



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ  
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ  
ΤΜΗΜΑ ΙΑΤΡΙΚΗΣ



ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΟ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΣΠΟΥΔΩΝ  
«ΕΦΑΡΜΟΣΜΕΝΗ ΔΗΜΟΣΙΑ ΥΓΕΙΑ ΚΑΙ ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝΤΙΚΗ  
ΥΓΙΕΙΝΗ»

ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

**ΜΕΛΕΤΗ ΤΗΣ ΠΑΡΟΥΣΙΑΣ ΤΗΣ ΩΧΡΑΤΟΞΙΝΗΣ Α ΣΤΑ  
ΣΦΑΓΙΑ ΧΟΙΡΟΥ ΣΤΑ ΣΦΑΓΕΙΑ ΤΗΣ ΚΑΡΔΙΤΣΑΣ**

ΤΗΣ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗΣ ΦΟΙΤΗΤΡΙΑΣ

ΜΙΚΕΛΑ ΚΩΝΣΤΑΝΤΙΝΟΥ ΒΛΑΧΟΥ

ΑΠΟΦΟΙΤΟΣ ΚΤΗΝΙΑΤΡΙΚΗΣ ΣΧΟΛΗΣ, ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟΥ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ

ΛΑΡΙΣΑ ΣΕΠΤΕΜΒΡΙΟΣ 2017



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ  
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ  
ΤΜΗΜΑ ΙΑΤΡΙΚΗΣ



ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΟ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΣΠΟΥΔΩΝ  
«ΕΦΑΡΜΟΣΜΕΝΗ ΔΗΜΟΣΙΑ ΥΓΕΙΑ ΚΑΙ ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝΤΙΚΗ  
ΥΓΙΕΙΝΗ»

ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

**ΜΕΛΕΤΗ ΤΗΣ ΠΑΡΟΥΣΙΑΣ ΤΗΣ ΩΧΡΑΤΟΞΙΝΗΣ Α ΣΤΑ  
ΣΦΑΓΙΑ ΧΟΙΡΟΥ ΣΤΑ ΣΦΑΓΕΙΑ ΤΗΣ ΚΑΡΔΙΤΣΑΣ**

ΤΗΣ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗΣ ΦΟΙΤΗΤΡΙΑΣ

ΜΙΚΕΛΑ ΚΩΝΣΤΑΝΤΙΝΟΥ ΒΛΑΧΟΥ

ΑΠΟΦΟΙΤΟΣ ΚΤΗΝΙΑΤΡΙΚΗΣ ΣΧΟΛΗΣ, ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟΥ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ

ΛΑΡΙΣΑ ΣΕΠΤΕΜΒΡΙΟΣ 2017

# Τριμελής Επιτροπή

## Επιβλέπουσα Καθηγήτρια:

Πεξάρá Ανδρεάνα: *Επίκουρη καθηγήτρια, Υγιεινή Τροφίμων Ζωικής Προέλευσης, Τμήμα Κτηνιατρικής, Σχολή Επιστημών Υγείας, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας.*

## Μέλη Τριμελούς Επιτροπής:

Γκόβαρης Αλέξανδρος: *Καθηγητής, Υγιεινή Τροφίμων Ζωικής Προέλευσης, Τμήμα Κτηνιατρικής, Σχολή Επιστημών Υγείας, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας.*

Σολωμάκος Νικόλαος: *Επίκουρος καθηγητής, Υγιεινή Τροφίμων Ζωικής Προέλευσης, Τμήμα Κτηνιατρικής, Σχολή Επιστημών Υγείας, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας.*

## Περίληψη

Η Ωχρατοξίνη Α (ΩΤΑ) είναι μια μυκοτοξίνη που παράγεται κυρίως από τους μύκητες *Aspergillus ochraceus*, *Penicillium verrucosum* και *Penicillium nordicum*. Είναι η πιο σημαντική από τις ωχρατοξίνες αφού είναι η περισσότερο τοξική και εντοπίζεται συχνότερα σε σχέση με τις ωχρατοξίνες Β και C. Η ΩΤΑ ανιχνεύεται σε διάφορα τρόφιμα φυτικής κυρίως προέλευσης. Από τα τρόφιμα ζωικής προέλευσης ιδιαίτερο ενδιαφέρον παρουσιάζει το χοιρινό κρέας και τα προϊόντα του. Το χοιρινό κρέας μολύνεται κυρίως όταν τα ζώα από τα οποία προέρχεται, είχαν καταναλώσει ζωοτροφές μολυσμένες με ΩΤΑ. Οι χοίροι είναι ιδιαίτερα ευαίσθητοι στην πρόσληψη της ΩΤΑ με τις υψηλότερες συγκεντρώσεις να εντοπίζονται στο αίμα, στους νεφρούς, στο ήπαρ, στους μύες και στο λίπος.

Αρκετές έρευνες έχουν διεξαχθεί σε διάφορες χώρες για την παρουσία της ΩΤΑ στους εδώδιμους ιστούς των χοίρων και στα προϊόντα από χοιρινό κρέας. Από τα αποτελέσματα των ερευνών αυτών προκύπτει ότι το χοιρινό κρέας και τα προϊόντα του, ιδιαίτερα αυτά που περιέχουν αίμα και νεφρούς χοίρου, αποτελούν τη σημαντικότερη πηγή μόλυνσης του ανθρώπου από την τοξίνη.

Η πρόσληψη της ΩΤΑ με τα τρόφιμα έχει μεγάλη σημασία για τη Δημόσια Υγεία καθώς έχει ταξινομηθεί ως δυνητικά καρκινογόνος ουσία (κατηγορία 2B) για τον άνθρωπο το 1993. Πολλές έρευνες επίσης έχουν δείξει ότι έχει τερατογόνο, νευροτοξική, γενοτοξική, ανοσοκατασταλτική και νεφροτοξική δράση και θεωρείται ότι αποτελεί μια από τις αιτίες της Ενδημικής Νεφροπάθειας των Βαλκανίων στον άνθρωπο. Λόγω της σημασίας της ΩΤΑ για τη Δημόσια Υγεία, έχουν τεθεί μέγιστα επιτρεπτά επίπεδα για την ΩΤΑ σε διάφορα τρόφιμα φυτικής κυρίως προέλευσης. Ωστόσο μέχρι σήμερα δεν έχουν οριστεί επίσημα όρια για την παρουσία της ΩΤΑ στο χοιρινό κρέας και τα προϊόντα του στην Ευρωπαϊκή Ένωση.

Σκοπός της συγκεκριμένης μελέτης ήταν ο έλεγχος της παρουσίας ΩΤΑ σε σφάγια χοίρου που η διαδικασία σφαγής τους έγινε στα βιομηχανικά σφαγεία της περιφερειακής ενότητας Καρδίτσας. Για το σκοπό αυτό συλλέχθηκαν 40 δείγματα ήπατος και 40 δείγματα νεφρών χοίρων. Τα δείγματα αυτά εξετάστηκαν για την παρουσία ΩΤΑ και πραγματοποιήθηκε ο προσδιορισμός της συγκέντρωσής της με τη χρήση της ειδικής τυποποιημένης ανοσοενζυμικής μεθόδου RIDASCREEN OTA ELISA kit (R-Biopharm, Germany).

Η παρουσία της ΩΤΑ ανιχνεύθηκε σε 10 από τα 40 δείγματα ήπατος (25%) και 17 από τα 40 δείγματα νεφρούς (42,5%). Οι συγκεντρώσεις της τοξίνης που προσδιορίστηκαν στα θετικά δείγματα ήταν μεταξύ 1,75 και 6,18 μg/kg στα δείγματα ήπατος, και μεταξύ 1,5 και 2,48 μg/kg στα δείγματα νεφρών. Η μέση τιμή ήταν 4,04 μg/kg και 2,05 μg/kg στα δείγματα ήπατος και νεφρών, αντίστοιχα.

Λόγω της σημασίας της ΩΤΑ για τη Δημόσια υγεία, η παρουσία ΩΤΑ στο ήπαρ και στους νεφρούς στα σφάγια χοίρου που διαπιστώθηκε στην παρούσα μελέτη έχει ιδιαίτερη σημασία και απαιτείται περαιτέρω έρευνα για να διαπιστωθεί το επίπεδο της μόλυνσης του χοιρινού κρέατος στη χώρα μας.

Βλάχου Κ. Μικέλα, Σεπτέμβριος 2017

**Λέξεις- Κλειδιά:** ήπαρ, νεφρός, μυκοτοξίνες, οχρατοξίνη Α, σφάγια χοίρου

## **Abstract**

Ochratoxin A (OTA) is a mycotoxin produced mainly by the fungus *Aspergillus ochraceus*, *Penicillium verrucosum* and *Penicillium nordicum*. It is the most prevalent and most toxic in relation to ochratoxins B and C. OTA is usually found in a variety of plant products. Among foods of animal origin pork meat and pork-derived products are of particular interest. OTA can be mainly found in pork meat as a result of indirect transmission from pigs exposed to naturally contaminated feed. Pigs are particularly susceptible to the uptake of OTA and the higher concentrations are found in blood, kidney, liver, muscle and fat. Results from research works in various countries showed that pork products containing blood or pork kidney presented the highest risk of OTA contamination among other food products of animal origin.

The OTA food intake is of great importance for Public Health, since it shows nephrotoxic, teratogenic, immunotoxic, carcinogenic action and is implicated in the etiology of Balkan Endemic Nephropathy in humans. In 1993 OTA has been classified by IARC as a possible carcinogen to human (Group 2B). The European Union has not yet set limits of OTA in pork meat, pork meat products and generally in foods of animal origin, in contrast to these of limits in foods of plant origin.

The aim of this study was to determine the occurrence of OTA in pig carcasses from a slaughterhouse in the Regional Unity of Karditsa. For this purpose, 40 liver and 40 kidney samples were collected. The samples were tested for the presence of OTA and their concentrations were determined using the enzyme-linked immunoassay: Ridascreen® ochratoxin A kit (R-Biopharm AG, Germany).

The presence of OTA was detected in 10 of 40 liver samples (25%) and 17 of 40 kidney samples (42.5%). The mean value was 4.04 µg/kg and 2.05 µg/kg in the liver and kidney samples respectively. OTA concentrations determined in the positive samples ranged from 1.75 to 6.18 µg/kg in liver samples, and from 1.5 to 2.48 µg/kg in kidney samples.

Detection of OTA in the liver and kidney in the pig carcasses in this study is a public health concern and further research is needed to determine the level of OTA contamination in pork meat in Greece.

Vlachou K. Mikela, September 2017

**Keywords:** liver, kidney, mycotoxins, ochratoxin A, pig carcasses

# ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

Σελ.

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ.....	i
ΚΑΤΑΣΤΑΣΗ ΠΙΝΑΚΩΝ.....	ii
ΚΑΤΑΣΤΑΣΗ ΣΧΗΜΑΤΩΝ.....	ii
ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ.....	1
ΕΙΣΑΓΩΓΗ.....	2
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1.....	4
ΜΥΚΟΤΟΞΙΝΕΣ.....	4
1.1 Ιστορική Αναδρομή.....	4
1.2 Γενικά για τις μυκοτοξίνες.....	5
1.3 Οι κυριότερες μυκοτοξίνες.....	6
1.4 Χαρακτηριστικά των μυκοτοξινών.....	6
1.5 Παραγωγή μυκοτοξινών.....	8
1.5.1 Παραγωγή μυκοτοξινών στα φυτά.....	8
1.5.2 Παραγωγή μυκοτοξινών στις ζωοτροφές.....	9
1.6 Επίδραση των μυκοτοξινών στην υγεία των ζώων.....	11
1.7 Είδη μυκοτοξινών.....	14
1.7.1 Τριχοθεσίνες.....	14
1.7.2 Ζερεανόλη.....	14
1.7.3 Φουμονισίνες.....	15
1.7.4 Αλκαλοειδή.....	15

1.7.5 Αφλατοξίνες.....	16
1.7.6 Ωχρατοξίνες.....	22
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2.....	24
ΩΧΡΑΤΟΞΙΝΗ Α (ΩΤΑ).....	24
2.1 Παραγωγή της ΩΤΑ.....	24
2.2 Χημικές και Φυσικές ιδιότητες της ΩΤΑ.....	26
2.3 Μεταβολισμός και Τοξικοκινητική της ΩΤΑ.....	27
2.4 Τοξικότητα της ΩΤΑ.....	30
2.5 ΩΤΑ Βιοδείκτες.....	33
2.5.1 ΩΤΑ στο ανθρώπινο αίμα.....	34
2.5.2 ΩΤΑ στα ούρα.....	35
2.5.3 ΩΤΑ στο ανθρώπινο γάλα.....	38
2.5.4 ΩΤΑ σε ανθρώπινους νεφρούς.....	39
2.6 Ωχρατοξίνη Α στα τρόφιμα ζωικής προέλευσης.....	40
2.7 Παρουσία της ΩΤΑ στο χοιρινό κρέας και τα προϊόντα του.....	42
2.8 Συμμετοχή του χοιρινού κρέατος και των προϊόντων του στην πρόσληψη της ΩΤΑ από τον άνθρωπο.....	48
2.9 Κανονισμός ΩΤΑ στα τρόφιμα και τις ζωοτροφές.....	49
2.9.1 Ευρωπαϊκή Νομοθεσία.....	51
2.9.2 Παγκόσμια Νομοθεσία.....	52
2.10 Ανάλυση και προσδιορισμός μυκοτοξινών.....	53
2.11 Ανάλυση και Μέθοδοι προσδιορισμού συγκέντρωσης ΩΤΑ.....	55

ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ.....	59
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3.....	60
ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΛΟΓΙΑ.....	60
3.1 Συλλογή του δείγματος .....	60
3.2 Προετοιμασία του δείγματος.....	60
3.3 Εκτέλεση της δοκιμής ELISA.....	61
3.3.1 Προετοιμασία αντιδραστηρίων.....	61
3.3.2 Διαδικασία δοκιμής ELISA.....	62
3.3.3 Υπολογισμός συγκέντρωση ωχρατοξίνης Α.....	62
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4.....	64
ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΚΑΙ ΣΥΖΗΤΗΣΗ.....	64
ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ.....	68
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....	69



# ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά την επιβλέπουσα καθηγήτρια κυρία Ανδρέα Πεξάρá, Επίκουρη Καθηγήτρια του Τμήματος Κτηνιατρικής, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας για την ανάθεση του θέματος, την άψογη συνεργασία, τη διαρκή καθοδήγηση και την απεριόριστη βοήθεια της, τόσο κατά τη διεξαγωγή του πειραματικού μέρους όσο και κατά τη συγγραφή της εργασίας. Οι συμβουλές της και η επιστημονική της κατάρτιση συνέβαλαν καθοριστικά στη διεκπεραίωση της διατριβής.

Ιδιαίτερες ευχαριστίες θα ήθελα να απευθύνω και στον κύριο Αλέξανδρο Γκόβαρη, Καθηγητή του Τμήματος Κτηνιατρικής, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας καθώς και στον κύριο Νικόλαο Σολωμάκο, Επίκουρο Καθηγητή του Τμήματος Κτηνιατρικής, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας για την άψογη συνεργασία, τις εύστοχες παρατηρήσεις και τις συμβουλές που μου παρείχαν.

Ευχαριστίες επίσης οφείλω στον κύριο Αθανάσιο Κουκούλη, Κτηνίατρο και Επιστημονικό Υπεύθυνο των Βιομηχανικών Σφαγείων Καρδίτσας για την πολύτιμη βοήθεια του στη συλλογή των δειγμάτων.

Τέλος, θα ήθελα να απευθύνω ένα τεράστιο ευχαριστώ στην οικογένεια μου, στους γονείς μου Κωνσταντίνο και Χριστίνα Βλάχου και στον αδερφό μου Δημήτριο Βλάχο, οι οποίοι έχουν υπάρξει θερμοί υποστηρικτές και αρωγοί μου σε όλες μου τις προσπάθειες, από την αρχή των μαθητικών μου χρόνων έως και σήμερα.

## ΚΑΤΑΣΤΑΣΗ ΠΙΝΑΚΩΝ

<b>Πίνακας 1.</b> Είδη μυκήτων, οι μυκοτοξίνες που παράγουν και οι κυριότεροι μεταβολίτες των μυκοτοξινών στον οργανισμό	ΣΕΛ. 6
<b>Πίνακας 2.</b> Είδη μυκήτων που παράγουν ΩΤΑ σε διάφορα τρόφιμα	ΣΕΛ. 26
<b>Πίνακας 3.</b> Σύνοψη των δεδομένων της ΩΤΑ στο αίμα υγιών ανθρώπων	ΣΕΛ. 35
<b>Πίνακας 4.</b> Παρουσία ΩΤΑ σε ανθρώπινα ούρα σε διαφορετικούς πληθυσμούς	ΣΕΛ. 38
<b>Πίνακας 5.</b> Δεδομένα για την παρουσία της ΩΤΑ στο γάλα παγκοσμίως.	ΣΕΛ. 39
<b>Πίνακας 6.</b> Παρουσία ΩΤΑ στο χοιρινό κρέας	ΣΕΛ. 46
<b>Πίνακας 7.</b> Παρουσία ΩΤΑ στα προϊόντα χοιρινού κρέατος	ΣΕΛ. 47
<b>Πίνακας 8.</b> Μέθοδοι προσδιορισμού ΩΤΑ σε ιστούς και βιολογικά υγρά	ΣΕΛ. 58
<b>Πίνακας 9.</b> Ανίχνευση της ΩΤΑ και συγκεντρώσεις ΩΤΑ (ng/ml) σε δείγματα ήπατος και νεφρού χοίρων	ΣΕΛ. 64

## ΚΑΤΑΣΤΑΣΗ ΣΧΗΜΑΤΩΝ

<b>Σχήμα 1.</b> Χημικοί τύποι Αφλατοξινών	ΣΕΛ. 17
<b>Σχήμα 2.</b> Χημικοί τύποι Ωχρατοξινών	ΣΕΛ. 23
<b>Σχήμα 3.</b> Στάδια μετατροπής της ωχρατοξίνης	ΣΕΛ. 27

# **ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ**

## ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Η ωχρατοξίνη Α (ΩΤΑ) είναι μια ευρέως διαδεδομένη μυκοτοξίνη, που συνήθως παράγεται ως δευτερογενής μεταβολίτης από τους μύκητες *Aspergillus spp.* και *Penicillium spp.*, κατά τη διάρκεια της αποθήκευσης των τροφίμων. Η σημασία της ΩΤΑ αντανακλάται σε ένα ευρύ φάσμα προϊόντων που ενδέχεται να μολυνθούν από αυτή αλλά και από τις πιθανές τοξικές επιδράσεις που μπορεί να έχει στα ζώα και στον άνθρωπο που τα καταναλώνουν.

Χαμηλής ποιότητας προϊόντα με εμφανή ανάπτυξη μούχλας ή με επίπεδα ΩΤΑ που τα καθιστούν ακατάλληλα για είσοδο στην ανθρώπινη τροφική αλυσίδα μπορεί να χρησιμοποιούνται ως ζωοτροφές. Αυτό εγείρει ανησυχίες σχετικά με την υγεία των ζώων, συμπεριλαμβανομένης της αυξημένης ευαισθησίας τους σε δευτερογενείς λοιμώξεις αλλά και τη μειωμένη απόδοσή τους στην παραγωγή τροφίμων. Εκδηλώσεις κλινικής ωχρατοξίκωσης που έχει προκληθεί από κατανάλωση μολυσμένων ζωοτροφών, έχουν αναφερθεί σε πουλερικά, χοίρους και κουνέλια (Duarte et al., 2011a).

Μεταξύ των εκτρεφόμενων ζώων, οι χοίροι είναι γνωστό ότι είναι οι πλέον ευαίσθητοι στην ΩΤΑ και μετά την απορρόφηση της μέσω του γαστρεντερικού σωλήνα, οι υψηλότερες συγκεντρώσεις της, ανευρίσκονται στο αίμα, ακολούθως στους νεφρούς, στην ουροδόχο κύστη, στο ήπαρ, στον σπλήνα, στους μύς και τέλος στο λίπος (Curtui et al., 2001; Curtui & Gareis, 2001; Chiavaro et al., 2002; Ceci et al., 2007). Η συχνότητα και τα μέσα επίπεδα μόλυνσης με ΩΤΑ σε χοίρους είναι γενικά υψηλότερη στους νεφρούς από ότι στους μύες (Curtui et al., 2001; Jørgensen & Petersen, 2002; Matrella et al., 2006). Οι Curtui et al., (2001) διαπίστωσαν ότι υπήρχε μια υψηλότερη συχνότητα ανίχνευσης αλλά χαμηλότερο μέσο επίπεδο μόλυνσης με ΩΤΑ στο ήπαρ από τους νεφρούς. Σε σχέση με τον ορό (100%), οι συγκεντρώσεις της ΩΤΑ σε νεφρούς χοίρου, ήπαρ και μύες ήταν 22,6, 8,5 και 2,57% αντίστοιχα (Curtui et al., 2001). Ο νεφρός μπορεί να είναι το πιο κατάλληλο δείγμα για την παρακολούθηση της μόλυνσης από ΩΤΑ όταν δεν υπάρχουν δείγματα ορού. Έχει διατυπωθεί η εκτίμηση ότι τα επίπεδα της ΩΤΑ στο χοιρινό κρέας είναι περίπου το 40% των επιπέδων της συγκέντρωσης στους νεφρούς (Buechmann & Hald, 1985).

Τα μηρυκαστικά έχουν υψηλότερη ανοχή στην έκθεση στην ΩΤΑ σε σχέση με τα μονογαστρικά ζώα, επειδή τα πρωτόζωα της μεγάλης κοιλίας είναι σε θέση να μεταβολίσουν την ΩΤΑ σε ωχρατοξίνη α (ΩΤα) καθώς και άλλους λιγότερο τοξικούς μεταβολίτες της (Fink-Gremmels, 2008). Κατά συνέπεια, ο κίνδυνος που συνδέεται με την κατανάλωση προϊόντων ζωικής προέλευσης περιορίζεται σε μεγάλο βαθμό στα μονογαστρικά είδη (Dall'Asta et al., 2010).

Επιπρόσθετα υπάρχουν ανησυχίες και για την δημόσια υγεία, που σχετίζονται με την κατανάλωση ζωικών προϊόντων που παράγονται από ζώα που είναι μολυσμένα με ΩΤΑ. Η ΩΤΑ έχει ταξινομηθεί ως πιθανό καρκινογόνο για τον άνθρωπο (ομάδα 2B) από τη Διεθνή Υπηρεσία Έρευνας για τον Καρκίνο (IARC, 1993). Υπάρχουν διαθέσιμες πολλές επιδημιολογικές μελέτες που υποστηρίζουν τη συμμετοχή της ΩΤΑ στην

αιτιοπαθολογία των ανθρώπινων νεφροπαθειών, συμπεριλαμβανομένων της ενδημικής νεφροπάθειας των Βαλκανίων (BEN) (Krogh et al., 1977) και της χρόνιας διάμεσης νεφροπάθειας στη Βόρεια Αφρική (Wafa et al., 1998). Επιπλέον, η BEN εμφανίζει ομοιότητες με τη μυκοτοξική νεφροπάθεια του χοίρου, η εμφάνιση της οποίας συσχετίστηκε με κατανάλωση ΩΤΑ από χοίρους στη Δανία στη δεκαετία του 1960 και 1970 (Krogh et al., 1973). Αν και ο ρόλος της ΩΤΑ στην ανθρώπινη νόσο εξακολουθεί να είναι μη αποσαφηνισμένος, δικαιολογούνται οι ανησυχίες για τη δημόσια υγεία λόγω των αποδεδειγμένων τοξικών επιδράσεών της, σε συνδυασμό και με την ικανότητά της να μεταφέρεται μέσω της τροφικής αλυσίδας (Duarte et al., 2011a).

Η ΩΤΑ εμφανίζεται σε ζωικής προέλευσης τρόφιμα (Hohler, 1998) όπως το χοιρινό και το κρέας κοτόπουλου (Jorgensen, 1998) μέσω του αποκαλούμενου ως «carry over effect» που είναι η επίδραση της κατανάλωσης από τα ζώα μολυσμένων τροφών (Abramson et al., 1997; Scudamore et al., 1997, 1998a, 1998b).

Λόγω της σημασίας της ΩΤΑ για τη Δημόσια Υγεία έχουν πραγματοποιηθεί πολλές μελέτες σε διάφορες χώρες σχετικά με την παρουσία της στα δημητριακά και σε άλλα τρόφιμα φυτικής προέλευσης. Ωστόσο, αρκετές έρευνες έχουν διεξαχθεί σε διάφορες χώρες για την παρουσία της ΩΤΑ στους εδώδιμους ιστούς των χοίρων και στα προϊόντα από χοιρινό κρέας. Για παράδειγμα, οι Curtui et al., 2001 σε μελέτη που πραγματοποίησαν στη Ρουμανία, βρήκαν το 79% των νεφρών να είναι μολυσμένοι με ΩΤΑ, με μέση συγκέντρωση 0,54 ng/g νεφρού καθώς και το 75% των δειγμάτων ήπατος με μέση συγκέντρωση ΩΤΑ 0,16 ng/g. Θετικό βρέθηκε το 33,4% των δειγμάτων νεφρών και το 26,7% των δειγμάτων ήπατος, που μελετήθηκαν στην έρευνα των Milicevic et al., 2012. Συγκεντρώσεις ΩΤΑ έως και 8 µg/kg έχουν επίσης βρεθεί σε αλλαντικά ήπατος και αλλαντικά αίματος καθώς και σε σπλάχνα χοίρων (Scheuer, 1989; Scheuer et al., 1997).

Από τα αποτελέσματα των ερευνών αυτών προκύπτει ότι το χοιρινό κρέας και τα προϊόντα του, και ιδιαίτερα αυτά που περιέχουν αίμα, ήπαρ και νεφρούς χοίρου, μπορεί να αποτελεί πηγή μόλυνσης του ανθρώπου από την τοξίνη. Στη χώρα μας δεν έχουν πραγματοποιηθεί ανάλογες μελέτες. Σκοπός της συγκεκριμένης μελέτης είναι ο έλεγχος της παρουσίας ΩΤΑ σε σφάγια χοίρου που η διαδικασία σφαγής τους γίνεται στα σφαγεία της Καρδίτσας. Η παρούσα μελέτη είναι η πρώτη που αφορά στους χοίρους και θα αποτελέσει την πρώτη εκτίμηση της παρουσίας της ΩΤΑ στα σφάγια χοίρου στη χώρα μας.

# ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1

## ΜΥΚΟΤΟΞΙΝΕΣ

### 1.1 Ιστορική Αναδρομή

Οι μυκοτοξίνες αποτελούν ετεροκυκλικές χημικές ενώσεις που παράγονται κυρίως από τους μύκητες *Aspergillus*, *Fusarium* και *Penicillium* (Kumar et al., 2008). Ο όρος «μυκοτοξίνες» είναι σύνθετος. Αποτελείται από την λέξη «*myces*», που προέρχεται από την ελληνική γλώσσα και σημαίνει μύκητας (μύκης) και την λέξη «*toxicum*» που στη λατινική γλώσσα σημαίνει τοξικός.

Η τοξική δράση των μυκοτοξινών παρουσιάζεται στον άνθρωπο, στα ζώα, στα ψάρια, στα φυτά αλλά και στους μικροοργανισμούς. Πέραν της άμεσης επίπτωσής τους στην υγεία των ζώων, οι μυκοτοξίνες μπορεί να αποτελούν κίνδυνο και για την υγεία του ανθρώπου, σε περίπτωση που τα προϊόντα τα οποία προέρχονται από ζώα που έχουν καταναλώσει μεγάλες ποσότητες μυκοτοξινών, προορίζονται για χρήση από τον άνθρωπο (Zinedine & Mapes, 2009).

Απασχολούν την ανθρωπότητα από πολλά χρόνια πριν, αφού έχουν θεωρηθεί ως η αιτία μιας από τις δέκα πληγές της Αιγύπτου, σύμφωνα με την οποία, μία οικογένεια και τα ζώα τους απεβίωσαν, μετά από την επαφή τους με τις εγκαταστάσεις αποθήκευσης των σιτηρών τους, το περιεχόμενο των οποίων ήταν μολυσμένο με τοξικούς μύκητες (Mars & Malloy, 1996). Κατά τον Μεσαίωνα, στην Κεντρική και Βόρεια Ευρώπη και συγκεκριμένα στη Λιμόζ της Γαλλίας, εκδηλώθηκε μία ακόμη επιδημία μετά από κατανάλωση αλεύρου σικάλεως το οποίο ήταν μολυσμένο με τοξίνες του μύκητα *Claviceps purpurea* και οδήγησε σε θάνατο 40.000 ανθρώπους.

Επιπλέον, ιστορικά αναφέρονται κι άλλες περιπτώσεις μυκοτοξικών σεωσεων, εντός της Ευρώπης κατά τον 10<sup>ο</sup> αιώνα, όπως αυτή του Αγίου Αντωνίου ή η «Αγία Φωτιά», η οποία είχε σχετιστεί με την κατανάλωση μολυσμένης σίκαλης με τον μύκητα *Claviceps purpurea*. Ένα ακόμη περιστατικό μυκοτοξίνωσης σημειώθηκε στο Λονδίνο και είχε ως αποτέλεσμα τον θάνατο 100.000 γαλοπούλων (Blout, 1961; Forgacs, 1962).

Στις δεκαετίες του 1940 και 1950, θανατηφόρα επεισόδια σημειώθηκαν στη Ρωσία κατά τη διάρκεια του Β΄ Παγκοσμίου Πολέμου, τα οποία αναφέρονται ως «Διατροφική Τοξική Αλευκία», μια παθολογική κατάσταση που εμφανίζεται με νεκρώσεις και αιμορραγίες, καθώς και με συμπτώματα από το Κεντρικό Νευρικό Σύστημα (Κ.Ν.Σ.) και η οποία αναγνωρίστηκε ως επίπτωση της κατανάλωσης σπόρων που είχαν μουχλιάσει (Richard, 2003). Αιτία αυτής της θανατηφόρου μόλυνσης, αποδείχθηκε πως ήταν οι τοξίνες T-2 του μύκητα *Fusarium sporotrichioides*, μετά από απομόνωση του από τους μουχλιασμένους σπόρους.

## 1.2 Γενικά για τις μυκοτοξίνες

Οι μυκοτοξίνες είναι μια "οικογένεια" χημικών ετεροκυκλικών ενώσεων, χαμηλού μοριακού βάρους, με συγγενείς μεταξύ τους χημικές ιδιότητες. Αποτελούν προϊόντα μεταβολισμού των μυκήτων που ανήκουν κυρίως στα γένη *Aspergillus*, *Fusarium* και *Penicillium* και απελευθερώνονται από μύκητες που βρίσκονται στη λογαριθμική και στην στατική φάση ανάπτυξής τους. Η τοξική τους δράση εμφανίζεται στον άνθρωπο, στα ζώα, στα ψάρια, στα φυτά αλλά και στους μικροοργανισμούς. Υπολογίζεται ότι το 25% των αγροτικών προϊόντων σε παγκόσμια κλίμακα είναι μολυσμένο με μυκοτοξίνες προκαλώντας μεγάλες οικονομικές απώλειες.

Οι παράγοντες που επηρεάζουν την παραγωγή μυκοτοξινών από τους μύκητες γενικά είναι:

- θερμοκρασία (7,5 - 40°C)
- υγρασία (>80% σχετική υγρασία)
- φως (μεγαλύτερη παραγωγή σε απουσία φωτός)
- pH (ιδανικό 4 - 4,6)
- υπόστρωμα (ευνοϊκό υπόστρωμα είναι τα προϊόντα «φυτικής προέλευσης»)
- παρουσία μυκοστατικών (NaCl, σορβικό οξύ, καφεΐνη, θεοφυλλίνη, κ.ά.)

Μέχρι σήμερα έχουν αναφερθεί πάνω από 400 μυκοτοξίνες, ωστόσο στα τρόφιμα μόνο μερικές από αυτές έχουν απομονωθεί. Για την επιστήμη της ασφάλειας τροφίμων ενδιαφέρει η υψηλή τοξικότητά τους, αλλά και η ανθεκτικότητά τους σε υψηλές θερμοκρασίες. Οι μυκοτοξίνες αναγνωρίζονται στην ανάλυση επικινδυνότητας των μελετών HACCP ως πιθανός κίνδυνος. Είναι ένας πιθανός κίνδυνος ο οποίος σχετίζεται με τρόφιμα φυτικής προέλευσης, όπως δημητριακούς καρπούς, σιτηρά, καλαμπόκι, φρούτα (μήλο, μπανάνες) και ξηρούς καρπούς (φυστίκια, σταφίδες), αν και απαντώνται ακόμη και σε τρόφιμα ζωικής προέλευσης όπως το γάλα, το κρέας, τα αυγά, και άλλα, γεγονός που οφείλεται στην κατανάλωση μολυσμένων με τις μυκοτοξίνες αυτές ζωοτροφών από τα ζώα.

Πέραν της άμεσης επίδρασης που έχουν οι μυκοτοξίνες στην υγεία των ζώων, μπορεί ακόμη να είναι επικίνδυνες και για την υγεία του ανθρώπου, σε περίπτωση που τα προϊόντα προέρχονται από ζώα που έχουν λάβει μεγάλες ποσότητες μυκοτοξινών και προορίζονται για ανθρώπινη κατανάλωση. Παρότι τα ζώα φιλτράρουν ή καταστρέφουν σε ένα ποσοστό τις μυκοτοξίνες στις οποίες εκτίθενται, έστω και μικρές ποσότητες μυκοτοξινών στο κρέας και στο γάλα δεν θα πρέπει να αγνοούνται. Η πρόληψη που βασίζεται στην απομάκρυνση της πηγής προέλευσης των μυκοτοξινών, είναι πιθανότατα ο μόνος τρόπος μείωσης της πρόσληψης. Η πρόληψη της επιμόλυνσης με μυκοτοξίνες που αρχίζει από τους αγρούς, είναι ο βασικός στόχος των βιομηχανιών τροφίμων, ωστόσο η μόλυνση των διαφόρων προϊόντων είναι αδύνατο να αποφευχθεί κάτω από ορισμένες περιβαλλοντικές συνθήκες.

Όρια πρόσληψης μυκοτοξινών που να είναι ασφαλή για τον άνθρωπο δεν έχουν ακόμη επαρκώς διερευνηθεί, αν και υπάρχουν όρια στις ισχύουσες νομοθεσίες για ορισμένες μυκοτοξίνες σε κάποια συγκεκριμένα τρόφιμα. (ζεαραλενόνη στα σιτηρά, αφλατοξίνες στο γάλα κ.ά.). Παγκοσμίως νοσήματα που αποδίδονται στην κατανάλωση τροφίμων

μολυσμένα με μυκοτοξίνες έχουν σημειωθεί. Ανάλογη περίπτωση είναι η ενδημική νεφροπάθεια των Βαλκανίων, για την οποία έχει ενοχοποιηθεί η πρόσληψη ωχρατοξίνης Α. Από τις ωχρατοξίνες η ωχρατοξίνη Α είναι η σημαντικότερη, αφού είναι η περισσότερο τοξική και εντοπίζεται σε μεγαλύτερη συχνότητα σε σχέση με τις ωχρατοξίνες Β και C.

Για την εργαστηριακή ανίχνευση και προσδιορισμό των μυκοτοξινών στα τρόφιμα έχουν περιγραφεί ποικίλες μέθοδοι (Helrich, 1968; Rodricks, 1976; WHO 1990) με την HPLC να κυριαρχεί (Egan, 1982) και την ELISA να είναι από τις πιο εύχρηστες και πρακτικές (Lee et al., 2004).

### 1.3 Οι κυριότερες μυκοτοξίνες

Στις ομάδες των μυκοτοξινών ανήκουν οι Αφλατοξίνες (aflatoxins), οι Τριχοθεσίνες (trichothecenes), οι Φουμονισίνες (fumonisins), οι Ωχρατοξίνες (ochratoxins) και η Ζεαραλενόνη (zearalenone). Στον πίνακα 1 παρουσιάζονται τα είδη των μυκήτων που εμφανίζονται συχνότερα, οι παραγόμενες μυκοτοξίνες και οι κυριότεροι μεταβολίτες τους.

**Πίνακας 1:** Είδη μυκήτων, οι παραγόμενες μυκοτοξίνες και οι κυριότεροι μεταβολίτες των μυκοτοξινών στον οργανισμό.

Μύκητες	Μυκοτοξίνες	Κυριότεροι Μεταβολίτες
<i>Aspergillus flavus</i> <i>Aspergillus parasiticus</i>	Αφλατοξίνες (B1, B2, G1, G2)	M1 (μεταβολίτης της B1)
<i>Penicillium verrucosum</i> <i>Aspergillus ochraceus</i>	Ωχρατοξίνη Α	
<i>Fusarium graminearum</i> <i>Fusarium culmorum</i> <i>Fusarium graminearum</i> <i>Fusarium culmorum</i> <i>Fusarium sporotrichioides</i>	Δεοξυνιβαλενόλη  T2 τοξίνη	HT2 τοξίνη
<i>Fusarium graminearum</i> <i>Fusarium culmorum</i>	Ζεαραλενόνη	α-ζεαραλενόλη β-ζεαραλενόλη
<i>Fusarium moniliforme</i> <i>Fusarium proliferatum</i>	Φουμονισίνες: B1, B2, B3	

**Πηγή:** Κουρουσέκος, 2008.

### 1.4 Χαρακτηριστικά των μυκοτοξινών

Οι μυκοτοξίνες είναι δευτερογενή προϊόντα μεταβολισμού διαφόρων γενών μυκήτων. Σχηματίζονται στο τέλος της λογαριθμικής και της στατικής φάσης ανάπτυξης του μύκητα ενώ δεν επηρεάζουν σε βιοχημικό επίπεδο την ανάπτυξή του (Smith &



Anderson, 1991). Υπάρχει και η περίπτωση να παραμένουν στο εσωτερικό του κυττάρου των μυκήτων και να απελευθερώνονται αφού προηγηθεί η θραύση του μικκυλίου. Οι μεταβολίτες αυτοί, αποτελούν μία τοξική και χημικά ετερογενή ομάδα, που απαρτίζεται από διάφορα μέλη τα οποία μπορεί να προκαλέσουν ασθένειες ή ακόμη και θάνατο. Έχουν τη δυνατότητα να αναπτύσσονται σε μια μεγάλη γκάμα προϊόντων και κάτω από διάφορες καταστάσεις, ενώ εμφανίζονται συχνότερα στα φυτά μεγάλων καλλιέργειών. Στους μύκητες που παράγουν μυκοτοξίνες, συμπεριλαμβάνονται και τα σαπρόφυτα που αναπτύσσονται σε τρόφιμα και φυτά, παθογόνοι μικροοργανισμοί που αναπτύσσονται σε καλλιέργειες κτηνοτροφικών φυτών και ενδόφυτων και οι οποίοι ζουν συμβιωτικά με ένα άλλο φυτό (Eaton & Groopman, 1994). Αξιοσημείωτο είναι πως είναι δραστικές, ακόμη και όταν βρίσκονται σε χαμηλή συγκέντρωση (Nielsen, 1998).

Γενικά, οι μύκητες αποτελούν φυσιολογικά ένα αρκετά μεγάλο ποσοστό επί του συνόλου των μικροοργανισμών που υπάρχουν στη γη. Τα διαφορετικά είδη των μυκήτων που υπάρχουν γενικά, υπολογίζεται πως είναι πάνω από 100.000 ενώ αυτά που έχουν τη δυνατότητα να παράγουν μυκοτοξίνες στις ζωοτροφές, είναι περίπου 220 είδη. Έως τώρα, έχουν αναγνωρισθεί 300 με 400 μυκοτοξίνες συνολικά, ενώ τουλάχιστον 300 ακόμη έχουν μέχρι σήμερα παραχθεί στο εργαστήριο χρησιμοποιώντας καλλιέργειες μυκήτων (Bennett & Klich, 2003). Μικρός αριθμός από αυτές έχουν απομονωθεί στα τρόφιμα (Murphy et al., 2006). Είναι οργανικές, αλειφατικές είτε κυκλικές ενώσεις, με ιδιαίτερα απλή δομή αφού αποτελούνται από λίγα άτομα άνθρακα. Μπορεί να είναι απλές ενώσεις με τέσσερα άτομα άνθρακα, όπως είναι η μονιλιφορμίνη, έως αρκετά πολύπλοκες ενώσεις, όπως είναι οι φομοψίνες (Dinis et al., 2007). Εμφανίζονται ως συγγενείς ενώσεις με τα μακρολίδια, τα στεροειδή, τα τερπενοειδή αλλά και με την κουμαρίνη. Η ικανότητα τους να σχηματίζουν διάφορες χημικές δομές έχει ως αποτέλεσμα να επιδρούν και διαφορετικά στην υγεία ανθρώπων και ζώων.

Οι μυκοτοξίνες αποτελούν ιδιαίτερα επικίνδυνες ενώσεις, αφού παραμένουν δραστικές για αρκετό διάστημα μετά την καταστροφή των μυκήτων από τους οποίους παρήχθησαν, ενώ είναι θερμοανθεκτικές κι επομένως δεν καταστρέφονται στις συνήθεις συνθήκες θερμικής επεξεργασίας των τροφίμων.

Η τοξική τους δράση είναι δυνατόν να σχετίζεται με διάφορα όργανα, όπως τους νεφρούς, το δέρμα, το αίμα και το κεντρικό νευρικό σύστημα. Στον άνθρωπο πιο συγκεκριμένα, οι αφλατοξίνες σχετίζονται με εμφάνιση καρκίνου στο ήπαρ, οι ωχρατοξίνες με καρκίνο του ουροποιητικού συστήματος και νεφροπάθειες, οι φουμονισίνες με καρκίνο στον οισοφάγο ενώ η ζερεανόλη με καρκίνο του ενδομητρίου.

Διάφοροι μύκητες μπορεί να παράγουν περισσότερες από μία μυκοτοξίνες, ενώ επίσης πολλές μυκοτοξίνες μπορεί να παραχθούν από διάφορα είδη μυκήτων. Επίσης, οι μύκητες δεν είναι όλοι τους τοξικοί ενώ υπάρχουν και κάποιοι δευτερογενείς μεταβολίτες τους, που δεν είναι τοξικοί. Επιπλέον, είναι πιθανό να ανιχνεύονται σε ένα υπόστρωμα διάφορες μυκοτοξίνες.

Παρόλο που όλες οι μυκοτοξίνες προέρχονται από μύκητες, υπάρχουν και μη τοξικά προϊόντα των μυκήτων. Τα προϊόντα που παράγονται από μύκητες και είναι τοξικά για τα βακτήρια, συνιστούν τα αντιβιοτικά, ενώ τα προϊόντα μυκήτων που εμφανίζουν τοξικότητα στα φυτά, ονομάζονται φυτοτοξίνες. Τέτοιο παράδειγμα αντιβιοτικού είναι η

πενικιλίνη, παράγωγο του μύκητα *Penicillium chrysogenum*. Οι μυκοτοξίνες, ακόμη κι όταν βρίσκονται σε χαμηλή συγκέντρωση, μπορεί να έχουν τοξικές επιδράσεις στα διάφορα σπονδυλωτά. Υπάρχουν κι άλλα προϊόντα μυκήτων, με χαμηλό μοριακό βάρος και τα οποία για να εμφανίζουν τοξικότητα πρέπει να βρίσκονται σε υψηλές συγκεντρώσεις, αλλά δεν θεωρούνται μυκοτοξίνες (Bennett, 1987). Τέτοιο παράδειγμα μεταβολίτη αποτελεί και η αιθανόλη. Για τη διάκριση μεταξύ τοξικών και μη, προϊόντων μεταβολισμού των μυκήτων, χρησιμοποιούνται παράμετροι διάκρισης όπως η συγκέντρωση και ο στόχος του μεταβολίτη.

Η συγκέντρωση τους μετράται συνήθως σε  $\mu\text{g}/\text{kg}$  τροφής (ppb). Επιπλέον, κατατάσσονται ως ο πιο υψηλός, μη-μολυσματικός παράγοντας κινδύνου, που προέρχεται από τη διατροφή και θεωρείται σημαντικότερος ακόμη και από τα πρόσθετα και τα υπολείμματα φυτοπροστατευτικών προϊόντων. Στην ανάλυση επικινδυνότητας των μελετών της Ανάλυσης Επικινδυνότητας στα Κρίσιμα Σημεία Ελέγχου (Hazard Analysis Critical Control Point, HACCP), οι μυκοτοξίνες αναγνωρίζονται ως πιθανός κίνδυνος. Οι λόγοι που οδηγούν στην παραγωγή τους, όπως συμβαίνει και με τους περισσότερους δευτερογενείς μεταβολίτες των μυκήτων, δεν έχουν διευκρινιστεί (Visconti & Perone, 2008). Ο κίνδυνος από την επίδραση των μυκοτοξινών, στην ανθρώπινη υγεία ή την υγεία των ζώων, έχει αναθεωρηθεί αρκετά τα τελευταία χρόνια (Yaling et al., 2008; Averkieva, 2009).

## 1.5 Παραγωγή μυκοτοξινών

### 1.5.1 Παραγωγή μυκοτοξινών στα φυτά

Οι μύκητες χωρίζονται σε δύο μεγάλες κατηγορίες, στους μύκητες που αναπτύσσονται κατά την διάρκεια της αποθήκευσης των καρπών και ιδίως των δημητριακών (Wilson & Abramson 1992, Dieber et al, 1998, Richard et al., 2007) και σε αυτούς που αναπτύσσονται κατά την καλλιέργεια των φυτών, όπως οι μύκητες του γένους *Fusarium* spp. Για την ανάπτυξη τους χρειάζονται υψηλή σχετική υγρασία (>70%) και ενεργότητα νερού ( $a_w$ ) (Xu et al., 2007). Είναι υπεύθυνοι για την πρόκληση θανάτων σε έμβρυα ζώων.

