišných stravovacích návyků a ekonomické síly obyvatelstva. Byl zjištěn vzestup hladiny OTA se stoupajícím věkem (retenční mechanismus při poklesu glomerulární filtrace). Závislost sérové koncentrace OTA na množství tělesného tuku je málo významná.

Klíčová slova: Mykotoxiny; Ochratoxin A; Sérové koncentrace OTA v populaci; OTA a BMI; OTA a pohlaví; OTA a věk; OTA v regionech ČR.

Incidence of Ochratoxin A in Czech Regions

Summary

The Department of Military Internal Medicine of the Faculty of Military Health Sciences University of Defence has been working on the research of ochratoxin A (OTA) in cooperation with the Health Institute in Hradec Kralove for several years. OTA belongs to mycotoxins and is produced by *Aspergillus* and *Penicillium* fungi. It occurs in common food; its presence has been proved in the serum of healthy people. Among experimentally proved undesirable effects of OTA on the organism belong: nephrotoxicity, genotoxicity, teratogenicity, immunosuppressive effects and also possible acute intoxication.

The study involves the development of OTA level in the serum of healthy blood donors in the Czech Republic within several years. The values have been compared with those in other countries: since 1994, OTA level has an upward trend in the Czech Republic whereas the Bavarian region in the mid-eighties of the 20th century reached eight times higher OTA values than the Czech Republic in the mid-nineties. These facts are probably consequences of the food chain globalization. While comparing OTA levels in two Czech regions (Prague and Usti nad Labem), a higher OTA concentration has been found in the North Bohemian region, probably due to different eating habits and economic power of the population. OTA level was rising with higher age (retentive mechanism with decreasing glomerular filtration). The dependence of serum OTA concentration on the amount of body fat is not very significant.

Key words: Mycotoxins; Ochratoxin A; Serum OTA concentrations in population; OTA and BMI; OTA and sex; OTA and age; OTA in Czech regions.

Úvod

Ochratoxin A byl poprvé izolován jihoafrickými badateli v roce 1965 během laboratorního scree-

ningu toxinogenních mikromycet. Jako přirozeně se vyskytující kontaminant kukuřice byl OTA poprvé nalezen v USA, a to až v roce 1969. Při jeho produkci se uplatňují především dva rody plísní:

Aspergillus (A. ochraceus) v tropických a subtropických oblastech a rod *Penicillium (P. viridicatum)* v oblastech chladnějších. OTA se vyskytuje v řadě komodit rostlinného i živočišného původu (tabulka 1). Dalšími zdroji mohou být např. rozinky, fíky, lékořice, grepová šťáva, červené a růžové víno nebo vinný ocet (13).

Tabulka 1

Možné zdroje OTA v potravinách

Cereálie	mouka, kroupy
Živočišné zdroje	vepřové maso, játra, slezina, ledviny, krev
Ostatní	káva, pivo, koření, luštěniny

Příjem OTA probíhá tedy alimentární cestou. Zpracováván je dále v játrech a je vylučován ledvinami. Detekovatelný je v krevním séru a v některých případech také v moči, a to i u zdravých osob. Přípustná koncentrace v séru ještě není definitivně stanovena. Na základě empiricky získaných hodnot jsou tolerovány hladiny do 14,4 µg/l. Je však zřejmé, že čím nižší bude hladina OTA v krvi, tím menší jsou zdravotní rizika způsobená ochratoxikózou. V tabulce 2 je uveden přehled hlavních nežádoucích účinků OTA bezpečně prokázaných na podkladě experimentálních poznatků (4, 6, 7).

Tabulka 2

Přehled hlavních nežádoucích účinků OTA

	Citace
Nefrotoxicita	1, 6, 10
Genotoxicita	2, 9
Teratogenita	5, 14
Imunosupresivní účinky	11, 12
Potenciální kancerogenita	16
Neurotoxicita	2, 9
Možnost akutní intoxikace	3, 17

Hygienický limit OTA pro potraviny, který platí v celé EU, je 3 µg/kg (1).