Τα γένη *Aspergillus* spp. και *Penicillium* spp. αναπτύσσονται κυρίως όταν υπάρξουν ακατάλληλες συνθήκες αποθήκευσης με υψηλή υγρασία (Christensen & Kaufmann, 1965). Οι μύκητες αυτοί βρίσκονται σε μεγάλα ποσοστά στη φύση, στο έδαφος, σε νεκρή οργανική ύλη και σε τρόφιμα. (Wegst & Lingens, 1983). Ο μύκητας *A. flavus* αποτελεί εξαίρεση αφού έχει τη δυνατότητα να παράγει αφλατοξίνες σε διάφορους καρπούς προτού γίνει η αποθήκευσή τους (Osweiler, 1999; Taylor, 1999). Το επίπεδο υγρασίας στα σιτηρά είναι καθοριστικής σημασίας, διότι τα υψηλά επίπεδα της ευνοούν την ανάπτυξη μυκήτων (Battilani, 2004). Οι μύκητες αυτοί παράγουν τοξίνες όταν βρεθούν κάτω από διάφορες συνθήκες stress όπως μειωμένη υγρασία, μειωμένο αερισμό, απότομη αλλαγή θερμοκρασίας και μικροβιακό ανταγωνισμό.

Επιπρόσθετα, ο επαρκής αερισμός, η κατάλληλη υγρασία (>13%) και θερμοκρασία (συνήθως μεταξύ 12-25° C), καθώς και η ύπαρξη αναγκαίας ποσότητας υδατανθράκων

είναι οι καθοριστικοί παράγοντες που διαμορφώνουν την ανάπτυξη των μυκήτων και την παραγωγή των τοξινών (Wilson & Abramson 1992; Xu et al., 2007). Άλλος σημαντικός παράγοντας, που επηρεάζει την ανάπτυξη τους, είναι ο χρόνος παραμονής των καρπών υπό ακατάλληλες συνθήκες (Belli et al., 2004; Mitchell et al., 2004; Belli et al., 2005). Επιπλέον, παράγοντες οι οποίοι οδηγούν σε καταστροφή των διαφόρων φυτών όπως οι ακατάλληλα υψηλές θερμοκρασίες, η προσβολή από έντομα, η ξηρασία και άλλοι, διευκολύνουν την ανάπτυξη των μυκήτων στα καλλιεργούμενα φυτά και κατ' επέκταση και την παραγωγή μυκοτοξινών (Richard & Cole, 1989; Omniski et al., 1994). Κι άλλοι παράγοντες όπως ο αναποτελεσματικός έλεγχος των εντόμων, το ακατάλληλο έδαφος και η περιεκτικότητα του σε άζωτο, επίσης προδιαθέτουν στην αυξημένη παραγωγή μυκοτοξινών. Διάφοροι μηχανικοί παράγοντες που προκαλούν καταστροφή στα φυτά όπως είναι η βροχή, το pH, η διαθεσιμότητα των μετάλλων και των ιχνοστοιχείων καθώς και η αποξήρανση των προϊόντων, είναι δυνατόν να εμπλέκονται στην πρόκληση μυκοτοξινώσεων (Abramson et al., 1987; Chelack et al., 1991; Gimeno, 2000; Eskola, 2002; Atalla et al., 2003; Magan et al., 2003).

Τέλος, η παραγωγή των μυκοτοξινών εξαρτάται κι από τη γεωγραφική εξάπλωση των μυκήτων. Υπάρχουν περιοχές που είναι επιβαρυνμένες με ορισμένους μύκητες, αν και αυτή η γεωγραφική κατανομή μπορεί να αλλάξει εξαιτίας αλλαγών που μπορεί να προκύψουν στις περιβαλλοντικές συνθήκες όπως η μεγάλη ξηρασία ή το ισχυρό ψύχος. Επίσης, η μεταφορά των σιτηρών καθώς και η αποθήκευσή τους σε ακατάλληλες συνθήκες υγρασίας και θερμοκρασίας μπορεί να αλλάξουν τη γεωγραφική κατανομή εμφάνισης των μυκοτοξινώσεων (Osweiler, 1999; WHO-FAO, 2001; Richard et al., 2007).

### **1.5.2 Παραγωγή μυκοτοξινών στις ζωοτροφές**

Προϋπόθεση για την ύπαρξη μυκοτοξινών στις ζωοτροφές ή στα διάφορα τρόφιμα είναι η προϋπάρχουσα παρουσία μυκήτων. Ωστόσο για την ανάπτυξη αυτών των μυκήτων, απαραίτητο είναι να υπάρχουν τα σπόρια των μυκήτων στις πρώτες ύλες. Στη συνέχεια τα σπόρια αυτά ή αλλιώς κονίδια, μεταφέρονται με το νερό, τον αέρα και τα έντομα, μολύνοντας με αυτό τον τρόπο, τόσο τα φυτά κατά τη διάρκεια της καλλιέργειάς τους όσο και τις τροφές κατά την αποθήκευσή τους.

Οι εναλλαγές που προκύπτουν κατά διαστήματα, κατά τη διάρκεια της αποθήκευσης των ζωοτροφών, βοηθούν στην ανάπτυξη των μυκήτων. Καθώς το επίπεδο της μόλυνσης με μυκοτοξίνες είναι αθροιστικό, οι συνθήκες ξήρανσης και αποθήκευσης αλλά και η χρονική στιγμή συγκομιδής (κυρίως Άνοιξη και Φθινόπωρο) μπορούν να παίξουν έναν ακόμη, ιδιαίτερα σημαντικό ρόλο στην παραγωγή μυκοτοξινών.

Οι μυκοτοξίνες λοιπόν παράγονται είτε από σαπροφυτικούς μύκητες κατά την αποθήκευση, είτε από ενδοφυτικούς μύκητες κατά την ανάπτυξη των φυτών. Συσσωρεύονται στους λιπώδεις ιστούς των φυτών και των ζώων λόγω του λιπόφιλου χαρακτήρα τους (Eaton & Groopman, 1994). Οποιαδήποτε κατάσταση καθιστά το φυτό-ξενιστή ευαίσθητο, επιτρέπει την είσοδο του μικροοργανισμού και στη συνέχεια την ανάπτυξη του μικροοργανισμού στον ιστό του ξενιστή. Γενικά οι μύκητες αποικίζουν

τους κατεστραμμένους πυρήνες των φυτών ενώ σε κάποιες περιπτώσεις παράγουν ένζυμα, όπως η πηκτινάση, τα οποία βοηθούν στη διείσδυση τους σε μη κατεστραμμένους ξενιστές. Σε έντονα κατεστραμμένες καλλιέργειες φυτών, είναι δυνατόν να παρατηρηθούν μάζες κονιδίων, κιτρινοπράσινου χρώματος, οι οποίες γίνονται εμφανείς στην περιοχή όπου βρίσκονται οι κατεστραμμένοι πυρήνες είτε κατά μήκος των διαδρομών που σχηματίστηκαν κατά τη διάρκεια της διατροφής των εντόμων.

Τα επίπεδα παραγωγής των μυκοτοξινών εξαρτώνται από τα διαφορετικά στελέχη του κάθε είδους του μύκητα, από το θρεπτικό υπόστρωμα που διατίθεται για την ανάπτυξη τους αλλά και από τις περιβαλλοντικές συνθήκες (Nielsen, 1998). Η αποθήκευση προϊόντων φυτικής προέλευσης σε συνθήκες υψηλής υγρασίας και θερμοκρασίας, οδηγεί στην ανάπτυξη μυκήτων σε αυτά και στην παραγωγή μυκοτοξινών από αυτούς. Σε αυτά τα προϊόντα φυτικής προέλευσης, συγκαταλέγονται οι δημητριακοί καρποί και ιδίως το καλαμπόκι, η βρώμη, η σόγια το σιτάρι, το κριθάρι, ο βαμβακόσπορος, τα φιστίκια αλλά και τα φρούτα (Βάσσος, 2004). Ακόμη, η ανθεκτικότητα τους στη θέρμανση και στις διάφορες μορφές επεξεργασίας που είναι δυνατόν να υφίστανται οι ζωοτροφές, διευκολύνει την παραμονή των μυκοτοξινών στα προϊόντα αυτά για αρκετά μεγάλο χρονικό διάστημα (Eaton & Groopman, 1994). Σε μια μελέτη του Scott το 1984, αποδείχθηκε πως οι μυκοτοξίνες είναι ιδιαίτερα ανθεκτικές και παραμένουν σταθερές κατά τη διάρκεια της θερμικής επεξεργασίας των τροφίμων.

Δεν υπάρχουν διαθέσιμα δεδομένα που να αποδεικνύουν την ύπαρξη συσχέτισης μεταξύ της έκτασης της μυκητιακής μόλυνσης και του επιπέδου παραγωγής των μυκοτοξινών στα προσβεβλημένα φυτά ή τρόφιμα. Η παρουσία των μυκήτων δεν συνεπάγεται απαραίτητα και την παραγωγή μυκοτοξινών από αυτούς, ενώ η αδυναμία αναγνώρισης μικκυλίων σε αποθηκευμένα ή φρέσκα τρόφιμα δεν σημαίνει και μη ύπαρξη της μυκοτοξίνης (Diekman & Green, 1992). Η μακροσκοπική εξέταση επομένως των φυτών και των ζωοτροφών αλλά και άλλων προϊόντων, δεν είναι κατάλληλη μέθοδος προσδιορισμού ύπαρξης μυκοτοξινών, γεγονός που καθιστά δύσκολη την εξαγωγή συμπεράσματος όσον αφορά την καταλληλότητα των προϊόντων αυτών για κατανάλωση από ζώα (WHO-FAO 2001).

Η πρώτη ταυτοποίηση μυκοτοξινών σε σιτηρέσια μηρυκαστικών, ήταν η εύρεση αφλατοξινών σε συμπυκνωμένες ζωοτροφές. Τα μηρυκαστικά με τη βόσκηση των χόρτων, εκτίθενται σε διαφορετικές μυκοτοξίνες και το επίπεδο μόλυνσης εξαρτάται από τη γεωγραφική περιοχή (Cheece, 1995). Τα μηρυκαστικά χρειάζονται μεγάλες ποσότητες χονδροειδών ζωοτροφών προκειμένου να υπάρχει ισορροπία στη μεγάλη κοιλία τους. Αυτό οφείλεται στη φύση της λειτουργίας του πεπτικού τους συστήματος, όπου η ζύμωση και η πέψη των φυτικών συστατικών, όπως είναι η κυτταρίνη, πραγματοποιείται από μικροοργανισμούς της μικροβιακής χλωρίδας των προστομάχων τους. Στην εκτατική κτηνοτροφία, μεγάλο ποσοστό του ημερήσιου σιτηρεσίου των ζώων καλύπτεται από τη βόσκηση ενώ η πρόσληψη συμπυκνωμένων ζωοτροφών περιορίζεται, ενώ αντίθετα στην εντατική εκτροφή, οι συμπυκνωμένες ζωοτροφές αποτελούν το 70% του ημερήσιου σιτηρεσίου των ζώων, γεγονός που αυξάνει σημαντικά τον κίνδυνο έκθεσης των ζώων αυτών σε μυκοτοξίνες.

Η σημαντικότερη ωστόσο πηγή μυκοτοξινών στη διατροφή των μηρυκαστικών ζώων είναι η παρουσία μυκοτοξινών στο ενσίρωμα, στο άχυρο και στο σανό (O' Brien et al.,

2005; Mansfield & Kuldan, 2007). Μετά την αποθήκευση για μεγάλο χρονικό διάστημα, στο ενσίρωμα αναπτύσσονται διάφοροι μύκητες. Σε διάφορες μελέτες που πραγματοποιήθηκαν, ανιχνεύθηκαν στο ενσίρωμα μύκητες των γενών *Penicillium* spp., όπως *P. roqueforti*, *P. paneum*, *Aspergilli* όπως *A. Fumigatus* και *A. flavus* (Cole et al., 1977), *Monascus* spp. (Shneweis et al., 2001) και *Byssochlamus nivea* (Escoula, 1975). Αξίζει να σημειωθεί πως η μόλυνση με μυκοτοξίνες των ζωοτροφών πριν την ενσίρωση τους, αυξάνει το συνολικό φορτίο μυκοτοξινών που προκύπτει στο τελικό ενσίρωμα.

Το πρόβλημα των μυκοτοξινών, εμφανίζει ιδιαίτερη ανησυχία και φαίνεται πως έχει άμεση σχέση με τις κλιματικές αλλαγές αλλά και με τις αλλαγές στις γεωργικές πρακτικές που εφαρμόζονται. Επίσης, δημιουργούν προβλήματα στο εμπόριο των πρώτων υλών (Wu, 2006). Σύμφωνα με τον Οργανισμό Τροφίμων και Γεωργίας (FAO) των Ηνωμένων Εθνών, από την συνολική παγκόσμια παραγωγή δημητριακών καρπών το 25% είναι μολυσμένο με μυκοτοξίνες (CAST, 1989). Αύξηση έχει παρατηρηθεί παγκοσμίως, στη συχνότητα εμφάνισης μόλυνσης προϊόντων με μυκοτοξίνες. Είναι πιθανό αυτή η αύξηση σε παγκόσμια κλίμακα να οφείλεται στην αύξηση των ελέγχων που διενεργούνται για την ανίχνευση μυκοτοξινών. Τέλος, οι παγκόσμιες διαστάσεις που έχει λάβει το εμπόριο των πρώτων υλών έχει εντείνει το πρόβλημα αφού είναι πιθανό, ένα τρόφιμο να περιέχει πρώτες ύλες από διάφορες περιοχές.

## 1.6 Επίδραση των μυκοτοξινών στην υγεία των ζώων

Στην πλειονότητα των περιπτώσεων, η νόσηση από μυκοτοξίνωση οφείλεται στην κατανάλωση τροφών μολυσμένων με μυκοτοξίνες. Η πιθανότητα μόλυνσης μετά από εισπνοή μυκοτοξινών είτε μετά από άμεση επαφή τους με το δέρμα ασθενών είναι δυνατή αλλά με περιορισμένες πιθανότητες (Osweiler 1999; Richard 2007). Επίσης, σε μελέτη του Jarvis, 2002 αποδείχθηκε πιθανή μετάδοση μέσω του αέρα ή με τη μολυσμένη σκόνη.

Η κλινική εικόνα της κατάποσης μολυσμένων με μυκοτοξίνες ζωοτροφών σε μέτριες έως υψηλές ποσότητες εμφανίζεται με μείωση του ρυθμού ανάπτυξης των ζώων, μείωση της γονιμότητας καθώς και θνησιμότητα οξείας μορφής. (Berry, 1988; Neldon-Ortiz & Quereshi, 1991). Επιπρόσθετα, η έκθεση ακόμη και σε μικρές ποσότητες μυκοτοξινών είναι πιθανό να επιφέρει καταστολή του ανοσοποιητικού συστήματος. Επίπεδα μυκοτοξινών μικρότερα από αυτά που είναι τοξικά για τα ζώα οδηγούν σε ανοσοκαταστολή (Richard et al., 1978). Η ανοσοκαταστολή αυτή εμφανίζεται ως μείωση στην παραγωγή αντισωμάτων, υποδραστηριότητα των T και B λεμφοκυττάρων καθώς και αναποτελεσματική δράση μακροφάγων και ουδετερόφιλων. Η καταστολή του ανοσοποιητικού συστήματος είναι πιθανό να οδηγήσει σε ενεργοποίηση χρόνιων φλεγμονών ή σε ελαττωμένη δραστηριότητα των φαρμάκων. Έχει αποδειχθεί πως οι μυκοτοξίνες έχουν την ικανότητα να επηρεάζουν την φλεγμονώδη αντίδραση ενώ παράλληλα μπορούν να επιδράσουν και στη βιωσιμότητα των φαγοκυττάρων, μειώνοντας την έκκριση ή/και τη δράση των κυττάρων αυτών. Η χυμική ανοσία επηρεάζεται επίσης από τη δράση (Oswald & Comera, 1998; Bondy & Pestka, 2000). Οι Nyman et al., 2007 απέδειξαν συσχέτιση της κακής ποιότητας ενσιρωμάτων με προβλήματα στα άκρα των ζώων καθώς και με αυξημένη συχνότητα εμφάνισης μαστίτιδας σε γαλακτοπαραγωγά ζώα.

Τα μηρυκαστικά εμφανίζουν μειωμένη συχνότητα σε μυκοτοξινώσεις αφού η μικροβιακή χλωρίδα των προστομάχων αποτελεί μία μορφή άμυνας (Kiessling et al., 1984). Τέτοιο παράδειγμα είναι η ωχρατοξίνη Α (ΩΤΑ), όπου τα μηρυκαστικά έχουν την ικανότητα μέσω της βοήθειας των μικροοργανισμών της μικροβιακής χλωρίδας τους, μετατρέπεται την ΩΤΑ σε ωχρατοξίνη α που είναι μη τοξική. Έχει βρεθεί σε μελέτες πως 12mg ΩΤΑ/kg τροφής που χορηγήθηκαν σε βοοειδή μπορούσαν να αδρανοποιηθούν (Hult et al., 1976; Pettersson et al., 1982). Το πρόβατο έχει αποδειχθεί πιο ανθεκτικό από την αγελάδα. Αλλαγές στο σιτηρέσιο με προσθήκη υψηλού ποσοστού συμπυκνωμάτων, λόγω της μεγάλης περιεκτικότητας σε πρωτεΐνες, μπορεί να μεταβάλλει τη δραστηριότητα διάσπασης των μικροοργανισμών των προστομάχων (Xiao et al., 1991; Muller et al., 2001). Αυτό εξηγεί και το λόγο για τον οποίο μόνο μικρές συγκεντρώσεις ΩΤΑ ανιχνεύονται στο γάλα (Skang, 1999).

Υπάρχουν ωστόσο και μυκοτοξίνες που μολύνουν τις πρώτες ύλες που χρησιμοποιούνται στις ζωοτροφές και δεν μεταβολίζονται σε αδρανείς μορφές. Σε μελέτη των Γιαννικouris et al., 2002 αποδείχθηκε πως η AFB1 σε συγκέντρωση 10 µg/ml είναι σε θέση να αναστείλει την ανάπτυξη ορισμένων βακτηρίων. Επομένως, αποδεικνύεται η ικανότητα της μυκοτοξίνης να μεταβάλλει την δραστηριότητα των μικροοργανισμών της μικροβιακής χλωρίδας των προστομάχων των μηρυκαστικών. Επιπλέον, ένας ακόμη παράγοντας που συμβάλλει στη μείωση της ευπάθειας των μηρυκαστικών μετά από έκθεση σε μυκοτοξίνες είναι η βόσκηση. Κατά τη διαδικασία αυτή, μαζί με τα χόρτα τα ζώα καταπίνουν παράλληλα και άλλα συστατικά του εδάφους, τα οποία μπορεί και να συμμετέχουν στον περιορισμό του κινδύνου που πιθανόν να ενέχουν οι μυκοτοξίνες για τα ζώα αυτά.

Η κατανάλωση αφλατοξινών από τα μηρυκαστικά οδηγεί σε μειωμένη πρόσληψη τροφής. Αυτό έχει ως άμεση συνέπεια τη μείωση της γαλακτοπαραγωγής στις αγελάδες γαλακτοπαραγωγής. Επίσης, συνέπεια της έκθεσης σε αφλατοξίνες είναι και η ηπατική βλάβη. Η μειωμένη ηπατική λειτουργία μπορεί επίσης να ευθύνεται για την φωτοευαισθησία που επίσης συνδιάζεται με την έκθεση σε μυκοτοξίνες (Miller & Wilson, 1994).

Η μόλυνση με μυκοτοξίνες αποτελεί σημαντικό πρόβλημα και στον τομέα της πτηνοτροφίας. Έχουν σημειωθεί απώλειες πτηνών οι οποίες είχαν ως αιτιολογικό παράγοντα τη μόλυνση από μυκοτοξίνες και κυρίως από αφλατοξίνες (AFB1), ΩΤΑ και τριχοθεσίνες (T2). Εξαιτίας της ανοσοκαταστολής που προκαλείται από τη δράση των μυκοτοξινών, τα πτηνά αυτά εμφανίζουν αυξημένα περιστατικά σαλμονελάσεων και κοκκιδιάσεων. Κλινικά παρατηρείται απώλεια βάρους, μείωση του ρυθμού ανάπτυξης, αιμορραγίες καθώς και νεκρώσεις σε διάφορους ιστούς (Smith et al., 1992).

Στα ιπποειδή, η μόλυνση με μυκοτοξίνες οδηγεί σε διάφορα προβλήματα, όπως ανορεξία, χωλότητα ενώ το σύστημα που προσβάλλεται κυρίως είναι το νευρικό σύστημα. Συγκεκριμένα, έχει αποδειχθεί πως η φουμονισίνη Β είναι ικανή να προκαλέσει εκφυλιστικές αλλοιώσεις του εγκεφάλου των ιπποειδών (Placida et al., 1999).

Σε αντίθεση με τα μηρυκαστικά, ο χοίρος και κυρίως οι σύες αποτελούν την πιο ευπαθή ομάδα παραγωγικών ζώων όσον αφορά τη μόλυνση από τις μυκοτοξίνες. Κύρια κλινικά

συμπτώματα είναι η καθυστέρηση ανάπτυξης με μείωση της μέσης ημερήσιας αύξησης βάρους, καταστροφή της λειτουργικότητας των νεφρών, καθώς και βλάβη των ηπατικών κυττάρων (Southern & Clawson, 1979). Σημαντικό ρόλο στην υγεία των χοίρων, παίζει και η ζεαραλενόνη, μία μυκοτοξίνη η οποία συνδέεται με εμφάνιση προβλημάτων που αφορούν το αναπαραγωγικό σύστημα των συών. Αυτό οφείλεται στο γεγονός ότι οι μεταβολίτες της ζεαραλενόνης εμφανίζουν χημική ομοιότητα με την οιστραδιόλη 17-β και για αυτό το λόγο μπορούν να συνδέονται στους υποδοχείς των οιστρογόνων (Hurd, 1977).

Η αλληλεπίδραση των διαφόρων μυκοτοξινών σε περίπτωση ταυτόχρονης κατανάλωσης, δεν έχει μελετηθεί επαρκώς. Θεωρείται πως οι αλληλεπιδράσεις αυτές μπορεί να διαφέρουν από είδος σε είδος ζώου αφού υπάρχει ποικιλία αντιδράσεων της ευαισθησίας τους απέναντι στις μυκοτοξίνες. Ορισμένες μυκοτοξίνες μπορεί να εμφανίζουν αθροιστική δράση γεγονός που μπορεί να οδηγεί σε αυξημένη τοξικότητα τους. Οι Huff et al., 1988 και Harvey et al., 1989 έχουν αποδείξει ανάλογη αθροιστική δράση μετά από κατανάλωση σιτηρεσίου στο οποίο συνυπήρχαν ΩΤΑ και αφλατοξίνες (Huff et al., 1988; Harvey et al., 1989α).

Οι μύκητες έχουν τη δυνατότητα να παράγουν δευτερογενείς μη τοξικούς μεταβολίτες οι οποίοι συντελούν στην ενίσχυση της δράσης των μυκοτοξινών. Αυτό έχει αποδειχθεί με εργασίες οι οποίες έχουν πραγματοποιηθεί και έχουν δείξει ιστοί που μολύνθηκαν με μύκητα με φυσικό τρόπο, παρουσίαζαν μεγαλύτερη τοξικότητα σε σύγκριση με ιστούς οι οποίοι μολύνθηκαν τεχνητό τρόπο, όπου έγινε έγχυση της ίδιας συγκέντρωσης μυκοτοξίνης. Έρευνες των Diaz et al., 2011 αποδεικνύουν πως οι αλληλεπιδράσεις μεταξύ των διαφόρων μυκοτοξινών είναι ιδιαίτερα σημαντικές και ίσως ξεπερνούν σε σημαντικότητα και τις επιπτώσεις της δράσης μεμονωμένων μυκοτοξινών (Diaz et al., 2011).

Οι μυκοτοξίνες μπορεί να έχουν καρκινογόνο δράση όπως η ωχρατοξίνη, η φουμονισίνη και οι αφλατοξίνες, τερατογόνο δράση όπως η ωχρατοξίνη, μεταλλαξιογόνο δράση όπως οι αφλατοξίνες. Επιπλέον, μπορεί να εμφανίζουν δράση έναντι των οιστρογόνων όπως η ζεαραλενόνη, αιμορραγική διάθεση καθώς και δερματοτοξικότητα όπως τα τριχοθυκένια, ανοσοτοξικότητα όπως η ωχρατοξίνη και οι αφλατοξίνες, νεφροτοξικότητα όπως η ωχρατοξίνη, ηπατοτοξικότητα όπως οι αφλατοξίνες καθώς και νευροτοξικότητα όπως στην περίπτωση των εργοτοξινών. Η επίδραση των διαφόρων μυκοτοξινών στην υγεία των ζώων επηρεάζεται από ποικίλους παράγοντες όπως η τοξικότητα των επιμέρους συστατικών μιας τροφής αφού συντελεί στην εμφάνιση οξείας ή χρόνιας παθολογικής κατάστασης, η παρουσία και άλλων μυκοτοξινών λόγω της αθροιστικής δράσης τους, η ποσότητα της τροφής που καταναλώνουν συνολικά καθώς και το σωματικό βάρος των ζώων σε σχέση με την ποσότητα μυκοτοξίνης που προσλαμβάνουν.

## 1.7 Είδη μυκοτοξινών

### 1.7.1 Τριχοθεσίνες

Στην ομάδα των τριχοθεσινών ανήκουν περισσότερες από 154 μυκοτοξίνες που έχουν αναγνωριστεί μέχρι σήμερα. Ως προς τη χημική τους δομή, χαρακτηρίζονται από την παρουσία ενός διπλού δεσμού μεταξύ των ατόμων C9 και C10, καθώς και από έναν εποξικό δακτύλιο στην θέση C12-C13. Ο δακτύλιος αυτός είναι υπεύθυνος και για τις τοξικές επιπτώσεις που εμφανίζουν οι τοξίνες που ανήκουν σε αυτή την ομάδα. Η παραγωγή τους οφείλεται σε περισσότερους από 20 μύκητες, οι οποίοι ανήκουν στο γένος *Fusarium* και η ανάπτυξη τους ευνοείται κυρίως σε περιοχές με εύκρατο κλίμα (Wood, 1992). Οι τοξίνες αυτές, με κριτήριο την παρουσία ή μη αλυσίδας συνδεμένης στον άνθρακα στη θέσης C7, ταξινομούνται σε δύο ομάδες. Η ταξινόμηση αυτή τις διακρίνει σε τριχοθεσίνες ομάδας A (T-2, HT-2, διακετοξυσκιρπενόλη) και τριχοθεσίνες της ομάδας B (νιβαλενόλη, DON, φουζαρενόνη). Οι τριχοθεσίνες, ως χημικές ενώσεις χαρακτηρίζονται από σταθερότητα, ενώ έχουν την δυνατότητα να μην εμφανίζουν αλλοιώσεις για μεγάλο χρονικό διάστημα μετά την παραγωγή τους. Από τις μυκοτοξίνες που ανήκουν στην ομάδα αυτή, το μεγαλύτερο ενδιαφέρον εμφανίζει η DON, η οποία εμφανίζει εξάπλωση σε παγκόσμιο επίπεδο και απομονώνεται από δημητριακούς καρπούς όπως το καλαμπόκι, το κριθάρι κ.α. Σε περίπτωση που προκύψει φυσική μόλυνση, τα κυριότερα παράγωγα της DON είναι η 3-ακέτυλο-DON και η 15-ακέτυλο-DON. Στους δημητριακούς καρπούς τα παράγωγα αυτά, είναι δυνατόν να συνυπάρχουν με την DON και το ποσοστό τους μπορεί να προσεγγίζει το 10-20% της συνολικής συγκέντρωσης.

Το ευπαθέστερο είδος ζώου στη μόλυνση από DON είναι ο χοίρος (Patterson, 1992) στους οποίους προκαλεί υπογονιμότητα αλλά και διαταραχές στη γέννηση αλλά και στην ανάπτυξη των χοιριδίων (Harvey et al., 1990). Ωστόσο, ανάλογα προβλήματα προκαλεί και στα μηρυκαστικά και ιδίως στις αγελάδες, όπου έχουν καταγραφεί αποβολές (Hsu et al., 1972, Mann et al., 1983), προβλήματα στο πεπτικό σύστημα θάνατο (Weaver et al., 1980) ενώ έχει αποδειχθεί και η ικανότητα της να περνάει στο γάλα (Prelusky et al., 1984) και η πρόκληση μείωσης της ποσότητας του γαλακτος (Whitlow et al., 1994). Η T2 έχει συσχετιστεί με πρόκληση ανοσοκαταστολής στους οργανισμούς που μολύνονται (Creppy, 2002).

### 1.7.2 Ζερεανόλη

Η Ζερεανόλη (ZEN) είναι μια λακτόνη του ρεσορκυκλικού οξέος. Αποτελεί δευτερογενή μεταβολίτη που παράγεται από τους μύκητες του γένους *Fusarium* και κυρίως από τους μύκητες *F.graminearum* και *F.culmorum* οι οποίοι παράγουν και τις τριχοθεσίνες για αυτό και είναι πιθανό να συνυπάρχουν με αυτές στις ζωοτροφές (Diekman, 1992). Εντοπίζεται στη βρώμη, στο καλαμπόκι, στο κριθάρι και στο σιτάρι. Η παραγωγή της παρατηρείται κυρίως κατά την καλλιέργεια των δημητριακών αν και δεν είναι απίθανο να παραχθεί και κατά τη διάρκεια της αποθήκευσής τους. (Scott, 1996;



Ryu et al., 2003; Jouany, 2007; Zinedine et al., 2007). Για την ανάπτυξη τους απαιτείται υψηλό ποσοστό υγρασίας, μέχρι 25% (Jimenez et al., 1996).

Μεταβολίτες της ζερεανόλης είναι η α-ζεραλενόνη, η οποία εντοπίζεται πιο συχνά σε συνθήκες μόλυνσης και η β-ζεραλενόνη και οι οποίοι προκύπτουν μετά από δράση των μικροοργανισμών της μεγάλης κοιλίας στα μηρυκαστικά. Οι μεταβολίτες αυτοί γενικά εμφανίζουν οιστρογονική δράση και προκαλούν διαταραχές στο γεννητικό σύστημα των ζώων.

### 1.7.3 Φουμονισίνες

Οι φουμονισίνες αποτελούν μία ομάδα χημικά και δομικά συγγενών μυκοτοξινών. Έχουν αναφερθεί 15 σε αριθμό διαφορετικές φουμονισίνες, οι οποίες ανιχνεύονται κυρίως στο καλαμπόκι και παράγονται κυρίως από τους μύκητες *Fusarium moniliforme* και *Fusarium proliferatum*. Αποτελούνται από μια μακρά υδροξυλιωμένη αλυσίδα υδρογονανθράκων η οποία διαθέτει αμινοομάδες και ομάδες μεθυλίου. Από αυτές, αυτές που ανιχνεύονται συχνότερα είναι οι φουμονισίνες B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub> και B<sub>3</sub> εκ των οποίων τη μεγαλύτερη τοξικότητα παρουσιάζει η φουμονισίνη B<sub>1</sub>. Είναι υδατοδιαλυτες ουσίες και παρουσιάζουν ανθεκτικότητα στα αλκάλια. Ο χημικός τύπος της φουμονισίνης B<sub>1</sub> είναι C<sub>34</sub>H<sub>59</sub>NO<sub>15</sub> και η σχετική μοριακή μάζα της είναι 721 g/mol. Η μυκοτοξίνη αυτή εμφανίζει χημική σταθερότητα στην επίδραση διαλύματος μεθανόλης. Επίσης, παραμένει ανθεκτική σε χαμηλές θερμοκρασίες (-18°C) ενώ σημειώνει σταδιακή μείωση σε θερμοκρασίες μεγαλύτερες από 25 °C.

Η τοξικότητα αυτών των μυκοτοξινών βασίζεται στην ικανότητα τους, να αναστέλλουν τη βιοσύνθεση των σφιγγολιπιδίων. Τα σφιγγολιπίδια είναι συστατικά των κυτταρικών μεμβρανών και μέσω της δράσης των φουμονισινών σε αυτά, προκαλείται καταστροφή των κυττάρων (Norred et al., 1992; Riley et al., 1993; Ramasamy et al., 1995; Constable et al., 2003). Ο Creppy το 2002 διατύπωσε την άποψη πως οι φουμονισίνες επιδρούν στα κύτταρα όλων των ιστών με εξαίρεση αυτά του εγκεφάλου. Επίσης, επιδρούν στις κυτοκίνες, επιδρώντας στο μεταβολισμό τους στα μακροφάγα, προκαλώντας έτσι ανοσοκαταστολή (Liu et al., 2002; Oswald et al., 2003).

Σε αυτή την κατηγορία μυκοτοξινών, μεγαλύτερη ευαισθησία εμφανίζει ο ίππος στον οποίο προκαλείται εγκεφαλομαλάκυνση (Dutton 1996; Norred et al., 1996). Έχουν παρατηρηθεί επιπλέον τοξικές επιδράσεις στους αρουραίους και στους χοίρους. Στον άνθρωπο έχει συσχετιστεί με πρόκληση καρκίνου τόσο στο ήπαρ (Ueno et al., 1997) όσο και στον οισοφάγο (Rheeder et al., 1992).

### 1.7.4 Αλκαλοειδή

Τα αλκαλοειδή παράγονται από τον μύκητα *Claviceps purpurea*, ο οποίος παρασιτεί στους καρπούς των αγρωστωδών όπως είναι η σίκαλη, η βρώμη και το σιτάρι. Έχουν αναγνωρισθεί 50 είδη αλκαλοειδών από τα οποία, τα περισσότερα προέρχονται από τροπικές περιοχές. Αποτέλεσμα της μακροχρόνιας έκθεσης στις μυκοτοξίνες της ομάδας

αυτής, είναι ο εργοτινισμός. Στον άνθρωπο εμφανίζεται με δύο μορφές, το γαγγραινώδη εργοτισμό όπου παρατηρείται οίδημα στα άκρα, γάγγραινα και θάνατος (King, 1979) και τον σπασμωδικό εργοτισμό με παραισθήσεις και παράλυση (Peraica et al., 1999).

### 1.7.5 Αφλατοξίνες

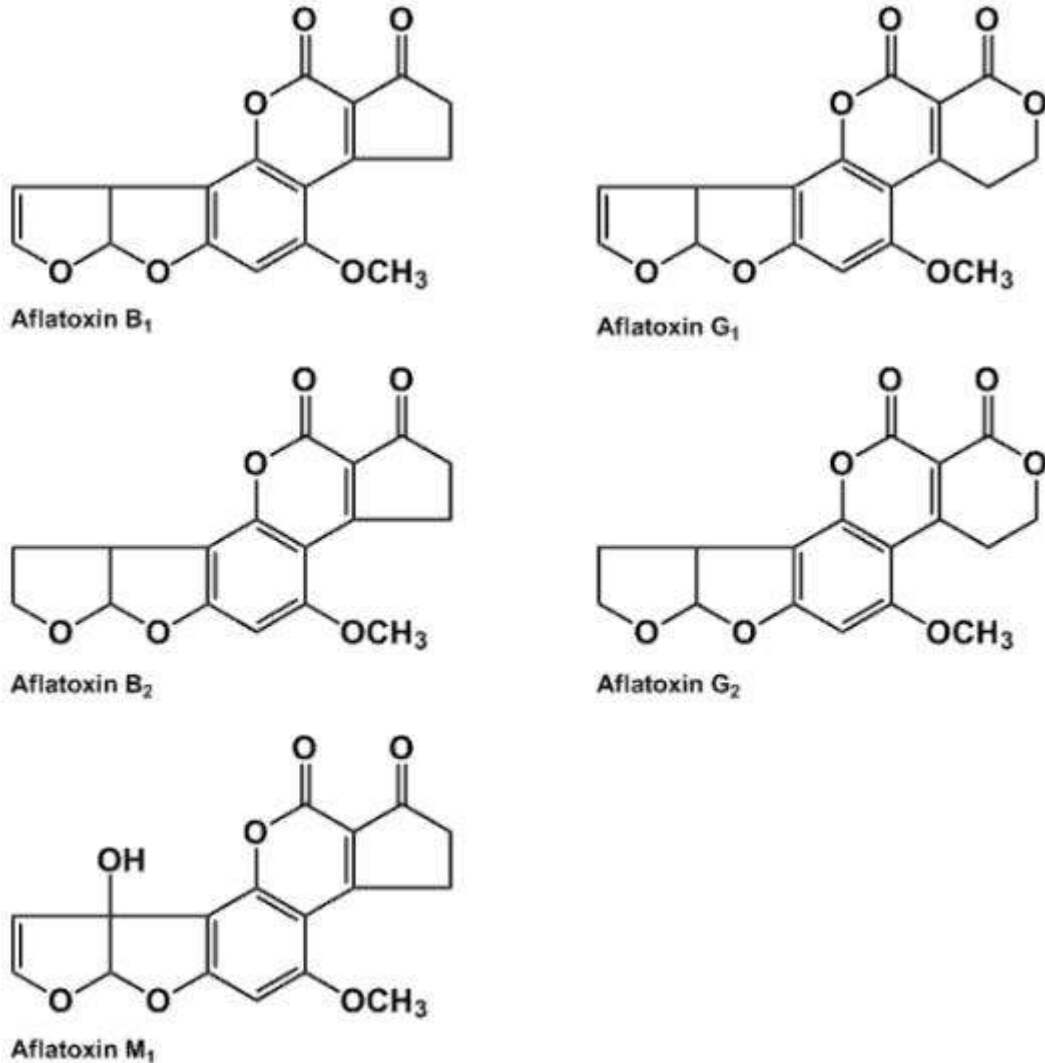
Οι αφλατοξίνες αποτελούν την ομάδα των μυκοτοξινών η οποία έχει ερευνηθεί περισσότερο. Η ύπαρξη της χρονολογείται στο 1960 στην Αγγλία, όπου σημειώθηκε ένα περιστατικό που αφορούσε την απώλεια πάνω από 100.000 γαλοπούλες οι οποίες είχαν καταναλώσει νωρίτερα μολυσμένες αραχίδες εισαγωγής από τις χώρες της Βορείου Αμερικής και της Αφρικής. Μετά από εργαστηριακό έλεγχο στα φιστίκια αυτά απομονώθηκε ο μύκητας *Aspergillus flavus* (Jay, 1996). Από το μύκητα αυτό έλαβαν και το όνομά τους [από το αρχικό α της λέξης *aspergillus* και από τα τρία πρώτα γράμματα της λέξης *flavus* (a+fla+toxin)]. Το ίδιο χρονικό διάστημα στις Η.Π.Α. σημειώθηκε και ένα περιστατικό με αυξημένα κρούσματα καρκίνου του ήπατος σε πέστροφες, η οποία στη συνέχεια αποδείχθηκε πως οφειλόταν σε μόλυνση τους από αφλατοξίνες, οι οποίες είχαν μόλυνει την τροφή των ψαριών αυτών (βαμβακόσπορος).

Οι αφλατοξίνες παράγονται κυρίως από δύο είδη μυκήτων, τον *Aspergillus flavus* και τον *Aspergillus parasiticus*. Τα είδη αυτά εμπλέκονται στον πρωτογενή αγροτικό τομέα, ενώ ο κύριος μύκητας στις μολυσμένες περιοχές είναι *A. flavus* (Payne & Brown, 1998). Ο *A. flavus* παράγει μόνο αφλατοξίνη Β, ενώ ο *A. parasiticus* παράγει αφλατοξίνες Β και G. Ωστόσο και οι δύο μπορούν να εμφανίσουν δράση σε φυτά, πριν να γίνει η συγκομιδή τους (Piener et al., 1987). Υπάρχουν κι άλλα είδη μυκήτων, όπως είναι ο *Aspergillus nomius*, ο *Aspergillus bombycis* ή ο *Aspergillus pseudotamari*, οι οποίοι έχουν την ικανότητα να παράγουν αφλατοξίνες ωστόσο είναι αποδεδειγμένο πως οι μύκητες αυτοί δεν αναπτύσσονται στα τρόφιμα και στις ζωοτροφές συχνά. Αυτό οφείλεται στο γεγονός πως υπάρχουν διαφορές στην ικανότητα παραγωγής αφλατοξινών μεταξύ των διαφορετικών στελεχών του ίδιου μύκητα. Από τους μύκητες του γένους *A. flavus*, για παράδειγμα, σχεδόν μόνο τα μισά του στελέχη εμφανίζουν την ιδιότητα να παράγουν αφλατοξίνες.

Είκοσι διαφορετικοί τύποι αφλατοξινών έχουν καταγραφεί. Από αυτούς, 4 κυρίως είναι οι τύποι που βρίσκονται συνήθως στα τρόφιμα και είναι οι αφλατοξίνες B1 (AFB1), B2 (AFB2), G1 (AFG1) και G2 (AFG2). Στις ζωοτροφές απαντάται συνηθέστερα η AFB1, η οποία είναι και η περισσότερη τοξική από όλες. Στα ζώα και στους υπόλοιπους ζωικούς οργανισμούς απομονώνεται η αφλατοξίνη M1 (AFM1).

Η ταξινόμηση τους γίνεται με βάση την χαρακτηριστική τους ιδιότητα, που είναι ο φθορισμός των διαλυμάτων τους όταν βρεθούν κάτω από υπεριώδη ακτινοβολία ( $\lambda_{\max}=365\text{nm}$ ). Ανάλογα με το χρώμα του φθορισμού που εμφανίζεται, προκύπτει και ο χαρακτηρισμός των αφλατοξινών με το γράμμα που ταξινομεί τις αφλατοξίνες σε Β και G. Οι αφλατοξίνες Β (B1, B2) εμφανίζουν γαλάζιο χρώμα φθορισμού κατά την ανίχνευση τους, χρησιμοποιώντας χρωματογραφία λεπτής στιβάδας (TLC). Με  $\lambda_{\max}$  425nm και το όνομα τους προήλθε από το Β, αρχικό γράμμα της λέξης Blue (γαλάζιο) ενώ οι αφλατοξίνες G (G1, G2) εμφανίζουν πράσινο χρώμα φθορισμού ( $\lambda_{\max}$  450 nm) και το όνομα τους προέκυψε από από το G, αρχικό γράμμα της λέξης Green (πράσινο).

Οι αφλατοξίνες AFB<sub>2</sub> και AFG<sub>2</sub> είναι τα υδροξυλιωμένα παράγωγα των AFB<sub>1</sub> και AFG<sub>1</sub>. Ο Troller, 1993 απέδειξε πως δεν παράγονται άμεσα από τους μύκητες, αλλά μόνο έμμεσα ως προϊόντα μεταβολισμού, στο πεπτικό σύστημα ανθρώπων και ζώων μετά από κατανάλωση μολυσμένων τροφών. Στο Σχήμα 1 που ακολουθεί απεικονίζονται σχηματικά οι χημικοί τύποι των διαφόρων αφλατοξινών.



**Σχήμα 1.** Χημικοί τύποι Αφλατοξινών

Αποτελούν ενώσεις κρυσταλλικές, που εμφανίζουν διαλυτότητα σε διαλύματα όπως η μεθανόλη, η ακετόνη, το χλωροφόρμιο, το ακετονιτρίλιο και το νερό. Παρουσιάζουν έντονο φθορισμό υπό την επίδραση του υπεριώδους φωτός, σε μήκος κύματος 365 nm. Απουσία φωτός εμφανίζουν εξαιρετική σταθερότητα ενώ είναι ιδιαίτερα θερμοανθεκτικές ακόμη και μετά από θέρμανση σε θερμοκρασίες πάνω από τους 100 °C. Οι επεξεργασίες που μπορεί να υποστούν τα τρόφιμα, όπως ο βρασμός, η ψύξη, η κατάψυξη, η παστερίωση και η ζύμωση δεν μπορούν να τις αδρανοποιήσουν (Izquierdo et al., 2005).

Ως προς τη χημική τους δομή, οι αφλατοξίνες αποτελούν παράγωγα της δι-φουροκουμαρίνης. Ο χημικός τους τύπος αποτελείται από ένα λακτονικό δακτύλιο που

εντοπίζεται στο ένα άκρο του μορίου τους. Ο φουρανικός δακτύλιος αυτός όταν βρεθεί σε αλκαλικό περιβάλλον παρουσιάζει μεγάλη ευαισθησία και προκαλείται διάσπαση του σε διάφορες άλλες ενώσεις που έχουν μικρότερη τοξική δράση. Με την προσθήκη νερού στο διπλό δεσμό του δακτυλίου και υπό την παρουσία ενός οξέος, οι αφλατοξίνες B1 και G1 μετατρέπονται σε αφλατοξίνες B2 και G2 αντίστοιχα.

Στο παρελθόν, υπήρχε η γνώμη πως οι αφλατοξίνες παράγονται κατά τη διάρκεια της αποθήκευσης αφού γινόταν η συγκομιδή των καρπών. Στη συνέχεια αποδείχθηκε πως η παραγωγή τους μπορεί να προκύψει και κατά τη διάρκεια της καλλιέργειας των φυτών στους αγρούς (Moss, 1989). Ωστόσο, οι υψηλότερες συγκεντρώσεις αφλατοξινών καταγράφονται, μετά τη συγκομιδή, σε ζωοτροφές που δεν έχουν συντηρηθεί σωστά. Να σημειωθεί πως η ανίχνευση των υπεύθυνων μυκήτων δεν σημαίνει αναγκαστικά και την παρουσία αφλατοξίνης, αφού χρειάζεται οι συνθήκες για να παραχθούν οι τοξίνες να είναι περισσότερο οριακές από αυτές που απαιτούνται για την ανάπτυξη μόνο του μύκητα και οι οποίες συνδέονται με στρεσογόνους παράγοντες.

Η ανάπτυξη των μυκήτων και συνεπώς και η παραγωγή των αφλατοξινών εξαρτάται από διάφορους παράγοντες όπως είναι η υγρασία, η θερμοκρασία, το οξυγόνο που υπάρχει διαθέσιμο αλλά και η ευαισθησία των φυτών. Η υγρασία παίζει τον πρωταρχικό ρόλο αφού η υψηλή υγρασία δημιουργεί κατάλληλο περιβάλλον για την ανάπτυξη των μυκήτων. Είναι αδύνατο, σε συνήθεις συνθήκες συντήρησης και αποθήκευσης των ζωοτροφών να εξασφαλιστούν συνθήκες που να αποτρέπουν την ανάπτυξη των μυκοτοξινών.

Οι ιδανικές θερμοκρασίες για την παραγωγή της AFB1 από τους μύκητες είναι οι 24-28 °C, ενώ για την παραγωγή της AFG1 είναι οι 30 °C. Ελάχιστη θερμοκρασία παραγωγής των αφλατοξινών είναι η θερμοκρασία των 12 °C, η μέγιστη στους 40-42 °C, ενώ η καταλληλότερη έχει αποδειχθεί πως είναι η θερμοκρασία των 27 °C. Οι μύκητες *A. flavus* και *A. parasiticus* χρειάζονται μεγάλο ποσοστό υγρασίας το οποίο ξεπερνάει ακόμη και το 85%. Περιοχές που εμφανίζουν υψηλά ποσοστά θερμοκρασίας και υγρασίας, όπως είναι οι τροπικές περιοχές, αποτελούν το καταλληλότερο περιβάλλον για την παραγωγή αφλατοξινών. Προϊόντα που ευνοούν την παραγωγή αφλατοξινών είναι ο βαμβακόσπορος, ο αραβόσιτος, οι αραχίδες και το ρύζι.

Αφού γίνει η κατανάλωση της μολυσμένης με αφλατοξίνες τροφής, ακολουθεί η απορρόφηση τους από το γαστρεντερικό σωλήνα, είσοδος των τοξινών στην κυκλοφορία του αίματος και τελικώς η κατανομή τους σε ιστούς και όργανα. Το ήπαρ είναι το όργανο στο οποίο οι αφλατοξίνες παρουσιάζουν τη μεγαλύτερη τοξική δράση. Στο μεταβολισμό των αφλατοξινών συμμετέχουν διάφορα ένζυμα όπως είναι το κυτόχρωμα P-450, η αναγωγή του κυτοχρώματος P-450, οι οξειδάσες και η φλαβοπρωτεΐνη. Με τη δράση της οξειδάσης του κυτοχρώματος, η AFB1 οξειδώνεται και προκύπτουν διάφοροι μεταβολίτες, όπως η αφλατοξίνη Q1 (AFQ1), η AFM1 και η AFB2 και οι οποίες είναι περισσότεροι υδατοδιαλυτές με αποτέλεσμα να απομακρύνονται ευκολότερα από τον οργανισμό. Επιπλέον, με τη δράση των ενζύμων του κυτοχρώματος P-450 προκύπτει μετατροπή της AFB1 σε 8, 9 εποξειδίου της AFB1. Το 8, 9 εποξειδίου της AFB1 διαφοροποιείται σε δύο ισομερή, το ένδο- και έξω-εποξειδίου, εκ των οποίων το έξω-εποξειδίου είναι το περισσότερο τοξικό και εμφανίζει δράση στα ηπατοκύτταρα. Ο μεταβολίτης αυτός έχει την ικανότητα να συνδέεται με τη γουανίνη του DNA και να οδηγεί σε καρκινογένεση ενώ μπορεί ακόμη να συνδεθεί και με πρωτεΐνες, όπως οι αλβουμίνες. Η τοξικότητα της AFB1 στους οργανισμούς έχει

σχέση με το ποσοστό της μετατροπής του 8, 9 εποξειδίου της αφλατοξίνης B<sub>1</sub> σε σχέση με την παραγωγή άλλων λιγότερο τοξικών μεταβολιτών. Η AFB<sub>1</sub> είναι η πιο δραστική ηπατοτοξίνη και εκδηλώνει μία ποικιλία από βιολογικές δράσεις, όπως η καρκινογένεση, η τερατογένεση και η μεταλλαξιογόνος ικανότητα σε διάφορα αγροτικά ζώα (Applebaum et al., 1982), ενώ η AFM<sub>1</sub> έχει ιδιαίτερα γενετοξική δράση αν και έχει θεωρηθεί 10 φορές λιγότερο καρκινογόνος τοξίνη σε σχέση με την AFB<sub>1</sub> (Lafont et al., 1989). Αρκετά συνήθης είναι και η εμφάνιση ηπατοκυτταρικού καρκινώματος (Diekman et al., 1992).

Οι αφλατοξίνες εμφανίζουν μεγάλη τοξικότητα και είναι σε θέση να προκαλέσουν καταστολή του ανοσοποιητικού συστήματος, μεταλλάξεις στο γονιδίωμα, καρκίνο του ήπατος και έχει συσχετισθεί και με άλλες ασθένειες, όπως η κίρρωση του ήπατος, η ηπατίτιδα Β και το σύνδρομο Reye. Έχουν πραγματοποιηθεί πολλές έρευνες σχετικά με την τοξική επίδραση των αφλατοξινών στον άνθρωπο και τα ζώα. Τα συμπτώματα από την τοξίκωση αυτή αναφέρθηκαν από τους Mayo, 1891 και Dalrymple, 1893 ενώ το 1928 χαρακτηρίστηκε από τον Schwarte ως «δηλητηρίαση από καλαμπόκι». Υπάρχουν διάφοροι παράγοντες που επηρεάζουν το βαθμό τοξικότητας των αφλατοξινών. Σε αυτούς συμπεριλαμβάνονται παράγοντες που αφορούν χαρακτηριστικά του ζώου όπως το είδος του ζώου, η ηλικία, το φύλο, η θρεπτική κατάσταση αλλά και χαρακτηριστικά της πρόσληψης όπως η ποσότητα των ζωοτροφών που καταναλώνουν αλλά και το συνολικό διάστημα πρόσληψης των ζωοτροφών (Diekman et Green, 1992; Hui et al., 2001).

Όσον αφορά τα ζώα συγκεκριμένα, η μόλυνση με αφλατοξίνες είναι πιθανό να έχει ως αποτέλεσμα την εμφάνιση διάφορων παθήσεων όπως: ανορεξία, καθυστέρηση ανάπτυξης, απώλεια βάρους, ίκτερο, νέκρωση του ήπατος, νεόπλασμα στο ήπαρ, διόγκωση της χοληδόχου κύστης, νεφροπάθεια, ανοσοκαταστολή, εσωτερικές αιμορραγίες, έλκη του εντέρου, μειωμένη γονιμότητα, αποβολές, αυξημένη θνησιμότητα, μείωση της γαλακτοπαραγωγής στα μηρυκαστικά, χαμηλό βάρος γέννησης των μοσχαριών και των αρνιών, μείωση της αυγοπαραγωγής αλλά και προβλήματα στην εκκολασιμότητα των αυγών, εμφάνιση αδυναμίας στα άκρα στα πουλικά αλλοιώσεις στο σφάγιο των πουλερικών που αφορούν κυρίως την εναπόθεση μελανίνης. Όλες αυτές οι καταστάσεις οδηγούν σε μειωμένη παραγωγή και συνεπώς και σε αυξημένες οικονομικές απώλειες στο ζωικό κεφάλαιο. Όσον αφορά τη δημόσια υγεία, το πρόβλημα από τις αφλατοξινώσεις των ζώων, έγκειται στην παραγωγή τροφίμων από αυτά τα ζώα τα οποία είναι μολυσμένα με αφλατοξίνες και εκθέτουν σε κίνδυνο τους καταναλωτές.

Κρούσματα με οξεία τοξίκωση εμφανίζονται στους ανθρώπους σπανιότερα και κυρίως στις αναπτυσσόμενες χώρες όπως είναι η Αφρική και η Ασία και προκύπτουν από την κατανάλωση δημητριακών και σιτηρών που είναι μολυσμένα με αφλατοξίνες. Συνηθέστερο είναι να εμφανίζονται οι χρόνιες μορφές των αφλατοξινώσεων που οφείλονται στην έκθεση σε χαμηλές συγκεντρώσεις αφλατοξινών για μεγάλα χρονικά διαστήματα. Οι καταστάσεις που μπορεί να έχουν σχέση με την επί μακρό χρονικό διάστημα έκθεση στις αφλατοξίνες, είναι οι χρόνιες ηπατίτιδες, η κίρρωση του ήπατος και ο καρκίνος του ήπατος. Ο καρκίνος του ήπατος στον άνθρωπο εμφανίζεται σε υψηλότερο ποσοστό σε περιοχές όπου οι συνθήκες του περιβάλλοντος επηρεάζουν θετικά την παραγωγή αφλατοξινών. Η καρκινογόνος δράση της AFB<sub>1</sub> έχει αποδειχθεί πως είναι περίπου 1000 φορές πιο ισχυρή από αυτή του βενζοπυρενίου, ενός

αρωματικού υδρογονάνθρακα που είναι το κύριο συστατικό του καπνού των τσιγάρων που οδηγεί σε μεταλλάξεις. Έχει αναφερθεί και συνεργική δράση των αφλατοξινών και της ηπατίτιδας Β (HBV) στην εμφάνιση του καρκίνου του ήπατος. Επίσης οι αφλατοξίνες μπορεί να συμβάλλουν και στην εμφάνιση διαφόρων παθολογικών καταστάσεων, όπως είναι η νόσος Kwashiorkor και το σύνδρομο Reyes.

Είναι αποδεδειγμένο πως η AFB<sub>1</sub> αλλά και η AFM<sub>1</sub> είναι πιθανόν να οδηγήσουν σε γονιδιακές βλάβες όπως σε βλάβη στη δομή του DNA, σε μετάλλαξη των γονιδίων, σε κυτταρική εξαλλαγή καθώς και σε χρωματοσωμικές ανωμαλίες. Έχει βρεθεί πως η αυτή δράση της AFM<sub>1</sub> είναι περιορισμένη σε σχέση με τη δράση της AFB<sub>1</sub>. Η δόση της AFB<sub>1</sub> που χρειάζεται κατ' ελάχιστο για να οδηγήσει σε καρκινογένεση έχει αποδειχθεί μετά από μελέτες σε πειραματόζωα πως αντιστοιχεί σε 0,1 μg/kg σωματικού βάρους ημερησίως και το όριο πρόσληψης από τον άνθρωπο ανά ημέρα έχει οριστεί στα 0,01 ng ανά κιλό σωματικού βάρους ανά ημέρα. Έχει βρεθεί πως η καρκινογόνος δράση της AFB<sub>1</sub> είναι περίπου 1000 φορές ισχυρότερη από αυτή του βενζοπυρενίου, ενός αρωματικού υδρογονάνθρακα που θεωρείται το πιο δραστικό μεταλλαξιογόνο συστατικό του καπνού των τσιγάρων (Cole & Cox, 1981). Επίσης, η AFB<sub>1</sub> έχει αποδειχθεί πως είναι τέσσερις φορές περίπου πιο τοξική από την AFB<sub>2</sub>.

Όσον αφορά την αφλατοξίνη M<sub>1</sub>, αυτή έχει εντοπιστεί σε μητρικό γάλα αιγοπροβάτων, αγελάδων, βουβάλων, καμηλών καθώς και στο ανθρώπινο (Galvano et al., 1996). Συγκεκριμένα στο ανθρώπινο μητρικό γάλα έχει βρεθεί σε αρκετά μεγάλες συγκεντρώσεις σε περιοχές με τροπικό και υποτροπικό κλίμα (El-Nezami et al., 1995; Saad et al., 1995; Galvano et al., 1996, Abdulrazzaq et al., 2003). Όπως προαναφέρθηκε ήδη, τα μηρυκαστικά με τη βοήθεια της μικροβιακής χλωρίδας των προστομάχων τους, διασπούν την AFB<sub>1</sub> που είναι ιδιαίτερα τοξική, σε ένα μεταβολίτη με μικρότερη τοξικότητα, την AFM<sub>1</sub>. Από τη συνολική ποσότητα της AFB<sub>1</sub> που υπάρχει στην τροφή, μόνο μια μικρή ποσότητα περνάει στο ζώο με την κατανάλωση της τροφής και στη συνέχεια στο γάλα με τη μορφή AFM<sub>1</sub>, που αντιστοιχεί σε 0.5 – 5% (Patterson et al., 1980). Επιπλέον, στις αγελάδες υψηλής γαλακτοπαραγωγής έχει καταγραφεί μεταφορά στο γάλα τους AFM<sub>1</sub> σε ποσοστό 6.2% κατά τη φάση της μέγιστης γαλακτοπαραγωγής. Η ποσότητα αυτή της μεταφοράς της AFM<sub>1</sub>, εξαρτάται από πολλούς παράγοντες όπως το είδος του ζώου, η παραγωγή του γάλακτος ημερησίως ενώ μπορεί να διαφέρει κι από ημέρα σε ημέρα ενώ διαφορά μπορεί να παρατηρείται και μεταξύ των αμέλξεων που πραγματοποιούνται κατά τη διάρκεια της ημέρας (Harris & Staples, 1992). Η σχέση μεταξύ της ποσότητας AFB<sub>1</sub> που προσλαμβάνει ένα ζώο με την κατανάλωση μολυσμένων ζωοτροφών και της ποσότητας AFM<sub>1</sub> που σχηματίζεται στο ήπαρ του, έχει αποδειχθεί πως είναι γραμμική (Dregacci et al., 1995).

Οι Miller & Wilson, 1994 ανέφεραν πως το πρόβατο αποτελεί το πιο ανθεκτικό είδος ζώου στη μόλυνση με μυκοτοξίνες. Ωστόσο ακολούθησαν μελέτες που έδειξαν πως μετά από χορήγηση μολυσμένων με αφλατοξίνες ζωοτροφών, τα αρνιά εμφάνισαν ηπατοξικότητα (Harvey et al., 1995) καθώς και αλλοιώσεις στους νεφρούς (Fernandez et al., 1997). Η μορφή εκτατικής εκτροφής των αιγών είναι συνήθης στη Μεσόγειο (Boyazoglou, 2002) και έχει σχέση με τη μικρή έκθεση τους σε αφλατοξίνες (Roussi et al., 2002). Σε αυτό οφείλεται η πιο υγιεινή εικόνα του αίγιου γάλακτος που προέρχεται από αίγες που εκτρέφονται εκτατικά σε περιοχές της Μεσογείου (Debeuf et al., 2004). Η ποσότητα της AFM<sub>1</sub> που ανευρίσκεται στο αίγιο γάλα, αντιστοιχεί σε ποσοστά 0,18%

και 3% από την συνολική ποσότητα της AFB1 που προσέλαβαν (Stoloff, 1980; Goto & Hsieh, 1985).

Όσον αφορά τα γαλακτοκομικά προϊόντα και τη μόλυνση τους με αφλατοξίνη M1, η εκτεταμένη κατανάλωση τους και οι ιδιότητες των αφλατοξινών όπως να παραμένουν σταθερές κατά την θερμική επεξεργασία, όπως παστερίωση και αποστείρωση καθώς και η υδατοδιαλυτότητα τους, είναι στοιχεία που οδηγούν σε αυξημένη πιθανότητα πρόκλησης τοξινώσεων από αυτά τα προϊόντα. Η υδατοδιαλυτότητα τους σχετίζεται με την δυνατότητα που τους προσδίδει να συνδέονται με τα υδρόφοβα τμήματα των καζεϊνών (Kaniou-Grigoriadou et al., 2005) και να επικρατούν στο μη λιπαρό κλάσμα του γάλακτος (Van Egmond & Panlsch, 1986). Αυτή η σύνδεση τους με την καζεΐνη, εξηγεί και την παρουσία τους στα γαλακτοκομικά προϊόντα (Montagna et al., 2008).

Όπως αναφέρθηκε και νωρίτερα, οι αφλατοξίνες είναι ιδιαίτερα θερμοανθεκτικές ενώσεις επομένως δεν καταστρέφονται ούτε και κατά τη διάρκεια των επεξεργασιών που υφίσταται το γάλα. Οπότε η AFM1 δεν καταστρέφεται κατά τη διάρκεια της ψύξης του γάλακτος ούτε κατά την παστερίωση ή οποιαδήποτε άλλη επεξεργασία του γάλακτος κατά την μετατροπή του σε γιαούρτη ή τυρί. Μελέτες έχουν δείξει πως η συγκέντρωση της AFM1 που ανιχνευόταν στο παστεριωμένο γάλα ήταν όμοια με αυτή που βρισκόταν στο νωπό γάλα που δεν είχε υποστεί παστερίωση και μετά από διάστημα 17 ημερών αποθήκευσης στους 3,89°C (Harris & Staples, 1992). Ανθεκτική στην παστερίωση έχει αποδειχθεί και η AFB<sub>1</sub> (Carvajal et al., 2003b). Έχει επιπλέον αποδειχθεί πως η παστερίωση του γάλακτος στους 62° C για 30 min, προκαλεί μείωση της συγκέντρωσης της AFM<sub>1</sub> σε ποσοστό 32% (Purchhase et al., 1972).

Στα τυριά η κύρια μυκοτοξίνη που εντοπίζεται είναι η αφλατοξίνη M1. Η ύπαρξη της σε αυτά είναι πιθανόν να σχετίζεται με γάλα μολυσμένο με αφλατοξίνη M1 που χρησιμοποιείται ως πρώτη ύλη και προέρχεται από ζώα που έχουν καταναλώσει μολυσμένες ζωοτροφές με αφλατοξίνη B1, δηλαδή «έμμεση μόλυνση». Μπορεί να οφείλεται στην παραγωγή αφλατοξινών B1, B2, G1 και G2 από τους μύκητες *A. flavus* και *A. parasiticus* και είδη του γένους *Penicillium* που αναπτύχθηκαν στο τυρί κατά τη διάρκεια παρασκευής, ωρίμανσης (Fox et al, 2004) και αποθήκευσης του υπό ψύξη, δηλαδή «άμεση μόλυνση». Έχει αποδειχθεί σε μελέτη του Bullerman et al., 1981 πως κατά την αποθήκευση τυριών υπό ψύξη, δηλαδή σε χαμηλές θερμοκρασίες, αναπτύσσονται κυρίως μύκητες του γένους *Penicillium*. Παρόλα αυτά έχει βρεθεί πως η ανάπτυξη τοξικών μυκήτων στα τυριά είναι σπάνια, ακόμη κι αν πρόκειται για τυριά στα οποία χρησιμοποιούνται μύκητες για την ωρίμανση τους (Scott, 1989). Τέλος, μπορεί να οφείλεται και σε μεταφορά της αφλατοξίνης M1 στο τυρί, από σκόνη γάλακτος που χρησιμοποιείται ως πρώτη ύλη και που είναι μολυσμένη με AFM1. Σε γαλακτοκομικά προϊόντα που υφίστανται ζύμωση, όπως είναι η γιαούρτη και το κεφίρ έχει βρεθεί πως προκύπτει μείωση της συγκέντρωσης της AFM1.

Η κατανάλωση γάλακτος αλλά και των προϊόντων του που είναι μολυσμένα με AFM1 είναι πιθανόν να οδηγήσει σε δυσμενείς επιπτώσεις για την ανθρώπινη υγεία. Το γάλα αποτελεί τη βασική τροφή των βρεφών και γενικά των νεαρών ατόμων, και η μόλυνση του με την αφλατοξίνη αυξάνει την επικινδυνότητα του καθώς τα παιδιά εμφανίζουν καθυστερημένη ανάπτυξη του ανοσοποιητικού τους συστήματος και μπορεί να προκαλέσει καθυστερημένη ανάπτυξη και νοητική στέρηση. Επιπλέον, έχει αποδειχθεί πως έχουν τη δυνατότητα να περνούν τον πλακούντα και να ενεργοποιούνται μέσα στη

μήτρα. Για να αποφευχθούν αυτές οι δυσμενείς επιπτώσεις, ιδιαίτερα στα παιδιά, έχουν θεσπιστεί τα μέγιστα επιτρεπτά όρια (MRLs) της AFM1 στο γάλα αλλά και της AFB1 στις ζωοτροφές σε διάφορες χώρες. Στα πλαίσια της Ευρωπαϊκής Ένωσης έχει θεσπιστεί για την AFM1 μέγιστο επιτρεπτό όριο στα 0,05 µg/kg στο νωπό γάλα, στο γάλα που έχει υποστεί θερμική επεξεργασία αλλά και στο γάλα που χρησιμοποιείται για την παρασκευή γαλακτοκομικών προϊόντων. Στα προϊόντα που περιέχουν γάλα και πρόκειται να καταναλωθούν από βρέφη, το μέγιστο επιτρεπτό όριο θέτεται στα 0,025 µg/kg σύμφωνα με τον Κανονισμό 1881/ 2006 ΕΚ. Για τις ζωοτροφές, η Νομοθεσία είναι λιγότερο αυστηρή και το όριο είναι στα 10 µg/kg για την παρουσία αφλατοξίνης B1 (EFSA 2004, EFSA 2009). Ωστόσο, παρά τους ελέγχους που πραγματοποιούνται και τα επίσημα όρια που έχουν θεσπιστεί, δύσκολα μπορεί να αποκλειστεί η επιβάρυνση του γάλακτος με αφλατοξίνη.

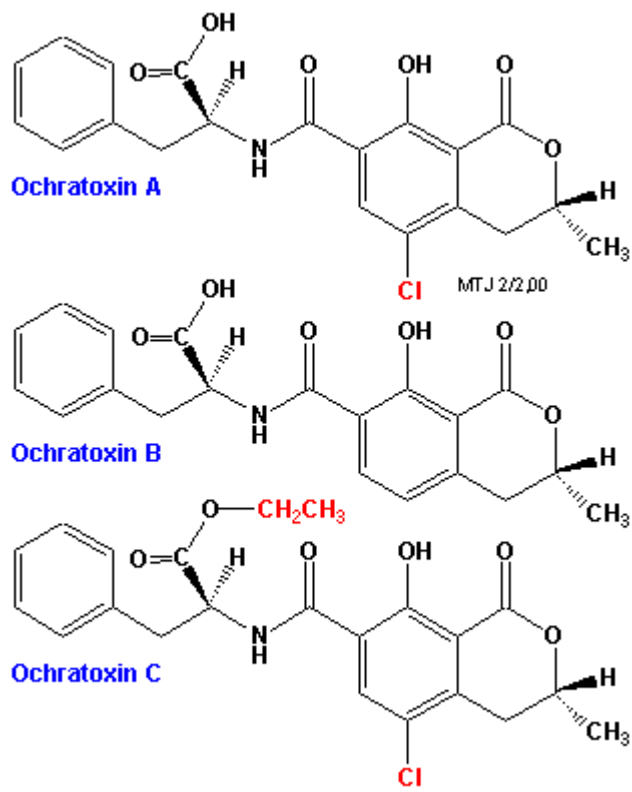
Η παρουσία της AFM1 δεν έχει ερευνηθεί τόσο εκτεταμένα στα υπόλοιπα τρόφιμα ζωικής προέλευσης όπως το κρέας, το αυγό και άλλα λόγω της επιστημονικής γνώσης πως στα μονογαστρικά ζώα αλλά και στα πουλερικά, οι υψηλότερες συγκεντρώσεις ανιχνεύονται στο ήπαρ και στους νεφρούς και όχι στους μύς, ενώ στα ζυμούμενα προϊόντα κρέατος η ανάπτυξη των μυκήτων *A.flavus* και *A.parasiticus* είναι αρκετά μικρή. Στα αυγά των πουλερικών οι αφλατοξίνες περνούν από τις τροφές και οι χήνες εμφανίζουν τις υψηλότερες συγκεντρώσεις στα αυγά τους με ποσοστό έως και 50%.

Ο διεθνής οργανισμός έρευνας για τον καρκίνο (International Agency for the Research of Cancer) έχει κατατάξει την AFB1 ως καρκινογόνο για τον άνθρωπο (κατηγορία 1) (Rosi et al., 2007) και την AFM1 ως πιθανό καρκινογόνο για τον άνθρωπο (κατηγορία 2b) (Cathey et al., 1994; Moss, 2002; Creppy, 2002) ενώ και η Ευρωπαϊκή Επιτροπή για τα Τρόφιμα (EET), στις 23 Σεπτεμβρίου 1994 διατύπωσε την άποψη πως είναι γονιδοτοξικά καρκινογόνα. Εξαιτίας της μεταβίβασης τους στα τρόφιμα και στον οργανισμό του ανθρώπου κατ'επέκταση, πιστεύεται πως είναι ικανές να επηρεάσουν την ανθρώπινη υγεία περισσότερο από όλες τις υπόλοιπες μυκοτοξίνες.

### 1.7.6 Ωχρατοξίνες

Στις μυκοτοξίνες ανήκουν και οι ωχρατοξίνες, οι οποίες ταξινομούνται σε τρεις τύπους Α, Β και C. Από αυτές, η πιο σημαντική είναι η ωχρατοξίνη Α (ΩΤΑ), καθώς θεωρείται ως η πιο τοξική και εντοπίζεται συχνότερα σε σχέση με τις ωχρατοξίνες Β και C. Εμφανίζεται συνήθως στο σίτο, στο καλαμπόκι, στη βρώμη, στον καφέ, στα φυστίκια, στα δημητριακά, στα ξηρά φρούτα, στα σταφύλια, στο κακάο (Dall'Asta et al., 2010), καθώς επίσης και σε κρέας ή τυρί που έχει παραχθεί από ζώα που έχουν καταναλώσει μολυσμένες τροφές. Η ονομασία της οφείλεται στο μύκητα *Aspergillus ochraceus*, από τον οποίο απομονώθηκε για πρώτη φορά το 1965 στη Νότιο Αφρική. Η ωχρατοξίνη Β (ΩΤΒ) είναι η απογλωρισμένο ανάλογο της ΩΤΑ και θεωρείται λιγότερο τοξική από την ΩΤΑ (Moss 1996). Στο Σχήμα 2 που ακολουθεί απεικονίζονται οι χημικοί τύποι των τριών τύπων ωχρατοξίνης.





Σχήμα 2. Χημικοί τύποι Ωχρατοξινών

## ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2

### ΩΧΡΑΤΟΞΙΝΗ Α (ΩΤΑ)

#### 2.1 Παραγωγή της ΩΤΑ

Η ΩΤΑ απομονώθηκε και χαρακτηρίστηκε χημικά, για πρώτη φορά, το 1965 στη Νότια Αφρική, σε ένα γεύμα με καλαμπόκι. Η ΩΤΑ [7-1-φαινυλαλανιλκαρβονιλ-5-χλώρο-8-υδρόξυ-3,4-διυδρο-3-*R*-μεθυλισοκουμαρίνη] παράγεται από διάφορους μύκητες που ανήκουν στα γένη *Aspergillus* (*A. ochraceus*, *A. alliaceus*, *A. awicomus*, *A. carbonarius*, *A. glaucus*, *A. malleus*, *A. sulphweus*, *A. sciendum*, *A. niger* κ.α.) και *Penicillium* (*P. verrucosum*, *P. nordicum*, *P. vindication*, *P. chrysogenum*). Οι μύκητες αυτοί αναπτύσσονται κυρίως κατά την αποθήκευση των δημητριακών καρπών. Η δυνατότητα παραγωγής ΩΤΑ εξαρτάται από τα στελέχη των μυκήτων. Έτσι, το 90% των απομονωθέντων στελεχών *A. niger* μπορεί να παράγει ΩΤΑ, ενώ για τον *P. verrucosum* αναφέρεται, ότι, το 74% των στελεχών που απομονώθηκαν στην Ευρώπη μπορεί να παράγει ΩΤΑ *in vitro*. Δυο, όμως, είναι τα κυριότερα είδη μυκήτων που απομονώνονται συχνότερα από τα τρόφιμα και τις ζωοτροφές και ενοχοποιούνται για την παραγωγή ΩΤΑ, οι *A. ochraceus* και *P. verrucosum*.

Ο *A. ochraceus* εντοπίζεται συνήθως σε τροπικά κλίματα και οι συνθήκες που ευνοούν την ανάπτυξη του είναι θερμοκρασία 12 έως 37 °C και Συντελεστή Ενεργού Ύδατος (ΣΕΥ) μέχρι 0,77. Ο *P. verrucosum* εντοπίζεται κυρίως στις ψυχρές κλιματικές ζώνες και αναπτύσσεται σε θερμοκρασίες 4 έως 31 °C και ΣΕΥ μέχρι 0,8. (Pittet 1998; Duarte et al., 2010a). Ο *A. ochraceus* μπορεί να αναπτυχθεί καλύτερα σε τρόφιμα, όπως φυστίκια και σόγια, ενώ η ανάπτυξη του *P. verrucosum* ευνοείται στο καλαμπόκι και τη βρώμη. (Pleadin et al., 2013).

Ο *A. ochraceus* ήταν ο πρώτος παραγωγός της ΩΤΑ που εντοπίστηκε. Η ΩΤΑ ανακαλύφθηκε για πρώτη φορά σε καλαμποκέλαιο το οποίο εμβολιάστηκε σκόπιμα με *A. ochraceus* (Van der Merwe et al., 1965). Στη συνέχεια, σε μια έρευνα που έγινε σχετικά με την εμφάνιση ΩΤΑ, από τα στελέχη που απομονώθηκαν από τις ζωοτροφές, τα 2 από τα 19 προϊόντα απομόνωσης του *Aspergillus niger* var. *niger* ήταν σε θέση να παράγουν ΩΤΑ όταν βρισκόταν σε μέσο το οποίο περιείχε 2% εκχύλισμα ζύμης και 15% ζωμό σακχαρόζης καθώς και σε καλλιέργειες αραβοσίτου. Αυτή ήταν η πρώτη αναφορά σχετικά με την παραγωγή ΩΤΑ από τον *A. niger* (Abarca et al., 1994). Επιπλέον, οι Teren et al., 1996 εξέτασαν 157 στελέχη που ανήκουν στο είδος *Aspergillus nigr* για παραγωγή ΩΤΑ. ΩΤΑ επίσης ανιχνεύθηκε και σε 5 από τα 12 διηθήματα καλλιέργειας των στελεχών *Aspergillus carbonarius*. Τα είδη *Aspergillus* που παράγουν ΩΤΑ, ο *A. carbonarius* και ο *A. niger* που παράγει ΩΤΑ σπανιότερα, αναπτύσσονται καλά ακόμα και σε υψηλές θερμοκρασίες και παράγουν χρωστικές υφές και σπόρια, καθιστώντας αυτά τα είδη ανθεκτικά στο υπεριώδες φως. Συνεπώς, ο *A. carbonarius* απαντάται συνήθως στα σταφύλια και σε παρόμοια φρούτα που ωριμάζουν στο φως του ήλιου και σε υψηλά επίπεδα θερμοκρασίας (Pitt et al., 2002). Η ικανότητα του *Aspergillus tubingensis* να παράγει ΩΤΑ και η επίδραση της ποικιλίας του σταφυλιού για την εμφάνιση μυκήτων που παράγουν ΩΤΑ στα σταφύλια περιγράφηκε για πρώτη

φορά το 2005 (Medina et al., 2005). Νέα είδη *Aspergillus* που παράγουν ΩΤΑ, όπως ο *A. Westerdijkiae* και ο *A. Steynii* απομονώθηκαν από τον καφέ, ανακαλύφθηκαν το 2004 (Frisvad et al., 2004). Επιπλέον, οι Samson et al., 2004 διαπίστωσαν την ύπαρξη νέων ειδών *Aspergillus* που παράγουν ΩΤΑ, τον *A. lacticoffeatus* και τον *A. sclerotioniger*, τα οποία επίσης απομονώθηκαν από τον καφέ.

Το 1969, οι Walbeek et al. απομόνωσαν ΩΤΑ από *Penicillium viridicatum*. Λόγω σημαντικών αναθεωρήσεων στην ταξινόμηση, ιδιαίτερα στο γένος *Penicillium* και με τις επακόλουθες δυσκολίες όσον αφορά στη σωστή ταξινόμηση, αυτή η ταυτότητα έχει αλλάξει με την πάροδο των ετών. Αρκετοί συγγραφείς επέστησαν την προσοχή στο γεγονός ότι τα προϊόντα απομόνωσης του *P. viridicatum*, όπως ορίστηκαν εκείνη την εποχή θα μπορούσαν τώρα πλέον να χωριστούν σε τρεις ομάδες, ανάλογα με τις διάφορες ιδιότητές τους, συμπεριλαμβανομένων των ρυθμών ανάπτυξης, παραγωγής των μυκοτοξινών και της πηγής παραγωγής τους (Ciegler et al., 1973; Samson et al., 2004). Τα προϊόντα απομόνωσης του *P. viridicatum* που ανήκουν στην ομάδα I, αναπτύσσονται γρήγορα και έχουν αρχικά ένα φωτεινό πράσινοκίτρινο φθορισμό και στην συνέχεια με την πάροδο του χρόνου αποκτούν σκούρο πράσινο χρώμα. Απομονώνονται κυρίως από μουχλιασμένους κόκκους αλλά δεν έχει βρεθεί ότι παράγουν ΩΤΑ ή κιτρινίνη (CIT). Τα προϊόντα απομόνωσης του *P. viridicatum* που ανήκουν στην ομάδα II αναπτύσσονται αργά και έχουν χρώμα κιτρινοπράσινο πάντοτε. Απομονώνονται από διάφορες φυτικές πηγές και παράγουν τόσο ΩΤΑ όσο και κιτρινίνη. Τα στελέχη του *P. viridicatum* της ομάδας III αναπτύσσονται μέτρια και γίνονται καφέ με το πέρασ του χρόνου. Προέρχονται από κρέας ή φυτά σε συσκευασμένα κρεατοσκευάσματα στην Ευρώπη. Αυτά τα τελευταία προϊόντα απομόνωσης παράγουν ΩΤΑ αλλά δεν έχει βρεθεί ότι παράγουν κιτρινίνη. Η ταξινόμηση των *P. viridicatum* και *P. verrucosum* έχει αναθεωρηθεί για να αποσαφηνιστεί η σύγκρουση σχετικά με τρεις ομάδες του *P. viridicatum* όπως καθορίστηκε από τους Ciegler et al. το 1973. Το συμπέρασμα είναι ότι το η ομάδα II του *P. viridicatum* αντιστοιχεί στο *P. verrucosum* και όχι στο *P. viridicatum*, όπως υποδεικνύεται από τον Pitt, 1979. Μεταξύ των υποειδών του *Penicillium*, μόνο το *P. verrucosum* είναι γνωστό ότι παράγει ΩΤΑ. Το κύριο τρόφιμο στο οποίο αναπτύσσεται το *P. verrucosum* φαίνεται να είναι τα δημητριακά που αναπτύσσονται σε ψυχρές εύκρατες ζώνες, κατά μήκος της Βόρειας και Κεντρικής Ευρώπης και του Καναδά (Pitt et al., 2002). Το 2001, προσδιορίστηκε και επιβεβαιώθηκε το *Penicillium nordicum* ως το δεύτερο είδος *Penicillium* που παράγει ΩΤΑ μαζί με το *P. verrucosum* (Larsen et al., 2001). Παρά την κοινή τους ικανότητα να παράγουν ΩΤΑ, οι Larsen et al., 2001 υποστήριξαν ότι τα δύο είδη διαφέρουν μεταξύ τους με ποικίλους τρόπους. Οι περιπτώσεις απομόνωσης ΩΤΑ από προϊόντα φυτικής προέλευσης, σχεδόν πάντα μολύνονται από *P. verrucosum*, ενώ η παραγωγή ΩΤΑ σε κρέας ή τυρί προέρχεται από μύκητες τους είδους *P. nordicum*. Υπό εργαστηριακές συνθήκες, το *P. nordicum* παράγει περισσότερη ΩΤΑ από τα στελέχη του *P. verrucosum* (Larsen et al., 2001 ; Bogs et al., 2006). Στον πίνακα 2 που ακολουθεί αναγράφονται τα είδη *Aspergillus* και *Penicillium* που είναι σε θέση να παράγουν ΩΤΑ στα διάφορα τρόφιμα.

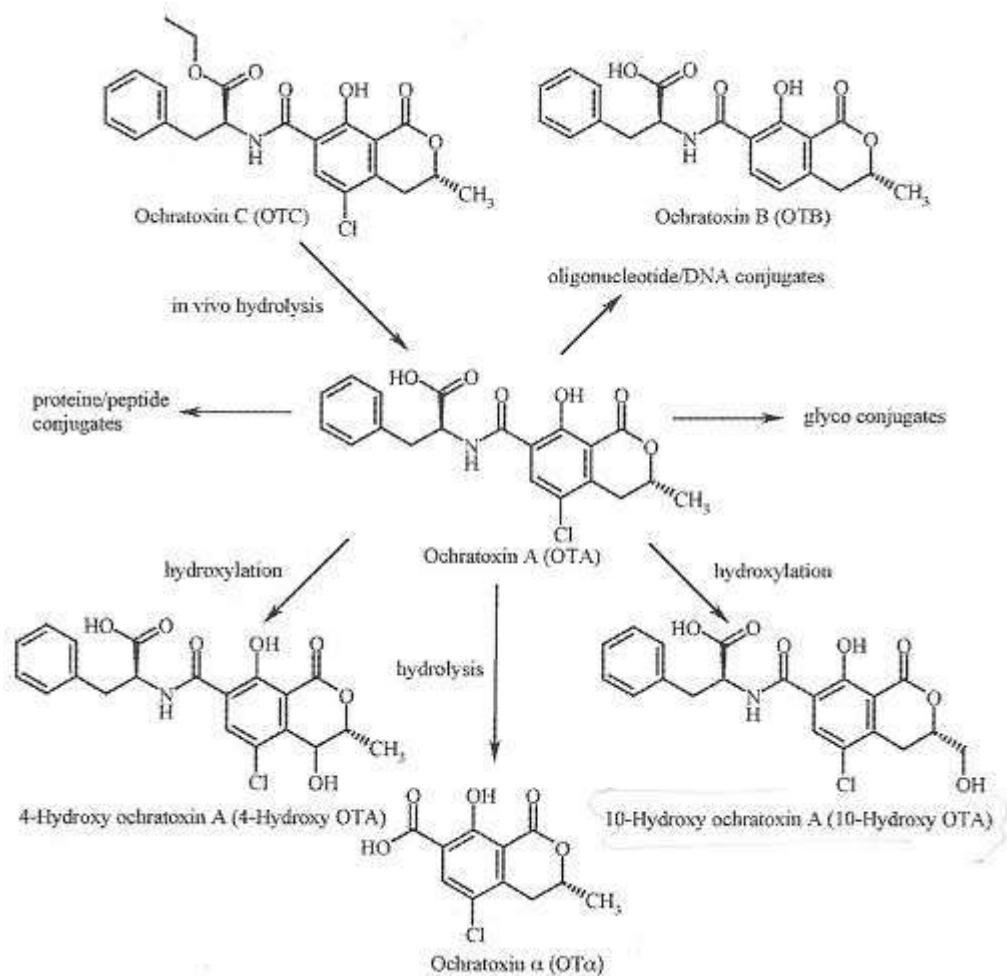
**Πίνακας 2.** Είδη μυκήτων που παράγουν ΩΤΑ σε διάφορα τρόφιμα

Γένος	Είδος	Τρόφιμο	Έτος ανακάλυψης	Συγγραφείς
<i>Aspergillus</i>	<i>A. ochraceus</i>	Σόγια, καρύδια, κόκκινη πιπεριά, δημητριακά, κόκκοι πράσινου καφέ	1965	G. Wilh.
	<i>A. steynii</i>	κόκκοι καφέ	2004	Frisvad & Samson
	<i>A. westerdijkiae</i>	κόκκοι καφέ	2004	Frisvad & Samson
	<i>A. carbonarius</i>	Σταφύλια, κόκκινη πιπεριά, δημητριακά, κόκκοι καφέ	1996	Thom
	<i>A. foetidus</i>	Σταφύλια	1996	Thom & Raper
	<i>A. lacticoffeatus</i>	κόκκοι καφέ	2004	Frisvad & Samson
	<i>A. niger.</i>	Σταφύλια, φυστίκια	1994	Tiegh
	<i>A. sclerotiumniger</i>	κόκκοι καφέ	2004	Frisvad & Samson
	<i>A. tubingensis</i>	Σταφύλια	2005	Mosseray
<i>Penicillium</i>	<i>P. verrucosum</i>	Δημητριακά	1969	Dierckx
	<i>P. nordicum</i>	Χοιρομήρι ωρίμανσης, σαλάμι	2001	Dragoni & Marino

## 2.2 Χημικές και Φυσικές Ιδιότητες της ΩΤΑ

Οι χημικές και φυσικές ιδιότητες της ΩΤΑ περιγράφηκαν εκτενώς από τον Budavari, 1989 και από τον IARC, 1993 ενώ πρόσφατη αναθεώρηση τους έγινε λεπτομερώς από τους Khoury & Atoui, 2010. Το σημείο τήξης της προσδιορίστηκε στους 169°C από τους van der Merwe et al., 1965 και τους Kuiper-Goodman & Scott, 1989. Η ΩΤΑ είναι μια ένωση φαινυλαλανίνης - κουραμίνης με διπλό αμιδικό δεσμό. Ο χημικός της τύπος είναι C<sub>20</sub>H<sub>18</sub>CINO<sub>6</sub> (Σχήμα 2). Το μοριακό της βάρος αντιστοιχεί σε 403,82 g/mol.

Δομικά, οι τρεις τοξίνες διαφέρουν ελαφρώς μεταξύ τους, με αυτές τις μικρές διαφορές να προκαλούν ελάχιστες διαφορές στην τοξικότητα της κάθε ωχρατοξίνης. Από τις ωχρατοξίνες αυτές, πιο σημαντική θεωρείται η ΩΤΑ, καθώς είναι αυτή που απαντάται συχνότερα αλλά είναι και η περισσότερο τοξική. Όπως απεικονίζεται και στο σχήμα 2, από την αντικατάσταση του χλωρίου με ένα άτομο υδρογόνου προκύπτει η ΩΤΒ. Έχει αποδειχθεί πως η ΩΤΒ είναι 10 έως 20 φορές λιγότερο τοξική συγκριτικά με την ΩΤΑ. Η διαφορά της με τις άλλες ωχρατοξίνες είναι το ένα άτομο χλωρίου που διαθέτει η ΩΤΑ στη θέση C5 του δακτυλίου της κουραμίνης. Η καρβοξυλική ομάδα της φαινυλανίνης παραμένει αδέσμευτη, με αποτέλεσμα η ΩΤΑ να αποτελεί ένα ασθενές οξύ (pKa=7,1). Επιπρόσθετες αλλαγές στη δομή, οδηγούν στην παραγωγή της ωχρατοξίνης C (ΩΤC), η οποία σε αντίθεση με τις άλλες δύο, δεν εμφανίζει τοξική δράση (Σχήμα 3). Ωστόσο, σύμφωνα με μια μελέτη που δημοσιεύτηκε, αναφέρεται η ΩΤC να είναι η πλέον τοξική μεταξύ των τριών, στην κυτταρική σειρά THP-1 από ανθρώπινα μονοκύτταρα (Lombaert et al., 2003).



**Σχήμα 3.** Στάδια μετατροπής της ωχρατοξίνης.

Η ΩΤΑ είναι μια άχρωμη κρυσταλλική ένωση, μερικώς διαλυτή σε οργανικούς διαλύτες, όπως το χλωροφόρμιο, η αιθανόλη, η μεθανόλη, η ξυλένη και το ακετονιτρίλιο (WHO, 1990), ενώ το άλας της με νάτριο είναι διαλυτό στο νερό. Επίσης, είναι εξαιρετικά ασταθής στην επίδραση του φωτός, με αποτέλεσμα να αποδομείται ακόμα και μετά από σύντομη έκθεση στο φως, ιδιαίτερα σε συνθήκες αυξημένης υγρασίας, ενώ είναι σχετικά σταθερή στη θέρμανση (Müller, 1982), αλλά οξονόλυση της σε υδατικά της διαλύματα είναι ιδιαίτερα αποτελεσματική στη καταστροφή της. Η αποικοδόμηση της ΩΤΑ εκτελέστηκε μετά από επεξεργασία με περίσσεια διαλύματος υποχλωριώδους νατρίου (Castegnaro et al., 1991). Δεν αλλοιώνει τα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά των τροφίμων.

### 2.3 Μεταβολισμός και Τοξικοκινητική της ΩΤΑ

Η σημαντικότητα της επίδρασης των μυκοτοξινών διαφέρει μεταξύ των ζωικών οργανισμών και εξαρτάται από διάφορους παράγοντες όπως η έκταση της μόλυνσης, ο ρυθμός απορρόφησής των μυκοτοξινών από τον οργανισμό, η κατανομή, η σύνδεση και η εντόπισή τους σε διάφορους ιστούς καθώς και η «βιομετατροπή» και η αποβολή τους

από τον οργανισμό. Η συμβολή των παραπάνω παραγόντων επηρεάζεται από τις φυσικές και χημικές ιδιότητες των ωχρατοξινών και από την αλληλεπίδρασή αυτών με τους διάφορους ιστούς, οι οποίοι έχουν την ικανότητα να μεταβολίζουν και να απομακρύνουν τις τοξίνες αυτές.

Μετά την κατανάλωση μολυσμένης τροφής, η ΩΤΑ απορροφάται βραδέως από την πρόσθια μοίρα του λεπτού εντέρου. Αυτό δεν συμβαίνει στα μηρυκαστικά εξαιτίας της δράσης της χλωρίδας της μεγάλης κοιλίας, η οποία διασπά τον αμιδικό δεσμό της ΩΤΑ και σχηματίζει φαινυλανίνη και ένα μη τοξικό μεταβολίτη, την ωχρατοξίνη α. Στη συνέχεια, μετά την απορρόφηση της στο λεπτό έντερο, εισέρχεται στη συστηματική κυκλοφορία του οργανισμού και εκεί μπορεί να συνδέεται με τις πρωτεΐνες του ορού και κυρίως με τις αλβουμίνες, με διάφορα μακρομόρια. Συσσωρεύεται κυρίως στους νεφρούς αλλά και σε μικρότερες συγκεντρώσεις στο ήπαρ, στο μυϊκό ιστό αλλά και στο λιπώδη ιστό.

Όσον αφορά τον χοίρο η ικανότητα σύνδεσης της ΩΤΑ, μπορεί να φθάσει έως και το 99% της ολικής συγκέντρωσης της ΩΤΑ. Παρόλη την υψηλή ικανότητα σύνδεσης της ΩΤΑ που παρατηρείται στο χοίρο, στα ερυθροκύτταρα του ανιχνεύονται συνήθως μόνο ίχνη της τοξίνης. Λόγω της σύνδεσης της με τις πρωτεΐνες του ορού ο χρόνος που απαιτείται για την απομάκρυνση της ποικίλλει ευρύτατα στα διάφορα είδη ανάλογα με το είδος και την έκταση της σύνδεσης. Επίσης, η ΩΤΑ έχει αυξημένη ημιπερίοδο ζωής (LD50) στον ορό διαφόρων θηλαστικών, πλην των μηρυκαστικών ζώων και αυτό οφείλεται στην σύνδεση της με τις πρωτεΐνες του ορού ενώ και ο χρόνος μέχρι την απομάκρυνση της από τον οργανισμό, ποικίλλει στα διάφορα είδη και εξαρτάται από το είδος και την έκταση της σύνδεσης. Ο μεταβολισμός της είναι μικρός και γίνεται στους νεφρούς και σε μικρότερο βαθμό στο ήπαρ των οργανισμών.