Cíle práce

V práci jsou porovnány průměrné koncentrace OTA v séru zdravé populace České republiky v letech 1994 (n = 680), 1998 (n = 1758) a 2006 (n = 1434). Srovnávané skupiny představují dárce krve z různých regionů.

Vzájemně porovnány byly také průměrné koncentrace OTA v séru obyvatel ČR se zahraničím. Srovnávanými oblastmi byly Bavorsko, jako blízký region na západ od ČR, a vzdálené Alžírsko a Tunisko s jinými než středoevropskými potravinovými zvyklostmi.

Dále byly porovnány průměrné hodnoty hladin OTA ve dvou českých regionech, Praze a Ústí nad Labem. Byla sledována závislost hladin OTA na Body Mass Indexu (BMI), věku a pohlaví.

Metodika stanovení OTA

Pro stanovení OTA byla použita metoda vysokoučinné kapalinové chromatografie (HPLC) s fluorescenční detekcí po předchozí extrakci OTA z 5 ml séra založené na dělicím koeficientu OTA ve vodných (roztok chloridu hořečnatého a kyseliny chlorovodíkové, roztok 0,1 mol/l hydrogenuhličitanu sodného) a organických rozpouštědlech (chloroform) ve vztahu k hodnotě pH (cca 2,5). Po odpaření chloroformu ve vodní lázni byl odparek rozpuštěn v metanolu a napipetován do Eppendorfových špiček.

Jeden díl byl použit pro přímou analýzu OTA, druhý díl k potvrzení OTA, např. po jeho rozkladu enzymem karboxypeptidázou (za vzniku ochratoxinu α a fenylalaninu), třetí díl byl zálohován pro případnou kontrolu. Dobře uzavřené a popsané špičky byly uloženy v chladničce do doby vlastní analýzy. (Při tomto způsobu uložení a uzavření jsou stabilní asi 1 rok). Pro stanovení OTA na HPLC byla použita mobilní fáze: metanol:acetonitril:0,05 mol/l octan sodný:kyselina octová. Rychlost průtoku mobilní fáze byla 1,5 ml/min. Parametry fluorescenčního detektoru: vlnová délka – excitace 340 nm, emise 465 nm. Při těchto podmínkách byl eluční čas OTA delší než 7 minut. Současně se vzorky byly vždy analyzovány standardy OTA 0,4 µg/l, 4 µg/l metanolu, slepý vzorek a podle možnosti i vzorky sér uměle spikované OTA.

Pro zjištění koncentrace OTA (µg/l) byla použita metoda vnějšího standardu, kdy se reálná koncentrace OTA ve vzorku vypočte ze součinu koncen-

trance standardu a poměru ploch vzorku/standardu. Jedná se o metodu srovnatelnou s metodami používanými celosvětově, s detekčním limitem (což představuje současně i mez stanovitelnosti) 0,1 µg OTA/l séra.

Výsledky

Porovnáním průměrných koncentrací OTA v krvi zdravé populace ČR v letech 1994, 1998 a 2004 byl zaznamenán nárůst průměrné sérové koncentrace OTA (tab. 3).

V tabulce 4 jsou porovnané hladiny OTA mezi ČR, Bavorskem, Alžírskem a Tuniskem. Hladina v Bavorsku z roku 1985 je 8krát vyšší než hladina u nás měřená o 10 let později. Hodnoty OTA ze zemí severní Afriky jsou pak jen o 2 roky mladší než v České republice, ale jsou 14krát (Alžírsko) a 17krát (Tunisko) vyšší než u nás.

Při porovnání hladin OTA v České republice (rok 2004) ve vybraných regionech a mezi oběma pohlavími byly zjištěny vyšší sérové hladiny OTA u žen (0,257 µg/l) oproti mužům (0,216 µg/l), ale pouze v regionu hlavního města Prahy. V Ústí nad Labem měly obě sledované skupiny hladiny shodné (0,266 µg/l) a zároveň obě průměrně vyšší než v Praze (tab. 5).

Při zkoumání vztahu hladiny OTA k věku u dárců krve v ČR bylo patrné, že koncentrace OTA má s rostoucím věkem stoupající tendenci. Mezi zdravými dárči krve do 25 let je průměrná sérová hladina 0,232 µg/l, u osob mezi 26. a 40. rokem je 0,266 µg/l a po 41. roce roste až na hodnotu 0,288 µg/l.

V grafech 1 a 2 je uveden vztah mezi sérovou hladinou OTA a BMI. Korelační koeficient dosáhl hodnoty 0,114 v Praze a 0,16 v Ústí nad Labem, což ukazuje na slabou vzájemnou závislost. Hodnoty přesto nejsou rozvrženy zcela nahodile.

Výsledky byly zpracovány programem NCSS 2004 and PASS 2002.

Diskuse

Globalizací potravinového řetězce a otevřením se české ekonomiky světu dochází i u nás k výskytu onemocnění v minulosti prakticky neznámých. V potravinách zpracovávaných a skladovaných v podmínkách vhodných pro růst a rozmnožování plísní

Tabulka 3

Průměrné koncentrace OTA v České republice

Rok	Počet sledovaných osob	Průměrná hladina OTA (µg/l)
1994	680	0,2
1998	1758	0,252
2004	1434	0,311

Tabulka 4

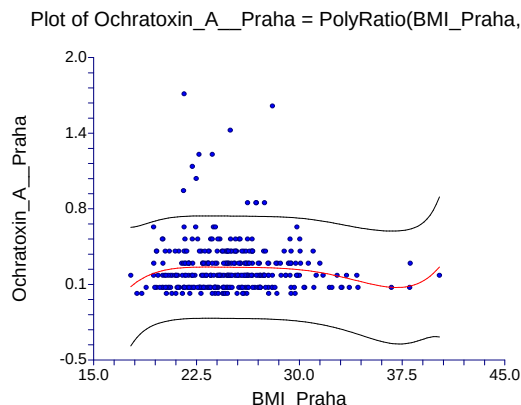
Hladiny OTA v některých oblastech

Země	Rok	Počet osob	Hladina OTA (µg/l)
ČR	1994	680	0,2
Bavorsko	1984	84	1,3
Alžírsko	1992	346	2,8
Tunisko	1992	442	3,5

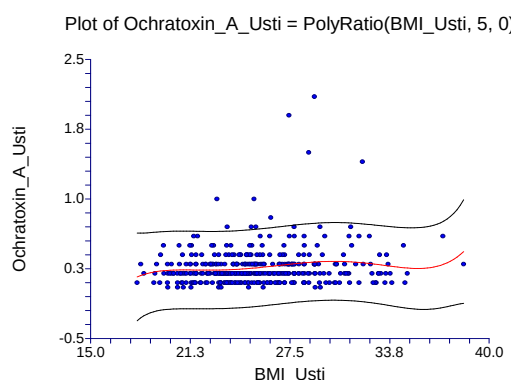
Tabulka 5

Koncentrace OTA v regionech Praha a Ústí nad Labem

Pohlaví	Region	Počet osob	Hodnota OTA (µg/l)
muži	Praha	240	0,216
	Ústí	291	0,266
	<i>celkem</i>	<i>531</i>	<i>0,241</i>
ženy	Praha	110	0,257
	Ústí	101	0,266
	<i>celkem</i>	<i>211</i>	<i>0,262</i>
<i>celkem</i>		742	0,262



Graf 1: Závislosti hladiny OTA ($\mu\text{g/l}$) na BMI pro Prahu



Graf 2: Závislosti hladiny OTA ($\mu\text{g/l}$) na BMI pro Ústí nad Labem

(subtropické a tropické oblasti) a následně distribuovaných k nám, se ve zvýšené míře tyto mikroorganismy objevují buď samotné, nebo jejich toxiny. Jedním z nich je i OTA, s velkým možným počtem nežádoucích účinků na lidský organismus (tab. 2). Některé práce potvrzují, že se OTA chová jako kumulativní jed s rychlou absorpcí a pomalým vylučováním, jehož poločas je u člověka asi 35 dní. Hlavními místy jeho zachytu jsou játra, ledviny, varlata a střevo (rychlá kinetika), rezervu tvoří tuková tkáň a svaly. V krvi je velmi silně vázán na albumin a na makromolekulu o relativní molekulární hmotnosti asi 20 000 (7, 8, 15).