Συνολικά η απορρόφηση της τοξίνης στους χοίρους φτάνει το 66%, με τη μέγιστη απορρόφηση να παρατηρείται στο λεπτό έντερο και κυρίως στην αρχική μοίρα της νήστιδας. Η ΩΤΑ που έχει συνδεθεί με τις αλβουμίνες του ορού, μπορεί για μεγάλο χρονικό διάστημα να απελευθερώνεται στην κυκλοφορία και στη συνέχεια να συσσωρεύεται σε διάφορους ιστούς. Η μέγιστη συγκέντρωση της στον ορό του αίματος μπορεί να ανιχνευθεί μετά από 10-48 ώρες, όταν η πρόσληψη της γίνει από τη στοματική οδό ενώ ο χρόνος ημίσειας ζωής της στον ορό του αίματος είναι 72-120 ώρες. Στον άνθρωπο το μεγαλύτερο LD50 της ΩΤΑ αντιστοιχεί σε 840 ώρες και στον χοίρο σε 120 ώρες. Η απομάκρυνση της ΩΤΑ από την κυκλοφορία του αίματος έχει βρεθεί πως είναι καθυστερημένη σε σχέση με την αντίστοιχη στους νεφρούς, στο ήπαρ και στους άλλους ιστούς. Η συνεχής χορήγηση ΩΤΑ για διάστημα 3 εβδομάδων με την τροφή οδηγεί σε σταθερή συγκέντρωση της ωχρατοξίνης στο αίμα. Ο μεταβολισμός της τοξίνης στους ιστούς των θηλαστικών είναι ιδιαίτερα μικρός και μόνο ένα μικρό μέρος της οξειδώνεται και προκύπτουν οι μεταβολίτες 4R ή 4S - υδροξυωχρατοξίνης Α. Μέρος στην οξείδωση αυτή λαμβάνει το κυτόχρωμα P 450.

Μετά από κατανάλωση της με την τροφή απορροφάται βραδέως από την πρόσθια μοίρα του λεπτού εντέρου. Φτάνοντας στη συστηματική κυκλοφορία συνδέεται με τις πρωτεΐνες του ορού και κυρίως με τις αλβουμίνες, ενώ είναι δυνατό να συνδεθεί και με άλλα μακρομόρια. Στο χοίρο η δυνατότητα σύνδεσης μπορεί να φθάσει έως και το 99% της συνολικής συγκέντρωσης ΩΤΑ. Ωστόσο, στα ερυθροκύτταρα των χοίρων συνήθως ανιχνεύονται μόνο ίχνη της. Λόγω της σύνδεσης της με τις πρωτεΐνες του ορού, ο

χρόνος που απαιτείται για την απομάκρυνση της ποικίλλει ευρύτατα στα διάφορα είδη ανάλογα με το είδος και την έκταση της σύνδεσης. Έτσι, η ΩΤΑ έχει αυξημένη ημιπερίοδο ζωής (LD50) στον ορό διαφόρων θηλαστικών, εκτός των μηρυκαστικών ζώων. Μετά από χορήγηση ΩΤΑ από το στόμα οι μέγιστες συγκεντρώσεις της στον ορό του αίματος ανιχνεύονται μετά από 10-48 ώρες, ενώ ο χρόνος ημίσειας ζωής της στον ορό είναι 72-120 ώρες και συγκεκριμένα ο μεγαλύτερος LD50 της ΩΤΑ αναφέρεται για τον άνθρωπο 840 ώρες και το χοίρο 120 ώρες και η αποβολή της από το αίμα είναι βραδύτερη σε σύγκριση με τους νεφρούς, το ήπαρ και άλλους ιστούς. Η τοξίνη μεταβολίζεται ελάχιστα στους ιστούς των θηλαστικών και μόνο μια μικρή ποσότητά της μετατρέπεται με οξείδωση σε μεταβολίτες 4R ή 4S - υδροξυωχρατοξίνης Α. Στις οξειδωτικές αυτές διεργασίες εμπλέκεται το κυτόχρωμα P 450. Μεταβολίζεται σε μικρό βαθμό και συσσωρεύεται κυρίως στους νεφρούς, αλλά και στο ήπαρ.

Ο κίνδυνος είναι περιορισμένος στα μηρυκαστικά, γιατί λόγω της δράσης της μικροχλωρίδας της μεγάλης κοιλίας η ΩΤΑ υδρολύεται σε φαινυλαλανίνη και ωχρατοξίνη α, που γενικά θεωρείται μη τοξική (Karlovsky, 1999). Μεταξύ των εκτρεφόμενων ζώων οι χοίροι είναι ιδιαίτερα ευαίσθητοι στη πρόσληψη της ΩΤΑ και οι υψηλότερες συγκεντρώσεις εντοπίζονται στο αίμα, στους νεφρούς, στο ήπαρ, στους μύες και στο λίπος (Lusky et al., 1993; Gareis & Scheuer, 2000). Για το λόγο αυτό, από τα τρόφιμα ζωικής προέλευσης το χοιρινό κρέας, τα προϊόντα του και ιδιαίτερα αυτά που περιέχουν αίμα και νεφρούς χοίρου είναι η σημαντικότερη πηγή μόλυνσης του ανθρώπου από την τοξίνη (Frank, 1991; Gareis & Scheuer, 2000; JECFA 2001; Matrella et al., 2006).

Η απέκκριση της ωχρατοξίνης πραγματοποιείται από τη χολή και τους νεφρούς. Στους τελευταίους, μόνο το μη συνδεδεμένο τμήμα της τοξίνης μπορεί να περάσει τη σπειραματική διήθηση ενώ υπάρχει η πιθανότητα να σημειωθεί επαναπορρόφηση της τοξίνης στα εγγύς σπειροειδή σωληνάκια. Με αυτό τον τρόπο προκαλείται συσσώρευση της τοξίνης και αργή αποβολή της. Η συμμετοχή της κάθε πιθανής οδού στην απέκκριση της ΩΤΑ εξαρτάται από το μέγεθος της σύνδεσης της ωχρατοξίνης με τα διάφορα μόρια του ορού του αλλά και από τις διαφορές που παρουσιάζονται κατά την εντεροηπατική κυκλοφορία της.

Στα τρωκτικά μόνο έχει αποδειχθεί πως η ΩΤΑ περνά διαμέσω του πλακούντα (WHO/FAO, 2001δ). Σε μία μελέτη όπου χορηγήθηκε ΩΤΑ σε έγκυες σύες σε ποσότητα 380 μg/kg σωματικού βάρους, αρχίζοντας από την 21η-28η ημέρα της κυοφορίας είτε ποσότητα 7-16 μg/kg σωματικού βάρους ΩΤΑ καθόλη τη διάρκεια της εγκυμοσύνης, δεν αποδείχθηκε η ικανότητα της ΩΤΑ να περνά μέσω του πλακούντα, ενώ κατάλοιπα της τοξίνης δεν βρέθηκαν ούτε στους ιστούς των χοιριδίων. Σε αντίθεση με αυτό, σε άλλη μελέτη όπου χορηγήθηκε ΩΤΑ μέσω της τροφής τους, σε έγκυες σύες, ανιχνεύθηκε η ενδομήτρια μεταφορά της ΩΤΑ και στο αίμα των χοιριδίων.

Τέλος, είναι δυνατόν να παρατηρηθεί εκτόπιση της ΩΤΑ από τη σύνδεσή της με τις αλβουμίνες του ορού, από άλλες ουσίες με μεγαλύτερη ικανότητα σύνδεσης με τις πρωτεΐνες του ορού, τα λεγόμενα «ξеноβιοτικά» και στις οποίες περιλαμβάνονται άλλες μυκοτοξίνες καθώς και διάφορες φαρμακευτικές ουσίες.

## 2.4 Τοξικότητα της ΩΤΑ

Η ΩΤΑ χαρακτηρίστηκε το 1993 από τον IARC (International Agency for Research on Cancer, Διεθνής Οργανισμός για Έρευνα στον Καρκίνο) ως καρκινογόνο κατηγορίας 2B για τον άνθρωπο. Η ευαισθησία στην εμφάνιση του καρκίνου είναι εξαρτώμενη από το είδος και το φύλο. (Castegnaro et al., 1998; Pfohl-Leszkowicz et al., 2007; Malir et al., 2013). Πολλές έρευνες επίσης έχουν δείξει ότι έχει τερατογόνο, νευροτοξική, γενοτοξική, ανοσοκατασταλτική και νεφροτοξική δράση (IARC 1993 Moss 2000; JEFCA 2001; Schaaf et al., 2002; Luhe et al., 2003; Alvarez et al., 2004; Lioi et al., 2004; Matrella et al., 2006). Η ΩΤΑ έχει επίσης εμπλακεί στα αιτία μιας νόσου γνωστή ως Ενδημική Νεφροπάθεια των Βαλκανίων (Balkan Endemic Nephropathy, BEN) που χαρακτηρίζεται από προοδευτική ίνωση των νεφρών και όγκους της ουροποιητικής οδού σε ανθρώπους που ζουν στα Βαλκάνια κυρίως στην Βουλγαρία, Γιουγκοσλαβία και Ρουμανία (IARC 1993; Matrella et al., 2006; Pfohl-Leszkowicz et al., 2006), ενώ νέοι μύκητες βρέθηκαν να εμπλέκονται στην αιτιολογία της BEN (Stoen, 2017). Η σημασία της ΩΤΑ για τη δημόσια υγεία αναγνωρίζεται ολοένα και περισσότερο τα τελευταία χρόνια. Είναι χαρακτηριστικό ότι σε αρκετές έρευνες αποδείχθηκε η παρουσία της ΩΤΑ σε δείγματα αίματος ανθρώπων, στο μητρικό γάλα αλλά και σε ανθρώπινους νεφρούς (Bauer et al., 1986; Frohlich et al., 1991; Creppy et al., 1993; Ueno et al., 1998).

Η ΩΤΑ έχει νεφροτοξική, ανοσοκατασταλτική, τερατογόνο, μεταλλαξιογόνο και καρκινογόνο δράση στα ζώα αλλά και στους ανθρώπους. Η τοξικότητα της ΩΤΑ στους διάφορους οργανισμούς οφείλεται στην ικανότητα της να προκαλεί νέκρωση και υπερπλασία των νεφρικών κυττάρων, να αναστέλλει τη διαδικασία της οξειδωτικής φωσφορυλίωσης στα μακροφάγα, να ελαττώνει τη σύνθεση πρωτεϊνών, να αυξάνει τον αριθμό των υπεροξειδίων των λιπιδίων και των ελεύθερων ριζών οξυγόνου, καθώς επίσης και να διαταράσσει το μεταβολισμό του σίδηρου, με αποτέλεσμα την αναστολή παραγωγής ένζυμων που είναι απαραίτητα για τις φυσιολογικές λειτουργίες των κυτταρικών μεμβρανών. Επιπλέον, συμβάλλει στην ενεργοποίηση της δράσης ενζύμων, όπως τα CYP1A2, CYP2C9, CYP3A4 και πιθανώς το CYP1B1 καθώς και στην κυκλοοξυγενάση και στη λιποοξυγενάση, οι οποίες είναι ικανές να δημιουργήσουν βλάβη στο DNA των κυττάρων.

Κατά την οξεία τοξίκωση από ΩΤΑ, τα όργανα των διαφόρων οργανισμών εμφανίζονται αιμορραγικά, με εναποθέσεις ινικής σε όργανα όπως ο σπλήνας, το ήπαρ, ο εγκέφαλος, οι νεφροί και η καρδιά. Επίσης εντερίτιδες και νεκρώσεις σε ήπαρ, νεφρούς και λεμφοειδείς ιστούς εμφανίζονται σε αυτό το είδος της τοξίκωσης.

Στην υποξεία και χρόνια τοξίκωση από ΩΤΑ στα διάφορα είδη ζώων εμφανίζεται νεφροπάθεια, με τον χοίρο να αποτελεί το ζώο με τη μεγαλύτερη ευαισθησία στην πρόκληση νεφροπάθειας μετά από χρόνια δράση της ΩΤΑ. Σε δόση 1 mg/kg σωματικού βάρους η ΩΤΑ έχει θανατηφόρο δράση στους χοίρους μετά από συνεχή χορήγηση για διάστημα 5-6 ημερών. Επιπρόσθετα, παρατηρείται καταστροφή των εγγύς σπειροειδών σωληναρίων του νεφρού σε περιπτώσεις ωχρατοξίνωσης, ενώ έχει αναφερθεί πως μετά από χορήγηση ΩΤΑ σε ποσότητα 1 ppm για διάστημα 3 μηνών σε χοίρους, οδηγεί σε πολυδιψία, πολουρία, μειωμένο ρυθμό ανάπτυξης και αύξησης του δείκτη μετατρεψιμότητας της τροφής. Σε άλλη μελέτη έχει βρεθεί πως εμφανίζονται αλλοιώσεις στους νεφρούς χοίρων, όταν χορηγείται ΩΤΑ σε συγκέντρωση έως 200 ppb για



εβδομάδες, την εμφάνιση. Επιπρόσθετα μπορεί στους χοίρους να εμφανισθεί διάρροια, ανορεξία και αφυδάτωση, ενώ νεκροτομικά οι νεφροί τους εμφανίζονται ωχροί και πλαδαροί.

Στους χοίρους οι τοξικές επιδράσεις της ποικίλλουν. Στα απογαλακτισμένα χοιρίδια εμφανίζει νευροτοξικές και κυτταροτοξικές επιδράσεις με έντονη παραγωγή ενεργών ριζών οξυγόνου στο αίμα, μείωση της φαγοκυτταρικής δραστηριότητας των λεμφοκυττάρων και μεγάλη αύξηση του αριθμού των εωσινοφίλων και των αποπτωτικών φαγοκυττάρων. Στους αναπτυσσόμενους χοίρους προκαλεί καταστολή της κυτταρικής ανοσίας. Τέλος, στα ενήλικα προκαλεί μεταλλάξεις και τοξικές επιδράσεις στο γεννητικό σύστημα και ειδικά στους κάπρους επιδρά στην παραγωγή των σπερματοζωαρίων όπου μειώνει τόσο την παραγωγή όσο και την ποιότητα του σπέρματος.

Παράλληλα αποτελεί δυνητικά τερατογόνο ουσία για μύες, επίμυες και κοτόπουλα. Έχει επίδραση στο μεταβολισμό της γλυκόζης, αυξάνοντας τη συσσώρευση του γλυκογόνου στο ήπαρ των διάφορων οργανισμών. Οδηγεί σε αυξημένη συχνότητα εμφάνισης ηπατοκυτταρικών όγκων, νεφροκυτταρικών αδενωμάτων και καρκινωμάτων σε μύες και επίμυες.

Τα πλέον ευαίσθητα είδη στην επίδραση της ΩΤΑ φαίνεται να είναι ο σκύλος και ο χοίρος, αφού οι τιμές LD<sub>50</sub> είναι αντίστοιχα 0,2 και 1 mg/kg σωματικού βάρους (ΣΒ), ενώ τα ποντίκια και οι αρουραίοι αποτελούν τα πλέον ανθεκτικά είδη με τιμές LD<sub>50</sub> 58 και 30 mg/kg ΣΒ, αντίστοιχως. Οι τιμές LD<sub>50</sub> δεν έχουν διευκρινιστεί για τα μηρυκαστικά. Στα πτηνά, η δράση της ΩΤΑ είναι νεφροτοξική από ηπατοτοξική και η χρόνια επίδραση της σε αυτά, έχει αποτέλεσμα τη μείωση του ρυθμού ανάπτυξης καθώς και της ανάπτυξης των οστών και περιστατικά αναιμίας. Δεν υπάρχουν μελέτες όσον αφορά τη χρόνια δράση της ΩΤΑ στα άλλα είδη των παραγωγικών ζώων.

Στα μηρυκαστικά δεν έχουν καταγραφεί κρούσματα με οξεία ή χρόνια ωχρατοξίκωση. Η μικροβιακή χλωρίδα που υπάρχει στη μεγάλη κοιλία των προβάτων εμφανίζει πιο μικρή ικανότητα να μεταβολίζει την ΩΤΑ συγκριτικά με αυτή της χλωρίδας των αγελάδων ενώ έχει αποδειχθεί πως η συγκέντρωση της ωχρατοξίνης στον ορό των προβάτων εμφανίζει γραμμική συσχέτιση με τη συγκέντρωση της ωχρατοξίνης που χορηγείται, οπότε και προτείνεται η αποφυγή της χορήγησης μολυσμένης με τοξίνη τροφής (Blank et al., 2003).

Στους ανθρώπους η ΩΤΑ εμπλέκεται με την παθογένεση ορισμένων νεφρικών νοσημάτων, όπως είναι η ενδημική νεφροπάθεια των Βαλκανίων (BEN), οι όγκοι νεφρών που εμφανίστηκαν σε ενδημικές περιοχές της Βαλκανικής Χερσονήσου (Pfohl-Leszko et al., 2002; Fuchs et al., 2005) και η διάμεση νεφρίτιδα (CIN) στην περιοχή της Τυνησίας (Maaroufi et al., 1995a; Grosso et al., 2003) και άλλων στις χώρες της Νότιας Αφρικής (Wafa et al., 2005).

Οι βλάβες στους νεφρούς ξεκινούν με αλλοιώσεις που εντοπίζονται στα εγγύς σωληνάκια. Τα επιθηλιακά κύτταρα καταστρέφονται, για παράδειγμα, η συνοχή των μεμβρανών χάνεται και το μέγεθος και η πυκνότητα των οργάνων μειώνονται. Η χρωματίνη συμπυκνώνεται και ο πυρηνικός φάκελος εξαφανίζεται. Ιστολογικά εμφανίζεται με την εικόνα της μεγέθυνσης της μεμβράνης των σωληναρίων και εμφάνιση ινών κολλαγόνου (WHO, 1965).

Η BEN είναι μια πάθηση που αφορά τους νεφρούς του ανθρώπου και αναγνωρίστηκε για πρώτη φορά τη δεκαετία του 1950 στη Βουλγαρία, τη Ρουμανία και την πρώην Γιουγκοσλαβία. Η ΩΤΑ θεωρείται ότι αποτελεί έναν από τους σημαντικότερους αιτιολογικούς παράγοντες της BEN και αυτό οφείλεται στο γεγονός πως η ωχρατοξίνη ανιχνεύεται σε υψηλές συγκεντρώσεις στα αποθηκευμένα τρόφιμα των προσβεβλημένων οικογενειών, στο αίμα των προσβεβλημένων ατόμων σε συγκεντρώσεις  $\geq 2$   $\mu\text{g/l}$  καθώς και στα ούρα των κατοίκων στις περιοχές που θεωρούνται ενδημικές για τη συγκεκριμένη νόσο. Τα κύρια χαρακτηριστικά της BEN είναι οι αμφοτερόπλευρες αλλοιώσεις που παρατηρούνται στο νεφρικό φλοιό. Στην αρχή, η ασθένεια BEN χαρακτηρίζεται από μια τροποποίηση στα επιθηλιακά κύτταρα χωρίς καμία αλλαγή στο μέγεθος του οργάνου. Μετά από χρόνια έκθεση, το μέγεθος στα νεφρά μειώνεται και η διάμεση ίνωση είναι η πιο χαρακτηριστική εικόνα. Στο τελικό στάδιο, η εξασθένηση της νεφρικής λειτουργίας οδηγεί σε ενζυμουρία (π.χ. γαμμα γλουταμυλο τρανσφεράση, αλκαλική φωσφατάση, γαλακτική αφυδρογονάση), πολουρία και συνοδεύεται από κόκκινη γλώσσα, δίψα και πικρή γεύση (Plestina et al., 1991). Ούτε οίδημα ούτε υπέρταση παρατηρείται. Άλλα συμπτώματα όπως πονοκεφάλους, οσφυαλγία, εξασθένηση και αναιμία (ανεπάρκεια σιδήρου) έχουν ωστόσο καταγραφεί. Αρκετές βιοχημικές παράμετροι μεταβάλλονται συμπεριλαμβανομένης της γλυκοζουρίας, της πρωτεϊνουρίας (0,15-0,5 g/24 ώρες), αλκαλοποίηση ούρων, αυξημένη κρεατινίνη ορού και αύξηση της ανοσοσφαιρίνης M (IgM) και της ανοσοσφαιρίνης E (IgE) (Stefanovic et al., 1991 ; Plestina et al., 1992).

Τα πιο πρόσφατα δεδομένα για την νεφροτοξικότητα της ΩΤΑ στους ανθρώπους είναι η μελέτη των Hennemeier et al., 2014 που αποδείχθηκε πως η ΩΤΑ έχει τη δυνατότητα να ξεκινήσει ή να ενισχύσει την ανάπτυξη ινωτικών νεφρικών νόσων με τη συμμετοχή μηχανισμών μετα-μεταγραφικών ρυθμίσεων που περιλαμβάνουν το miR-29b. Η ΩΤΑ μειώνει την επίδραση του miR-29b και έτσι ενισχύει την έκφραση των πρωτεϊνών του κολλαγόνου και μια ακόμη απόδειξη πως η διατροφική έκθεση σε ΟΤΑ αποτελεί σοβαρό πρόβλημα υγείας, συμπεριλαμβανομένων των όγκων της ουροδόχου κύστης στον άνθρωπο (Heussner et al., 2015).

Το 1976 και το 1983, ο IARC αξιολόγησε για πρώτη φορά τον καρκινογόνο κίνδυνο που θέτει η ΩΤΑ στον άνθρωπο. Δεν υπήρχαν αναφορές σε περιπτώσεις καρκίνου ή επιδημιολογικών μελετών διαθέσιμες εκείνη την εποχή και, ελλείψει επαρκών επιδημιολογικών δεδομένων, δεν θα μπορούσε να αξιολογηθεί η καρκινογένεση της ΩΤΑ σε σχέση με τους ανθρώπους (IARC 1976, IARC 1983). Το 1987, ο IARC αναταξινόμησε την ΩΤΑ στην ομάδα 3 (δεν μπορούσε να ταξινομηθεί στην ομάδα καρκινογόνου για τους ανθρώπους). Με βάση ένα μεγάλο αριθμό ενδείξεων καρκινογένεσης από ΩΤΑ που αποκαλύφθηκαν σε νέες μελέτες που πραγματοποιήθηκαν σε ζώα, επαναταξινομήθηκε και πάλι στην ομάδα 2B (πιθανώς καρκινογόνος για τους ανθρώπους) το 1993. Προς το παρόν, νέες πληροφορίες σχετικά με τη γονιδιοτοξικότητα της ΩΤΑ (σχηματισμός προϊόντων προσθήκης ΩΤΑ-DNA), το ρόλο της στο οξειδωτικό στρες και την ταυτοποίηση των επιγενετικών παραγόντων που εμπλέκονται στην καρκινογένεση από την ΩΤΑ, παρέχουν πράγματι ισχυρές ενδείξεις ότι η καρκινογένεση της ΩΤΑ διαμεσολαβείται από έναν μηχανισμό που επίσης εμφανίζεται στον άνθρωπο και θα μπορούσε να οδηγήσει σε μια άλλη αναταξινόμηση της ΩΤΑ. Υπό το πρίσμα των πρόσφατα διαθέσιμων στοιχείων, δεν φαίνεται ακατάλληλο να αναβαθμιστεί η καρκινογένεσή του από την ομάδα 2B (ενδεχομένως

καρκινογόνο σε ανθρώπους) ή σε Ομάδα 2Α (πιθανώς καρκινογόνο για τον άνθρωπο) (IARC, 2016).

Οι μελέτες σχετικά με την ικανότητα της ΩΤΑ να προκαλέσει καρκινογένεση ξεκίνησαν το 1978 όπου οι Kanisawa et al., απέδειξαν πως η ΩΤΑ επάγει νεφρικούς και ηπατικούς όγκους σε ποντικούς ενώ το 1985 αναφέρεται πως η ΩΤΑ είναι καρκινογόνος για τα ποντίκια (Bendele et al., 1985). Για πρώτη φορά μόρια συνδεδεμένα ΩΤΑ-DNA ευρίσκονται στο νεφρό, το ήπαρ και το σπλήνα ποντικών το 1991 από τους Pfohl-Leszkoewicz et al. Η εμπλοκή της ΩΤΑ στην πρόκληση καρκίνου των όρχεων έχει επίσης βρεθεί σε πολλές έρευνες τόσο στα ποντίκια (Schwartz et al., 2002; Schwartz et al., 2007; Schwartz et al., 2010) όσο και στους ανθρώπους (Mantle et al., 2010). Στα πούλικα περιγράφηκε ως καρκινογόνο το 2010 από τους Stoen et al. Σε αρκετά πρόσφατη έρευνα φάνηκε πως η διατροφική έκθεση σε ΩΤΑ αποτελεί σοβαρό πρόβλημα υγείας, συμπεριλαμβανομένων των όγκων της ουροδόχου κύστης στον άνθρωπο (Heussner et al., 2015).

## 2.5 ΩΤΑ βιοδείκτες

Η παρακολούθηση της ΩΤΑ παρέχει την καλύτερη προσέγγιση για την αξιολόγηση της έκθεσης του ανθρώπου σε ΩΤΑ από οποιαδήποτε πηγή και μέσω οποιασδήποτε διαδρομής (Degen et al., 2011). Οι πρώτες μελέτες που αναφέρουν την παρουσία ΩΤΑ στο ανθρώπινο αίμα διεξήχθησαν στα Βαλκάνια τη δεκαετία του 1970 (Hult et al., 1982). Η έκθεση του ανθρώπινου πληθυσμού στην ΩΤΑ και σε άλλες ωχρατοξίνες αποτελεί ένα παγκόσμιο πρόβλημα. Οι Baldwin et al., 2011 αναθεώρησαν τις έρευνες που υπήρχαν για τους βιοδείκτες για τις σημαντικότερες μυκοτοξίνες και καθόρισαν άλλους βιοδείκτες. Πρόσφατα, ένας βιοδείκτης της έκθεσης έχει οριστεί ως βιολογικό μέτρο που συσχετίζεται με την ποσότητα του ξενοβιοτικού που πέπτεται, έχοντας ως αποτέλεσμα τη βελτιωμένη ταξινόμηση της έκθεσης σε σύγκριση με τις περισσότερο παραδοσιακές προσεγγίσεις (Turner et al., 2012). Η ΩΤΑ στο γάλα (μη επεμβατική δειγματοληψία), η ΩΤΑ στον ορό του αίματος (επεμβατική δειγματοληψία), η ΩΤΑ στα ούρα (μη επεμβατική δειγματοληψία) και η ΩΤΑ σε ανθρώπινους νεφρούς (δειγματοληψία μετά τη σφαγή ή μετά από νεφρεκτομή) έχουν πιστοποιηθεί ως βιοδείκτες έκθεσης σε ΩΤΑ (Duarte et al., 2011). Οι Soto et al., 2015 έχουν πρόσφατα χρησιμοποιήσει αρκετούς βιοδείκτες για την αξιολόγηση της έκθεσης σε ΩΤΑ. Οι τιμές της ΩΤΑ ανιχνεύθηκαν σε πιθανούς βιοδείκτες έκθεσης για το αίμα, το μητρικό γάλα και τα ούρα, κυμαίνονταν από 0,15 έως 18,0, από 0,002 έως 13,1 και από 0,013 έως 0,2 ng/ml, αντίστοιχα. Το υπολογισμένο ποσοστό έκθεσης ημερήσιας πρόσληψης (EDI) για την ΩΤΑ στο πλάσμα κυμαινόταν από 0,15 έως 26 ng/kg σωματικού βάρους/ημέρα και έχει αποδειχθεί ότι η συγκέντρωση αυτή είναι υψηλότερη από εκείνη που λαμβάνεται στα ούρα (0,017 έως 0,4 ng/kg Σ.Β./ημέρα). Όλες αυτές οι τιμές συσχετίστηκαν με το εύρος της έκθεσης μετά από ημερήσια πρόσληψη για την ΩΤΑ που υπολογίστηκε από προϊόντα διατροφής: 0,0001-25,2 ng / kg βάρους / ημέρα (Soto et al., 2015).

### 2.5.1 ΩΤΑ στο ανθρώπινο αίμα

Το 1979, αναπτύχθηκε ο προσδιορισμός της ΩΤΑ στο ανθρώπινο ολικό αίμα και στον ορό (Hult et al., 1979). Εδώ και αρκετές δεκαετίες, έχει εντοπιστεί ΩΤΑ σε δείγματα ανθρώπινου αίματος σε παγκόσμια κλίμακα. Ο Scott, 2005 περιέγραψε την ΩΤΑ στον ορό του αίματος ως ένα μοναδικά χρήσιμο βιοδείκτη της έκθεσης σε ΩΤΑ λόγω της υψηλής ικανότητας σύνδεσης με την αλβουμίνη του ορού ή με άλλες μικρές πρωτεΐνες, γεγονός που θα έχει ως αποτέλεσμα υψηλότερα ορό επίπεδα ΩΤΑ στον ορό και τη μακρά διάρκεια παραμονής της ΩΤΑ στον ορό του αίματος (Scott, 2005). Οι συγκεντρώσεις ΩΤΑ στο αίμα θα ενσωματώνουν την έκθεση για μεγαλύτερες περιόδους (Gilbert et al., 2001). Η χρήση ορού ή πλάσματος αίματος έχει περιγραφεί ως η καταλληλότερη επιλογή δειγμάτων σε σύγκριση με το πλήρες αίμα (Zimmerli et al., 1995; Castegnaro et al., 2006b). Γενικά, ο προσδιορισμός της ΩΤΑ σε δείγματα αίματος παραμένει η βασική μέθοδος για τον τρόπο παρακολούθησης της έκθεσης του ανθρώπου στην ΩΤΑ, η οποία είναι πανταχού παρούσα σε ορό ή πλάσμα ανθρώπινου αίματος και υποδεικνύει τη συνεχή έκθεση στην τοξίνη, προερχόμενη κυρίως από πρόσληψη τροφής (Scott, 2005).

Τα πλεονεκτήματα που προκύπτουν από την παρακολούθηση της ΩΤΑ στο αίμα των υγιών ατόμων συνίστανται κυρίως στα σχετικά υψηλά επίπεδα ΩΤΑ που βρέθηκαν σε σύγκριση με προσδιορισμούς ΩΤΑ στα ούρα (Duarte et al., 2011). Ο προσδιορισμός της ΩΤΑ στο αίμα ενσωματώνει την έκθεση για μεγαλύτερες περιόδους, ωστόσο η ανάλυση των βιοδεικτών στα ούρα φαίνεται να αντικατοπτρίζει καλύτερα τις καθημερινές διακυμάνσεις της έκθεσης ενηλίκων και βρεφών. (Gilbert et al., 2001; Pfohl-Leskowicz et al., 2006; Castegnaro et al., 2006b; Turner et al., 2012; Muñoz et al., 2014; Ali et al., 2014).

Ο Πίνακας 3 περιγράφει μερικά από τα πιο αξιοσημείωτα ευρήματα της ΩΤΑ στο αίμα σε παγκόσμια κλίμακα

**Πίνακας 3.** Σύνοψη των δεδομένων της ΩΤΑ στο αίμα υγιών ανθρώπων

ΧΩΡΑ	ΠΕΡΙΟΔΟΣ ΣΥΛΛΟΓΗΣ	n+ (%)	ΩΤΑ (μg/L)	ελάχιστο-μέγιστο	ΩΤΑ Μέσος (μg/L)	ΠΗΓΗ
Ευρώπη					5.4	Hult et al., 1982; Hald B., 1991
Πρ.					0.6	Bauer et al., 1997
Γιουγκοσλαβία	1980	7.8	Μεγ. 8.0		12.0	Petkova-Bocharova et al., 1988
Γερμανία	1977–1985	56.5	0.1–14.4		0.28	
Βουλγαρία	1984, 1986, 1989–	10	-		-	Golinski et al., 1991
Πολωνία	1990	7.2	1–40		0.75	Fuchs et al., 1991
Πρ.	1983–1985	0-3.7	μεγ. 50.0		0.20	Hadlok et al., 1993
Γιουγκοσλαβία	1981–1989	68	0.1–8.4		0.37	Breitholtz et al., 1991
Γερμανία	1988	12.8	0.3–7.0		1.8	Fukal et al., 1990
Σουηδία	1989	21	0.5–12.0		-	Hald B., 1991
Τσεχοσλοβακία	1990	54.2	0.1–13.2		0.63	Creppy et al., 1991
Δανία	1990	-	0.1–6.0(αγρότες), 0.1–1.3 (αστοί)		0.4	Ruprich et al., 1993
Γαλλία	-	40	0.5–19.4		0.53	Creppy et al., 1993; Benford et al., 2001
Τσεχοσλοβακία	1990–1991	18.1	0.1–161		ca. 0.4	Breitholtz-Emanuelsson et al., 1994
Γαλλία	1991–1992	100	0.1–2.0		0.56	Zimmerli et al., 1995
Ιταλία	1992–1993	100	0.06–6.02		-	Kovacs et al., 1995
Σουηδία	1995	51	0.2–12.9		0.24	Palli et al., 1995
Ουγγαρία	1994–1996	97	0.1–57.2		0.71	Solti et al., 1999
Ιταλία	1995	82	0.2–10.0		-	Malir et al., 2001
Ουγγαρία	1994–2002	94.2	0.1–13.7		0.30	Jimenez et al., 1998
Τσεχία	1996–1998	53.3	0.5–4.0		0.21	Perez de Obanos et al., 2001
Ισπανία	1996–1997	72	0.21–6.96		0.18	Tapai et al., 1997
Ισπανία	1997	77	0.1–1.4		0.27	Domijan et al., 1999
Ουγγαρία	1997–1998	59.4	μεγ. 15.9		1.09	Thuvander et al., 2001
Κροατία	1997	100	0.01–0.48		0.40	Thuvander et al., 2001
Σουηδία	1998	100	0.05–0.42		1.59	Rösner et al., 2000
Νορβηγία	1999	98.1	0.06–2.03		0.75	MacDonald et al., 2001
Γερμανία	2000	100	0.4–3.11		0.21	Skaug, 2003
H. B.	-	-	0.02–5.53		1.09	Petkova-Bocharova et al., 2003
Νορβηγία	-	100	μεγ. 8.4		0.86	Lino et al., 2008
Βουλγαρία	2001–2002	100	0.14–2.49		0.25	Grajewski et al., 2007
Πορτογαλία	2005	100	0.1–0.4		0.8	Degen et al., 2007
Πολωνία	2005–2006	83.7	0.05–0.75			Malir et al., 2008
Γερμανία	2005	100	0.1–2.3			Medina et al., 2010
Τσεχία	2008	98.6	0.15–5.71			Coronel et al., 2009
Ισπανία	2008	100	0.11–8.68			Muñoz et al., 2010
Ισπανία	2008	100	0.19–0.29			Coronel et al., 2011a
Ισπανία	-	-	0.06–10.92			

### 2.5.2 ΩΤΑ στα ούρα

Τα ούρα είναι μια σημαντική διαδρομή απέκκρισης τόσο για την ΩΤΑ όσο και για την ΟΤα στους ανθρώπους (Ringot et al., 2006). Η ΩΤΑ μπορεί να βρεθεί στα ούρα αρκετές ημέρες μετά την κατάποση της ΩΤΑ με την τροφή (Pfohl-Leszkowicz et al., 2007). Τα επίπεδα εξάλειψης της ΩΤΑ μέσω των ανθρώπινων ούρων έχει αναφερθεί ότι είναι χαμηλά (μέση τιμή μεταξύ 20 και 80 ng/ημέρα) και είναι ανεξάρτητα της δόσης που λήφθηκε (Castegnaro et al., 2006b). Η πρόσληψη ΩΤΑ έχει περιγραφεί ως εξαρτώμενη από την συγκέντρωση της ελεύθερης ΩΤΑ, η οποία περιορίζεται σοβαρά από τη δέσμευση της ΩΤΑ στην αλβουμίνη του ορού (Pfohl-Leszkowicz et

al.,2007). Έτσι, η σχέση μεταξύ της ΩΤΑ στα ούρα και της πρόσληψης ΩΤΑ παραμένει περίπλοκη, όπως συμβαίνει στην περίπτωση της ΩΤΑ στο αίμα.

Η πρώτη μελέτη που μετρά την ΩΤΑ στα ούρα στην Ευρώπη διεξήχθη από τους Mac Donald et al., 2001 στο Ηνωμένο Βασίλειο. Σε αυτή τη μελέτη, η ΩΤΑ βρέθηκε σε 46 δείγματα ούρων (92%) που συλλέχθηκαν για 24 ώρες από 50 εθελοντές που ήταν υγιή άτομα από το Ηνωμένο Βασίλειο. Οι συγκεντρώσεις ΩΤΑ κυμαίνονταν από <10 έως 58 ng/l και η μέση τιμή ήταν περίπου 21 ng/l. Αυτή η μελέτη κατέδειξε μια ισχυρή συσχέτιση μεταξύ των συγκεντρώσεων της ΩΤΑ στα ούρα και τη διατροφή τους. Η δεύτερη μελέτη στην Ευρώπη διεξήχθη στη Βουλγαρία από τους Castegnaro et al., 1991. Συνολικά 152 δείγματα ούρων συλλέχθηκαν από ασθενείς με BEN ή όγκους ουροφόρων οδών (UTT) και από τις οικογένειες που αποτελούσαν την ομάδα ελέγχου αναλύθηκαν και η ΩΤΑ ανιχνεύθηκε σε περίπου 33% των δειγμάτων ούρων (συχνότερα σε ενδημικά χωριά από ό, τι σε μη ενδημικά) στην περιοχή 5-604 ng/l και σε υγιείς ανθρώπους στην περιοχή 5-43 ng/l (LOQ = 5 ng/l). Στην Ευρώπη, μια άλλη μελέτη παρακολούθησης της ΩΤΑ σε δείγματα ούρων μετά από 24 ώρες έγινε συλλογή ούρων από τους κατοίκους με BEN στη Βουλγαρία (από 16 υγιείς εθελοντές από δύο χωριά που βρίσκονται στην περιοχή Vratza, μια περιοχή υψηλού κινδύνου για την BEN, 5 από το Gorno Pestehne και 11 από το Beli Izvor, διεξήχθη από τους Petkova-Bocharova et al., 2003. Από αυτά, το 98% των δειγμάτων ήταν θετικά και περιείχε ΩΤΑ στην περιοχή σε συγκέντρωση 10-1910 ng/l. Η μέση τιμή της ΩΤΑ στο Gorno Pestehne ήταν 50,8 ng/l και στο Beli Izvor ήταν 168,6 ng/l. Σε μια τσεχική μελέτη που πραγματοποιήθηκε το 2010, η ΩΤΑ μετρήθηκε σε 236 δείγματα ούρων που συλλέχθηκαν από υγιή άτομα σε ένα 24ωρο κύκλο (αρσενικά / θηλυκά, 45-60 έτη, δύο δείγματα ανά άτομο από μη διαδοχικές ημέρες, με διαφορά χρόνου τουλάχιστον 14 ημερών). Συνολικά τα 185 δείγματα (78%) από αυτά τα 236 δείγματα ήταν θετικά, με ένα όριο ποσοτικοποίησης (LOQ) 2,0 ng/l, μέση τιμή 7,32 ng/l και μέση τιμή 4,47 ng/l (Ostry et al., 2010). Αυτά τα δεδομένα δείχνουν το πραγματικό μέγεθος της έκθεσης της συγκεκριμένης πληθυσμιακής ομάδας στην ΩΤΑ, με υψηλότερο ποσοστό θετικών δειγμάτων ούρων στους άνδρες (92%) από τις γυναίκες (65%).

Εξέταση ούρων ανθρώπων ως βιοδείκτες έγινε και στη Σουηδία, για ανίχνευση μυκοτοξινών που προέρχονται από τη διατροφή τους (Wallin et al., 2015). Σκοπός της παρούσας μελέτης ήταν η μελέτη της ταυτόχρονης έκθεσης σε μυκοτοξίνες μέσω της ανάλυσης πολλαπλών βιολογικών δεικτών ούρων, καθώς και οι πιθανές συσχετίσεις με τη διατροφή. Συλλέχθηκαν δείγματα ούρων από 252 ενήλικες που συμμετείχαν στη Σουηδική εθνική διατροφική έρευνα Riksmaten 2010-2011 μαζί με ένα αρχείο διατροφής τεσσάρων ημερών. Η ταυτόχρονη έκθεση σε μυκοτοξίνες μελετήθηκε με τη χρήση μίας μεθόδου LC-MS/MS πολλαπλών βιολογικών δεικτών. Τα αποτελέσματα αποκάλυψαν ότι η έκθεση σε μυκοτοξίνες είναι κοινή και η ταυτόχρονη έκθεση σε περισσότερες από μία τοξίνες βρέθηκε στο 69% του πληθυσμού της μελέτης. Ωστόσο, κατά τη σύγκριση του αριθμού των τοξινών που ανιχνεύθηκαν και με τα αναφερόμενα δεδομένα κατανάλωσης, ήταν δύσκολο να γίνει διάκριση των τρόπων διατροφής, γεγονός που υποδηλώνει αυξημένο κίνδυνο έκθεσης σε πολλές μυκοτοξίνες ταυτόχρονα. Η ΩΤΑ καθορίστηκε συνήθως σε πρωινά ούρα (όχι σε 24 ωρών ούρα) σε αυτές τις χώρες. Ωστόσο, σε μελέτες έκθεσης, συνιστάται η συλλογή ούρων 24h, αντιπροσωπευτικά της απέκκρισης καθ' όλη τη διάρκεια της ημέρας (Warth et al., 2013). Οι μέθοδοι πολλαπλών βιοδεικτών έχουν εφαρμοστεί σε διάφορες πιλοτικές μελέτες για να αποδειχθεί η δυνατότητα εφαρμογής τους στην εκτίμηση της έκθεσης σε μυκοτοξίνες

σε δοκιμαζόμενους πληθυσμούς ή άτομα. Η εφαρμογή αυτών των μεθόδων συνέβαλε σε προηγμένα δεδομένα σχετικά με τα πρότυπα έκθεσης και αποκάλυψε νέα ευρήματα σχετικά με την ταυτόχρονη έκθεση σε συνδυασμούς μυκοτοξίνης (Warth et al., 2013).

Επιπλέον, πρέπει να αναφερθεί ότι η ουρική απέκκριση κυρίως αντανακλά την πρόσφατη πρόσληψη μυκοτοξινών, ενώ οι μετρήσεις στο πλάσμα/ορό είναι πιθανότερο να αντανακλούν τη μακροπρόθεσμη έκθεση (Warth et al., 2013). Ως αποτέλεσμα της εμφάνισης της τελευταίας γενιάς υψηλής απόδοσης χρωματογραφίας LC-MS / MS, μια σαφής τάση ανάπτυξης και εφαρμογής μεθόδων πολυανάλυσης για την έρευνα βιοτοξικών μυκοτοξινών, μπορεί να παρατηρηθεί (Warth et al., 2012). Μια μέθοδος που αναπτύχθηκε από τους Ediage et al., 2012 κάλυψε επτά μυκοτοξίνες και αρκετές σημαντικές συζεύξεις και προϊόντα διάσπασης (για συνολικά 18 αναλύσεις). Σε αυτή τη μελέτη, ΩΤΑ, ΩΤα, και 4-OH-ΩΤΑ μετρήθηκε σε ανθρώπινους εθελοντές. Ωστόσο, κανείς από τους στοχευόμενους μεταβολίτες της ΩΤΑ, όπως η ΩΤα ή η 4-OH-ΩΤΑ δεν επιβεβαιώθηκαν σε μια άλλη μελέτη που διεξήχθη με δείγματα ούρων στο Καμερούν (Ediage et al., 2013) αλλά τα στοιχεία συσχετίζονται με παρόμοια ευρήματα που αναφέρθηκαν σε έναν κορεατικό πληθυσμό (Ahn et al., 2010). Σύμφωνα με τον Munoz et al., 2010a η διατομική μεταβλητότητα στην αποτοξίνωση της ΩΤΑ σε ανθρώπινα ούρα μπορεί να συνεισφέρει σε παρατηρούμενες διακυμάνσεις στην ΩΤα, και δεν μπορεί να αποκλειστεί το ενδεχόμενο πως ο χαμηλός ρυθμός αποτοξίνωσης της ΩΤΑ είναι χαρακτηριστικό ορισμένων πληθυσμών (Ediage et al., 2013).

Η υψηλότερη συγκέντρωση ΩΤΑ που έχει αναφερθεί μέχρι σήμερα σε ανθρώπινα ούρα ανιχνεύθηκε στη Σιέρα Λεόνε με μια τιμή από 70-148.000 ng/l, αλλά ο μέσος όρος δεν αναφέρθηκε (Jonsyn et al., 2000). Ο Πίνακας 4 συνοψίζει την ανίχνευση ΩΤΑ σε ανθρώπινα πρωινά ούρα παγκοσμίως. Τελευταίο, αλλά εξίσου σημαντικό είναι πως σε διατροφικές μελέτες που πραγματοποιήθηκαν στη Σερβία, εκτός από την ΩΤΑ, αρκετά παράγωγα ΩΤΑ έχουν ανιχνευθεί στα ούρα (αλλά και στο αίμα). Μια σαφής διαφορά μεταξύ ανδρών και γυναικών έχει επίσης παρατηρηθεί (Pfohl-Leszkowicz, 2009).

**Πίνακας 4.** Παρουσία ΩΤΑ σε ανθρώπινα ούρα σε διαφορετικούς πληθυσμούς.

ΧΩΡΑ	n	n+ %	Μέσος (ng/l)	ΠΗΓΗ
Κροατία	35	94	239	Domijan et al., 2003
Ουγγαρία	88	61	13	Fazekas et al., 2005
Πορτογαλία	60	70	27	Pena et al., 2006
Πορτογαλία	30	43	19	Manique et al., 2008
Πορτογαλία	43	72.1	26	Duarte et al., 2009
Κροατία	45	43	17	Domijan et al., 2009
Κροατία	45	18	7	Domijan et al., 2009
Πορτογαλία	155	92	18	Duarte et al., 2007
Τουρκία	233	90	14.3	Akdemir et al., 2010
Γερμανία	13	100	70	Muñoz et al., 2010
Νότια Κορέα	12	100	31	Ahn et al., 2010
Ισπανία	72	12.5	237	Coronel et al., 2011b
Ισπανία	27	Δεν δηλώθηκε	-	Rubert et al., 2011
Ιταλία	10	100	-	Solfrizzo et al., 2011
Σρι Λάνκα	31	93.5	20	Desalegn et al., 2011
Πορτογαλία	95	87.4	22	Duarte et al., 2012
Πορτογαλία	95	81.1	16	Duarte et al., 2012
Κροατία	40	78	90	Klapec et al., 2012
Κροατία	40	58	130	Klapec et al., 2012
Χιλή	39	-	-	Muñoz et al., 2014
Πορτογαλία	472	86.4	-	Solfrizzo et al., 2014
Γερμανία	30	15	-	Duarte et al., 2015
Αιτή	47	33	-	Duarte et al., 2015
Μπανγκλαντές	72	76	-	Duarte et al., 2015

### 2.5.3 ΩΤΑ στο ανθρώπινο γάλα

Καθώς η ΩΤΑ απεκκρίνεται επίσης μέσω του ανθρώπινου γάλακτος, τα παιδιά που θηλάζουν συμπεριλαμβανομένων και των μωρών εκτίθενται στην ΩΤΑ επίσης (Gareis et al., 1988; Muñoz et al., 2014). Παρ'όλα αυτά, οι ποσότητες ΩΤΑ στο γάλα αναφέρεται ότι είναι πολύ χαμηλότερες από τις συγκεντρώσεις της ΩΤΑ στο αίμα μέχρι και 10 φορές (Breitholtz-Emanuelsson et al., 1993). Στην Ιταλία, η ΩΤΑ ανιχνεύθηκε στο γάλα που προερχόταν από υγιείς γυναίκες με ποικίλες καθημερινές διατροφές και σε διαφορετικές γεωγραφικές περιοχές (Micco et al., 1991). Η σχέση μεταξύ της μόλυνσης από ΩΤΑ του ανθρώπινου γάλακτος και της διατροφικής πρόσληψης εξετάστηκε και αυτό ήταν που επιβεβαίωσε ότι η εμφάνιση της ΩΤΑ στο ανθρώπινο γάλα πιθανότατα συνδέεται με τις διατροφικές συνήθειες της μητέρας. Οι ισχυρότερες συσχετίσεις παρατηρήθηκαν με τα τρόφιμα φυτικής προέλευσης και σε μικρότερο βαθμό, με τα τρόφιμα ζωικής προέλευσης (Skaug et al., 2001). Ο Πίνακας 5 συνοψίζει τα στοιχεία σχετικά με την παρουσία ΩΤΑ στο ανθρώπινο γάλα παγκοσμίως.



**Πίνακας 5.** Δεδομένα για την παρουσία της ΩΤΑ στο γάλα παγκοσμίως.

ΧΩΡΑ	n	ΕΥΡΟΣ ΘΕΤΙΚΩΝ ΔΕΙΓΜΑΤΩΝ (ng/l)	ΠΗΓΗ
Γερμανία	36	17-30	Gareis et al., 1988
Ιταλία	50	1200-6600	Micco et al., 1993
Σουηδία	40	10-40	Breitholtz-Emanuelsson et al., 1991
Ουγγαρία	92	200-7200	Palli et al., 1999
Ελβετία	40	5-14	Zimmerli et al., 1995
Ιταλία	111	100-12000	Micco et al., 1995
Ιταλία	4	8-540	Miraglia et al., 1995
Νορβηγία	115	10-130	Skaug et al., 1998
Νορβηγία	80	10-182	Skaug et al., 2001
Ιταλία	231	10-57	Turkoni et al., 2004
Πολωνία	13	6-17	Postupolski et al., 2006
Ιταλία	82	5-405	Galvano et al., 2008
Σλοβακία	76	2-60	Dostal et al., 2008
Ιταλία	57	1-75	Biasucci et al., 2011
Γερμανία	90	3000-3600	Muñoz et al., 2013
Σιέρα Λεόνε	113	90-140	Jonsyn et al., 1995
Αίγυπτος	120	1.6-60	El-Sayed et al., 2002
Αίγυπτος	50	10-20	Hassan et al., 2006
Αυστραλία	100	44-184	Apostolou et al., 1998
Τουρκία	75	-	Gürbay et al., 2009
Ιράν	136	-	Afshar et al., 2013
Ιράν	87	-	Dehghan et al., 2014
Βραζιλία	50	-	Navas et al., 2005
Χιλή	11	-	Muñoz et al., 2010
Βραζιλία	224	-	Andrade et al., 2013
Χιλή	50	10-186	Muñoz et al., 2014
Βραζιλία	100	0.3-21	Iha et al., 2014

Σε ορισμένες χώρες, π.χ. στην Αίγυπτο, την Τουρκία και τη Σιέρα Λεόνε, βρέθηκαν συγκεντρώσεις ΩΤΑ στο γάλα να είναι πάνω από 100 φορές υψηλότερη σε σύγκριση με την Ευρώπη (βλ. Πίνακα 5). Μπορούμε να συμπεράνουμε ότι, παρά το γεγονός ότι οι συγκεντρώσεις ΩΤΑ στο γάλα, σε σύγκριση με το αίμα είναι πολύ χαμηλότερες, η μόλυνση του ανθρώπινου μητρικού γάλακτος παρουσιάζει δυνητικά σοβαρό κίνδυνο για την υγεία (Kuiper-Goodman et al., 2010).

#### 2.5.4 ΩΤΑ σε ανθρώπινους νεφρούς

Η παρουσία της ΩΤΑ σε ανθρώπινους ιστούς φαίνεται να αποτελεί άμεση και σαφή απόδειξη της ανθρώπινης έκθεσης σε ΩΤΑ, αν και η πρακτικότητα τέτοιων μετρήσεων "in vivo" είναι προφανώς περιορισμένη (Malir et al., 2012). Λαμβάνοντας υπόψη ότι τη νεφροτοξικότητα της ΩΤΑ, ειδικότερα, δεν υπάρχουν πολλές διαθέσιμες μελέτες για τον προσδιορισμό της ΩΤΑ σε ανθρώπινους νεφρούς. Έχουν διεξαχθεί αρκετές μελέτες σχετικά με το περιεχόμενο της ΩΤΑ σε ανθρώπινους νεφρούς, π.χ. στη Γερμανία (Bauer

et al., 1994), στην Τσεχική Δημοκρατία σε 30 δείγματα νεφρών βρέθηκαν 40% θετικά δείγματα και η ΩΤΑ κυμαίνονταν από 0,1 έως 0,2 ng/g, με μέση τιμή 0,07 ng/g (Ostry et al., 2005), και στην Πολωνία σε 19 δείγματα νεφρού βρέθηκε το 78,9% θετικό, με την ΩΤΑ να κυμαίνεται από 0,15 έως 0,39 ng/g και με μέση τιμή 0,26 ng/g (Rösner et al., 2000). Αρκετά δείγματα ανθρώπινων νεφρών (60), ελήφθησαν από ασθενείς που πάσχουν από καρκίνο του νεφρού (ή καρκίνο της ουροδόχου κύστης) από τη Βουλγαρία (8 δείγματα) (Pfohl-Leszkowicz et al., 1993), τη Σερβία (10 δείγματα), την Κροατία (16 δείγματα) και η Γαλλία (18) (Pfohl-Leszkowicz et al., 2007; Pfohl-Leszkowicz et al., 2009) και έχουν αναλυθεί μέχρι τώρα. Όχι μόνο εντοπίστηκε ΩΤΑ αλλά και παράγωγα της, όπως ΟΤΗQ, ΟΤΗQ-GSH, 4-ΟΗΟΤΑ και ΩΤΒ.

## 2.6 Ωχρατοξίνη Α στα τρόφιμα ζωικής προέλευσης

Όσον αφορά τα τρόφιμα ζωικής προέλευσης, έρευνες που έγιναν σχετικά με τη συχνότητα και τη συγκέντρωση ΩΤΑ σε δείγματα από τρόφιμα υποδεικνύουν ότι πολυάριθμα τρόφιμα έχουν μολυνθεί. Η παρουσία της ΩΤΑ στα τρόφιμα ζωικής προέλευσης μπορεί να προέλθει άμεσα, λόγω της απευθείας επιμόλυνσης τους με τοξικούς μύκητες και έμμεσα, λόγω της κατανάλωσης από τα ζώα, ζωοτροφών μολυσμένων με ΩΤΑ (Gareis, 1996) και που αποτελεί την πλέον συχνή μορφή μόλυνσης των τροφίμων αυτών.

Από τα τρόφιμα ζωικής προέλευσης, το χοιρινό κρέας, καθώς και τα κρεατοσκευάσματά του, θεωρούνται ως η πιο σημαντική πηγή μόλυνσης του ανθρώπου από την ΩΤΑ. Στους χοίρους, οι υψηλότερες συγκεντρώσεις ΩΤΑ εντοπίζονται στο αίμα, τους νεφρούς, το ήπαρ, τους μύες και το λίπος. Συνεπώς, τα κρεατοσκευάσματα που εμπεριέχουν αίμα και νεφρούς χοίρου πρέπει να θεωρούνται σημαντικός παράγοντας για πιθανή μόλυνση των καταναλωτών από την τοξίνη.

Από έρευνες που έχουν γίνει παγκοσμίως σχετικά με την εμφάνιση της ΩΤΑ στα προϊόντα χοιρινού κρέατος, η κατανάλωση μολυσμένης τροφής από τα ζώα θεωρείται ως κύρια οδός μόλυνσής τους (Lusky et al., 1993; Gareis & Scheuer, 2000; Gareis & Wolff, 2000; Yiannikouris & Jouany, 2002).

Σύμφωνα με τα συγκεντρωτικά αποτελέσματα ερευνών για την ανίχνευση της ΩΤΑ σε τρόφιμα που πραγματοποιήθηκαν σε διάφορες χώρες κατά το χρονικό διάστημα 1990-1998, σε σύνολο 23.167 εξετασθέντων δειγμάτων τροφίμων θετικών στην παρουσία ΩΤΑ (δημητριακά και τα προϊόντα δημητριακών, κρασί, μύρα, χυμό σταφυλιού, αρωματικό καφέ, κακάο και τα προϊόντα του κακάο, χοιρινό κρέας και εδώδιμους ιστούς σφάγιων χοίρων), το 85% προερχόταν από χώρες της Ευρώπης (Κροατία, Δανία, Φιλανδία, Γαλλία, Ισπανία, Σουηδία, Ελβετία και Ηνωμένο Βασίλειο), το 7% από χώρες της Νοτίου Αμερικής (Βραζιλία και Ουρουγουάη), το 6% από χώρες της Βορείου Αμερικής (Καναδά και Η.Π.Α.), 1% από χώρες της Αφρικής (Σιέρα Λεόνε και Τυνησία) και 1% από χώρες της Ασίας (Ντουμπάϊ και Ιαπωνία) (JECFA, 2001). Οι μέσες συγκεντρώσεις της τοξίνης που ανιχνεύθηκαν στα κρεατοσκευάσματα από χοιρινό κρέας ήταν 0,052 µg/kg, ενώ συγκριτικά οι αντίστοιχες τιμές στα δημητριακά ήταν 0,94 µg/kg.

Για την επιστήμη της ασφάλειας τροφίμων ενδιαφέρον έχει η υψηλή τοξικότητά της, αλλά και η ανθεκτικότητά σε υψηλές θερμοκρασίες, αφού η ΩΤΑ είναι πολύ σταθερή ουσία και δεν καταστρέφεται από τις συνήθεις επεξεργασίες που εφαρμόζονται κατά την παρασκευή των τροφίμων, καθώς απαιτείται θερμοκρασία πάνω από 250 °C για αρκετά λεπτά για να μειωθεί η συγκέντρωση της τοξίνης (Boudra et al., 1995). Συνεπώς, τόσο νωπά όσο και προϊόντα θερμικής επεξεργασίας χοιρινού κρέατος μπορεί να περιέχουν ΩΤΑ.

Επιπλέον της παρουσίας της ΩΤΑ στο χοιρινό κρέας που χρησιμοποιείται ως πρώτη ύλη, η ανίχνευση της στα τελικά προϊόντα μπορεί να σχετίζεται με διάφορους παραμέτρους κατά την παρασκευή ή τη συντήρησή τους. Οι περιβαλλοντολογικές συνθήκες που υπάρχουν στους χώρους παρασκευής και ωρίμανσης πολλών προϊόντων αλλαντοποιίας είναι ευνοϊκές για την ανάπτυξη μυκήτων, που ανήκουν κυρίως στα γένη *Aspergillus* και *Penicillium* στην επιφάνεια των προϊόντων (Mizakova et al., 2002; Comi et al., 2004; Dall'Asta et al., 2010). Έχει διαπιστωθεί ότι οι μύκητες *P. verrucosum*, *P. nordicum*, και *A. ochraceus* είναι ικανοί να παράγουν ΩΤΑ όταν αναπτύσσονται στην επιφάνεια του χοιρινού κρέατος και σε προϊόντα του, όπως τα αλλαντικά ωρίμανσης (Leistner, 1984; Gareis & Scheuer, 2000; Curtui et al., 2001; Spotti et al., 2001; Chiavaro et al., 2002; Castella et al. 2002; Comi et al. 2004; Matrella et al. 2006, Pietri et al., 2006; Battilani et al., 2007; Sorensen et al., 2008; Iacumin et al., 2009). Επιπρόσθετα η χρήση μολυσμένων καρυκευμάτων μπορεί να συμβάλει στην ανίχνευση της τοξίνης στα προϊόντα χοιρινού κρέατος (Nunez et al., 1996; Gareis & Scheuer, 2000; Bailly et al., 2005).

Στην Σερβία το 2012 πραγματοποιήθηκε μια μελέτη στην οποία έγινε ανάλυση κινδύνου και αξιολόγηση έκθεσης σε ΩΤΑ (Milicevic et al., 2012). Σκοπός της μελέτης αυτής ήταν να ελεγχθεί η σημερινή κατάσταση της μόλυνσης από ΩΤΑ του Σερβικού χοιρινού κρέατος και κοτόπουλου από τα εκ φύσεως εκτεθειμένα ζώα που αποτελούν μέρος της αλυσίδωτης παραγωγής. Η γνώση αυτή θα μπορούσε να χρησιμοποιηθεί ως εργαλείο, από την άποψη της ασφάλειας των τροφίμων, προκειμένου να προβλεφθεί εάν η περιεκτικότητα σε ΩΤΑ σε χοιρινό και κοτόπουλο, ενέχει κίνδυνο για την ανθρώπινη υγεία και επιβλαβείς επιδράσεις στην υγεία και την ευεξία των ζώων. Συνολικά συλλέχθηκαν 540 δείγματα χοίρειου αίματος, νεφρού, ήπατος και κοτόπουλου τα οποία και επιλέχθηκαν τυχαία από (N = 90) χοίρους και κοτόπουλα (n = 90) και εξετάστηκαν για την παρουσία ΩΤΑ με Υγρή Χρωματογραφία υψηλής απόδοσης (HPLC-FL).

Τα αποτελέσματα στα δείγματα χοιρινού ιστού έδειξαν πως από τα 90 δείγματα ήπατος, το 26,6% περιείχε ΩΤΑ σε εύρος από 0,22-14,5 ng/g. Η επίπτωση της ΩΤΑ στον ορό και στους νεφρούς ήταν πολύ παρόμοια (31% και 33,3% αντίστοιχα), με μέγιστη συγκέντρωση 220,8 ng/ml και 52,5 ng/g, αντίστοιχα. Η πλειοψηφία των δειγμάτων ιστών κοτόπουλων δεν βρέθηκε να περιέχει μετρήσιμες ποσότητες ΩΤΑ. Επιπλέον, τα επίπεδα της ΩΤΑ που βρέθηκαν στους ιστούς που αναλύθηκαν ήταν γενικά χαμηλά. Συμπερασματικά, τα αποτελέσματα αυτής της έρευνας δείχνουν ότι η περιεκτικότητα της ΩΤΑ στους εξεταζόμενους ιστούς είναι πολύ μικρότερη από αυτή που ενέχει κίνδυνο για την υγεία των καταναλωτών. Ωστόσο, τα αποτελέσματα αυτής της μελέτης δείχνουν ότι στη Σερβία, οι καταναλωτές συχνά εκτίθενται σε ωχρατοξίνες.

## 2.7 Παρουσία της ΩΤΑ στο χοιρινό κρέας και τα προϊόντα του

Πολλές έρευνες έχουν διεξαχθεί σε διάφορες χώρες για την παρουσία της ΩΤΑ στους εδάδιμους ιστούς των χοίρων και στα προϊόντα από χοιρινό κρέας. Σε έρευνες που πραγματοποιήθηκαν για την ανίχνευση της ΩΤΑ σε τρόφιμα σε διάφορες χώρες το χρονικό διάστημα 1990-1998 (JECFA 2001), η μέση συγκέντρωση της τοξίνης που ανιχνεύθηκε στα προϊόντα από χοιρινό κρέας ήταν 0,052  $\mu\text{g}/\text{kg}$ . Τα συγκεντρωτικά αποτελέσματα δύο μελετών για την παρουσία της ΩΤΑ στα τρόφιμα στις χώρες της Ευρωπαϊκής Ένωσης (SCOOP task 3.2.2. EU 1997, SCOOP task 3.2.7. EU 2002) για τα χρονικά διαστήματα 1997-1999 και 2000-2002 έδειξαν ότι σε σύνολο 1.860 δειγμάτων κρέατος που εξετάστηκαν (στοιχεία από Γαλλία, Γερμανία, Ιταλία και Ηνωμένο Βασίλειο) ανιχνεύτηκε σχετικά χαμηλό ποσοστό θετικών δειγμάτων (18%). Το σύνολο των θετικών δειγμάτων προέρχονταν από τρόφιμα χοιρινού κρέατος και η μέση συγκέντρωση τοξίνης σε αυτά ήταν 0,19  $\mu\text{g}/\text{kg}$ .

Σε μελέτη που πραγματοποιήθηκε στη Βόρειο Ιταλία για την παρουσία της ΩΤΑ σε μύες και νεφρούς χοίρων, οι Matrella et al., 2006 αναφέρουν ότι σε σύνολο 54 δειγμάτων όλα τα δείγματα βρέθηκαν μολυσμένα με τοξίνη. Συγκεκριμένα στο 78% των δειγμάτων βρέθηκε ότι η συγκέντρωση της ΩΤΑ ήταν μεγαλύτερη από 0,05  $\text{ng}/\text{g}$ . Στην ίδια μελέτη, στο 20% των δειγμάτων η συγκέντρωση της τοξίνης ήταν μεγαλύτερη από 0,5  $\text{ng}/\text{g}$ , ενώ η μεγαλύτερη συγκέντρωση που καταγράφηκε ήταν 0,9  $\text{ng}/\text{g}$ . Οι μέσες τιμές που καταγράφηκαν ήταν 0,024 και 0,29  $\text{ng}/\text{g}$  για τους μύες και τους νεφρούς των χοίρων που εξετάστηκαν, αντίστοιχα. Η συγκέντρωση της ΩΤΑ σε όλα τα δείγματα ήταν χαμηλότερη από το επίσημο όριο στην Ιταλία (1  $\text{ng}/\text{g}$ ) για τα προϊόντα από χοιρινό κρέας. Την ίδια περίοδο οι Pietri et al., 2006 σε μια έρευνα για την παρουσία της ΩΤΑ στους μύες των χοίρων στην Ιταλία, μόνο το 9% των δειγμάτων βρέθηκε θετικό. Η μέση τιμή των συγκεντρώσεων (0,05  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ) και η μεγαλύτερη συγκέντρωση (0,06  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ) που καταγράφηκε ήταν εξαιρετικά χαμηλές. Ανάλογα, οι Curtui et al., 2001 στην μελέτη τους που πραγματοποιήθηκε στη Ρουμανία το 2001, το ποσοστό μόλυνσης των μυών των χοίρων ήταν χαμηλό (17%) με μέση συγκέντρωση της τοξίνης στα θετικά δείγματα 0,15  $\text{ng}/\text{g}$ . Αντίθετα το 98% των δειγμάτων αίματος βρέθηκαν θετικά στην παρουσία της τοξίνης σε συγκεντρώσεις που κυμαίνονταν από 0,05  $\text{ng}/\text{ml}$  έως 13,4  $\text{ng}/\text{ml}$ . Τα ποσοστά θετικών δειγμάτων νεφρών και ήπατος κυμάνθηκαν σε ανάλογα επίπεδα (79 και 75%) με μέση συγκέντρωση τοξίνης 0,54  $\text{ng}/\text{g}$  και 0,16  $\text{ng}/\text{g}$ , αντίστοιχα. Σε άλλη μελέτη η οποία πραγματοποιήθηκε στη Ρουμανία το 2001 από τους Curtui & Gareis, 2001, το 94% των δειγμάτων αίματος από χοίρους βρέθηκε θετικό με συγκεντρώσεις της τοξίνης 0,1  $\text{ng}/\text{kg}$  έως 13,4  $\text{ng}/\text{kg}$ . Σε μελέτη που πραγματοποιήθηκε στη Δανία το 1999 (Jorgensen & Petersen, 2002) η συγκέντρωση της ΩΤΑ στους νεφρούς των χοίρων κυμαινόταν από 0  $\mu\text{g}/\text{kg}$  έως 15  $\mu\text{g}/\text{kg}$  (μέση συγκέντρωση 0,50  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ), ενώ στους μύες από τα ίδια ζώα η αντίστοιχη συγκέντρωση κυμαινόταν από 0  $\mu\text{g}/\text{kg}$  έως 2,9  $\mu\text{g}/\text{kg}$  (μέση συγκέντρωση 0,12  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ). Οι ερευνητές υπολόγισαν ότι το επίπεδο της τοξίνης στα δείγματα από τους μύες βρίσκονταν στο 39% του επιπέδου της συγκέντρωσης στους νεφρούς. Σε έρευνα που πραγματοποιήθηκε το 1988 στο Δυτικό Καναδά το 7,8% των δειγμάτων αίματος χοίρων είχαν συγκεντρώσεις ΩΤΑ που ξεπερνούσαν τα 20  $\text{ng}/\text{ml}$ . Σε επόμενη έρευνα το 1989-90, 16-65% των δειγμάτων είχαν ανιχνεύσιμα επίπεδα ΩΤΑ με μέση συγκέντρωση 5,4-19,4  $\text{ng}/\text{ml}$  (Frohlich et al., 1991).

Οι Dragacci et al., 1999 πραγματοποίησαν μια έρευνα στη Γαλλία λαμβάνοντας δείγματα νεφρών από 300 υγιείς και 100 χοίρους με νεφροπάθεια το 1997 και 710 από υγιείς χοίρους το 1998. Στην έρευνα του 1997 λιγότερο από 10% των δειγμάτων ήταν σημαντικά μολυσμένα με ΩΤΑ και το 1% των δειγμάτων περιείχαν την τοξίνη σε συγκεντρώσεις 0,40 mg/kg έως 1,40 mg/kg. Στην έρευνα του 1998 το 7,6% περιείχαν ΩΤΑ σε συγκεντρώσεις 0,5 mg/kg έως 5 mg/kg. Στους νεφρούς με πρόβλημα μόνο ίχνη (0,16 mg/kg έως 0,48 mg/kg) ανιχνεύτηκαν σε 6 από τα 100 δείγματα. Σε μια πιο πρόσφατη έρευνα των Stoen et al., 2010 που διεξάχθηκε σε χοίρους με νεφροπάθεια στη Βουλγαρία η μέση συγκέντρωση της τοξίνης ήταν 188,8 μg/kg.

Σε έρευνα των Dall'Asta et al., 2010 που πραγματοποιήθηκε στην Ιταλία, αλλαντικά που παρασκευάστηκαν με πρώτη ύλη το κρέας από χοίρους που λάμβαναν με τροφή ΩΤΑ για 40 ημέρες (πρόσληψη 0,68 mg/ημέρα, 4,8 μg/kg Σ.Β.) βρέθηκαν να περιέχουν τοξίνη λόγω της κατανάλωσης μολυσμένης τροφής. Ωστόσο οι συγκεντρώσεις της τοξίνης στους μύες μετά τη σφαγή και στα τελικά προϊόντα ήταν χαμηλά (εύρος 2,40–3,32 μg/kg).

Στην Ιταλία, οι Monaci et al., 2005 εξέτασαν 30 δείγματα σαλαμιού από χοιρινό κρέας και βρήκαν ότι τα 14 ήταν μολυσμένα με ΩΤΑ με συγκεντρώσεις 0,006 έως 1 ng/kg (μέση συγκέντρωση 0,4 ng/kg). Σε άλλη μελέτη που πραγματοποιήθηκε επίσης στην Ιταλία οι Chiavaro et al., 2002 εξέτασαν 42 δείγματα από χοιρομήρι για την παρουσία ΩΤΑ. Τα 24 δείγματα βρέθηκαν μολυσμένα με την τοξίνη σε συγκεντρώσεις 0,04 μg/kg έως 1 μg/kg, 7 δείγματα με συγκεντρώσεις 1-2 μg/kg και 1 δείγμα με 2,3 μg/kg.

Ο Frank, 1991 διαπίστωσε ότι 58 από τα 325 δείγματα (ποσοστό 18%) στη Γερμανία που περιείχαν ορό χοιρινό ήταν μολυσμένα με ΩΤΑ με ένα μέσο όρο 0,15 mg/kg. Σε μια έρευνα που διεξάχθηκε από τους Gareis et Scheuer, 2000 εκτίμησαν την παρουσία της ΩΤΑ σε προϊόντα χοιρινού κρέατος, το 68%, 46,7% και 77,2% των δειγμάτων, σε τύπου «πατέ», σε τύπου Bologna και σε αλλαντικά αίματος αντίστοιχα βρέθηκε θετικό. Η μέση τιμή της συγκέντρωσης της ΩΤΑ για τα τύπου «πατέ» ήταν 0,02 μg/kg (ανώτερη τιμή 4,56 μg/kg), για τα αλλαντικά αίματος η μέση τιμή ήταν 0,04 μg/kg (ανώτερη τιμή 3,16 μg/kg) και για τα αλλαντικά τύπου Bologna η μέση συγκέντρωση ΩΤΑ ήταν 0,01 μg/kg (ανώτερη τιμή 0,38 μg/kg). Η αυξημένη συγκέντρωση της ΩΤΑ που διαπιστώθηκε στις παραπάνω έρευνες οφείλεται κυρίως στη χρήση του αίματος, του ήπατος ή των νεφρών στην παρασκευή των αλλαντικών. Επιπρόσθετα η προσθήκη καρυκευμάτων όπως η πάπρικα, το πιπέρι, το μοσχοκάρυδο και το κόλιανδρο μπορεί να συμβάλει στην τελική συγκέντρωση της τοξίνης στα τελικά προϊόντα (Nunez et al., 1996; Gareis & Scheuer, 2000; Bailly et al., 2005).

Στην έρευνα των Pietri et al., 2006 παρόλο που το χοιρινό κρέας που χρησιμοποιήθηκε ως πρώτη ύλη είχε χαμηλή συγκέντρωση ΩΤΑ, διαπιστώθηκε υψηλό ποσοστό θετικών δειγμάτων σε ορισμένα προϊόντα όπως σε χοιρομήρια (θετικά 40%) και μάλιστα η συγκέντρωση της τοξίνης ήταν ιδιαίτερα υψηλή (μέση τιμή 4,06 μg/kg, μέγιστη συγκέντρωση 28,4 μg/kg). Οι συγγραφείς πρότειναν ότι η μόλυνση με στελεχά μυκήτων που παράγουν ΩΤΑ στην διάρκεια της ωρίμανσης ορισμένων προϊόντων από χοιρινό κρέας μπορεί να εξηγήσει τα υψηλά επίπεδα της τοξίνης που βρέθηκε σε ορισμένα δείγματα. Στην έρευνα των Dall'Asta et al., 2010 σε δείγματα από χοιρομήρια που διεξάχθηκε στην Ιταλία, έδειξε την παρουσία της ΩΤΑ στην επιφάνεια σε 84 από τα 110

δείγματα με μια μέση τιμή της συγκέντρωσης 0,53 µg/kg, ενώ στο εσωτερικό μόνο στα 32 από τα 110 δείγματα με μια μέση τιμή μικρότερη από 0,1 µg/kg.

Στην έρευνα των Iacumin et al., 2009 συνολικά 757 στελέχη μυκήτων απομονώθηκαν από θήκες αλλαντικών. *A. ochraceus* απομονώθηκε μόνο σε μία παρτίδα. Περίπου το 45% αυτών των δειγμάτων ήταν θετικά για την παρουσία ΩΤΑ. Στις θήκες των εξεταζόμενων αλλαντικών οι χαμηλότερες και υψηλότερες συγκεντρώσεις της ΩΤΑ που προσδιορίστηκαν ήταν 3 mg/kg και 18 mg/kg αντίστοιχα. Η απομάκρυνση όμως των μυκήτων από τη θήκη των αλλαντικών ελαχιστοποιούσε ή και εξάλειψε το κίνδυνο.

Σε μελέτη των Pleadin et al., 2015 στην Κροατία, ερευνήθηκε η παρουσία της ΩΤΑ σε παραδοσιακά Κροατικά προϊόντα. Η μελέτη περιελάμβανε συνολικά 410 δείγματα παραδοσιακών χοιρομήριων (n=105), λουκάνικα ξηράς ζύμωσης (n=208), μπέικον (n=62) και μαγειρεμένα λουκάνικα (n=35), που συλλέχθηκαν σε διάστημα τεσσάρων ετών (2011-2014). Οι συγκεντρώσεις μυκοτοξινών ποσοτικοποιήθηκαν και επιβεβαιώθηκαν με τη χρήση της επικυρωμένης μεθόδου ανοσοπροσδιορισμού (ELISA) και Υγρής Χρωματογραφία υψηλής απόδοσης με ανίχνευση φθορισμού (HPLC-FLD), αντίστοιχα. Το μέγιστο παρατηρούμενο επίπεδο ΩΤΑ στα ζυμωμένα λουκάνικα και τα ζαμπόν ήταν περίπου 5 φορές (5,10 mg/kg) έως 10 φορές (9,95 mg/kg) υψηλότερα από το μέγιστο συνιστώμενο επίπεδο (1 mg/kg) που προβλέπεται για τα προϊόντα χοιρινού κρέατος σε ορισμένες χώρες της ΕΕ. Τα αποτελέσματα έδειξαν περιστασιακή μόλυνση με μυκοτοξίνη στα παραδοσιακά προϊόντα με βάση το κρέας, ειδικά από την ΩΤΑ, επισημαίνοντας ότι για να αποφευχθεί αυτή η μόλυνση, το κρέας και τα προϊόντα με βάση το κρέας στα νοικοκυριά πρέπει να παράγονται και να υφίστανται επεξεργασία υπό τυποποιημένες και καλά ελεγχόμενες συνθήκες συνθήκες.

Οι Armorini et al., 2015 πραγματοποίησαν μελέτη για να εξετάσουν την παρουσία της ΩΤΑ σε σαλάμι. Η αναλυτική μέθοδος που χρησιμοποιήθηκε, περιελάμβανε την προετοιμασία του δείγματος με στήλες ανοσοσυγγένειας (IAC), ανάλυση με υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης με ανίχνευση φθορισμού (HPLC-FD), ενώ έχει εγγυηθεί υψηλό ποσοστό ανάκτησης (περίπου 97%) και όριο ανίχνευσης (LOD) και όριο ποσοτικοποίησης (LOQ), αντίστοιχα, 0,06 µg/kg και 0,20 µg/kg. Η ΩΤΑ ανιχνεύθηκε σε πέντε δείγματα, αλλά μόνο μία υπερέβη την τιμή κατευθυντήριας γραμμής (1 µg/kg) που καθιερώθηκε από το ιταλικό Υπουργείο Υγείας για το χοιρινό κρέας και τα παράγωγα προϊόντα. Τα αποτελέσματα φαίνεται να δείχνουν ότι το σαλάμι που παράγεται με την παραδοσιακή, μη βιομηχανική μέθοδο παραγωγής, μπορεί να θεωρηθεί ασφαλές όσον αφορά τη μόλυνση από την ΩΤΑ. Ωστόσο, η πολύ υψηλή συγκέντρωση που παρατηρείται σε ένα δείγμα αποδεικνύει ότι είναι δυνατή και η υψηλή μόλυνση με ΩΤΑ σε αυτό το είδος προϊόντος. Επομένως, οι έλεγχοι της μόλυνσης από μυκοτοξίνες πρέπει να λαμβάνουν υπόψη και το σαλάμι.

Το 2013 οι Bertuzzi et al., πραγματοποίησαν μια ακόμη μελέτη για την ΩΤΑ. Σκοπός αυτής της μελέτης ήταν η αξιολόγηση της συμβολής της άμεσης και έμμεσης μόλυνσης στα επίπεδα ΩΤΑ στα διάφορα προϊόντα χοιρινού κρέατος που έχουν ωριμάσει. Ένα σύνολο 24 μεγάλων λευκών χοίρων τροφοδοτήθηκε φυσικά με ΩΤΑ (4 διαφορετικά επίπεδα μόλυνσης, από 0,40 mg/kg έως 171 mg/kg) για 2 εβδομάδες. Τα τυπικά Ιταλικά προϊόντα χοιρινού κρέατος (λουκάνικα ξηράς ωρίμανσης, χοιρινή ωμοπλάτη ξηράς ωρίμανσης, μπέικον και χοιρομήρι ξηράς ωρίμανσης), παρασκευάστηκαν χρησιμοποιώντας τους μολυσμένους ιστούς και ωρίμαζαν σε 3 μονάδες παραγωγής

προϊόντων ξηράς ωρίμανσης. Το πλάσμα, τα όργανα, οι ιστοί και τα προϊόντα ωρίμανσεως χοιρινού κρέατος αναλύθηκαν για περιεκτικότητα σε ΩΤΑ. Όσον αφορά τα ζώα που τροφοδοτήθηκαν με ελαφρώς μικρότερη συγκέντρωση από 50 mg/kg, η τιμή καθοδήγησης που συνιστά η Επιτροπή στις Ευρωπαϊκές Κοινότητες, τα επίπεδα ΩΤΑ που βρέθηκαν στους μύς και στα ωριμασμένα προϊόντα ήταν κοντά στο 1 mg/kg (εύρος μέσων τιμών 0.65-1.62 mg/kg), η κατευθυντήρια τιμή στα προϊόντα με βάση το κρέας που συνιστά το Ιταλικό Υπουργείο Υγείας. Το λουκάνικο ξηράς ωρίμανσης και η ωμοπλάτη χοιρινού κρέατος ξηράς ωρίμανσης, έδειξαν σημαντικά υψηλότερες συγκεντρώσεις ΩΤΑ από το ζαμπόν ξηράς ωρίμανσης και από το μπέικον ξηράς ωρίμανσης επίσης. Η ΩΤΑ υποβαθμίστηκε μερικώς κατά τη διάρκεια του χρόνου μακράς ωρίμανσης του ζαμπόν ξηράς ωρίμανσης. Στο λουκάνικο και στη χοιρινή ωμοπλάτη η άμεση μόλυνση ήταν χαμηλή και δεν ανιχνεύθηκε καθόλου στο μπέικον. Αντίθετα, πολύ υψηλά επίπεδα ΩΤΑ ανιχνεύθηκαν σε αρκετά εξωτερικά δείγματα ζαμπόν ξηράς ωρίμανσης (μέγιστη τιμή ΩΤΑ: 314 mg/kg). Αυτά τα αποτελέσματα επιβεβαίωσαν ότι η άμεση μόλυνση θα πρέπει να παρακολουθείται κυρίως σε ζαμπόν ξηράς ωρίμανσης, ενώ η έμμεση μόλυνση μπορεί τελικά να είναι σημαντική σε άλλα προϊόντα χοιρινού κρέατος που έχουν ωριμάσει.

Μελέτη για την παρουσία της ΩΤΑ τόσο στο χοιρινό κρέας, συμπεριλαμβανομένων των διαφόρων ιστών χοίρων (ήπαρ, νεφροί, λίπος) και των βιολογικών υγρών τους (πλάσμα και ορός αίματος) όσο και στα προϊόντα χοιρινού κρέατος, όπως φαίνεται από τα παραπάνω, έχουν πραγματοποιηθεί σε διάφορες χώρες και σε διαφορετικά χρονικά διαστήματα. Στους πίνακες 6 και 7 που ακολουθούν παρουσιάζονται συνολικά οι μελέτες αυτές.

**Πίνακας 6.** Παρουσία ΩΤΑ στο χοιρινό κρέας

Δείγμα	Χρονικό διάστημα	ΩΤΑ συγκέντρωση	Χώρα	Πηγή
Χοιρινό κρέας	1999	0-2,9 µg/kg μέση: 0,12 µg/kg	Δανία	Jorgensen & Petersen, 2002
	2001	Θετικά: 17% μέση: 0,15 ng/g	Ρουμανία	Curtui et al., 2001
	2005	μέση: 0,024 ng/g	Βόρειο Ιταλία	Matrella et al., 2006
	2006	Θετικά: 9% μέση: 0,05 µg/g μέγιστη: 0,06 µg/kg	Ιταλία	Pietri et al., 2006
	2016	Μέγιστη:0,20µg/kg μέση:0,13±0,04 µg/kg Μέση: 4,72µg/kg	Ιταλία Κροατία	Giacomo et al., 2016 Pleadin et al., 2016
Κρέας & Νεφροί χοίρου	2005	<b>78%: &gt; 0,05, 20%: &gt; 0,5 ng/g</b> μέγιστη: 0,9 ng/g	Βόρειο Ιταλία	Matrella et al., 2006
Νεφροί	1997	<b>10%: υψηλές συγκεντρώσεις 1% : 0,40-1,40 mg/kg</b>	Γαλλία	Dragacci et al.,1999
	1998	<b>7,6%: 0,5 -5 mg/kg</b>	Γαλλία	
	1999	<b>0-15 µg/kg μέση: 0,50 µg/kg</b>	Δανία	Jorgensen & Petersen, 2002
	2001	<b>θετικά: 79% μέση: 0,54 ng/g</b>	Ρουμανία	Curtui et al., 2001
	2006	<b>μέση: 0,29 ng/g</b>	Βόρειο Ιταλία	Matrella et al., 2006
* με νεφροπάθεια	2009-10	Θετικά:33,4% Μέγιστη: 52.5 ng/g	Σερβία	Milicevic et al., 2012
	2012	Μέση: 0,13µg/kg	Ιταλία	Bertuzzi et al., 2013
	2016	Μέγιστη:0,91µg/kg μέση:0,37±0,30 µg/kg Μέση: 13.87µg/kg	Ιταλία Κροατία	Giacomo et al.,2016 Pleadin et al., 2016
Ήπαρ	2001	θετικά: 75% μέση: 0,16 ng/g	Ρουμανία	Curtui et al., 2001
	2009-10	Θετικά:26,7% Μέγιστη: 14.5 ng/g	Σερβία	Milicevic et al., 2012
	2012	Μέση: 0,06µg/kg	Ιταλία	Bertuzzi et al., 2013
	2016	Μέγιστη: 0,59µg/kg μέση:0,35±0,20 µg/kg Μέση: 7,28µg/kg	Ιταλία Κροατία	Giacomo et al., 2016 Pleadin et al., 2016
Αίμα	1988	7,8% > 20 ng/ml	Καναδάς	Frohlich et al., 1991
	1989-90	θετικά: 16-65% μέση:5,4-19,4 ng/ml	Καναδάς	Frohlich et al., 1991
	2001	<b>θετικά: 98% 0,05-13,4 ng/ml</b>	Ρουμανία	Curtui et al., 2001
	2001	<b>θετικά δείγματα: 94% 0,1-13,4 ng/Kg</b>	Ρουμανία	Curtui & Gareis,2001
(Ορός)	2009-10	Θετικά:31,2% Μέγιστη:220.8 ng/mL	Σερβία	Milicevic et al., 2012
(Πλάσμα)	2012	Μέση: 0,19µg/L	Ιταλία	Bertuzzi et al., 2013
(Ορός)		Μέση: 4,77µg/L	Κροατία	Pleadin et al., 2016
Λίπος		Μέση: 4,11µg/kg	Κροατία	Pleadin et al., 2016



**Πίνακας 7.** Παρουσία ΩΤΑ στα προϊόντα χοιρινού κρέατος

Δείγμα	Χρονικό διάστημα	ΩΤΑ συγκέντρωση	Χώρα	Πηγή
Διάφορα προϊόντα	1990-1998	μέση:0,052 µg/Kg	Διάφορες χώρες	JECFA 2001
	1997-1999 & 2000-2002	θετικά :18%	Γαλλία, Γερμανία, Ιταλία, Η.Β.	EU 1997, EU 2002
	2012	Θετικά:25% μέση:0,405µg/kg	Πορτογαλία	Duarte et al., 2012
Χοιρομήρια		57,1%: 0,04-1 µg/kg 16,7%: 1-2 µg/kg 2,4%: 2,3 µg/kg	Ιταλία	Chiavaro et al., 2002
	2006	<b>Θετικά: 40%</b> <b>μέση:4,06</b> <b>μέγιστη:28,4 µg/kg</b>	Ιταλία	Pietri et al., 2006
* στην επιφάνεια	2009	<b>θετικά: 92,4%</b> μέση: 0,53 µg/kg	Ιταλία	Dall'Asta et al., 2010
* στο κέντρο	2009	<b>θετικά: 35,2%</b> μέση:<0,1 µg/kg	Ιταλία	Dall'Asta et al., 2010
	2011-2014	<b>Θετικά: 13,6 - 33,3%</b> μέση:0,16- 1,82µg/kg	Κροατία	Pleadin et al., 2014
Χοιρομήρια αλιπάστωσης	2013	Θετικά:22,1% Μέγιστη: 9,95 µg/kg	Κροατία	Vulić et al., 2016
Αλλαντικά ωρίμανσης	2005	θετικά:46,7% 0,006-1 ng/kg μέση: 0,4 ng/kg		Monaci et al., 2005
(Λουκάνικα)	2011-2014	Θετικά:5,7-7,2% μέση:0,08-0,21µg/kg	Κροατία	Pleadin et al., 2014
(Bacon)	2011-2014	Θετικά:5,9% μέση:0,07µg/kg	Κροατία	Pleadin et al., 2014
* industrial	2013	Θετικά:32,1% Μέγιστη: 7,12 µg/kg	Κροατία	Vulić et al.,2016
* homemade		Θετικά:14,3% Μέγιστη: 6,26 µg/kg		
Θήκες από αλλαντικά ωρίμανσης		Θετικά: 45% 3-18 mg/kg		Iacumin et al.,2009
Προϊόντα τύπου «πατέ»	2000	θετικά: 68% μέση:0,02 μέγιστη:4,56 µg/kg		Gareis & Scheuer, 2000
αλλαντικά ήπατος «πατέ»	2011-2014	Θετικά:11,1% μέση:0,26µg/kg	Κροατία	Pleadin et al.,2014
Προϊόντα τύπου Bologna	2000	θετικά: 46,7% μέση:0,01 μέγιστη:0,38 µg/kg		Gareis & Scheuer, 2000
Αλλαντικά αίματος	2000	<b>θετικά: 77,2%</b> <b>μέση:0,04</b> <b>μέγιστη:3,16 µg/kg</b>		Gareis & Scheuer, 2000
Προϊόντα με ορό χοιρινό	1991	θετικά:18% μέση:0,15 mg/kg	Γερμανία	Frank, 1991

## 2.8 Συμμετοχή του χοιρινού κρέατος και των προϊόντων του στην πρόσληψη της ΩΤΑ από τον άνθρωπο

Τα πορίσματα των επιστημονικών μελετών από όλο τον κόσμο συντείνουν στο ότι η παρουσία μυκοτοξινών στα τρόφιμα θέτει σε σοβαρό κίνδυνο την υγεία των καταναλωτών. Αυτό έχει οδηγήσει τόσο σε εντατικούς ελέγχους όσον αφορά την παρουσία τους στα διάφορα τρόφιμα όσο και στην καθιέρωση ορίων, όπως και στην Ε.Ε. Η Ευρωπαϊκή Αρχή για την Ασφάλεια των Τροφίμων (EFSA) έθεσε ένα ανεκτό όριο εβδομαδιαίας πρόσληψης (ΑΟΕΠ) ύψους 120 ng/kg Σ.Β. (EC 1881/2006).

Πρόσφατη μελέτη για την πρόσληψη με την τροφή της ΩΤΑ από τους ευρωπαίους καταναλωτές, διαπίστωσε ότι η εβδομαδιαία πρόσληψη ποικίλει από 15 ng έως 60 ng ΩΤΑ/kg Σ.Β., και συνεπώς είναι σημαντικά μικρότερη από το ΑΟΕΠ, ακόμη και στους καταναλωτές με μεγάλη κατανάλωση τροφίμων που περιέχουν υψηλή συγκέντρωση της τοξίνης (EFSA, 2006).

Σε μελέτες που πραγματοποιήθηκαν στα πλαίσια δύο επιστημονικών προγραμμάτων για την παρουσία της ΩΤΑ στα τρόφιμα στις χώρες της Ένωσης (SCOOP task 3.2.2. EU 1997, SCOOP task 3.2.7. EU 2002), μετά από συσχέτιση των συγκεντρώσεων της τοξίνης στο πλάσμα αίματος ανθρώπων από Γαλλία, Νορβηγία, Σουηδία με τις αντίστοιχες συγκεντρώσεις στα τρόφιμα για τα χρονικά διαστήματα 1997-1999 και 2000-2002, έδειξε ότι τα δημητριακά συνέβαλλαν κατά 50%, ενώ το χοιρινό κρέας μόλις 1%. Ο Jorgensen, 2005 εκτίμησε τη συνολική πρόσληψη της ΩΤΑ από τους καταναλωτές στην Ευρώπη σε 45 μg/kg Σ.Β. εβδομαδιαίως, ενώ η συνεισφορά των προϊόντων από χοιρινό κρέας υπολογίστηκε περίπου σε 1,5 μg/kg Σ.Β. εβδομαδιαίως. Σε έρευνα του Frank, 1991 υπολογίστηκε ότι η κατανάλωση αλλαντικών συμμετείχε με 1,6 ng στην ημερήσια πρόσληψη της ΩΤΑ στους κατοίκους της Γερμανίας.