V této práci bylo prokázáno, že reprezentativní vzorek naší populace (1750 osob) má určitou hladinu OTA v séru, tzn. že konzumuje potraviny kontaminované tímto toxinem. Jednalo se o osoby zdravé, u nichž nebylo zjištěno žádné onemocnění (zdraví dárce krve). Výsledky studie dále prokázaly, že hladina OTA má u nás od roku 1994 vzestupnou tendenci. Skutečnost, že bavorský region již v polovině

80. let 20. století dosahoval průměrné koncentrace OTA 8krát vyšší než Česká republika v polovině 90. let by mohl být důkazem zařazení ČR do globálního potravinového řetězce.

Vysvětlení výrazně vyšších hladin OTA v severní Africe oproti Evropě pak lze hledat v lepších klimatických podmínkách pro růst plísní, zejména rodu *Aspergillus*.

Zvýšenou průměrnou koncentraci u mužů i u žen v regionu Ústí nad Labem (0,266 $\mu\text{g/l}$) oproti Praze (0,236 $\mu\text{g/l}$) je možné vysvětlit zvýšeným přísunem OTA potravou. Příčinou mohou být odlišné stravovací návyky v obou regionech, nezanedbatelnou příčinou je také rozdílná ekonomická síla obyvatelstva. Stejně hladiny OTA u mužů i žen v regionu Ústí nad Labem ukazují na příjem stejně kvalitních potravin u obou pohlaví. Pražské ženy mají vyšší hladinu OTA než muži, což může být důsledek konzumace „zdravějších“ potravin z dovozu v rámci dietních režimů propagovaných sdělovacími prostředky.

Rozdílnost hladin OTA v závislosti na věku lze vysvětlit poklesem glomerulární filtrace ledvin a tím postupné retence OTA se stoupajícím věkem. Také zde hrají roli rozdílné stravovací návyky v různých věkových skupinách.

Sérové koncentrace OTA stoupají málo významně v závislosti na vzestupu BMI v obou sledovaných regionech. Množství tukové tkáně není tedy určujícím faktorem hladiny OTA v séru. Tento je spíše deponován v periferním kompartmentu (tuková tkáň).

Závěry

1. Zjištěno promoření naší populace OTA.
2. Koncentrace OTA v séru u nás má od r. 1994 stoupající tendenci (otevírání se našeho trhu).
3. Populace v sousedním regionu Bavorsko měla podle literárních údajů 8krát vyšší sérovou koncentraci OTA již 10 let před prvními měřeními v České republice (otevřený německý trh).
4. Zjištěna zvýšená koncentrace OTA v regionu Ústí nad Labem oproti Praze závisí pravděpodobně na jiné skladbě potravin.
5. Pozorovány rozdílné hladiny OTA u mužů (0,216 $\mu\text{g/l}$) a u žen (0,257 $\mu\text{g/l}$) v Praze. Pravděpodobně závisí na příjmu odlišných potravin.
6. Zjištěno zvýšení hladiny OTA v závislosti na věku (zánik nefronů) a také na odlišných stravo-

vacích návycích v jednotlivých věkových skupinách.

7. Zjištěna malá významnost závislosti sérové koncentrace OTA na BMI, protože OTA je depnován hlavně v tukové tkáni.
8. Studium koncentrací OTA u zdravých osob je základním předpokladem ke studiu koncentrací OTA u celé řady chorob. Z teoretického hlediska se v současné době nabízí podrobnější studium hladin OTA u některých ledvinových či jaterních chorob, zvláště v souvislosti s nádorovým poškozením těchto orgánů.