Μια εκτεταμένη μελέτη για την έκθεση του καταναλωτή στην ΩΤΑ πραγματοποιήθηκε από τους SCF (EC 1998) και JECFA (FAO/WHO, 2001). Το SCF εκτίμησε ότι η μέση ημερήσια πρόσληψη ποικίλει από 0,7 ng/kg έως 4,6 ng/kg Σ.Β. Ανάλογα το JECFA εκτίμησε μια πρόσληψη περίπου 90 ng/kg Σ.Β. ανά εβδομάδα που αντιστοιχεί σε 13 ng/kg Σ.Β. ανά ημέρα. Η πρόσληψη σχετίζεται κυρίως με την κατανάλωση φυτικής προέλευσης προϊόντων και μόνο σε μικρό βαθμό προέρχεται από τρόφιμα ζωικής προέλευσης (EFSA, 2004a,b). Ωστόσο η κατανάλωση ορισμένων προϊόντων που περιέχουν μεγάλες ποσότητες χοιρινού αίματος (Thuvander et al., 2001), συμβάλει σημαντικά στην πρόσληψη της ΩΤΑ (EFSA, 2006), κυρίως στα παιδιά στα οποία το σχετικά χαμηλό σωματικό βάρος συγκριτικά με τους ενήλικες έχει σαν αποτέλεσμα την υψηλότερη έκθεση ανά kg Σ.Β. Οι Frohlich et al., 1991 εξετάζοντας δείγματα αίματος από ανθρώπους διαπίστωσαν ότι η ΩΤΑ βρίσκεται στο αίμα των ανθρώπων στο Καναδά (σε ποσοστό περίπου 40%). Οι συγγραφείς συσχετίζοντας τα αποτελέσματα αυτά με την παρουσία των μολυσμένων με ΩΤΑ δειγμάτων αίματος από χοίρους πριν τη σφαγή, εξέφρασαν την άποψη ότι πιθανά σημεία της εισόδου της τοξίνης στη ανθρώπινη τροφική αλυσίδα είναι τα μολυσμένα με την τοξίνη προϊόντα χοιρινού κρέατος.

Σκοπός της μελέτης των Biasucci et al., 2010 ήταν η απόδειξη της σχέσης μεταξύ των διατροφικών συνηθειών, συμπεριλαμβανομένου και του χοιρινού κρέατος, έγκυων γυναικών ιταλικής αλλά και αλλοδαπής ιθαγένειας που είναι κάτοικοι της Ιταλίας και

την παρουσία ωχρατοξίνης A στον ορό του αίματος και στο μητρικό γάλα. Η μελέτη αυτή περιελάμβανε 130 έγκυες γυναίκες και η διατροφή τους κατά τη διάρκεια της εγκυμοσύνης, αξιολογήθηκε με τη βοήθεια του ενός ερωτηματολογίου (EPIC). Η περιεκτικότητα σε ΩΤΑ προσδιορίστηκε στον ορό του αίματος και στο μητρικό γάλα με HPLC. Τα αποτελέσματα έδειξαν πως η μέση ημερήσια διατροφική πρόσληψη ΩΤΑ ήταν  $1,02 \pm 1,20$  και  $0,87 \pm 0,78$  ng/kg σωματικού βάρους για τις γυναίκες Ιταλικής ιθαγένειας και μή, αντίστοιχα, αλλά αυτή η διαφορά δεν ήταν στατιστικά σημαντική. Η συχνότητα εμφάνισης θετικών δειγμάτων γάλακτος ήταν μεταξύ 73% και 85% Ιταλίδες και μη μητέρες, αντίστοιχα. Η κατανάλωση χοιρινού κρέατος, όπως και τα αναψυκτικά, τα γλυκά και το κόκκινο κρασί έδειξαν σημαντική συσχέτιση με το επίπεδο της ΩΤΑ που ανιχνεύθηκε στον ορό. Όσον αφορά το μητρικό γάλα, εμφανίστηκε θετική σχέση με το χοιρινό κρέας, γλυκά, αναψυκτικά και έλαια σπόρων. Μια θετική συσχέτιση μεταξύ του επιπέδου ΩΤΑ στον ορό του αίματος και της αναλογίας ΩΤΑ ορού/μητρικού γάλακτος βρέθηκε επίσης. Αυτή η μελέτη λοιπόν επιβεβαιώνει ότι η ΩΤΑ περνά μέσω της διατροφής της εγκύου στο ανθρώπινο μητρικό γάλα και συνεπώς θα μπορούσε να αποτελέσει κίνδυνο για το νεογέννητο.

Αξιολόγηση πιθανής έκθεσης του ανθρώπου στην ωχρατοξίνη A λόγω της κατανάλωσης προϊόντων με βάση το κρέας που έχουν υποστεί ξήρανση και ζύμωση διεξήχθη στην Κροατία (Vulić et al., 2016). Τα δεδομένα έδειξαν ότι η εβδομαδιαία πρόσληψη ΩΤΑ στο 90% των αρσενικών καταναλωτών από προϊόντα χοιρινού κρέατος που έχουν υποστεί ζύμωση είναι 51,9 ng/kg Σ.Β., δηλαδή πολύ κάτω από την ανεκτή εβδομαδιαία πρόσληψη (TWI) που αντιστοιχεί σε 120 ng/kg Σ.Β εβδομαδιαίως. Η πρόσληψη ΩΤΑ που προέρχεται από την κατανάλωση άλλων προϊόντων με βάση το κρέας που βρίσκονται υπό μελέτη και μελετώνται, είναι χαμηλότερη και κυμαίνεται από 0,1 έως 42,1 ng/kg Σ.Β. εβδομαδιαίως, εξαρτώμενη από τη μελέτη. Η μελέτη αυτή, κατέδειξε ότι τα προϊόντα με βάση το κρέας στην Κροατία δεν αποτελούν μια αξιοσημείωτη πηγή ΩΤΑ στην ανθρώπινη διατροφή, έτσι ώστε ο κίνδυνος για την ανθρώπινη υγεία που προέρχεται από την κατανάλωση προϊόντων με βάση το κρέας που έχουν υποστεί ξήρανση και ζύμωση είναι αμελητέα.

Ως συμπέρασμα λοιπόν θα μπορούσε να διατυπωθεί ότι καθώς το χοιρινό κρέας αποτελεί πηγή πρόσληψης της ΩΤΑ από τον άνθρωπο και δεδομένου ότι οι χοίροι σίγουρα εκτίθενται σε αυτή την μυκοτοξίνη ο έλεγχος των ζωοτροφών για χοίρους και των προϊόντων με βάση το χοιρινό κρέας είναι απαραίτητη. Λόγω της σημασίας της ΩΤΑ για τη Δημόσια Υγεία πρέπει να ενθαρρυνθεί η δημιουργία και η εφαρμογή προγραμμάτων ελέγχου που θα καταγράφουν την παρουσία της ΩΤΑ στο χοιρινό κρέας και στα προϊόντα του, αλλά και θα διερευνούν επιπλέον τους παράγοντες που πιθανόν να την επηρεάζουν.

## **2.9 Κανονισμός ΩΤΑ στα τρόφιμα και τις ζωοτροφές**

Η θέσπιση μέγιστων ορίων για τις μυκοτοξίνες στα τρόφιμα είναι μια περίπλοκη υπόθεση, καθώς η καθιέρωση των μέγιστων συγκεντρώσεων μυκοτοξινών που επιτρέπεται να βρεθούν στα τρόφιμα, προϋποθέτει να λαμβάνονται υπόψη διάφοροι παράγοντες όπως ο μεταβολισμός των μυκοτοξινών, τα τοξικολογικά δεδομένα, η οξεία

και χρόνια τοξικότητα που μπορούν να προκαλέσουν, η παρουσία τους σε συγκεκριμένα τρόφιμα καθώς και η ποσότητα έκθεσης των καταναλωτών. Με βάση τα τωρινά δεδομένα, δεν υπάρχει συγκεκριμένο όριο κάτω από το οποίο, οι επιπτώσεις των μυκοτοξινών να μην είναι δυσμενείς για τον καταναλωτή. Για αυτό το λόγο δεν είναι εφικτό να θεσπιστεί ανεκτή ημερήσια πρόσληψη (ΕΚ 1881/2006). Επομένως, η Ε.Ε. έχει ορίσει νομοθετικά όρια στις πρώτες ύλες που προορίζονται για κατανάλωση ως τρόφιμα είτε ως ζωοτροφές (Maroto et al., 2005). Προκειμένου να θεσπιστούν τα μέγιστα όρια, συμμετέχουν διάφοροι επιστημονικοί οργανισμοί, αρχές και σώματα, όπως η Κοινή FAO/WHO Επιτροπή για τα Πρόσθετα και τους Επιμολυντές των Τροφίμων (Joint FAO/WHO Committee on Food Additives and Contaminants–JECFA), ο Διεθνής Οργανισμός για την Έρευνα του Καρκίνου (International Agency on Research on Cancer–IARC) και το Διεθνές Πρόγραμμα για την Χημική Ασφάλεια (International Programm on Chemical Safety–IPCS). Στα πλαίσια αποκλειστικά της Ευρωπαϊκής Ένωσης υπεύθυνη είναι η Επιστημονική Επιτροπή για τα Τρόφιμα ενώ διάφορες άλλες ομάδες και επιτροπές, εξουσιοδοτημένες από όλα τα κράτη μέλη δημιουργούν και αξιολογούν τις προτάσεις που κατατίθενται.

Λόγω των τοξικών ιδιοτήτων του, η ΩΤΑ υπόκειται σε νομική ρύθμιση τόσο σε εθνικό όσο και σε διεθνές επίπεδο. Η τοξικότητα της ΩΤΑ έγινε περισσότερο ή λιγότερο εμφανής στα τέλη της δεκαετίας του '70. Μια πραγματική συζήτηση σχετικά με το εάν η ΩΤΑ στα τρόφιμα και τις ζωοτροφές θα πρέπει να ρυθμιστεί σε εθνικό ή/και διεθνές επίπεδο δεν φαίνεται να είχε γίνει πριν από τη δεκαετία του 1990. Η κατάσταση αυτή έρχεται σε αντίθεση με την περίπτωση άλλων μυκοτοξινών, ειδικότερα δε των αφλατοξινών, όπου στις ΗΠΑ, τα πρώτα όρια για τις αφλατοξίνες θεσπίστηκαν ήδη από τη δεκαετία του 1960, αρκετά σύντομα μετά την ανακάλυψή τους (Park et al., 2002) και οι Ευρωπαϊκές Κοινότητες ακολούθησαν τη δεκαετία του 1970 (FAO 2003). Για την ΩΤΑ, το 1991, ο Van Egmond εκτιμά ότι από τις 60 χώρες όπου υπάρχουν κάποιες νομικές ρυθμίσεις όσον αφορά τις μυκοτοξίνες, μόνο 11 όρια υπάρχουν για την ΩΤΑ (Βραζιλία, Τσεχοσλοβακία, Δανία, Γαλλία, Ελλάδα, Ουγγαρία, Ισραήλ, Κάτω Χώρες, Ρουμανία, Σουηδία και Ηνωμένο Βασίλειο). Το 2003, όταν διεξήχθη έρευνα σε παγκόσμιο επίπεδο σχετικά με τη νομική ρύθμιση των μυκοτοξινών από τον FAO το 2004 σε συνεργασία με την Ολλανδική Υπηρεσία Εξωτερικών, ο αριθμός των χωρών με νόμιμα όρια για την ΩΤΑ στα τρόφιμα και στις ζωοτροφές, το 2006, αυξήθηκε σε 37 (σε σύγκριση με περισσότερες από 76 χώρες με νόμιμα όρια για τις αφλατοξίνες). Δεν έχει αναφερθεί τέτοια έρευνα μεγάλης κλίμακας από τότε (Duarte et al., 2010). Εντούτοις, μπορεί να υποθεθεί ότι ο αριθμός των χωρών όπου η παρουσία της ΩΤΑ στα τρόφιμα και τις ζωοτροφές υπόκειται σε νομική ρύθμιση, δεν είναι μικρότερος τώρα από ότι το 2003. Αυτή η υπόθεση μπορεί να βασιστεί σε δύο σημαντικά επιχειρήματα. Πρώτον, από το 2003, η έρευνα έδωσε νέα δεδομένα για τις επιβλαβείς επιδράσεις της ΩΤΑ στον άνθρωπο και τα ζώα. Δεύτερον, λόγω της παγκοσμιοποίησης των αγορών τροφίμων και ζωοτροφών, η συζήτηση σχετικά με τον τρόπο αντιμετώπισης του προβλήματος και οι κίνδυνοι για την υγεία που συνδέονται με την ΩΤΑ (και άλλες μυκοτοξίνες) έχουν ενταθεί σε διεθνές επίπεδο και είχε επιπτώσεις στο εθνικό επίπεδο. Για παράδειγμα, η Κίνα φαίνεται να έχει πρόσφατα θεσπίσει όρια για την ΩΤΑ σε τρόφιμα και ζωοτροφές (Li et al., 2014).

Η συμμετοχή των κρατών σε διεθνείς ή περιφερειακούς οργανισμούς μπορεί επίσης να συμβάλει στην υιοθέτηση νομικών κανονισμών για την ΩΤΑ. Προς το παρόν, τα δεσμευτικά μέγιστα όρια για την ΩΤΑ φαίνονται να υπάρχουν μόνο στην Ευρωπαϊκή

Ένωση (ΕΕ). Σε παγκόσμιο επίπεδο, συζήτηση σχετικά με τη σκοπιμότητα της σύστασης ανώτατων ορίων για την ΩΤΑ έγινε στην Επιτροπή του Codex Alimentarius (CAC), ένα κοινό διακυβερνητικό όργανο που συστάθηκε από τον FAO και τον ΠΟΥ και που είναι υπεύθυνο για την εφαρμογή του κοινού προγράμματος προτύπων τροφίμων FAO/WHO. Μετά τον FAO και την επιτροπή εμπειρογνομόνων για τα πρόσθετα τροφίμων (JECFA) της Παγκόσμιας Οργάνωσης Υγείας (ΠΟΥ), ένας εμπειρογνώμονας που παρέχει επιστημονικές συμβουλές στη CAC επανειλημμένα ασχολήθηκε με την ΩΤΑ το 1991, το 1995, το 2001 και το 2007 και έχει θεσπιστεί πρόσφατα το ανώτατο όριο των 5 μg/kg όσον αφορά το σιτάρι, το κριθάρι και τη σίκαλη, σύμφωνα με το γενικό πρότυπο Codex για τις μολυσματικές και τοξίνες στα τρόφιμα και τις ζωοτροφές. Επιπλέον, υπάρχουν τέσσερις κώδικες πρακτικής που στοχεύουν στην πρόληψη και στη μείωση της μόλυνσης στα σιτηρά, στο κρασί και στον καφέ, που εγκρίθηκαν μεταξύ του 2007 και του 2014. Παρόλο που τα πρότυπα του Codex Alimentarius δεν είναι καθαυτά δεσμευτικά, η σημασία τους πηγάζει κυρίως από το γεγονός ότι ο Παγκόσμιος Οργανισμός Εμπορίου (ΠΟΕ) θεωρεί ότι τα μέτρα που έλαβαν τα κράτη μέλη του, συμμορφώνονται με τα πρότυπα του Codex Alimentarius που είναι επιστημονικά, κατάλληλα και χωρίς διακρίσεις, σύμφωνα με τη συμφωνία του ΠΟΕ για την εφαρμογή υγειονομικών και φυτοϋγειονομικών μέτρων που υπογράφηκε το 1994 και επομένως δεν τις αντιμετωπίζει ως παραβιάσεις των κανόνων του παγκόσμιου εμπορίου.

### **2.9.1 Ευρωπαϊκή Νομοθεσία**

Όσον αφορά τα υφιστάμενα όρια για την ΩΤΑ, εκτιμάται γενικά ότι αυτά της ΕΕ είναι πιο ολοκληρωμένα και λεπτομερή. Σχετικά με τα όρια της ΩΤΑ στα τρόφιμα, αυτά θεσπίστηκαν για πρώτη φορά σε επίπεδο ΕΕ από την Επιτροπή Κανονισμών (ΕΚ) αριθ. 472/2002 του Συμβουλίου, της 12ης Μαρτίου 2002, για την τροποποίηση του κανονισμού (ΕΚ) αριθ. 466/2001 για τον καθορισμό ανώτατων ορίων για ορισμένες προσμείξεις στα τρόφιμα όπως στους δημητριακούς καρπούς, στον καφέ, στα σταφύλλια και άλλα. Ο κανονισμός Αριθ. 466/2001 τροποποιήθηκε επανειλημμένα και το 2006 αντικαταστάθηκε από μια νέα πράξη, (ΕΚ) αριθ. 1881/2006 της 19ης Δεκεμβρίου 2006, για τον καθορισμό μέγιστων επιπέδων για ορισμένες προσμείξεις σε τρόφιμα. Η έκδοση του κανονισμού 1881/2006 στηρίχθηκε στην επιστημονική γνώμη της επιστημονικής ομάδας για τις προσμείξεις στην τροφική αλυσίδα της ΕΑΑΤ που εξέδωσε στις 4 Απριλίου 2006 και η οποία επικύρωσε την προηγούμενη γνωμοδότηση της επιστημονικής επιτροπής τροφίμων για την ΩΤΑ που εγκρίθηκε στις 17 Σεπτεμβρίου 1998 (Verstraete, 2006).

Στην ΕΕ, ο κανονισμός 1881/2006 παραμένει σε ισχύ σήμερα, αν και έχει τροποποιηθεί σχεδόν 26 φορές. Από τον Φεβρουάριο του 2016, ο κανονισμός αριθ. 1881/2006 ορίζει όχι μόνο τα ανώτατα όρια για την ΩΤΑ στα δημητριακά αλλά σε μεγάλη ποικιλία άλλων τροφίμων. Αυτά τα όρια είναι νομικά δεσμευτικά για όλα τα 28 κράτη μέλη της ΕΕ, τα οποία υποχρεούνται να εφαρμόζουν πλήρως τους εν λόγω κανόνες. Εκτός από τη θέσπιση δεσμευτικών ορίων για την ΩΤΑ στα τρόφιμα, από το 2002, η ΕΕ έχει επίσης ενοποιήσει τις μεθόδους δειγματοληψίας και ανάλυσης για τους σκοπούς του επίσημου ελέγχου των επιπέδων μυκοτοξινών στα τρόφιμα, που εκτελούνται από τις αρχές των κρατών μελών (κατ 'αρχάς με την οδηγία 2002/26/ΕΚ της Επιτροπής, της

13 Μαρτίου 2002, που αντικαταστάθηκε αργότερα από τον κανονισμό (ΕΚ) αριθ. 401/2006 της Επιτροπής της 23ης Φεβρουαρίου 2006 που παραμένει σε ισχύ μέχρι σήμερα). Ωστόσο για την ΩΤΑ σε ζωοτροφές, μέχρι σήμερα μόνο μια μη δεσμευτική σύσταση υπάρχει όσον αφορά τα σιτηρά και τις ζωοτροφές για χοίρους και πουλερικά σε επίπεδο ΕΕ (σύσταση της Επιτροπής 2006/576/ΕΚ της 17ης Αυγούστου 2006 σχετικά με την παρουσία δεσοξυνιβαλενόλης, ζεαραλενόνης, ΩΤΑ, T-2 και HT-2 και φουμονισίνες σε προϊόντα που προορίζονται για τη διατροφή των ζώων).

Η αρμόδια Επιτροπή της Ευρωπαϊκή Κοινότητας (ΕΚ) δεν έχει καθορίσει έως σήμερα, επίσημα ανώτατα επιτρεπόμενα όρια για την παρουσία της ΩΤΑ στο χοιρινό κρέας και τα προϊόντα του ή σε άλλα ζωικά προϊόντα, στην Ευρωπαϊκή Ένωση. Ωστόσο, ορισμένες χώρες έχουν επιβάλει τα μέγιστα επίπεδα της ΩΤΑ όπως για παράδειγμα η Δανία (νεφρό χοίρου 10 μg/kg, αίμα χοίρου 25 μg/ml), η Εσθονία (ήπαρ χοίρων 10 μg/kg), η Ρουμανία (νεφρός χοίρων, ήπαρ και κρέας 5 μg/kg) (Curtui et al., 2001) και η Σλοβακία (κρέας, γάλα 5 μg/kg). Σε άλλες χώρες έχουν αναπτυχθεί κατευθυντήριες γραμμές για τα συνιστώμενα μέγιστα επίπεδα ΩΤΑ, όπως είναι για παράδειγμα η Ιταλία (χοίρειο κρέας και παράγωγα προϊόντα 1 μg/kg) (Monaci et al. 2004; Duarte et al., 2010). Η Ευρωπαϊκή Αρχή για την Ασφάλεια των Τροφίμων (EFSA) έθεσε για την ΩΤΑ ένα ανεκτό όριο εβδομαδιαίας πρόσληψης (ΑΟΕΠ) ύψους 120 ng/kg Σ.Β.

Στην Ελλάδα ο επίσημος έλεγχος πραγματοποιείται από το Γενικό Χημείο του Κράτους στο Εργαστήριο Αρ.14 Εργαστήριο Περιβαλλοντικής και Άλλης Επιβάρυνσης Τροφίμων Διαπιστευμένο σύμφωνα με το ISO/IEC/EN 17025, όπου ελέγχεται η παρουσία μυκοτοξινών σε δημητριακούς καρπούς και τρόφιμα ζωικής προέλευσης όπως γάλα και άλλα προϊόντα.

### 2.9.2 Παγκόσμια Νομοθεσία

Τα δεδομένα από τις επιστημονικές μελέτες που έχουν γίνει παγκοσμίως συντείνουν στο γεγονός πως η παρουσία των μυκοτοξινών στα τρόφιμα ενέχει υψηλό κίνδυνο για την υγεία των καταναλωτών. Στις ανεπτυγμένες χώρες του κόσμου, όπου παρατηρείται αύξηση της διάρκειας ζωής σε συνδυασμό με την καλύτερευση της ποιότητας ζωής πραγματοποιείται μεγαλύτερη προσπάθεια για τον έλεγχο των αφλατοξινών (Yu et al., 2008). Αντίθετα στις αναπτυσσόμενες χώρες, η αντιμετώπιση της φτώχειας και των ασθενειών είναι το βασικότερο μέλημα τους, έχοντας ως συνέπεια τη μη καθιέρωση ευρέως, κανονισμών για τις μυκοτοξίνες ή εφόσον υπάρχουν να μην είναι αρκετά αυστηροί. (Whitaker et al., 2005; Yu et al., 2008). Για παράδειγμα στις Η.Π.Α. το μέγιστο επιτρεπτό όριο για την παρουσία αφλατοξινών ανέρχεται στα 20 ppb για τρόφιμα και ζωοτροφές (Yu et al., 2008), ενώ στην Ε.Ε. στα κελυφωτά φιστίκια το όριο είναι στα 2 ppb για την AFB1 και στα 4 ppb για το άθροισμα των αφλατοξινών. Δηλαδή στην Ε.Ε. τα όρια είναι 5 φορές πιο χαμηλά συγκριτικά με τις Η.Π.Α (Gilbert et al., 2002). Ταυτόχρονα, ο αρμόδιος φορέας της Αμερικής, έχει θεσπίσει ως όριο για την AFB1 στο γάλα και τα συναφή προϊόντα του το 0.5 μg/l γάλακτος, ενώ στην Ε.Ε. το αντίστοιχο όριο είναι 0.05 μg/l γάλακτος.

Υπάρχουν, ωστόσο, προσεγγίσεις για τη νομική ρύθμιση της ΩΤΑ, διαφορετικές από την καθιερωμένη και την επιβαλλόμενη με τα δεσμευτικά μέγιστα όρια για την ΩΤΑ

στα τρόφιμα και τις ζωοτροφές, όπως είναι στην ΕΕ. Αξιοσημείωτο είναι πως δεν υπάρχουν δεσμευτικά όρια για την ΩΓΑ σε τρόφιμα ή ζωοτροφές στις ΗΠΑ. Ακόμη πιο εντυπωσιακό είναι το γεγονός πως δεν έχουν θεσπιστεί συμβουλευτικά ή ρυθμιστικά όρια δράσης, από τις αρχές των ΗΠΑ. Αντ' αυτού, ο Αμερικάνικος FDA, ενεργώντας σύμφωνα με την Federal Food, Drug and Cosmetic Act (FFDCA), έχει βασιστεί στη θέσπιση ορθών γεωργικών και κατασκευαστικών πρακτικών και στην απαίτηση για την εφαρμογή σχεδίων ασφάλειας τροφίμων στις επιχειρήσεις βιομηχανίας τροφίμων (Park et al., 2002). Σε επέκταση, ο FDA παρακολουθεί τη συμμόρφωση με αυτές τις πρακτικές και την παρουσία ΩΓΑ σε εγχώρια και εισαγόμενα τρόφιμα (Πρόγραμμα συμμόρφωσης με τα τρόφιμα αριθ. 7307.001 με τίτλο "Μυκοτοξίνες σε οικιακά και εισαγόμενα τρόφιμα"). Μια προσέγγιση ανάλογη με αυτή των ΗΠΑ υιοθετήθηκε από μια σειρά άλλων χωρών, όπως την Αυστραλία, τον Καναδά και την Ιαπωνία (Batt et al., 2014).

Για ορισμένους συγγραφείς, η προσέγγιση των ΗΠΑ για τη ρύθμιση των μυκοτοξινών, συμπεριλαμβανομένης της ΩΓΑ, είναι σαφώς προτιμότερη καθώς θεωρείται ως μια επιλογή που θα μπορούσε να "διαχέει τις εμπορικές τριβές και ταυτόχρονα να συμβάλει στη μείωση οικονομικών απωλειών από μόλυνση με μυκοτοξίνες και αποκλίνοντα πρότυπα" (Dohlman, 2003). Η αλήθεια είναι ότι η προσέγγιση των ΗΠΑ φαίνεται να ασκεί αμελητέα επιρροή σε διεθνές επίπεδο, π.χ. εντός της CAC, η οποία, όπως προαναφέρθηκε, ενέκρινε τέσσερις κώδικες ορθής πρακτικής με στόχο τη μείωση της εμφάνισης ΩΓΑ σε πολλά τρόφιμα με εμπορική σημαντικότητα. Συνοψίζοντας, τόσα χρόνια μετά την ανακάλυψη της ΩΓΑ, διαφορές στον τρόπο νομοθετικής ρύθμισης των μυκοτοξινών συμπεριλαμβανομένων και των ΩΓΑ, εξακολουθούν να σημειώνονται. Ωστόσο, ακόμη και σε μια εποχή που η περαιτέρω ελευθέρωση του παγκόσμιου εμπορίου προβλέπεται, λόγω οικονομικών και πολιτικών αντιπαραθέσεων που συνδέονται με τις υφιστάμενες πολιτικές πάνω στις μυκοτοξίνες, δεν μπορεί να αναμένεται κάποια εναρμονισμένη προσέγγιση για τη νομική ρύθμιση των μυκοτοξινών, συμπεριλαμβανομένου και της ΩΓΑ, να μπορέσει να καθιερωθεί εύκολα σε παγκόσμιο επίπεδο (Dohlman, 2003; Wu, 2006; Van Egmond et al., 2007).

## **2.10 Ανάλυση και προσδιορισμός μυκοτοξινών**

Η επίδραση των μυκοτοξινών στην υγεία ζώων και ανθρώπων, καθιστά την ανίχνευση και τον προσδιορισμό της συγκέντρωσης τους σε τρόφιμα και ζωοτροφές ιδιαίτερα σημαντικά. Οι μέθοδοι που χρησιμοποιούνται για την ανάλυση των μυκοτοξινών πρέπει να είναι ακριβείς, αξιόπιστες και επικυρωμένες (Gilbert et al., 2002). Σύμφωνα με τον Κανονισμό 882/2004, Παράγραφος 3 οι μέθοδοι ανάλυσης που χρησιμοποιούνται για τη διεξαγωγή ανίχνευσης μυκοτοξινών στα τρόφιμα θα πρέπει να έχουν τα εξής χαρακτηριστικά: ορθότητα, ευκολία εφαρμογής, όριο ανίχνευσης, όριο προσδιορισμού, ακρίβεια, επαναληψιμότητα, αναπαραγωγιμότητα, ανάκτηση, επιλεκτικότητα, ευαισθησία, γραμμικότητα, αβεβαιότητα.

Οι διαδικασίες που ακολουθούνται για τον προσδιορισμό των μυκοτοξινών σε κάποιο δείγμα είναι κατά σειρά η δειγματοληψία, η προετοιμασία του δείγματος, η εκχύλιση των μυκοτοξινών από το δείγμα, ο καθαρισμός του δείγματος και ο ποιοτικός και ποσοτικός προσδιορισμός τους με τη χρήση διαφόρων μεθόδων.

Όσον αφορά τη δειγματοληψία αυτή αποσκοπεί στην επιλογή ενός αντιπροσωπευτικού δείγματος από το συνολικό δείγμα του τροφίμου στο οποίο θα πραγματοποιηθεί ο έλεγχος για την παρουσία μυκοτοξινών (Whitaker et al., 2005). Παίζει σημαντικό ρόλο στην αποτελεσματική ανίχνευση των μυκοτοξινών καθώς αυτές δεν είναι ομοιόμορφα καταναμημένες στα διάφορα τρόφιμα και ζωοτροφές (Schatzki, 1998).

Η προετοιμασία του δείγματος έχει ως στόχο τη μείωση μεγέθους των σωματιδίων στα αναλυόμενα τρόφιμα με άλεση και ομογενοποίηση τους, προκειμένου να αυξηθεί η επιφάνεια τους και να επιτευχθεί ικανοποιητική εκχύλιση από τον διαλύτη (Gilbert et al., 2002; Γεωργιάδη, 2009).

Για την εκχύλιση, η μέθοδος που θα επιλεγεί εξαρτάται από το τη φύση του αναλυόμενου προϊόντος, από τις φυσικο-χημικές ιδιότητες των υλικών που έχουν μολυνθεί με μυκοτοξίνες και από τη διαλυτότητα των μυκοτοξινών σε διαφορετικούς οργανικούς διαλύτες (Sheibani et al., 2008). Χρησιμοποιούνται συνήθως οργανικοί διαλύτες ή μίγματά τους όπως ακετόνη, χλωροφόρμιο ή μεθανόλη, διότι οι μυκοτοξίνες είναι διαλυτές σε μετρίως ή ελαφρώς πολικούς διαλύτες (Aghamohammadi et al., 2007). Επιπλέον, η χρήση νερού μαζί με τους διαλύτες που προαναφέρθηκαν, βελτιώνει την εκχύλιση των μυκοτοξινών αφού αυξάνει την υγρασία στο υπόστρωμα διευκολύνοντας υγραίνει το υπόστρωμα και αυξάνοντας έτσι τη διέλευση των οργανικών διαλυτών στο δείγμα. Οι συνηθέστερα χρησιμοποιούμενοι διαλύτες για την εκχύλιση μυκοτοξινών στα τρόφιμα είναι μίγματα μεθανόλης-νερού, χλωροφορμίου-νερού, μεθανόλης ακετονιτριλίου-νερού και ακετονιτριλίου-νερού (Gilbert et al., 2002; Sheibani et al., 2008). Σε τρόφιμα που περιέχουν μεγάλη λιποπεριεκτικότητα έχει αποδειχθεί πως είναι προτιμότερη η χρήση μη-πολικών διαλυτών, όπως το εξάνιο, για το διαχωρισμό του λίπους ενώ τέλος αναφέρεται και η χρήση μεθόδου εκχύλισης πεπιεσμένου υγρού (Pressurized Fluid Extraction – PFE) γνωστή και ως εκχύλιση επιταχυνόμενου διαλύτη (Accelerated Solvent Extraction – ASE) (Sheibani et al., 2008).

Μετά την εκχύλιση ακολουθεί μια διαδικασία καθαρισμού του δείγματος (Haghighi et al., 1981) η οποία παραγματοποιείται με τη χρήση διαχωριστών υγρού-υγρού (φίλτρα) ή συσκευές/φυσίγγια εκχύλισης στερεής φάσης (solid phase extraction cartridges) και στήλες ανοσοσυγγένειας (Immunoaffinity Columns ή IAC) (Pearson et al., 1999; Gilbert et al., 2002). Κατά τη διαδικασία αυτή, μονοκλωνικά αντισώματα εξειδικευμένα για τις μυκοτοξίνες ακινητοποιούνται πάνω σε σεφαρόζη και ενσωματώνονται σε μικρές στήλες. Στη συνέχεια γίνεται συλλογή της προς ανίχνευση τοξίνης μετά από έκλουση με κατάλληλο διαλύτη. Με αυτόν τον τρόπο το εκχύλισμα του δείγματος του εξεταζόμενου τροφίμου περνά μέσα από τη στήλη και προκύπτει ένα εντελώς καθαρό εκχύλισμα, ελεύθερο από άλλες ουσίες (Pearson et al., 1999).

Τέλος για τον ποιοτικό και ποσοτικό προσδιορισμό των μυκοτοξινών, υπάρχουν διάφοροι τύποι χρωματογραφικών μεθόδων, διαθέσιμοι για την ανάλυση τους στα διάφορα τρόφιμα (Turner et al., 2009). Παραδοσιακά, οι συνηθέστερα χρησιμοποιούμενες μέθοδοι για την ανάλυση μυκοτοξινών είναι η Χρωματογραφία Λεπτής Στιβάδας (Thin-Layer Chromatography), η ηλεκτροφόρηση τριχοειδών (Capillary Electrophoresis), η Υγρή Χρωματογραφία Υψηλής Απώδοσης (High Pressure Liquid Chromatography), η Αέρια Χρωματογραφία (Gas Chromatography) σε συνδυασμό με μια μεγάλη ποικιλία ανιχνευτών όπως ανιχνευτές φθορισμού



(Fluorescence Detectors, FLD), ιονισμού φλόγας (Flame Ionization Detectors, FID), συλλήψεως ηλεκτρονίων (Electron Capture Detectors, ECD), ανιχνευτές υπεριώδους (Ultraviolet, UV) ή ακόμα και φασματοσκοπία μάζας (Mass Spectroscopy detectors, MS). Αυτές οι τεχνικές απαιτούν εκτεταμένη επεξεργασία του δείγματος και έχουν υψηλό κόστος εκτέλεσης. Ως εκ τούτου, μία ταχεία και ευαίσθητη τεχνική για το συνήθη προσδιορισμό των μυκοτοξινών στα τρόφιμα είναι απαραίτητη. Τα τελευταία 20 χρόνια, η αναγνώριση και η εφαρμογή των τεχνικών ανοσοδιαγνωστικής, όπως η RIA (Radioimmunoassay) και ιδίως η ELISA (Enzyme-linked Immunosorbent Assay) έχουν αναπτυχθεί σημαντικά (Lee et al., 2004). Τα ELISA test kits έχουν γίνει πολύ δημοφιλή τελευταία, λόγω του σχετικά χαμηλού κόστους αλλά και της εύκολης εφαρμογής τους ενώ τα αποτελέσματά τους θα μπορούσαν να συγκριθούν με αυτά που προκύπτουν από τις συμβατικές μεθόδους όπως TLC and HPLC (Zheng et al., 2004; Zheng et al., 2005a; Zheng et al., 2005b).

## 2.11 Ανάλυση και Μέθοδοι προσδιορισμού συγκέντρωσης ΩΤΑ

Στην πραγματικότητα, πιο ευαίσθητες αναλυτικές μέθοδοι ή νέες μέθοδοι για τον προσδιορισμό της ΩΤΑ και των ωχρατοξινών γενικά σε βιολογικά υλικά, αναπτύσσονται διαδοχικά με την εξέλιξη στην ανάπτυξη των οργάνων και των αναλυτικών τεχνικών αλλά και της βελτίωση των μεθόδων της εργαστηριακής ανάλυσης. Οι πλέον χρησιμοποιούμενες και παραδοσιακές αναλυτικές τεχνικές περιλαμβάνουν τη χρωματογραφία λεπτής στιβάδας (TLC), Υγρή χρωματογραφία υψηλής πίεσης (HPLC) και ELISA.

Γενικά, όλες οι χημικές μέθοδοι για την ανάλυση της ΩΤΑ συνίστανται από διάφορα στάδια όπως εκχύλιση, καθαρισμός, διαχωρισμός, ανίχνευση, ποσοτικοποίηση και επιβεβαίωση ταυτότητας (Van Egmond, 1991). Η εκχύλιση και ο καθαρισμός του δείγματος συνήθως επιτυγχάνονται με υγρή εκχύλιση για τον προσδιορισμό της ΩΤΑ σε νεφρούς χοίρων (Paulsch et al., 1982). Πιο πρόσφατα, έχουν γίνει δημοφιλείς οι εκχυλίσεις σε στερεά φάση (SPE), ιδίως για τον προσδιορισμό της ΩΤΑ στις ζωοτροφές (Cohen et al., 1986) και οι στήλες ανοσοσυγγένειας (IAC) (IPCS WHO 1990; Ueno et al., 1991; Zimmerli et al., 1995). Επί του παρόντος, είναι εμπορικά διαθέσιμες διαφόρων ειδών φυσίγγια για τον καθαρισμό και την προ-συμπύκνωση, συμπεριλαμβανομένου της IAC και τα Μοριακού Αποτυπώματος Πολυμερή (MIPs), που αποτελούνται από αντι-ΩΤΑ αντισώματα και τρισδιάστατο δίκτυο ειδικό για το μόριο στόχο. Σε αυτή την περίπτωση, η ΩΤΑ περνά μέσω των φυσίγγων (π.χ. Mycosep<sup>TM</sup> ή Mycospin<sup>TM</sup>) (Prelle et al., 2013). Βασίζεται στην προσρόφηση και στη διαδικασία ανταλλαγής ιόντων (Cao et al., 2013). Η χρήση της χρωματογραφίας ανοσοσυγγένειας στο στάδιο του καθαρισμού βελτιώνει την ανάλυση των μυκοτοξινών και έχει έναν αριθμό πλεονεκτημάτων: καθαρά εκχυλίσματα, ορθότητα και ακρίβεια, ταχύτητα και μείωση της χρήσης επικίνδυνων διαλυτών (Scott et al., 1997). Τα κυριότερα πλεονεκτήματα αυτών των στηλών είναι η ειδική δέσμευση της ΩΤΑ πάνω στο αντίσωμα και την σχεδόν πλήρη αφαίρεση της παρεμβολής του αρχικού δείγματος (Castellari et al., 2000). Εντούτοις, στην περίπτωση της ΩΤΑ, η υποεκτίμηση μπορεί να παρατηρηθεί εάν η εκχύλιση γίνεται σε αλκαλική κατάσταση, επειδή η ΩΤΑ μετατρέπεται σε ανοιχτού δακτυλίου ΩΤΑ (OP-OA) και δεν αναγνωρίζεται πλέον από

τα αντισώματα Castegnaro et al., 2006; Polisenska et al., 2010; Tozlovanu et al., 2010; Bazin et al., 2013).

Η επιβεβαίωση της παρουσίας της ΩΤΑ σε βιολογικά υλικά είναι πολύ σημαντική προκειμένου να εγγυηθεί την ποιότητα των αναλυτικών αποτελεσμάτων. Οι Hult & Gatenbeck, 1976 παρουσίασαν την επιβεβαίωση της παρουσίας ΩΤΑ με την καρβοξυπεπτιδάση Α (Hult et al., 1976) , όπως έπραξε ο Hunt et al., 1980 με μεθανόλη τριφθοριούχου βορίου (Hunt, et al., 1980) και οι Studer-Rohr et al., 1995 με διαζομεθάνιο. Η διασφάλιση της ποιότητας των αναλυτικών αποτελεσμάτων (διαπίστευση εργαστηρίου, τη συμμετοχή του σε δοκιμές επάρκειας και τη χρήση πιστοποιημένων υλικών αναφοράς), γίνεται σύμφωνα με τις απαιτήσεις του περασμένου προτύπου EN 45001 (1989) και με το πρόσφατο πρότυπο που είναι σε ισχύ, ISO 17025 (2005) και είναι πολύ σημαντική για τους σκοπούς προσδιορισμού της ΩΤΑ σε βιολογικά υλικά.

Η καταλληλότητα των διαφόρων δειγμάτων, ειδικά σε χοίρους καταδείχθηκε από τη μελέτη των Pleadin et al., 2016 όπου στόχος αυτής της μελέτης ήταν η σύγκριση των επιπέδων ΩΤΑ σε ιστούς χοίρων και βιολογικά υγρά μετά από έκθεση ζώων σε μολυσμένη διατροφή (250 μg ΩΤΑ/kg τροφής) κατά τη διάρκεια 4 εβδομάδων πάχυνσης. Οι συγκεντρώσεις ΩΤΑ ποσοτικοποιήθηκαν χρησιμοποιώντας μια επικυρωμένη μέθοδο ανοσοπροσδιορισμού (ELISA) και υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης με ανιχνευτή φθορισμού (HPLC-FD). Η υψηλότερη μέση συγκέντρωση ΩΤΑ στους ιστούς χοίρων προσδιορίστηκε σε νεφρούς των εκτεθειμένων ζώων (13,87±1,41 μg/kg), ακολουθούμενη από πνεύμονες (10,47±1,97 μg/kg), ήπαρ (7,28±1,75 μg/kg), σπλήνα (4,81±0,99 μg/kg), μυϊκό ιστό (4,72±0,86 μg/kg), λιπώδης ιστός (4,11±0,88 μg/kg), καρδιά (3,71±1,09 μg/kg) και εγκέφαλο (3,01±0,25 μg/kg). Επιπλέον, την τελευταία ημέρα έκθεσης (ημέρα 28), σημαντικά υψηλότερα μέσα επίπεδα ΩΤΑ προσδιορίστηκαν στα ούρα (16,06±3,09 μg/l) σε σύγκριση με τον ορό (4,77±1,57 μg/l), δείχνοντας ότι η ανάλυση ούρων ΩΤΑ αποτελεί καλό δείκτη για τον εντοπισμό αυξημένων επιπέδων αυτού του μολυσματικού παράγοντα σε χοίρους που χρησιμοποιούνται για ανθρώπινη κατανάλωση. Αυτή η μελέτη έδωσε οδηγίες για τον πιο αποτελεσματικό έλεγχο ΩΤΑ σε βιολογικά υλικά που προέρχονται από χοίρους και μπορούν να ασκηθούν σε σφαγεία.

Πολλές αναλυτικές μέθοδοι για τον προσδιορισμό της ΩΤΑ έχουν αναπτυχθεί (Van Egmond, 1991) και οι περισσότερες από αυτές περιλαμβάνουν τη χρήση χρωματογραφίας λεπτής στιβάδας (TLC) (Nesheim et al., 1973; Nesheim, 1973) και κυρίως, υγρής χρωματογραφίας υψηλής απόδοσης (HPLC) με ανίχνευση φθορισμού (FLD) (Schweighardt et al., 1980). Στη συνέχεια, η ΩΤΑ ταυτοποιείται και ανιχνεύεται με Υγρή Χρωματογραφία συνδεδεμένη με Φασματομετρία Μάζας (LC-MS) (Abramson, 1987) ,LC-MS/MS (Becker et al., 1998; Jørgensen et al., 1999), απταμερή (Cruz-Aguado et al., 2008; Rhouati et al., 2013; Chen et al., 2012), ELISA (Pestka et al., 1981; Ruprich et al., 1991) και ανοσοευαίσθητες μεθόδους (Ricciardi et al., 2013). Ωστόσο, η τεχνική που χρησιμοποιείται πιο συχνά βασίζεται σε υγρή χρωματογραφία (LC) σε συνδυασμό με φθορισμομετρικό ανιχνευτή (FLD) για εξαιρετικά ευαίσθητο σήμα ανίχνευσης (Prelle et al., 2013). Είναι γνωστό ότι, λόγω του φυσικού φθορισμού της ΩΤΑ, η ΩΤΑ γενικά προσδιορίζεται με χρωματογραφικές τεχνικές (Frennette et al., 2008; Turner et al., 2009).

Οι άλλες μέθοδοι για τον προσδιορισμό της ΩΤΑ που χρησιμοποιούνται περιλαμβάνουν αέρια χρωματογραφία-Φασματομετρία μάζας (GC-MS) (Jiao et al., 1992; Studer-Rohr et al., 1995), κιτ μέτρησης φθορισμού (στήλες ανοσοσυγγένειας συζευγμένες με ένα φθορισμόμετρο) (Scott et al., 1997; Shim et al., 2004), ανοσολογική δοκιμή πόλωσης φθορισμού (Fluorescence Polarization Immunoassay ή PFIA) (Shim et al., 2004), αραίωση ισοτόπων (Al-TaHER et al., 2013) και μια ραδιοανοσοδοκιμασία (RIA) (Aalund et al., 1975; Chu, et al., 1976; Rousseau et al., 1985; Rousseau et al., 1986; Fukal, 1990; Fukal, 1991). Εντούτοις, λόγω των κινδύνων για την υγεία από τις ραδιοεπισημασμένες ενώσεις και η εξειδικευμένη διάθεση αποβλήτων, η RIA δεν έχει χρησιμοποιηθεί για πολύ καιρό (Meulenberg, 2012). Πιο πρόσφατες μέθοδοι για τον προσδιορισμό της ΩΤΑ είναι η φασματομετρία μάζας επαγωγικά συζευγμένου πλάσματος (Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry ή ICP-MS) (Giesen et al., 2010) και τριχοειδείς τεχνικές ηλεκτροφόρησης (Maragos, 1998) όπως είναι η τριχοειδής ηλεκτροφόρηση με επαγόμενη από λέιζερ ανίχνευση φθορισμού (Capillary Electrophoresis with Laser-Induced Fluorescence detection ή CE-LIF) (Böhns et al., 1995; Corneli et al., 1998), κερατοειδής χρωματογραφία κεκλιμένης ηλεκτροκινητικής (Micellar Electrokinetic Capillary Chromatography ή MEKC) (Holland et al., 1993), Μοριακού Αποτυπώματος Πολυμερή (Wulff, 1995; Shephard, 2001; Yu et al., 2010), βιοαισθητήρες (Shephard, 2001; Ngundi et al., 2005; Wang et al., 2010) και απταμερή (μονοκλωνικά ολιγονουκλεοτίδια DNA ή RNA, επιλεγμένα *in vitro* για σύνδεση με υψηλή συγγένεια και ειδικότητα σε μοριακούς στόχους) (Cruz-Aguado et al., 2008; Rhouati et al., 2013). Οι εφαρμογές των απταμερών είναι γνωστές και αναπτυγμένες, π.χ., σε χρωματογραφία, τριχοειδή ηλεκτροφόρηση, φασματομετρία μάζας και βιοαισθητήρες (Tombelli et al., 2005; Bonel et al., 2011).

Μια νέα μέθοδος αναπτύχθηκε για την ταχεία ανάλυση της ΩΤΑ σε χοίρους χρησιμοποιώντας μικροεκχύλισμα διασποράς υγρού-υγρού (Dispersive Liquid-Liquid Microextraction ή DLLME) σε συνδυασμό με γρήγη χρωματογραφία υψηλής απόδοσης (HPLC). Η ΩΤΑ εκχυλίστηκε με μεθανόλη και στη συνέχεια καθαρίστηκε με διαδικασία DLLME. Αφού ξηράνθηκε και επαναδιαλύθηκε, το δείγμα προσδιορίστηκε χρησιμοποιώντας γρήγη χρωματογραφία υψηλής απόδοσης με ανιχνευτή φθορισμού (HPLC-FLD). Υπό τις πειραματικές συνθήκες, το όριο ανίχνευσης (Limit Of Detection ή LOD) ήταν 0,21 μg/kg, το όριο ποσοτικοποίησης (Limit Of Quantification ή LOQ) ήταν 0,70 μg/kg και η ανάκτηση ήταν υψηλότερη από 80%. Η επαναληψιμότητα εντός και εκτός ημέρας, εκφραζόμενη ως σχετική τυπική απόκλιση (Relative Standard Deviation ή RSD), ήταν μικρότερη από 5%. Η καθιερωμένη μέθοδος είναι πιο αποτελεσματική, ευκολότερη και φθηνότερη από τη συμβατική διαδικασία καθαρισμού (Luan et al., 2016).

Πλέον, η σύγχρονη τάση είναι να χρησιμοποιείται η HPLC για την ανάλυση ΩΤΑ, λόγω της μεγαλύτερης ακρίβειας σε σχέση με την TLC και της σταθερότητας των αποτελεσμάτων σε σχέση με την μέθοδο της ELISA. Ωστόσο η δοκιμή της ELISA θεωρείται αρκετά αξιόπιστη μέθοδος ανάλυσης ΩΤΑ, λόγω της μεγάλης ταχύτητας, της ευκολίας λειτουργίας της και της ευαισθησίας της μεθόδου. Η μέθοδος αυτή έχει χρησιμοποιηθεί με αξιόπιστα αποτελέσματα σε πολλές έρευνες (Jelka Pleadin et al., 2013; Peršič et al., 2014; Ana Vulić et al., 2016; Pleadin, et al., 2016).

Στον Πίνακα 8 που ακολουθεί, παρουσιάζονται συγκεντρωτικά οι διάφορες αναλυτικές μέθοδοι που έχουν χρησιμοποιηθεί κατά καιρούς σε διάφορες μελέτες, για τον

προσδιορισμό της ΩΤΑ σε διαφόρους ιστούς, κρέας και προϊόντα χοιρινού κρέατος αλλά και σε βιολογικά υγρά ανθρώπων και χοίρων.

**Πίνακας 8.** Μέθοδοι προσδιορισμού ΩΤΑ σε ιστού, βιολογικά υγρά και διάφορα προϊόντα χοιρινού κρέατος.

ΔΕΙΓΜΑ	ΜΕΘΟΔΟΣ	ΠΗΓΗ
Νεφροί χοίρων	MS	Hult et al., 1976
Βιολογικά υγρά	ELISA	Pestka et al., 1981
Ανθρώπινο πλάσμα	ion-pair HPLC	Breitholtz et al., 1991
Ανθρώπινος ορός	ELISA	Kawamura et al., 1993
Νεφροί χοίρων	LC-ESI-MS/MS	Jørgensen et al., 1999
Αίμα, ούρα	HPLC-FLD Επιβεβαίωση καρβοξυπεπτιδάσης	Petkova-Bocharova et al., 2003
Νεφροί, ήπαρ και κρέας χοίρων	HPLC-FLD	Malagutti et al., 2005
Ωμό χοιρινό κρέας και προϊόντα χοιρινού κρέατος (σαλάμι και ξηράς ωρίμανσης χοιρομήρι)	HPLC-FLD	Dall'Asta et al., 2009
Ανθρώπινος ορός αίματος και μητρικό γάλα	HPLC	Biasucci et al., 2010
Χοιρινό κρέας και προϊόντα του (ξηράς ωρίμανσης χοιρομήρι)	HPLC	Pietri et al., 2011
Αίμα, ήπαρ, νεφροί χοίρων και πρόλοβος κοτόπουλων	HPLC-FLD	Milicevic et al., 2012
Προϊόντα χοιρινού κρέατος (σαλάμι, μπέικον και ωμοπλάτη ξηράς ωρίμανσης), πλάσμα, ήπαρ, νεφροί χοίρου	HPLC-FLD	Bertuzzi et al., 2013
Χοιρινό προϊόντα ξηράς ωρίμανσης	ELISA	Pleadin et al., 2013
Ωμό και μαγειρεμένο χοιρινό κρέας	ELISA και HPLC-FLD	Perši et al., 2014
Παραδοσιακά προϊόντα χοιρινού κρέατος	ELISA	Pleadin et al., 2014
Χοιρομήρια ωρίμανσης	HPLC-FLD και UPLC-MS	Brera et al., 2014
Σαλάμι από χοιρινό κρέας	HPLC-FLD	Armorini et al., 2015
Μύες χοίρων	HPLC	Luan et al., 2015
Εδώδιμοι ιστοί χοίρων και βιολογικά υγρά	ELISA	Pleadin et al., 2016
Προϊόντα χοιρινού κρέατος ξηράς ωρίμανσης και ζυμούμενα προϊόντα	ELISA	Vulić et al., 2016
Μύες, ήπαρ και νεφροί χοίρων	HPLC-FLD	Giacomo et al., 2016
Χοιρομήρια ξηράς ωρίμανσης, λουκάνικα ζύμωσης	ELISA	Vulić et al., 2016

## **ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ**

## ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3

### ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΛΟΓΙΑ

#### 3.1 Συλλογή του δείγματος

Στην παρούσα εργασία συλλέχθηκαν 40 δείγματα νεφρών και 40 ήπατος από σφάγια χοίρου που προετοιμάστηκαν στα σφαγεία του Νομού Καρδίτσας. Τα σφάγια προέρχονταν από ζώα ηλικίας περίπου 5 μηνών και βάρους 100-110 κιλά. Τα δείγματα συλλέχθηκαν σε 2 δειγματοληψίες (Αύγουστος 2017), με τη μεθοδολογία που περιγράφεται από τους Fredriksson-Ahomaa et al., 2009. Συνοπτικά το πρώτο δείγμα λαμβάνονταν 5 λεπτά μετά τον εκσπλαχνισμό του πρώτου χοίρου στην γραμμή σφαγής και στην συνέχεια λαμβάνονταν κάθε 5 λεπτά από σφάγιο μετά τον εκσπλαχνισμό του. Τα δείγματα ήπατος και νεφρού τοποθετούνταν σε αποστειρωμένες σακούλες stomacher. Στην συνέχεια τα δείγματα μεταφέρονταν υπό ψύξη στο Εργαστήριο Υγιεινής Τροφίμων του Τμήματος Κτηνιατρικής του Π.Θ την ημέρα της δειγματοληψίας.

Επιλέχθηκαν οι νεφροί και το ήπαρ καθώς είναι τα περισσότερο επιβαρυνόμενα όργανα. Μετά τη λήψη τους, τα δείγματα εξετάστηκαν στο Εργαστήριο Υγιεινής Τροφίμων Ζωικής Προέλευσης του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας με τη μέθοδο της ανταγωνιστικής ELISA χρησιμοποιώντας το RIDASCREEN OTA ELISA kit (R-Biopharm, Germany). Η προετοιμασία των δειγμάτων και η εκτέλεση της μεθόδου έγινε σύμφωνα με τις οδηγίες του παρασκευαστή.

#### 3.2 Προετοιμασία του δείγματος

Πραγματοποιήθηκε ομογενοποίηση του δείγματος (νεφρός ή ήπαρ χοίρου). Ζυγίσαμε στη συνέχεια σε ένα πλαστικό σωλήνα χωρητικότητας 12 ml, 1 g φρέσκου ιστού (πλαστικός ώστε να είναι ανθεκτικός στον αιθυλεστέρα). Σε κάθε 1 g ομογενοποιημένου δείγματος νεφρών και ήπατος, προστέθηκαν 0,5 ml 1 M φωσφορικού οξέος ( $H_3PO_4$ ) και στη συνέχεια 3 ml οξικού αιθυλεστέρα. Τα δείγματα αναμίχθηκαν έντονα κάθε φορά, σε συσκευή vortex για 1 λεπτό και για 30 δευτερόλεπτα αντίστοιχα. Πραγματοποιήθηκε φυγοκέντρηση για 1 λεπτό στις 2000 στροφές σε θερμοκρασία δωματίου (20-25 °C). Μετά τη φυγοκέντρηση, σε θερμοκρασία δωματίου, το υπερκείμενο (οξικός αιθυλεστέρας) μεταφέρθηκε σε ένα νέο πλαστικό σωλήνα και συμπληρώθηκε με επιπλέον 3 ml οξικού αιθυλεστέρα. Μετά από ανάμιξη για 30 δευτερόλεπτα και φυγοκέντρηση (1min/2000rpm/20-25°C), οι στοιβάδες οξικού αιθυλεστέρα

συνδυάστηκαν και συμπληρώθηκαν 3 ml 0,65M ανθρακικού νατρίου ( $\text{NaHCO}_3$ ). Έπειτα αναδεύθηκε σε vortex για περίπου 15 δευτερόλεπτα και συνέχισε να αναμιγνύεται για άλλα 15 λεπτά. Στη συνέχεια έγινε φυγοκέντρηση (5 min/2000 rpm/20-25° C) και 1 ml από την κατώτερη υδατική φάση μεταφέρθηκε σε ένα γυάλινο σωλήνα χωρητικότητας 12 ml και θερμάνθηκε σε υδατόλουτρο στους 100 °C για 3 λεπτά. Το περιεχόμενο αναταράχθηκε και αφέθηκε να κρυώσει. Αφού κρύωσε, προστέθηκαν 4 ml αποσταγμένου νερού. Στη συνέχεια ένα κλάσμα αραιώθηκε με 0.13 M  $\text{NaHCO}_3$  και συγκεκριμένα χρησιμοποιήθηκαν 200  $\mu\text{l}$  δείγματος + 200  $\mu\text{l}$   $\text{NaHCO}_3$ . Τέλος, χρησιμοποιήθηκαν 50  $\mu\text{l}$  κάθε δείγματος ανά φρεάτιο στον προσδιορισμό.

### 3.3 Εκτέλεση της δοκιμής ELISA

Το RIDASCREEN Ochratoxin A 30/15 ELISA kit, είναι ένα kit ανταγωνιστικού ανοσοπροσδιορισμού ενζύμου, που χρησιμοποιείται για την ποσοτική ανάλυση της ΩΤΑ και παρέχεται από την R-Biopharm (Darmstadt, Germany). Η βάση της δοκιμασίας είναι η αντίδραση αντιγόνου-αντισώματος. Τα φρεάτια στην πλάκα μικροτίτλου είναι επικαλυμμένα με ειδικά αντισώματα έναντι της ΩΤΑ. Προστίθενται πρότυπα διαλύματα, διαλύματα ελέγχου και τα διαλύματα δείγματος. Τα ελεύθερα και τα συζευγμένα με ένζυμο, ανταγωνίζονται για την ωχρατοξίνη Α στις θέσεις δέσμευσης με το αντίσωμα (ανταγωνιστικός ανοσοπροσδιορισμός ενζύμου). Ακολουθεί ένα στάδιο έκπλυσης, όπου τα μη δεσμευμένα ένζυμα απομακρύνονται. Στη συνέχεια, ένα χρωμογόνο προστίθεται στα φρεάτια και γίνεται επώαση. Μετά την επώαση, το ένζυμο μετατρέπει το χρωμογόνο σε ένα μπλε προϊόν. Η προσθήκη του διαλύματος παύσης οδηγεί σε μια αλλαγή χρώματος από μπλε σε κίτρινο. Τελικώς, η μέτρηση γίνεται φωτομετρικά στα 450 nm. Η απορρόφηση είναι αντιστρόφως ανάλογη προς την συγκέντρωση της ΩΤΑ στο δείγμα.

Συγκεκριμένα, κάθε kit περιέχει μια πλάκα μικροτιλοδότησης που έχει 96 φρεάτια επικαλυμμένα με αντισώματα έναντι της ΩΤΑ, καθώς και πρότυπα υδατικά διαλύματα ΩΤΑ (0, 50, 100, 300, 900 και 1800 ng/ml), συζευγμένη με υπεροξειδάση ΩΤΑ, υπόστρωμα / χρωμογόνο (τετραμεθυλβενζιδίνη), ένα αντιδραστήριο παύσης (1N-θειικό Οξύ), ένα ρυθμιστικό διάλυμα αραιώσης και ένα ρυθμιστικό διάλυμα έκπλυσης (ρυθμιστικό διάλυμα 10 mM-φωσφορικού, PH = 7,4). Η δοκιμή ELISA εκτελέστηκε σε πλήρη συμφωνία με τις οδηγίες του κατασκευαστή του kit και οι μετρήσεις πραγματοποιήθηκαν στα 450 nm χρησιμοποιώντας Organon Teknika Reader 230S Version 1.23.

#### 3.3.1 Προετοιμασία αντιδραστηρίων

Όλα τα αντιδραστήρια πρέπει να βρίσκονται σε θερμοκρασία δωματίου (20 - 25 ° C / 68 - 77 ° F) πριν τη χρήση. Το σύζευγμα ενζύμου ωχρατοξίνης Α (φιάλη με κόκκινο πώμα) παρέχεται ως συμπύκνωμα. Επειδή το διάλυμα συζευγμένου αραιωμένου ενζύμου και το

ποσό που χρειάζεται θα πρέπει να ανασυσταθεί. Για ανασύσταση το συμπύκνωμα συζυεύγματος αραιώνεται 1:11 (1+10) σε ρυθμιστικό διάλυμα αραιώσεως συζεύγματος. Πριν από τη χορήγηση με πιπέτα το συμπύκνωμα συζεύγματος πρέπει να ανακινείται προσεκτικά.

Ως ρυθμιστικό διάλυμα πλύσης χρησιμοποιήθηκε το ρυθμιστικό διάλυμα PBS Tween. Το ρυθμιστικό άλας του κιτ διαλύεται σε ένα λίτρο απεσταγμένου νερού. Συντηρείται σε θερμοκρασία 2-8 °C (36 - 46 ° F). Η διάρκεια ζωής του είναι 4-6 εβδομάδες.

### 3.3.2 Διαδικασία δοκιμής ELISA

1. Προσθήκη 50 μl των πρότυπων διαλυμάτων ή του παρασκευασμένου δείγματος στα βοηθία.
2. Προσθήκη 50 μl του αραιωμένου ενζυμικού συζεύγματος (conjugate) σε κάθε φρεάτιο. Ανακατεύουμε απαλά την πλάκα με κυκλική κίνηση του χεριού και επώαση για 30 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου (20-25°C/68-77°F) στο σκοτάδι.
3. Απόρριψη του περιεχομένου των βοηθίων και έκπλυση τους με 250 μl διαλύματος έκπλυσης. Διασφάλιση της πλήρους εκκένωσης των βοηθίων με χτύπημα πάνω σε επιφάνεια με απορροφητικό υλικό (χαρτί). Επαναλαμβάνουμε τη διαδικασία έκπλυσης δύο φορές.
4. Προσθήκη 100 μl υποστρώματος / χρωμογόνου σε κάθε φρεάτιο. Ανακατεύουμε απαλά ανακινώντας την πλάκα με το χέρι και επώαση της για 15 λεπτά (+/- 1 λεπτό) σε θερμοκρασία δωματίου (20-25°C/68-77°F) στο σκοτάδι.
6. Προσθήκη 100 μl του διαλύματος διακοπής σε (stop solution) σε όλα τα βοηθία. Καλή ανακίνηση της πλάκας με το χέρι για να διασφαλιστεί η ομοιόμορφη κατανομή του. Μέτρηση της απορρόφησης μέσα στα επόμενα 30 λεπτά σε συσκευή ανάγνωσης πλάκας μικροτίτλου ρυθμισμένη στα 450 nm (Organon Teknika Reader 230S Version 1.23).

### 3.3.3 Υπολογισμός συγκέντρωση ωχρατοξίνης A

Για τον υπολογισμό χωρίς λογισμικό που πραγματοποιήσαμε ισχύει:

Πρότυπο απορρόφησης (ή δείγμα)

Πρότυπο απορρόφησης μηδέν  $\times 100 = \% \text{ απορρόφηση}$

Το πρότυπο μηδέν είναι φτιαγμένο έτσι ίσο με 100% και οι τιμές απορρόφησης είναι υπολογισμένες σε ποσοστά. Οι τιμές που υπολογίζονται για τα πρότυπα εισάγονται σε ένα σύστημα συντεταγμένων σε χαρτί ημιλογαριθμικού γραφήματος έναντι της συγκέντρωσης της ωχρατοξίνης A [ng/kg]. Για να ληφθεί η συγκέντρωση ωχρατοξίνης A σε ng/kg (ppb) ή σε μg/kg (ppb) που περιέχεται πραγματικά σε ένα δείγμα, η συγκέντρωση που διαβάζεται από την καμπύλη βαθμονόμησης, πρέπει να



πολλαπλασιάζεται περαιτέρω με τον αντίστοιχο συντελεστή αραίωσης. Σύμφωνα με την μέθοδο, ο συντελεστής αραίωσης για τον νεφρό και το ήπαρ είναι: 30.

Τα δείγματα υπολογίστηκαν με βάση τις καμπύλες βαθμονόμησης χρησιμοποιώντας μαθηματική παρεμβολή ακολουθούμενη από τον πολλαπλασιασμό με τον αντίστοιχο παράγοντα αραίωσης. Το εύρος των μετρήσεων της μεθόδου είναι 1,5–54 ppb (ή 1,5-54 mg/kg αντίστοιχα), ενώ το όριο ανίχνευσης της είναι τα 3 ppb. Το ποσοστό ανάκτησης της στα 10 ppb είναι 90-100 % για νεφρό και ήπαρ χοίρου.

## ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4

### ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΚΑΙ ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Τα αποτελέσματα της παρούσας μελέτης παρουσιάζονται στον Πίνακα 9. Εξετάστηκαν συνολικά 80 δείγματα (40 ήπατα και 40 νεφροί). Από τα δείγματα αυτά σε 10 από τα 40 ήπατα (25%) και 17 από τους 40 νεφρούς (42,5%) ανιχνεύθηκε η παρουσία της ΩΤΑ. Οι μέγιστες συγκεντρώσεις που παρατηρήθηκαν στα ήπατα και στους νεφρούς ήταν 6,18 μg/kg και 2,48 μg/kg, αντίστοιχα, με ένα εύρος τιμών 1,75-6,18 μg/kg για τα ήπατα και 1,54-2,48 μg/kg για τους νεφρούς. Η μέση τιμή ήταν 4,04 μg/kg στα ήπατα και 2,05 μg/kg στους νεφρούς.

**Πίνακας 9.** Ανίχνευση της ΩΤΑ και συγκεντρώσεις ΩΤΑ σε δείγματα ηπάτων και νεφρών χοίρων.

ΔΕΙΓΜΑ	ΑΡΙΘΜΟΣ ΘΕΤΙΚΩΝ ΔΙΕΓΜΑΤΩΝ (%)	ΕΥΡΟΣ ΣΥΓΚΕΝΤΡΩΣΗΣ (μg/kg)	ΜΕΣΗ ΤΙΜΗ ΣΥΓΚΕΝΤΡΩΣΗΣ (μg/kg)
Ήπαρ (n=40)	10/40 (25%)	1,75-6,18	4,04
Νεφρός (n=40)	17/40 (42,5%)	1,54-2,48	2,05

Η μεγαλύτερη συγκέντρωση ΩΤΑ που καταγράφηκε στο σύνολο των δειγμάτων ήταν 6,18 μg/kg, η οποία είναι αρκετά μεγαλύτερη από τη μέγιστη συγκέντρωση 0,9 ng/g που καταγράφηκε σε μελέτη των Matrella et al., που έλαβε χώρα στην Ιταλία το 2006 και αφορούσε την παρουσία ΩΤΑ σε μύες και νεφρούς χοίρων. Η μέτρηση των επιπέδων της ΩΤΑ έγινε με τη χρήση ELISA αλλά και HPLC-FD. Τα αποτελέσματα που ελήφθησαν με γραφική παράσταση των ELISA έναντι των αποτελεσμάτων της HPLC έδειξαν ότι η ELISA τείνει να υποτιμήσει ελαφρώς την περιεκτικότητα σε ΩΤΑ συγκριτικά με την HPLC. Παρ' όλα αυτά, η ELISA παραμένει ένα ανεκτίμητο εργαλείο ως γρήγορη ημιποσοτική τεχνική προσδιορισμού ΩΤΑ.

Όσον αφορά τους νεφρούς συγκεκριμένα, το ποσοστό των θετικών δειγμάτων ήταν 42,5%. Το ποσοστό αυτό είναι αρκετά μεγαλύτερο από αυτό που καταγράφηκε στην έρευνα των Dragacci et al. το 1999 που εξέτασε 300 υγιείς χοίρους και 100 χοίρους με νεφροπάθεια το 1997 και 710 υγιείς χοίρους το 1998 και όπου λιγότερο από 10% των δειγμάτων ήταν σημαντικά μολυσμένο με ΩΤΑ μετά από χρήση της HPLC-FLD ως μεθόδου προσδιορισμού, αλλά και από το 33,3% των θετικών δειγμάτων νεφρών που βρέθηκαν στην έρευνα των Milicevic et al., 2012. Είναι όμως μικρότερο από το 79% των δειγμάτων νεφρών που βρέθηκαν θετικοί στην ΩΤΑ το 2001 στη Ρουμανία από τους Curtui et al. Σε όλες αυτές τις μελέτες η ανίχνευση και ο προσδιορισμός της συγκέντρωσης της ΩΤΑ έγινε με HPLC. Αλλά και από το ποσοστό που καταγράφηκε στην μελέτη των Matrella et al., 2006, όπου το σύνολο των δειγμάτων νεφρών που

εξετάστηκαν βρέθηκε θετικό στην παρουσία ΩΤΑ. Επίσης, σε δείγματα νεφρών από πέντε χοίρους, που συλλέχθηκαν τυχαία από σφαγεία της Ιταλίας και εξετάστηκαν, όλα τα δείγματα βρέθηκαν μολυσμένα με διαφορετικές όμως ποσότητες ΩΤΑ (Giacomo et al., 2016).

Η μέση τιμή συγκέντρωσης της ΩΤΑ στους νεφρούς ήταν 2,05 µg/kg, μεγαλύτερη από τις μέσες συγκεντρώσεις που καταγράφηκαν στις μελέτες των Curtui et al., 2001 και Matrella et al., 2006 και ήταν 0,54 ng/g και 0,29 ng/g αντίστοιχα. Επιπλέον και σε άλλες μελέτες που πραγματοποιήθηκαν, η μέση τιμή των συγκεντρώσεων που ανιχνεύθηκαν ήταν πολύ χαμηλότερη, όπως σε αυτή των Jorgensen & Petersen, 2002, στην οποία η δειγματοληψία έγινε τυχαία από 300 υγιείς χοίρους από σφαγείο της Δανίας, η μέση συγκέντρωση ΩΤΑ που καταγράφηκε ήταν 0,50 µg/kg και η μέθοδος που χρησιμοποιήθηκε ήταν η HPLC όπως και στην έρευνα των Giacomo et al., 2016, με τυχαία δειγματοληψία των νεφρών από σφαγεία της Ιταλίας και μέση συγκέντρωση ΩΤΑ 0,37±0,30 µg/kg. Η μέθοδος προσδιορισμού της ΩΤΑ που χρησιμοποιήθηκε ήταν η ED σε συνδιασμό με HPLC-FLD. Στη μελέτη των Bertuzzi et al., 2013 μετά από ανάλυση των δειγμάτων με HPLC, η μέση συγκέντρωση που σημειώθηκε ήταν 0,13 µg/kg στους μάρτυρες (T0) ενώ αντίθετα στις άλλες τρεις ομάδες ζώων που περιελάμβανε ο πειραματισμός (T1, T2, T3) και τους χορηγούνταν τροφή μολυσμένη με ΩΤΑ σε τρία διαφορετικά επίπεδα μόλυνσης (50, 100 και 200 µg/kg) για 2 εβδομάδες, η μέση συγκέντρωση που παρατηρήθηκε στους νεφρούς ήταν 3,74 µg/kg, 5,24 µg/kg και 10 µg/kg. Οι Pleadin et al., 2016 εξέτασαν ιστούς χοίρων μετά από έκθεση τους σε μολυσμένη τροφή με 250 µg ΩΤΑ/kg τροφής για διάστημα 4 εβδομάδων και βρήκαν μέση τιμή ΩΤΑ στους νεφρούς 13,87 µg/kg χρησιμοποιώντας ELISA και HPLC. Παρομοίως, οι Persi et al., 2014 κατέγραψαν ως υψηλότερη μέση τιμή ΩΤΑ στους νεφρούς χοίρων 14,95±3,29 µg/kg, μετά από ανάλυση ιστών από χοίρους στους οποίους χορηγήθηκε ζωοτροφή μολυσμένη με 300 µg/kg ΩΤΑ για 30 ημέρες, με τις μεθόδους ELISA και HPLC. Τέλος, σε μια μελέτη όπου επίσης χορηγήθηκε μολυσμένη με ΩΤΑ ζωοτροφή (25 µg/kg για 119 ημέρες), η ανάλυση με τη μέθοδο HPLC έδειξε τη μέση συγκέντρωση στους νεφρούς να είναι 69 µg/kg (Malagutti et al., 2005). Από τις τελευταίες μελέτες, γίνεται εμφανές πως η χορήγηση στους χοίρους μολυσμένης με ΩΤΑ τροφής, έχει ως αποτέλεσμα την καταγραφή υψηλότερων συγκεντρώσεων ΩΤΑ στις αναλύσεις των νεφρών σε σχέση με τα ζώα που μολύνονται φυσικά. Υποστηρίζεται άλλωστε πως οι επιδράσεις της ΩΤΑ στους εκτιθέμενους οργανισμούς συνδέεται στενά όχι μόνο με τη δόση της ΩΤΑ που λαμβάνουν και τη διάρκεια έκθεσης τους, αλλά επίσης και με τον τύπο μόλυνσης (φυσική ή τεχνητή) επίσης (Lusky, Tesch & Gobel, 1993).

Όσον αφορά τη μέγιστη συγκέντρωση ΩΤΑ που σημειώθηκε στους νεφρούς, αυτή έφτανε τα 2,48 µg/kg, σε ένα εύρος τιμών από 1,54 µg/kg έως 2,48 µg/kg. Η τιμή αυτή είναι μεγαλύτερη συγκριτικά με αυτή των Giacomo et al., 2016 στην Ιταλία, οι οποίοι κατέγραψαν τη μέγιστη συγκέντρωση ΩΤΑ στους νεφρούς να είναι 0,91 µg/kg. Ωστόσο, είναι αρκετά μικρή σε σχέση με προηγούμενες μελέτες, όπως για παράδειγμα στη Δανία όπου οι Jorgensen & Petersen, 2002 βρήκαν στα θετικά δείγματα συγκεντρώσεις από 0-15 µg/kg ενώ οι Milicevic et al., το 2012 στη Σερβία, αφού εξέτασαν με τη μέθοδο HPLC, δείγματα από 90 τυχαία επιλεγμένα σφάγια χοίρων, κατέγραψαν μέγιστη συγκέντρωση 52,5 ng/g νεφρού. Οι Dragacci et al., 1999 στην έρευνα του 1997 κατέγραψαν συγκεντρώσεις που κυμαινόταν από 0,40 έως 1,40 mg/kg ενώ στην έρευνα του 1998 βρέθηκε μεγαλύτερη συγκέντρωση με τιμές από 0,5 έως 5 mg/kg. Επίσης,

είναι μικρότερη κι από το μέγιστο επίπεδο ΩΤΑ 25 µg/kg νεφρού που έχει ορίσει η Νομοθεσία του κράτους της Δανίας ως επιτρεπτό σε νεφρούς χοίρου αλλά και το αντίστοιχο της Ρουμανίας που είναι 5 µg/kg νεφρού.

Ωστόσο σημαντικό είναι ότι οι τιμές αυτές είναι αρκετά χαμηλές δεδομένου ότι θεωρείται ότι μια συγκέντρωση 25 µg/kg σε δείγματα νεφρών μπορεί να εξασφαλίσει ότι τα επίπεδα συγκέντρωσης στο κρέας δεν υπερβαίνει τα 10 µg/kg, στηριζόμενη στην εκτίμηση ότι τα επίπεδα της ΩΤΑ στο χοιρινό κρέας είναι περίπου το 40% των επιπέδων της συγκέντρωσης στους νεφρούς (Buechmann & Hald, 1985).

Στα δείγματα ήπατος, το 25% των δειγμάτων βρέθηκε θετικό στην παρουσία ΩΤΑ, ποσοστό που πλησιάζει αρκετά το 26,6% των Milicevic et al., 2012. Έχουν βρεθεί ωστόσο και αρκετά μεγαλύτερα ποσοστά μολυσμένων με ΩΤΑ σε δείγματα ήπατος όπως στη μελέτη των Curtui et al., 2001 όπου το ποσοστό των θετικών έφτανε το 75%.

Η μέση συγκέντρωση ΩΤΑ στα δείγματα ήπατος βρέθηκε 4,04 µg/kg, η οποία είναι πολύ μεγαλύτερη από τη μέση συγκέντρωση των 0,16 ng/g, που ανιχνεύθηκε στη μελέτη Curtui et al., 2001 αλλά και από το 0,35±0,20 µg/kg που καταγράφηκε ως μέση συγκέντρωση στο ήπαρ, στην έρευνα των Giacomo et al., 2016. Επιπρόσθετα, εμφανίζεται ως ιδιαίτερα υψηλή μέση συγκέντρωση σε σχέση με αρκετές ακόμη μελέτες όπως αυτή των Bertuzzi et al., 2013 με μέση συγκέντρωση 0,06 µg/kg ήπατος στους μάρτυρες (T0) ενώ στις άλλες τρεις ομάδες ζώων (T1-T3) που τους χορηγούνταν τροφή μολυσμένη με ΩΤΑ σε συγκεντρώσεις 50, 100 και 200 µg/kg για 2 εβδομάδες, η μέση συγκέντρωση που παρατηρήθηκε στο ήπαρ ήταν 1,60 µg/kg, 2,35 µg/kg και μόνο στο T3 ήταν 4,29 µg/kg, δηλαδή υψηλότερη. Μεγαλύτερη ήταν η μέση ωστόσο που ανίχνευσαν οι Pleadin et al., 2016 όπου η μέση συγκέντρωση ήταν 7,28 µg/kg. Τέλος, σε μια μελέτη όπου χορηγήθηκε μολυσμένη με ΩΤΑ ζωοτροφή (25 µg/kg για 120 ημέρες) η ανάλυση με τη μέθοδο HPLC έδειξε τη μέση συγκέντρωση στο ήπαρ να είναι 52 µg/kg (Malagutti et al., 2005), ενώ στην έρευνα των Persi et al., 2014 η υψηλότερη μέση τιμή ΩΤΑ στο ήπαρ χοίρων ήταν 8,52 µg/kg, ενώ στους χοίρους χορηγούνταν 0,78 mg ΩΤΑ ημερησίως (300 µg ΩΤΑ/kg ζωοτροφής για 30 ημέρες) και η ανάλυση πραγματοποιήθηκε με τις μεθόδους ELISA και HPLC.

Η μέγιστη συγκέντρωση ΩΤΑ που ανιχνεύσαμε στο ήπαρ ήταν 6,18 µg/kg ήπατος σε ένα εύρος τιμών 1,75-6,18 µg/kg. Η τιμή αυτή είναι μικρότερη από τα όρια που έχει θεσπίσει η Εσθονία για την παρουσία ΩΤΑ σε ήπαρ χοίρου (10 µg/kg ήπατος) ενώ είναι υψηλότερη από τα όρια που έχει θεσπίσει η Ρουμανία για την παρουσία ΩΤΑ σε ήπαρ χοίρου (5 µg/kg). Επίσης υπάρχουν μελέτες που ανιχνεύουν ακόμη μικρότερη μέγιστη συγκέντρωση, όπως η μέγιστη συγκέντρωση 0,59 µg/kg που καταγράφηκε σε δείγματα ήπατος στην Ιταλία, στη μελέτη των Giacomo et al., 2016. Αντίθετα, στη Σερβία σε μελέτη των Milicevic et al., 2012 βρέθηκε η αντίστοιχη μέγιστη συγκέντρωση να είναι 14,5 ng/g, δηλαδή σημαντικά μεγαλύτερη από τη μέγιστη συγκέντρωση ΩΤΑ που ανιχνεύσαμε στα δείγματα μας.

Όταν συγκρίνουμε τα αποτελέσματά μας, με τα μέγιστα επιτρεπτά επίπεδα ΩΤΑ που έχουν οριστεί σε διάφορες χώρες, συμπεραίνουμε ότι η μέγιστη συγκέντρωση ΩΤΑ που προσδιορίσαμε στους νεφρούς (2,48 µg/kg) είναι μικρότερη από τη μέγιστη συγκέντρωση 10 µg/kg νεφρού που έχει ορίσει η Νομοθεσία του κράτους της Δανίας ως επιτρεπτό όριο παρουσίας ΩΤΑ σε νεφρούς χοίρου αλλά και το αντίστοιχο της

Ρουμανίας που είναι 5 µg/kg νεφρού. Ενώ η μέγιστη συγκέντρωση ΩΤΑ που ανιχνεύσαμε στα δείγματα ήπατος ήταν 6,18 µg/kg ήπατος, τιμή που επίσης είναι μικρότερη από τα όρια που έχουν θεσπίσει η Εσθονία (10 µg/kg ήπατος), αλλά υψηλότερη από την αντίστοιχη που έχει ορίσει η Ρουμανία για την παρουσία ΩΤΑ στο ήπαρ (5 µg/kg ήπατος). Σε 3 δείγματα ήπατος ανιχνεύτηκαν τιμές πάνω από 5 µg/kg ήπατος (5,46, 6,12 και 5,46 µg/kg).

Στη μελέτη αυτή, η μέση συγκέντρωση ΩΤΑ ήταν υψηλότερη στο ήπαρ (4,04 µg/kg σε εύρος τιμών 1,75-6,18 µg/kg) συγκριτικά με τους νεφρούς (2,05 µg/kg σε ένα εύρος τιμών 1,54-2,48 µg/kg). Απαιτείται περαιτέρω διερεύνηση προκειμένου να εξηγηθεί αυτό καθώς έρχεται σε αντίθεση με την πλειοψηφία των παλαιότερων μελετών, στις οποίες οι υψηλότερες συγκεντρώσεις ανιχνεύονται πρωτίστως στους νεφρούς των χοίρων, έπειτα στο ήπαρ, ακολουθούν οι μύς και οι χαμηλότερες στον λιπώδη ιστό (Luský et al., 1993; Gareis & Wolff, 2000; Curtui et al., 2001; Pietri et al., 2006). Το ίδιο σχήμα κατανομής ΩΤΑ στους ιστούς χοίρων, αποδείχθηκε κι από τους Rosi, Sardi et al., 2006 οι οποίοι χορήγησαν 200 µg ΩΤΑ/kg τροφής για χρονικό διάστημα 35 ημερών, κατά την περίοδο όπου το μέσο βάρος των ζώων αυξανόταν από 146,5 kg σε 165 kg. Η υψηλότερη συγκέντρωση ΩΤΑ βρέθηκε στους νεφρούς (9,6±2,7 µg/kg), ακολουθούμενη από εκείνη στο ήπαρ (6,3±1,7 µg/kg) και έπειτα στους μύς (1,9 ± 0,6 µg/kg), ενώ η χαμηλότερη συγκέντρωση βρέθηκε στο λιπώδη ιστό (1,1±0,6 µg/kg). Ομοίως, στην έρευνα των Persi et al., 2014, η υψηλότερη μέση τιμή ΩΤΑ παρατηρήθηκε στους νεφρούς των χοίρων (14,95±3,29 µg/kg) που τους χορηγήθηκε μολυσμένη με ΩΤΑ τροφή, ενώ ακολουθούσε ο πνευμονικός ιστός (13,71±2,90 µg/kg) και έπειτα το ήπαρ (8,52±2,29 µg/kg). Ανάλογα αποτελέσματα υπήρξαν και στη μελέτη των Gareis & Scheuer, 2000 με τις υψηλότερες τιμές ΩΤΑ να προσδιορίζονται στο νεφρό χοίρου (9,33 µg/kg) και έπειτα στο ήπαρ (2,72 µg/kg). Οι Milićević et al., 2012 αποκάλυψαν επίσης τις υψηλότερες συγκεντρώσεις ΩΤΑ να εμφανίζονται σε νεφρό χοίρου και έπειτα να ακολουθεί το ήπαρ.

Ωστόσο, τα αποτελέσματα όλων αυτών των μελετών, υποδηλώνουν την καταλληλότητα των νεφρών και του ήπατος για την ανίχνευση ενδεχόμενης μόλυνσης με ΩΤΑ κρέατος και προϊόντων με βάση το κρέας. Λόγω της χρήσης τους ως πρώτες ύλες στην παρασκευή προϊόντων χοιρινού κρέατος, μπορούν να επηρεάσουν τις συγκεντρώσεις της ΩΤΑ στα τελικά προϊόντα κρέατος, καθώς υπάρχουν μελέτες που υποστηρίζουν πως το επίπεδο της μόλυνσης με μυκοτοξίνη στο τελικό προϊόν ζωικής προέλευσης εξαρτάται από τον έλεγχο της περιβαλλοντικής υγιεινής στις εγκαταστάσεις ωρίμανσης, το επίπεδο μόλυνσης των πρώτων υλών και τη συνταγή που χρησιμοποιείται για την παραγωγή τους (Dall'Asta et al., 2010). Οι Persi et al., 2014 τόνισαν ότι, προκειμένου να προβλεφθεί μια ορθή εφαρμογή του συστήματος HACCP, κατάλληλοι έλεγχοι θα πρέπει να ενσωματωθούν στη διαδικασία, ώστε να υπάρξει έλεγχος για κάθε δεδομένο κίνδυνο που μπορεί να προκύψει κατά μήκος της γραμμής της διαδικασία παραγωγής τροφίμων (Ceci et al., 2007).

Η παρουσία της ΩΤΑ στα δείγματα νεφρών και ήπατος των σφάγιων χοίρων που εξετάστηκαν μπορεί να οφείλεται σε μόλυνση των μιγμάτων ζωοτροφών και των δημητριακών καρπών με τα οποία εκτρέφονται αυτά τα ζώα, δεδομένου ότι το κλίμα της περιοχής ευνοεί την ανάπτυξη των μυκήτων που είναι υπεύθυνοι για την παραγωγή ΩΤΑ. Αυξημένες συγκεντρώσεις ΩΤΑ παρατηρούνται σε χώρες όπου οι καιρικές συνθήκες περιλαμβάνουν υγρούς και κρύους χειμώνες με μεγάλες διακυμάνσεις της

θερμοκρασίας (Pavlović et al., 1979; Pepeljnjak et al., 2008; Šegvić et al., 2009). Απαραίτητο είναι ωστόσο, να διεξαχθεί περαιτέρω έρευνα για να διερευνηθεί η πηγή της μόλυνσης, ενώ προκειμένου να παρεμποδιστεί αυτή η μόλυνση ενός προϊόντος ζωικής προέλευσης, διαρκής παρακολούθηση της ΩΓΑ στις ζωοτροφές, καθώς και στα τελικά προϊόντα ζωικής προέλευσης είναι απαραίτητη.

## **ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ**

Η μελέτη αυτή είναι η πρώτη που διεξάχθηκε στη χώρα μας για την παρουσία ΩΓΑ στους ιστούς (ήπαρ και νεφροί) χοίρων. Τα αποτελέσματα της μελέτης έδειξαν μόλυνση με ΩΓΑ των νεφρών και του ήπατος χοίρων που εκτρέφονται στην Περιφερειακή Ενότητα της Καρδίτσας σε ποσοστά 42,5% και 25%. Η μέγιστη συγκέντρωση ΩΓΑ που προσδιορίσαμε στα δείγματα νεφρών και ήπατος ήταν 2,48 µg/kg και 6,18 µg/kg αντίστοιχα. Μέχρι σήμερα δεν έχουν οριστεί επίσημα όρια για την παρουσία της ΩΓΑ στο χοιρινό κρέας και τα προϊόντα του στην Ευρωπαϊκή Ένωση.

Η παρουσία της ΩΓΑ στα όργανα (νεφροί και ήπαρ) των σφάγιων χοίρων που εξετάστηκαν μπορεί να οφείλεται σε μόλυνση των ζωοτροφών με τις οποίες εκτρέφονται αυτά τα ζώα, δεδομένου ότι το κλίμα της περιοχής ευνοεί την ανάπτυξη των μυκήτων που είναι υπεύθυνοι για την παραγωγή ΩΓΑ. Ωστόσο για να διερευνηθεί η πηγή της μόλυνσης απαιτείται περισσότερη έρευνα.

Λόγω της σημασίας της ΩΓΑ για τη Δημόσια υγεία η παρουσία ΩΓΑ στους νεφρούς και στο ήπαρ σφάγιων χοίρου που εκτρέφονται στην Περιφερειακή Ενότητα της Καρδίτσας που διαπιστώθηκε στην παρούσα μελέτη έχει ιδιαίτερη σημασία. Απαιτείται περαιτέρω έρευνα για να διαπιστωθεί το επίπεδο της μόλυνσης του χοιρινού κρέατος στη χώρα μας. Η διαρκής παρακολούθηση της ΩΓΑ στις ζωοτροφές, καθώς και στα τελικά προϊόντα ζωικής προέλευσης κρίνεται απαραίτητη. Επίσης καταδεικνύεται η ανάγκη για τη θέσπιση νομοθετικών ορίων για τη συγκέντρωση της ΩΓΑ στο χοιρινό κρέας και στα προϊόντα του σε επίπεδο Ευρωπαϊκής Ένωσης.

## BIBΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

### Ξενόγλωσση βιβλιογραφία

1. Aalund, O.; Brunfeldt, K.; Hald, B.; Krogh, P.; Poulsen, K. A radioimmunoassay for Ochratoxin A: A preliminary investigation. *Acta Pathol. Microbiol. Scand. Sect. C* 1975, 83, 390–392.
2. Abid, S.; Hassen, W.; Achour, A.; Skhiri, H.; Maaroufi, K.; Ellouz, F.; Creppy, E.; Bacha, H. Ochratoxin A and human chronic nephropathy in Tunisia: Is the situation endemic? *Hum. Exp. Toxicol.* 2003, 22, 77–84.
3. Afshar, P.; Shokrzadeh, M.; Kalhori, S.; Babaee, Z.; Saeedi Saravi, S. Occurrence of Ochratoxin A and aflatoxin M1 in human breast milk in Sari, Iran. *Food Control* 2013.
4. Ahn, J.; Kim, D.; Kim, H.; Jahng, K.Y. Quantitative determination of mycotoxins in urine by LC-MS/MS. *Food Addit. Contam. Part A* 2010, 27, 1674–1682.
5. Ali, N.; Blaszkewicz, M.; Manirujjaman, M.; Perveen, R.; Nahid, A.; Mahmood, S.; Rahman, M.; Hossain, K.; Degen, G. Biomonitoring of Ochratoxin A in blood plasma and exposure assessment of adult students in Bangladesh. *Mol. Nutr. Food Res.* 2014, 58, 2219–2225.
6. Alvarez L, Gil AG, Ezpeleta O Garcia Jalon JA, Lopez de Cerain, A. (2004). Immunotoxic effects of ochratoxin A in vistar rats after oral administration. *Food Chem Toxicol*, 42, 825–834.
7. Armorini Sara , Altafini Alberto, Zaghini Anna & Roncada Paola (2016) Ochratoxin A in artisan salami produced in Veneto (Italy), *Food Additives & Contaminants: Part B*, 9:1, 9-14.
8. Aslam, M.; Beg, A.; Blaszkewicz, M.; Degen, G.; Golka, K. Ochratoxin A blood concentration in healthy subjects and bladder cancer cases from Pakistan. *Toxicol. Lett.* 2006, 164, S280.
9. Azpilicueta, C.A.; Arbeloa, M.I.; de Maquirriain, P.F.J. Natural and synthetic occurring forms of the ochratoxins. In *Food Chemistry Research Developments*; Papadopoulos, K.N., Ed.; Nova Science Publishers: New York, NY, USA, 2008.
10. Bailly JD, Tabuc C, Querin A, Guerre P. (2005). Production and stability of patulin, ochratoxin A, citrinin and cyclopiazonic acid on dry cured ham. *J Food Prot*, 68, 151-167.
11. Baldwin, T.; Riley, R.; Zitomer, N.; Voss, K.; Coulombe, R., Jr.; Pestka, J.; Williams, D.; Glenn, A. The current state of mycotoxin biomarker development in humans and animals and the potential for application to plant systems. *World Mycotoxin J.* 2011, 4, 257–270.
12. Battilani P, Pietri A, Giorni P, Formenti S, Bertuzzi T, Toscani T, et al. (2007). Penicillium populations in dry-cured ham manufacturing plants. *J Food Prot*, 70(4), 975–980.
13. Bauer, J.; Gareis, M. Ochratoxin A in the food chain (Ger). *J. Vet. Med.* 1987, B34, 613–627.
14. Bauer, K.; Gekle, M.; Silbernagl, S. Ochratoxin A and kidney. In Proceedings of the 16th MycotoxinWorkshop Stuttgart-Hohenheim, Hohenheim, Germany, 16–18 May 1994.
15. Bazin, I.; Faucet-Marquis, V.; Monje, M.; El Khoury, M.; Marty, J.; Pfohl-Leszkowicz, A. Impact of pH on the stability and the cross-reactivity of Ochratoxin A and citrinin. *Toxins* 2013, 5, 2324–2340.