Literatura

1. BAHNEMANN, E., et al. Renal transepithelial secretion of ochratoxin A in the non-filtering toad kidney. *Toxicology*, 1997, vol. 120, no. 1, p. 11–17.
2. BAUDRIMONT, I. Variation de la néphrotoxicité de l'ochratoxine A sous l'effet de facteurs métaboliques et non métaboliques. (These pour le Doctorat, No. 2). Bordeaux, Université II. 25. 10. 1995, p. 3–205.
3. BREITHOLTZ-EMANUELSSON A., et al. Ochratoxin A in human serum samples collected in southern Italy from healthy individuals and individuals suffering from different kidney disorders. *Nat. Toxins*, 1994, vol. 2, no. 6, p. 366–370.
4. BRNDIAR, M. – KAČEROVSKÝ, J. – MALÍŘ, F. – VOSEČKOVÁ, A. – JEBAVÝ, L. Mykotoxiny jako bojové biologické látky. *Voj. zdrav. Listy*, 2003, roč. 72, č. 5, s. 203–207.
5. BROWN, MH. – SZCZECK, GM. – PURMALIS, BP. Teratogenic and toxic effects of ochratoxin A in ratp. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 1976, vol. 37, p. 31–38.
6. GEKLE, M. – SILBERNAGL, P. Mechanism of ochratoxin A-induced reduction of glomerular filtration rate in ratp. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 1993, vol. 267, no. 1, p. 316–321.
7. HOOD, RD. – NAUGHTON, MJ. – HAYES, AW. Teratogenic effects of ochratoxin A in hamsterp. *Teratology*, 1975, vol. 11, p. 23A. (Abstract).
8. HOOD, RD. – NAUGHTON, MJ. – HAYES, AW. Prenatal effects of ochratoxin A in hamsterp. *Teratology*, 1976, vol. 13, p. 11–14.
9. IARC MONOGRAPHS on the Evaluation of Carcinogenic Risks of Chemical to Humans: Some naturally occurring substances: some food items and constituents, heterocyclic aromatic amines and mycotoxins. Lyon, IARC Scientific Publications, 1993, vol. 56, p. 489–521.
10. KROGH, P. Mycotoxic porcine nephropathy: a possible model for Balkan endemic nephropathy. In PULCHEV, A., et al. (eds.). *Endemic nephropathy*. Sofia, Bulgarian Academy of Science, 1972, p. 266–270.
11. LEA, T. – STEIEN, K. – STORMER, C. Mechanisms of ochratoxin A induced immunosuppression. *Mycopathologia*, 1989, vol. 107, p. 153–159.
12. LUSTER, MI., et al. Selective immunosuppressions in mice of natural killer cell activity by ochratoxin A. *Cancer Res.*, 1987, vol. 47, p. 2259–2263.
13. MALÍŘ, F. Ochratoxiny: mykotoxiny s významnými toxikologickými vlastnostmi. (Habitační práce). VLA JEP, Hradec Králové, 2004.
14. MAYURA, K., et al. Embryocidal, fetotoxic and teratogenic effects of ochratoxin A in ratp. *Toxicology*, 1982, vol. 25, p. 175–185.
15. PFOHL-LESKOWICZ, A., et al. Les mycotoxines dans l'alimentation: évaluation et gestion du risque. Londres, New York, Lavoisier, Tec-Doc, 1999.
16. PFOHL-LESKOWICZ, A., et al. Ochratoxin A related DNA ductus in urinary tract tumours of Bulgarian subjectp. In *Postlabelling methods for detection of DNA adductp*. Lyon, IARC Scientific Publications, 1993, no. 124, p. 141–148.
17. SZCZECH, GM. – CARLTON, WW. – TUIE, J. Ochratoxicosis in beagle dogp. II. Pathology. *Vet. Pathol.*, 1973, vol. 10, p. 219.

Korespondence: MUDr. Helena Šultesová
Univerzita obrany
Fakulta vojenského zdravotnictví
Katedra válečného vnitřního lékařství
Třebešská 1575
500 01 Hradec Králové
Helisuli@seznam.cz

Do redakce došlo 20. 3. 2007