16. Bazin I., Nabais E., Lopez-Ferber M. Rapid Visual Tests: Fast and Reliable Detection of Ochratoxin A (2010).
17. Becker, M.; Degelman, P.; Herderich, M.; Schreier, P.; Humpf, H.-U. Column liquid chromatography-electrospray ionization-tandem mass spectrometry for the analysis of Ochratoxin. *J. Chromatogr. A* 1998, 818, 260–264.
18. Benford, D.; Boyle, C.; Dekant, W.; Fuchs, R.; Gaylor, D.W.; Hard, G.; McGregor, D.B.; Pitt, J.I.; Plestina, R.; Shepard, G.; et al. Ochratoxin A. In Safety Evaluation of Certain Mycotoxins in Food, Proceedings of the 56th Meeting of the Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives (JECFA), Geneva, 6–15 February, 2001; World Health Organization: Geneva, Switzerland, 2001; Volume 47, pp. 281–387.
19. Bertuzzi V, Gualla A, Morlacchini M, Pietri A. Direct and indirect contamination with ochratoxin A of ripened pork products (2013).
20. Biasucci, G.; Calabrese, G.; di Giuseppe, R.; Carrara, G.; Colombo, F.; Mandelli, B.; Maj, M.; Bertuzzi, T.; Pietri, A.; Rossi, F. The presence of Ochratoxin A in cord serum and in human milk and its correspondence with maternal dietary habits. *Eur. J. Nutr.* 2011, 50, 211–218.
21. Blout W.P., Turkey “X” Disease. *Turkeys* 9:55M58, (1961).
22. Bogs, C.; Battilani, P.; Geisen, R. Development of a molecular detection and differentiation system for Ochratoxin A producing *Penicillium* species and its application to analyse the occurrence of *Penicillium nordicum* in cured meats. *Int. J. Food Microbiol.* 2006, 107, 39–47.
23. Böhnns, B.; Seidel, V.; Lindner, W. Analysis of selected mycotoxins by capillary electrophoresis. *Chromatographia* 1995
24. Bonel, L.; Vidal, J.C.; Duato, P.; Castillo, J.R. An electrochemical competitive biosensor for Ochratoxin A based on a DNA biotinylated aptamer. *Biosens. Bioelectron.* 2011, 26, 3254–3259.
25. Boorman, G., Ed.; NTP Technical Report on the Toxicology and Carcinogenesis Studies of Ochratoxin A (CAS No. 30-47-9) in F344/N Rats (Gavage Studies), NIH Publication No. 89-2813; U.S. Department of Health and Human Services, National Institutes of Health: Research Triangle Park, NC, USA, 1989.
26. Boudra H, Le Bars P, Le Bars J. (1995). Thermostability of ochratoxin A in wheat under two moisture conditions. *Appl Environ Microbiol.* 61, 1156–1158.
27. Brown, A.; Odell, E.; Mantle, P. DNA ploidy distribution in renal tumours induced in male rats by dietary Ochratoxin A. *Exp. Toxicol. Pathol.* 2007, 59, 85–95.
28. Breitholtz-Emanuelsson, A.; Minervini, F.; Hult, K.; Visconti, A. Ochratoxin A in human serum samples collected in southern Italy from healthy individuals and individuals suffering from different kidney disorders. *Nat. Toxins* 1994, 2, 366–370.
29. Breitholtz-Emanuelsson, A.; Olsen, M.; Oskarsson, A.; Palminger, I.; Hult, K. Ochratoxin A in cow’s milk and in human milk with corresponding human blood samples. *J. AOAC Int.* 1993, 76, 842–846
30. Bruinink, A.; Rasonyi, T.; Sidler, C. Differences in neurotoxic effects of Ochratoxin A, ochracin and ochratoxin-a in vitro. *Nat. Toxins* 1998, 6, 173–177.
31. Budavari, S., Ed.; The Merck Index, 11th ed.; Merck & Co.: Rahway, NJ, USA, 1989; p. 1068.
32. Büchmann, N. B., and Hald, B., 1985, Analysis, occurrence and control of ochratoxin A residues in Danish pig kidneys. *Food Additives and Contaminants*, 2, 193±199.
33. Calado T., Venancio A., Abrunhosa L. Irradiation for Mold and Mycotoxin Control: A Review (2014).



34. Calin, G.A.; Sevignani, C.; Dumitru, C.D.; Hyslop, T.; Noch, S.; Yendamuri, S.; Shimizu, M.; Rattan, S.; Bullrich, F.; Negrini, M.; et al. Human microRNA genes are frequently located at fragile sites and genomic regions involved in cancers. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 2004, 101, 2999-3004.
35. Castegnaro, M.; Bartsch, H.; Chernozemsky, I.N. Endemic nephropathy and urinary tract tumours in the Balkans. *Cancer Res.* 1987, 47, 3608-3609.
36. Castegnaro, M.; Tozlovanu, M.; Wild, C.; Molinié, A.; Sylla, A.; Pfohl-Leszkowicz, A. Advantages and drawbacks of immunoaffinity columns in analysis of mycotoxins in food. *Mol. Nutr. Food Res.* 2006, 50, 480-487.
37. Castegnaro, M.; Canadas, D.; Vrabcheva, T.; Petkova-Bocharova, T.; Chernozemsky, I.; Pfohl-Leszkowicz, A. Balkan Endemic Nephropathy: Role of ochratoxins A through biomarkers. *Mol. Nutr. Food Res.* 2006b, 50, 519-529.
38. Castegnaro, M.; Maru, V.; Petkova-Bocharova, T.; Nikolov, I.; Bartsch, H. Concentrations of Ochratoxin A in the urine of endemic nephropathy patients and controls in Bulgaria: Lack of detection of 4-hydroxyochratoxin A. In *Mycotoxins, Endemic Nephropathy and Urinary Tract Tumours*; Castegnaro, M., Plestina, R., Dirheimer, G., Chernozemsky, I.N., Bartsch, H., Eds.; IARC Scientific Publications: Lyon, France, 1991; Volume 115, pp. 165-169.
39. Castella G, Larsen TO, Cabanes J, Schmidt H, Alberesi A, Niessen L, Farber P, Geisen R. (2002). Molecular characterization of ochratoxin A producing strains of the genus *Penicillium*. *Syst Appl Microbiol*, 25, 74-83.
40. Chen, J.; Fang, Z.; Liu, J.; Zeng, L. A simple and rapid biosensor for Ochratoxin A based on a structure-switching signalling aptamer. *Food Control* 2012, 25, 555-560.
41. Chiavaro E, Lepiani A, Colla F, Bettoni P, Pari E, Spotti E. (2002). Ochratoxin A determination in ham by immunoaffinity clean-up and a quick fluorimetric method. *Food Add Contam*, 19(6), 575-579.
42. Chu, F.S.; Chang, F.C.C.; Hinsdill, R.D. Production of antibody against Ochratoxin A. *Appl. Environ. Microbiol.* 1976, 31, 831-835.
43. Cohen, H.; Lapointe, M. Determination of Ochratoxin A in animal feed and cereal grains by liquid chromatography with fluorescence detection. *J. Assoc. Off. Anal. Chem.* 1986, 69, 957-959.
44. Comi G, Orlic S, Redzepovic S, Urso R, Iacumin L. (2004). Moulds isolated from Istrian dried ham at the pre-ripening and ripening level. *Int J Food Microbiol* 96, 29-34.
45. Corneli, S.; Maragos, C.M. Capillary electrophoresis with laser-induced fluorescence: Method for the mycotoxin Ochratoxin A. *J. Agric. Food Chem.* 1998, 46, 3162-3165.
46. Coronel, M.; Marin, S.; Tarragó, M.; Cano-Sancho, G.; Ramos, A.; Sanchis, V. Ochratoxin A and its metabolite Ochratoxin Alpha in urine and assessment of the exposure of inhabitants of Lleida, Spain. *Food. Chem. Toxicol.* 2011b, 49, 1436-1442.
47. Costa J., Saraiva N., Guerreiro P., Louro H., Silva M., Miranda J., Castro M., Batinic-Haberle I., Fernandes A., Oliveira N. Ochratoxin A-induced cytotoxicity, genotoxicity and reactive oxygen species in kidney cells: An integrative approach of complementary endpoints (2015).
48. Creppy, E.E.; Betbeder, A.M.; Gharbi, A.; Counord, J.; Castegnaro, M.; Bartsch, H.; Moncharmont, P.; Fouillet, B.; Chambon, P.; Dirheimer, G. Human Ochratoxicosis in France; IARC Sci. Publ.: Lyon, France, 1991; Volume 115, pp. 131-134.
49. Creppy, E.E.; Castegnaro, M.; Grosse, Y.; Meriaux, J.; Moncharmont, P.; Waller, C. Etude de l'ochratoxicose humaine dans trois regions de France: Alsace, Aquitaine, et region Rhone-Alpes. In *Human Ochratoxicosis and Its Pathologies*; Creppy, E.E.,

Castegnaro, M., Dirheimer, G., Eds.; Colloque INSERM/John Libbey Eurotext: London, UK, 1993; Volume 231, pp. 147–158.

**50.** Curtui VG and Gareis M. (2001). A simple HPLC method for the determination of the mycotoxin ochratoxin A and B in blood serum of swine. *Food Add Contam*, 17, 635–643.

**51.** Curtui VG, Gareis M, Usleber E, Martlbauer E. (2001). Survey of Romanian slaughtered pigs for the occurrence of mycotoxins ochratoxins A and B, and zearalenone. *Food Add Contam*, 18(8), 730–738.

**52.** Dall'Asta C, Galaverna G, Bertuzzi T, Moseriti A, Pietri A, Dossena A, Marchelli R. (2010). Occurrence of ochratoxin A in raw ham muscle, salami and dry-cured ham from pigs fed with contaminated diet. *Food Chem*, 120, 978–983.

**53.** Desalegn, B.; Nanayakkara, S.; Harada, K.; Hitomi, T.; Chandrajith, R.; Karunaratne, U.; Abeysekera, T.; Koizumi, A. Mycotoxin detection in urine samples from patients with chronic kidney disease of uncertain etiology in Sri Lanka. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 2011, 87, 6–10.

**54.** Di Giuseppe, R.; Bertuzzi, T.; Rossi, F.; Rastelli, S.; Mulazzi, A.; Capraro, J.; de Curtis, A.; Iacoviello, L.; Pietri, A. Plasma Ochratoxin A levels, food consumption, and risk biomarkers of a representative sample of men and women from the Molise region in Italy. *Eur. J. Nutr.* 2011, 51, 851–860.

**55.** Dirheimer, G.; Creppy, E.E. Mechanism of Action of Ochratoxin A; IARC Sci. Publ.: Lyon, France, 1991; Volume 115, pp. 171–186.

**56.** Dohnal, V.; Dvořák, V.; Malíř, F.; Ostrý, V.; Roubal, T. A comparison of ELISA and HPLC methods for determination of Ochratoxin A in human blood serum in the Czech Republic. *Food. Chem. Toxicol.* 2013, 62, 427–431

**57.** Dohlman, E. Mycotoxin Hazards and Regulations. Impacts on Food and Animal Feed Crop Trade. In *International Trade and Food Safety*; Buzby, J., Ed.; U.S. Dept. of Agriculture, Economic Research Service: Washington, DC, USA, 2003; pp. 97–108.

**58.** Domijan, A.M.; Peraica, M.; Fuchs, R.; Lucic, A.; Radic, B.; Balijsa, M.; Bosanac, I.; Grgicevic, D. Ochratoxin A in blood of healthy population in Zagreb. *Arh. Hig. Rada Toksikol.* 1999, 50, 263–271.

**59.** Dostal, A.; Jakusova, L.; Cajdova, J.; Hudeckova, H. Results of the first studies of occurrence of Ochratoxin A in human milk in Slovakia. *Bratisl. Lek. Listy* 2008, 109, 276–278.

**60.** Dragacci S, Grosso F, Bire R, Fremy M, Coulon S. (1999). A French Monitoring Programme for Determining Ochratoxin A Occurrence in Pig Kidneys. *Natural Toxins*, 7, 167-173.

**61.** Di Paolo, N.; Guarnieri, A.; Loi, F.; Sacchi, G.; Mangiarotti, A.; di Paolo, M. Acute renal failure from inhalation of mycotoxins. *Nephron* 1993, 64, 621–625.

**62.** Duarte, S.; Pena, A.; Lino, C. Human Ochratoxin A biomarkers—from exposure to effect. *Crit. Rev. Toxicol.* 2011, 41, 187–212

**63.** Duarte, S.; Alves, M.; Pena, A.; Lino, C. Determinants of Ochratoxin A exposure—A One year follow-up study of urine levels. *Int. J. Hyg. Environ. Health* 2012, 215, 360–367.

**64.** Duarte, S.; Lino, C.; Pena, A. Mycotoxin food and feed regulation and the specific case of Ochratoxin A: A review of the worldwide status. *Food Addit. Contam. Part A Chem. Anal. Control. Expo Risk. Assess.* 2010, 27, 1440–1450.

**65.** Duarte S.C., Lino C.M., Pena A. Novel IAC-LC-ESI-MS2 analytical set-up for ochratoxin A determination in pork (2012).

- 66.** EC (European Commission Regulation) (2006). Commission regulation (EC) no. 1881/2006 of 19 December 2006 setting maximum levels for certain contaminants in foodstuffs. *Official Journal of the European Union*, L364, 5–18.
- 67.** EC (European Commission) (1997) SCOOP, task 3.2.2. Assessment of dietary intake of ochratoxin A by the population in EU member states. European Commission, Directorate-General for Industry, Reports on tasks for scientific co-operation EUR 17523 EN. Revised version, November 1997.
- 68.** EC (European Commission) (2002) SCOOP, task 3.2.7. Assessment of dietary intake of ochratoxin A by the population in EU member states. European Commission, Directorate-General Health and Consumer Protection, Reports on tasks for scientific operation. January 2002.
- 69.** Ediage, N.E.; Diana Di Mavungu, J.; Song, S.; Sioen, I.; de Saeger, S. Multimycotoxin analysis in urines to assess infant exposure: A case study in Cameroon. *Environ. Int.* 2013, 57–58, 50–59.
- 70.** EFSA (European Food Safety Authority) (2006). Opinion of the Scientific Panel on Contaminants in the Food Chain on a request from the Commission related to ochratoxin A in food, adopted on 4 April 2006, *The EFSA Journal*, 365, 1-56.
- 71.** EFSA (European Food Safety Authority) (2004a). Opinion of the scientific panel on contaminants in the food chain on a request from the commission related to aflatoxin B1 as undesirable substance in animal feed. The European Food Standard Agency. *The EFSA Journal*, 39, 1-27.
- 72.** EFSA-Q-2003-039, RN. (2004b). 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. *The EFSA Journal*, 101, 1–36.
- 73.** Erkekoç glu, P.; Sabuncuoç glu, S.; Aydın, S.; Sahin, G.; Giray, B. Determination of seasonal variations in serum Ochratoxin A levels in healthy population living in some regions of Turkey by Enzyme-Linked Immunosorbent assay. *Toxicon* 2010, 55, 507–513.
- 74.** Faucet, V.; Pfohl-Leszkowicz, A.; Dai, J.; Castegnaro, M.; Manderville, R. Evidence for covalent DNA adduction by Ochratoxin A following chronic exposure to rat and subacute exposure to pig. *Chem. Res. Toxicol.* 2004, 17, 1289–1296.
- 75.** Ferrara Massimo , Magistà Donato , Epifani Filomena , Cervellieri Salvatore , Lippolis Vincenzo , Gallo Antonia , Perrone Giancarlo , Susca Antonia. Study of gene expression and OTA production by *Penicillium nordicum* during a small-scale seasoning process of salami (2016).
- 76.** Filali, A.; Betbeder, A.; Baudrimont, I.; Benayada, A.; Soulaymani, R.; Creppy, E. Ochratoxin A in human plasma in Morocco: A preliminary survey. *Hum. Exp. Toxicol.* 2002, 21, 241–245.
- 77.** Forgacs J., MycotoxicosesMthe neglected diseases. *Feedstuffs* 34:124 134, (1962)
- 78.** Frank HK. (1991). Food contamination by ochratoxin A in Germany, IARC scientific publications 115, 77-81.
- 79.** Frennette, C.; Paugh, R.; Tozlovanu, M.; Juzio, M.; Pfohl-Leszkowicz, A.; Manderville, R. Structure-activity relationships for the fluorescence of ochratoxin A: Insight for detection of ochratoxin A metabolites. *Anal. Chim. Acta* 2008, 617, 153–161.
- 80.** Fredriksson-Ahomaa, M., Korte, T., Korkeala, H. (2000). “Contamination of carcasses, offals and the environment with yadA-positive *Yersinia enterocolitica* in a pig slaughterhouse”. *Journal of Food Protection*, 63, 31–35.

- 81.** Frohlich AA, Marquardt RR, Ominski KH. (1991). Ochratoxin A as a contaminant in the human food chain: a Canadian perspective. IARC scientific publications, 115, 139-143.
- 82.** Fukal, I. A survey of cereals, cereals products, feedstuffs and porcine kidney by radioimmunoassay. *Food Addit. Contam.* 1990, 7, 253–258.
- 83.** Fukal, I. Spontaneous occurrence of Ochratoxin A residues in Czechoslovak slaughter pigs determined by radioimmunoassay. *Dtsch. Lebensm. Rundsch.* 1991, 87, 316–319.
- 84.** Gareis M and Scheuer R. (2000). Ochratoxin A in meat and meat products. *Archiv Fur Lebensmittelhygiene*, 51(4–5), 102–104.
- 85.** Gareis M and Wolff J. (2000). Relevance of mycotoxin contaminated feed for farming animals and carry over of mycotoxins in food of animal origin. *Mycoses*, 43, 79–83.
- 86.** Gareis M. (1996). Fate of ochratoxin A on processing of meat products, pp 35–37.
- 87.** Gerding J., Cramer B., Humpf H.-U. Determination of mycotoxin exposure in Germany using an LC-MS/MS multibiomarker approach (2014).
- 88.** Luci Giacomo, Vanni Michele, Ferruzzi Guido, Mani Danilo, Intorre Luigi, Meucci Valentina. Determination of ochratoxin A in pig tissues using enzymatic digestion coupled with high-performance liquid chromatography with a fluorescence detector, (2016)
- 89.** Gilbert J., Anklam E. Validation of analytical methods for determining mycotoxins in foodstuffs, *Trends in analytical chemistry*, 21, p.468-486, (2002)
- 90.** Gilbert, J.; Brereton, P.; MacDonald, S. 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.* 2001, 18, 1088–1093.
- 91.** Govaris A., Roussi V., Koidis P.A., Botsoglou N.A. (2002) Distribution and stability of aflatoxin M1 during production and storage of yoghurt. *Food Addit Contam*, 19: 1043-1050.
- 92.** Govaris A., Roussi V., Koidis P.A., Botsoglou N.A. (2001) Distribution and stability of aflatoxin M1 during processing, ripening and storage of Teleme cheese. *Food Addit Contam*, 18: 437-443.
- 93.** Govaris A. (2009) Aflatoxins in foods of animal origin, *Journal of the Hellenic Veterinary Medical Society*, 60(4): 534-543.
- 94.** Guerre P. Worldwide Mycotoxins Exposure in Pig and Poultry Feed Formulations (2016).
- 95.** Haghighi B. , Thorpe C., pohland A.E., Barnett R. Development of a sensitive high-performance liquid chromatographic method for detection of aflatoxins in pistachio nuts, *Journal of Chromatography*, 206 p.101-108 (1981)
- 96.** Heussner, A.H.; Bingle, L.E.H. Comparative Ochratoxin toxicity: A review of the available data. *Toxins* 2015, 7, 4253-4282.
- 97.** Holland, R.D.; Sepaniak, M.J. Qualitative analysis of mycotoxins using micellar electrokinetic capillary chromatography. *Anal. Chem.* 1993, 65, 1140–1146.
- 98.** Huong B.T.M., Tuyen L.D., Tuan D.H., Brimer L., Dalsgaard A. Dietary exposure to aflatoxin B<sub>1</sub>, ochratoxin A and fumonisins of adults in Lao Cai province, Viet Nam: A total dietary study approach (2016)
- 99.** Hult, K.; Hokby, E.; Gatenbeck, S. Analysis of ochratoxin B alone and in the presence of Ochratoxin A, using carboxypeptidase A. *Appl. Environ. Microbiol.* 1977, 33, 1275–1277.

- 100.** Iacumin L, Chiesa L, Boscolo D, Manzano M, Cantoni C, Orlic S, et al. (2009). Moulds and ochratoxin A on surfaces of artisanal and industrial dry sausages. *Food Microbiol*, 26(1), 65–70.
- 101.** Iacumin Lucilla, Manzano Marisa, Andyanto Debbie, Comi Giuseppe. Biocontrol of ochratoxigenic moulds (*Aspergillus ochraceus* and *Penicillium nordicum*) by *Debaryomyces hansenii* and *Saccharomycopsis fibuligera* during speck production (2016).
- 102.** IARC (1993). Ochratoxin A. Some Naturally Occurring Substances: Food Items and Constituents, Heterocyclic Aromatic Amines and Mycotoxins. In: IARC Monograph on the evolution of carcinogenic risks to humans, vol. 56. International Agency for Research on Cancer, Geneva, pp. 489–521.
- 103.** ICMFS (1996). Toxigenic fungi: *Aspergillus*. In: Roberts TA, Baird-Parker AC, Tompkin RB, editors. Microorganisms in foods 5: microbiological specification of food pathogens. International Commission on Microbiological Specification for Foods. London
- 104.** JECFA (1991). Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives, 37th Meeting: WHO Food Additives Series, No. 28. Geneva: WHO pp 281-415.
- 105.** JEFCA (FAO/WHO) (Food and Agriculture Organisation/World Health Organisation), (2001). Ochratoxin A. In: Safety evaluation of certain mycotoxins in food, Prepared by the 56th Meeting of the Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives (JECFA).WHO Food Additives Series 47, pp 281–387.
- 106.** JEFCA (2001). Ochratoxin A. In: Safety evaluation of certain mycotoxins in food. WHO Food Additives Series , No. 47, Geneva: WHO pp 281-415.
- 107.** Jørgensen, K. Survey of pork, poultry, coffee, beer and pulses for Ochratoxin A. *Food Addit. Contam.* 1998, 15, 550–554.
- 108.** Jorgensen K and Petersen A. (2002). Content of ochratoxin A in paired kidney and meat samples from healthy Danish slaughter pigs. *Food Addit Contam.* 19, 562-567.
- 109.** Jorgensen K. (2005). Occurrence of ochratoxin A in commodities and processed food – A review of EU occurrence data. *Food Addit Contam.* 22, 26-30.
- 110.** Kanisawa, M.; Suzuki, S. Induction of renal and hepatic tumors in mice by Ochratoxin A, a mycotoxin. *Gann* 1978, 69, 599–600.
- 111.** Karlovsky P. (1999). Biological detoxification of fungal toxins and its use in plant breeding, feed and food production. *Natural Toxins*, 7(1), 1–23.
- 112.** Kozaczynski, W. Experimental ochratoxicosis A in chickens. Histopathological and histochemical study. *Arch. Vet. Pol.* 1994, 34, 205–219.
- 113.** Krogh, P. Mycotoxic porcine nephropathy—A possible model for Balkan (endemic) nephropathy. In *Endemic Nephropathy, Proceedings of the Second International Symposium on Endemic Nephropathy, Sofia, Bulgaria, 9–12 November 1972*; Bulgarian Academy of Sciences: Sofia, Bulgaria, 1972; pp. 266–277.
- 114.** Kuramochi, G.; Gekle, M.; Silbernagl, S. Ochratoxin A disturbs pH homeostasis in the kidney: Increases in pH and HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>—In the tubules and vasa recta. *Pflugers Arch.* 1997, 434, 392–397.
- 115.** Larsen, T.O.; Svendsen, A.; Smedsgaard, J. Biochemical characterization of Ochratoxin A-Producing strains of the genus *Penicillium*. *Appl. Env. Microb.* 2001, 67, 3630-3635.
- 116.** Leistner L. (1984). Toxigenic penicillia occurring in feeds and foods: a review. *Food Technol Australia*, 36, 404–413.

117. Lioi MB, Santoro A, Barbieri R, Salsano S, Ursini MV. (2004). Ochratoxin A and zearalenone: a comparative study on genotoxic effects and cell death induced in bovine lymphocytes. *Mutat Res*, 557, 19–27.
118. G.A.Lombaert, P.Pellaers, V.Roscoe, M.Mankotia, R.Neil, P.M.Scott, Mycotoxins in infant cereal foods from the Canadian retail market, *Food Additives & Contaminants: Part A*, 01 May (2003).
119. Luan C., Wang L., Chen F., Wang S., Zhao L., Shao L. Determination of Ochratoxin A in Pig Muscle Using Dispersive Liquid-liquid Microextraction Combined with High-Performance Liquid Chromatography (2015).
120. Luhe A, Hildebran, H, Bach U. (2003). A new approach to studying ochratoxin A (OTA)-induced nephrotoxicity; expression profiling in vivo and in vitro employing cDNA microarrays. *Toxicol Sci*, 73(2), 315–328.
121. 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.
122. Malir, F.; Ostry, V.; Novotna, E. Toxicity of the mycotoxin Ochratoxin A in the light of recent data. *Toxin Rev*. 2013, 32, 19–33.
123. Malir, F.; Ostry, V.; Pfohl-Leszkowicz, A.; Novotna, E. Ochratoxin A: Developmental and reproductive toxicity-An overview. *Birth Defects Res. B* 2013, 98, 493–502.
124. Malir F., Ostry V, Pfohl-Leszkowicz A., Malir J. , Toman J. Ochratoxin A: 50 Years of Research (2016).
125. Mally, A.; Völkel,W.; Amberg, A.; Kurz, M.;Wanek, P.; Eder, E.; Hard, G.; Dekant,W. Functional, biochemical, and pathological effects of repeated oral administration of Ochratoxin A to Rats. *Chem. Res. Toxicol*. 2005, 18, 1242–1252
126. Matrella R, Monaci L, Milillo MA, Palmisano F, Tantillo MG. (2006). Ochratoxin A determination in paired kidneys and muscle samples from swines slaughtered in southern Italy. *Food Control*, 17(2), 114–117.
127. Milicevic, Stefanovic, Jankovic, Radicevic . Risk analysis and exposure assessment of Ochratoxin A in Serbia (2012).
128. Mizakova A, Pipova M, Turek P. (2002). The occurrence of moulds in fermented raw meat products. *Czech J Food Sci*, 3, 89–94.
129. Monaci L, Tantillo G, Palmisano F. (2004). Determination of ochratoxin in pig tissues by liquid-liquid extraction/clean-up and high performance liquid chromatography. *Anal Bioanal Chem*, 378, 1777-1782.
130. Moss MO. (2000). Toxicogenic fungi and mycotoxins. In: Lund, B.M., Baird-Parker, T.C., Springer Science, New York, USA, pp. 1490–1517.
131. Nunez F, Rodriguez MM, Bermu` dez ME, Cordoba JJ, Asensio MA, (1996). Composition and toxigenic potential of the mpould population on dry-cured Iberian ham. *Int J Food Microbiol*, 32, 185–197.
132. Ostry, V.; Malir, F.; Ruprich, J. Producers and important dietary sources of Ochratoxin A and citrinin. *Toxins* 2013, 5, 1574–1586.
133. Ostry, V.; Malir, F.; Dofkova, M.; Skarkova, J.; Pfohl-Leszkowicz, A.; Ruprich, J. Ochratoxin A dietary exposure of ten population groups in the Czech Republic: Comparison with data over the world. *Toxins* 2015, 7, 3608-3635.
134. Pearson S.M., Candlish A.A.G., Aidoo K.E.& Smith J.E. Determination of aflatoxin levels in pistachio and cashew nuts using immunoaffinity columnclean-up with HPLC and fluorescence detection *Biotechnology Techniques* 13: 97-99, (1999)

- 135.** Petkova-Bocharova, T.; Castegnaro, M.; Pfohl-Leszkowicz, A.; Garren, L.; Grosso, F.; Nikolov, I.; Vrabcheva, T.; Dragacci, S.; Chernozemsky, I.N. Analysis of Ochratoxin A in serum and urine of inhabitants from an area with Balkan endemic nephropathy: A one-month follow up study. *Facta Univ. Ser. Med. Biol.* 2003, 10, 62–68.
- 136.** Petkova-Bocharova, T.; Castegnaro, M.; Pfohl-Leszkowicz, A.; Garren, L.; Grosso, F.; Nikolov, I.; Vrabcheva, T.; Dragacci, S.; Chernozemsky, I.N. Analysis of Ochratoxin A in serum and urine of inhabitants from an area with Balkan endemic nephropathy: A one-month follow up study. *Facta Univ. Ser. Med. Biol.* **2003**, 10, 62–68.
- 137.** Petzinger E., Ziegler K.(2000). Ochratoxin A from a toxicological perspective. *J. Vet. Pharmacol. Therap.* 23, 91-98.
- 138.** Pfohl-Leszkowicz A, Vrabcheva T, Petkova-Bocharova T, Garren L, Grosso F, Nikolov I, Dragacci S, Chernozemsky IN, Castegnaro M. (2006). Analysis of ochratoxin A in serum, urine and food consumed by inhabitants from an area with Balkan endemic nephropathy: A one month follow-up study. (2006) In: Njapau H, Trujillo C, van Egmond HP, Park LD (eds) *Mycotoxins and phycotoxins. Advances in determination, toxicology and exposure management. Proceedings of the XIth International Symposium on Mycotoxins and Phytotoxins, May 17-21, Bethesda, Maryland, USA.* Wageningen Academic Publishers. The Netherlands.
- 139.** Pfohl-Leszkowicz, A.; Manderville, R. Ochratoxin A: An overview on toxicity and carcinogenicity in animals and humans. *Mol. Nutr. Food Res.* 2007, 51, 61–99.
- 140.** Pfohl-Leszkowicz, A.; Pinelli, E.; Bartsch, H.; Mohr, U.; Castegnaro, M. Sex and strain differences in Ochratoxin A metabolism and DNA adduction in two strains of rats. *Mol. Carcinog.* 1998, 23, 76–83.
- 141.** Pfohl-Leszkowicz, A. Ochratoxin A and aristolochic acid involvement in nephropathies and associated Urothelial tract tumours. *Arch. Ind. Hyg. Toxicol.* 2009, 60, 465–483.
- 142.** Pfohl-Leszkowicz, A.; Petkova-Bocharova, T.; Chernozemsky, I.; Castegnaro, M. Balkan Endemic Nephropathy and associated Urinary tract tumours: A review on aetiological causes and the potential role of mycotoxins. *Food Addit. Contam.* 2002, 19, 282–302.
- 143.** Pietri A, Bertuzzi T, Gualla A, Piva G. (2006). Occurrence of ochratoxin a in raw ham muscles and in pork products from Northern Italy. *It J Food Sci*, 18(1), 99–106.
- 144.** Pietri A., Gualla A., Rastelli S. & Bertuzzi T. (2011) Enzyme-assisted extraction for the HPLC determination of ochratoxin A in pork and dry-cured ham, *Food Additives & Contaminants: Part A*, 28:12, 1717-1723
- 145.** Pitout, M.J. The hydrolysis of Ochratoxin A by some proteolytic enzymes. *Biochem. Pharmacol.* 1969, 18, 485–491.
- 146.** Placida C.M., D'Mello J.P.F., Macdonald A.M.C., A review of worldwide contamination of cereal grains and animal feed with Fusarium mycotoxins.78:21M37, (1999)
- 147.** Pleadin J., Peršia N.,Kovačević D., Vahčić N., Scortichini G. & Miloned S.(2013). Ochratoxin A in traditional dry-cured meat products produced from sub-chronic-exposed pigs.
- 148.** Pleadin, J., Kudumija, N., Kovačević, D. et al. (2016). Comparison of ochratoxin A levels in edible pig tissues and in biological fluids after exposure to a contaminated diet
- 149.** Jelka Pleadin, Mladenka Malenica Staver , Nada Vah\_ci\_c , Dragan Kova\_cevi\_c ,Salvatore Milone , Lara Safti\_c , Giampiero ScortichiniSurvey of aflatoxin B1 and ochratoxin A occurrence in traditional meat products coming from Croatian households and markets, 2014.

- 150.** Plestina, R.; Stavljenic, A.; Ceovic, R.; Fuchs, R. Haematological features of the population of the area of Croatia, Yugoslavia, endemic for Balkan nephropathy. In *Mycotoxins, Endemic Nephropathy and Urinary Tract Tumours*; Castegnaro, M., Plestina, R., Dirheimer, G., Chernozemsky, I.N., Bartsch, H., Eds.; IARC: Lyon, France, 1991; pp. 43–46.
- 151.** Plestina, R. Some features of Balkan endemic nephropathy. *Food Chem. Toxicol.* 1992, 30, 177–181.
- 152.** Perši N., Pleadin J., Kovačević D., Scortichini G., Milone S. Ochratoxin A in raw materials and cooked meat products made from OTA-treated pigs. *Meat Science* 96 (2014) 203-210.
- 153.** Rhouati, A.; Hayat, A.; Hernandez, D.B.; Meraihi, Z.; Munoz, R.; Marty, J.-L. Development of an automated flow-based electrochemical aptasensor for on-line detection of Ochratoxin A. *Sens. Actuators B Chem.* 2013, 176, 1160–1166.
- 154.** Ringot, D.; Chango, A.; Schneider, Y.J.; Larondelle, Y. Toxicokinetics and toxicodynamics of Ochratoxin A, an update. *Chem. Biol. Interact.* 2006, 159, 18–46.
- 155.** Rousseau, D.M.; Slegers, G.A.; van Peteghem, C.H. Radioimmunoassay of Ochratoxin A in barley. *Appl. Environ. Microbiol.* 1985, 50, 529–531.
- 156.** Rousseau, D.M.; Slegers, G.A.; van Peteghem, C.H. Solid phase radioimmunoassay of Ochratoxin A in serum. *J. Agric. Food Chem.* 1986, 34, 862–865.
- 157.** Sava, V.; Reunova, O.; Velasquez, A.; Harbison, R.; Sanchez-Ramos, J. Acute neurotoxic effects of the fungal metabolite Ochratoxin A. *Neurotoxicology* 2006, 27, 82–92.
- 158.** Sava, V.; Velasquez, A.; Song, S.; Sanchez-Ramos, J. Adult hippocampal neural stem/progenitor cells in vitro are vulnerable to the mycotoxin Ochratoxin A. *Toxicol. Sci.* 2007, 98, 187–197.
- 159.** Schwartz, G. Hypothesis: Does OTA cause induces testicular cancer. *Cancer Causes Control* 2002, 13, 91–100.
- 160.** Schwartz, G.; Faucet-Marquis, V.; Jennings-Gee, J.; Miller, M.; Manderville, R.; Pfohl-Leskowicz, A. Prenatal exposure to Ochratoxin A causes DNA adducts in the testes of newborn mice. *Scand. J. Urol. Nephrol. Suppl.* 2007, 1, 217–220.
- 161.** Schwartz, G.; Manderville, R.; Pfohl-Leskowicz, A. Response to comments of Peter G. Mantle. *Toxins* 2010, 2, 2337–2339.
- 162.** Schweighardt, H.; Schuh, M.; Abdelhamid, A.M.; Böhm, J.; Leibetseder, J. Method for quantitative determination of Ochratoxin A in foods and feeds by high-pressure Liquid chromatography (HPLC) (Ger.). *Z. Lebensmittel. Untersuch. Forsch.* 1980, 170, 355–359.
- 163.** SCF (1998). Opinion on ochratoxin A. Expressed on 17 September 1998, the Scientific Committee on Food, the European Commission. [http://europa.eu.int/comm/food/fs/sc/scf/out14\\_en.html](http://europa.eu.int/comm/food/fs/sc/scf/out14_en.html)
- 164.** Schaaf GJ, Nijmeier SM, Maas RFM, Roestenberg P, De Groene EM, Fink-Gremmels J. (2002). The role of oxidative stress in ochratoxin A-mediated toxicity in proximal tubular cells. *Biochim Biophys Acta*, 1588, 149–158.
- 165.** Scott, P.M.; Trucksess, M.W. Application of immunoaffinity columns to mycotoxin analysis. *J. AOAC Int.* 1997, 80, 5, 941–949.
- 166.** Sheibani A., Ghaziaskar H.S.. Pressurized fluid extraction for quantitative recovery of aflatoxins B 1 and B 2 from pistachio, *Food Control* 20 p.124-128 (2008)
- 167.** Shim, W.-B.; Kolosova, A.Y.; Kim, Y.J.; Yang, Z.Y.; Park, S.J.; Eremin, S.A.; Lee, I.S.; Chung, D.-H. Fluorescence polarization immunoassay based on a monoclonal antibody for the detection of OTA. *Int. J. Food Sci. Technol.* 2004, 39, 827–837.



- 168.** Skaug, M.A. Levels of Ochratoxin A and IgG against conidia of *Penicillium verrucosum* in blood samples from healthy farm workers. *Ann. Agric. Environ. Med.* 2003, 10, 73–77
- 169.** Sorensen LM, Jacobsen T, Nielsen PV, Frisvad JC, Koch AG. (2008). Mycobiota in the n processing areas of two different meat products. *Int J Food Microb*, 24(1), 58–64.
- 170.** Spotti E, Chiavaro E, Bottazzi R, Del Soldato L. (2002). Monitoraggio di ocratossina A in carne suina fresca. *Ind Cons*, 77, 3–13.
- 171.** Spotti, E., Chiavaro, E., Lepiani, A., Colla, F., 2001. Contaminazione da muffe e da ocratossina A in prosciutti stagionati e in fase di tagionatura. *Ind. Cons.* 76, 341–354.
- 172.** Stefanovi'c, V.; Polenakovi'c, M. Balkan nephropathy. Kidney disease beyond the Balkans? *Am. J. Nephrol.* 1991, 11, 1–11.
- 173.** Stoev SD, Dutton MF, Njobeh PB, Mosonik JS, Steenkamp PA (2010). Mycotoxic nephropathy in Bulgarian pigs and chickens: Complex aetiology and similarity to Balkan Endemic Nephropathy. *Food Additives and Contaminants – Part A Chemistry, Analysis, Control, Exposure and Risk Assessment*, 27(1), 72–88.
- 174.** Stoev, S. Studies on carcinogenic and toxic effects of Ochratoxin A in chicks. *Toxins* 2010, 2, 649–664.
- 175.** Stoev, S.D., Gundasheva, D., Zarkov, I, Mircheva, T.⁺ Zapryanova, D., Denev, S., Mitev, Y., Daskalov, H., Dutton, M., Mwanza, M., Schneider, Y.-J. Experimental mycotoxic nephropathy in pigs provoked by a mouldy diet containing ochratoxin A and fumonisin B1 (2012).
- 176.** Stoev. D. Stoycho. Balkan Endemic Nephropathy e Still continuing enigma, risk assessment and underestimated hazard of joint mycotoxin exposure of animals or humans, 2016.
- 177.** Thuvander A, Paulsen JE, Axberg K, Johansson N, Vidnes A, Enghardt-Barbieri H, Trygg K, Lund-Larsen K, Jahrl S, Widenfalk A, Bosnes, V, Alexander J, Hult K. Olsen M. (2001). Levels of ochratoxin A in blood from Norwegian and Swedish blood donors and their possible correlation with food consumption. *Food Chem Toxicol*, 39, 1145–1151.
- 178.** Turner, N.W.; Subrahmanyam, S.; Piletsky, S.A. Analytical methods for determination of mycotoxins: A review. *Anal. Chim. Acta* 2009, 632, 168–180.
- 179.** Ueno, Y.; Kawamura, O.; Sugiura, Y.; Horiguchi, K.; Nakajima, M.; Yamamoto, K.; Sato, S. Use of monoclonal antibodies, enzyme–linked immunosorbent assay and immunoaffinity column chromatography to determine Ochratoxin A in porcine sera, coffee products and toxin-producing fungi. In *Mycotoxins, Endemic Nephropathy and Urinary Tract Tumors*; Castegnaro, M., Plestina, R., Dirheimer, G., Chernozemsky, I., Bartsch, H., Eds.; IARC Sci. Publ.: Lyon, France, 1991; Volume 115, pp. 71–75.
- 180.** Van der Merwe, K.J.; Steyn, P.S.; Fourie, L. Ochratoxin A, a toxic metabolite produced by *Aspergillus ochraceus* Wilh. *Nature* 1965, 205, 1112–1113.
- 181.** Van der Merwe, K.J.; Steyn, P.S.; Fourie, L. Mycotoxins Part II. The constitution of Ochratoxins A, B and C, metabolites of *Aspergillus ochraceus* Wilh. *J. Chem. Soc.* 1965, 204, 7083–7088.
- 182.** VanWalbeek,W.; Scott, P.M.; Harwig, J.; Lawrence, J.W. *Penicillium viridicatum* Westling: A new source of Ochratoxin A. *Can. J. Microbiol.* 1969, 15, 1281–1285.
- 183.** Vipotnik Z., Rodriguez A., Rodrigues P. *Aspergillus westerdijkiae* as a major ochratoxin A risk in dry-cured ham based-media (2017).
- 184.** Vukelic, M.; Sostaric, B.; Belicza, M. Pathomorphology of Balkan endemic nephropathy. *Food Chem. Toxicol.* 1992, 30, 193–200.

- 185.** Vulić Ana, Vahčić Nada, Hengl Brigita, Gross-Bošković Andrea, Jurković Martina, Kudumija Nina & show all (August 2016). Assessment of possible human exposure to ochratoxin A in Croatia due to the consumption of dry-cured and fermented meat products.
- 186.** Wafa, E.; Yahya, R.; Sobh, M.; Eraky, I.; El-Baz, M.; El-Gayar, H.; Betbeder, A.; Creppy, E. Human ochratoxicosis and nephropathy in Egypt: A preliminary study. *Hum. Exp. Toxicol.* 1998, 17, 124–129.
- 187.** Wallin S., Gambacorta L., Kotova N., Warensjö Lemming E., Nälsén C., Solfrizzo M., Olsen M. Biomonitoring of concurrent mycotoxin exposure among adults in Sweden through urinary multi-biomarker analysis (2015).
- 188.** Wang Y., Wang L., Liu F., Wang Q., Selvaraj J, Xing F, Zhao Y., Liu Y. Ochratoxin A Producing Fungi, Biosynthetic Pathway and Regulatory Mechanisms (2016).
- 189.** Warth, B.; Sulyok, M.; Krska, R. LC-MS/MS-based multibiomarker approaches for the assessment of human exposure to mycotoxins. *Anal. Bioanal. Chem.* 2013, 405, 5687-5695.
- 190.** Warth, B.; Sulyok, M.; Fruhmann, P.; Mikula, H.; Berthiller, F.; Schuhmacher, R.; Hametner, C.; Abia, W.; Adam, G.; Fröhlich, J.; et al. Development and validation of a rapid multi-biomarker liquid chromatography/tandem mass spectrometry method to assess human exposure to mycotoxins. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 2012, 26, 1533–1540
- 191.** WHO. Selected Mycotoxins: Ochratoxins, Trichothecenes, Ergot; Environmental Health Criteria, WHO: Geneva, Switzerland, 1990; Volume 105, pp. 1–260.
- 192.** World Health Organisation. Memorandum. The Endemic Nephropathy of South-eastern Europe. *Bull. World Health Organ.* 1965, 32, 441–448.
- 193.** Woo, C.S.J.; El-Nezami, H. Maternal-fetal cancer risk assessment of Ochratoxin A during pregnancy. *Toxins* 2016, 8, 87.
- 194.** Wu, Q.; Dohnal, V.; Huang, L.; Kuca, K.; Wang, X.; Chen, G.; Yuan, Z. Metabolic pathways of Ochratoxin A. *Curr. Drug Metab.* 2011, 12, 1–10.
- 195.** Yang, S.; Zhang, H.; de Saeger, S.; de Boevre, M.; Sun, F.; Zhang, S.; Cao, X.; Wang, Z. In vitro and in vivo metabolism of Ochratoxin A: A comparative study using ultra-performance liquid chromatography-quadrupole/time-of-flight hybrid mass spectrometry. *Anal. Bioanal. Chem.* 2015, 407, 3579-3589.
- 196.** Yang, L.; Zhang, Y.; Li, R.; Lin, C.; Guo, L.; Qiu, B.; Lin, Z.; Chen, G. Electrochemiluminescence biosensor for ultrasensitive determination of Ochratoxin A in corn samples based on aptamer and hyperbranched rolling circle amplification. *Biosens. Bioelectron.* 2015, 70, 268–274.
- 197.** Yiannikouris A and Jouany J P. (2002). Mycotoxins in feeds for ruminants; fate and effects on animals. *Productions Animales*, 15(1), 3–16.
- 198.** Yu, J.C.C.; La, E.P.C. Molecularly imprinted polymers for Ochratoxin A extraction and analysis. *Toxins* 2010, 2, 1536–1553
- 199.** Zimmerli, B.; Dick, R. Determination of Ochratoxin A at the ppt level in human blood, serum, milk and some foodstuffs by high performance liquid chromatography with enhanced fluorescence detection and immunoaffinity column cleanup: Methodology and Swiss data. *J. Chromatogr. B Biomed. Appl.* 1995, 666, 85–99.

## Ελληνική βιβλιογραφία

- 1. Αλεξόπουλος Κ.** (1997) *Μυκοτοξικώσεις: «Η πραγματική διάσταση του προβλήματος στη σύγχρονη χοιροτροφία»*. Σύγχρονη χοιροτροφία, 4: 29-33.
- 2. Βάσσος, Δ.Β.** (2004) *Τρόφιμα και υγεία του καταναλωτή (Τροφογενείς διαταραχές)*, Εκδόσεις Παπασωτηρίου, σελ. 131-136.
- 3. Γεωργιάδη Μ.,** «Μελέτη του προβλήματος των αφλατοξινών σε κελυφωτά φυστίκια», Μεταπτυχιακή Ερευνητική Εργασία, Αθήνα, (2009)
- 4.** Κανονισμός (ΕΚ) αριθ. 401/2006 της Επιτροπής της 23ης Φεβρουαρίου 2006 για καθορισμό μεθόδων δειγματοληψίας και ανάλυσης για τον επίσημο έλεγχο των επιπέδων μυκοτοξινών στα τρόφιμα.
- 5.** Κανονισμός (ΕΚ) αριθ. 1881/2006 της Επιτροπής της 19ης Δεκεμβρίου 2006 για καθορισμό μέγιστων επιτρεπτών επιπέδων για ορισμένες ουσίες οι οποίες επιμολύνουν τα τρόφιμα.