



Универзитет „СВ. КИРИЛ И МЕТОДИЈ“ во Скопје
Факултет за ветеринарна медицина - Скопје
Школа за докторски студии
Безбедност на храна

Докторска дисертација

**СПОРЕДБЕНА АНАЛИЗА НА ЕКСТРАКЦИСКИ МЕТОДИ НА
ОХРАТОКСИН А ОД ЖИВОТИНСКИ ТКИВА И НИВНА
СЕЛЕКТИВНА ПРИМЕНА ПРИ КВАНТИТАТИВНА ПРОЦЕНКА
КАЈ ПРИМЕРОЦИ СО ГЕОГРАФСКО ПОТЕКЛО ОД Р
МАКЕДОНИЈА**

Башак Кучукчакан Николовска, ДВМ

Скопје, 2018 година

Ментор: проф. д-р Зехра Хајрулаи-Муслиу

редовен професор на Факултетот за ветеринарна медицина во Скопје

Членови на комисијата:

проф. д-р Велимир Стојковски

редовен професор на Факултетот за ветеринарна медицина во Скопје, преседател

проф. д-р Светлана Кулеванова

редовен професор на Фармацевтскиот факултет во Скопје, член

проф. д-р Рубин Гулабоски

редовен професор на Факултетот за медицински науки при Универзитетот „Гоце Делчев“ во Штип, член

проф. д-р Деан Јанкулоски

вонреден професор на Факултетот за ветеринарна медицина во Скопје, член

проф.д-р Павле Секуловски

редовен професор на Факултетот за ветеринарна медицина во Скопје, член

Ми претставуваше голема чест и задоволство што имав можност да соработувам со проф. др. Зехра Хајрулаи Муслиу. Ѓ се заблагодарам за нејзината професионалност, посветеност и ентузијазам која ги вложи во текот на оваа докторска дисертација.

Проф. др. Велимир Стојковски ми даде голема поддршка уште на почетокот од мојот докторски студиум во Скопје. Му се заблагодарувам за неговата безрезервна поддршка за целиот овој период.

Др. Билјана Стојановска Димзоска беше секогаш достапна за моите прашања, но и за решавање на одредени проблеми кои се појавуваа во текот на мојата работа. Ѓ посветувам голема благодарност за нејзините стручни совети, трпеливост и доследност во текот на лабораториската работа.

Доктор Елизабета Димитриеска Стојковиќ, ми помогна да се решат комплицирани задачи поврзани со анализата на безбедноста на храната. Ѓ посветувам дел од оваа благодарност за нејзината поддршка.

Кога почнав со докторските студии во Скопје, една од најдобрите можности беше да стапам во контакт со г-ѓа Туркан Озтурк. Нејзиното позитивно влијание во мојот живот доведе до одлични резултати. Благодарна сум за нејзината поддршка.

Голема благодарност и за доц. др. Ирена Целеска која беше со мене од самиот почеток на мојот престој во Македонија, давајќи ми голема пријателска и професионална поддршка во мојата животна мисија. Не би можела да ги замислам последните четири години од мојот студиум без моите драги колеги и колешки Ристе, Душица, Катерина и Гордана, на кој сум им благодарна за секојдневните пријатни моменти кои ги поминавме заедно во лабораторијата.

Моите родители, беа, и сè уште се моите најголеми поддржувачи во животот. Им заблагодарам за нивната доверба и храброст што ми овозможија успешно да ја завршам оваа животна мисија далеку од нив.

Мартин и Теон, Вие го исполнивте мојот живот со љубов и радост. Му се заблагодарувам на мојот сопруг кој ме поддржа во мојата работа и ми помогна навремено да ги завршам сите предизвици. Овој докторат го посветувам на мојот драг син Теон, да му служи како доказ во животот дека успесите и среќата се постигнуваат исклучиво со љубов и искрена волја.

За моите драги баби, за нивната љубов и труд.

СПОРЕДБЕНА АНАЛИЗА НА ЕКСТРАКЦИСКИ МЕТОДИ НА ОХРАТОКСИН А ОД ЖИВОТИНСКИ ТКИВА И НИВНА СЕЛЕКТИВНА ПРИМЕНА ПРИ КВАНТИТАТИВНА ПРОЦЕНКА КАЈ ПРИМЕРОЦИ СО ГЕОГРАФСКО ПОТЕКЛО ОД Р МАКЕДОНИЈА

Абстракт

Охратоксинот А (ОТА) од добиточната храна има висока тропност за акумулирање во бубрежното ткиво кај свињите, а месните производи се потенцијален извор на контаминација за луѓето. Во Р. Македонија не постојат податоци за проценка на потенцијалниот ризик од оваа микотоксикоза. Методите за екстракција на ОТА од животинските ткива може значително да се разликуваат според валидациските квалификации. Целите на ова истражување беа: (1) да се направи валидациска проценка на два модифицирани ОТА екстракциски методи од животински ткива - модифицирана течно-течна екстракција (mLLE) и модифицирана цврсто-фазна екстракција (mSPE), и да се изврши нивна споредба со SPE-IAC (имуноафинитетни колони), LLE, SPE-C18; (2) да се изврши квантитативна и квалитативна проценка на ОТА во примероци од црн дроб од говеда и бубрези од свињи, со различно географско потекло од територијата на Р. Македонија. За SPE-IAC беа користени ткива од црн дроб (говеда) и бубрези (свињи) со три ОТА концентрации (1, 5, и 10 $\mu\text{g/kg}$), за mLLE, бубрези (свињи) со две ОТА концентрации (1 и 5 $\mu\text{g/kg}$), за LLE бубрези (свињи), за SPE и mSPE C18, црн дроб (говеда) со една ОТА концентрација (5 $\mu\text{g/kg}$). Квалитативната и квантитативната проценка беше изведена со HPLC-FD (течна хроматографија под висок притисок со флуоресцентен детектор). Методите беа проценувани согласно ЕУ регулативата 2002/657/ЕС, според вредностите за линеарност (R^2), аналитички принос (R , %), лимит на детекција (LOD, $\mu\text{g/kg}$), лимит на квантификација (LOQ, $\mu\text{g/kg}$), повторливост (RSD_r , %) и репродуцибилност (RSD_R , %). За втората цел беа анализирани примероци од црн дроб (говеда) и бубрези (свињи) од три региони на Р. Македонија (централна-ЦМК, западна-ЗМК и источна Македонија-ИМК), во периодот помеѓу Март, 2014 и Февруари, 2016 година. Екстракцијата на ОТА беше изведена со SPE-IAC, а квалитативната и квантитативната проценка со HPLC-FD. Вредноста на R^2 за LLE изнесуваше $>0,98$, а за сите останати методи $>0,99$ ($p<0,05$). SPE-IAC (црн дроб) и SPE-IAC (бубрези) имаа вредности за $R >70\%$, mLLE $R <70\%$ за ОТА 5 $\mu\text{g/kg}$ ($R=67\%$). Претходно наведените екстракциски методи имаа вредности за $RSD_r <20\%$ и $RSD_R <30\%$. LLE, SPE-C18 и mSPE-C18 методите имаа $R\%$ 25,02%, 15,89% и 5,12%, последователно. Од

анализираните примероци на животински ткива (N=182), 87% имаа вредност на LOD < 0,88 g/ml. Највисоки вредности ($\geq$ LOQ) имаа примероците од ЦМК (црн дроб од свињи - 0,63 $\mu\text{g/kg}$), ИМК (црн дроб од говеда - 0,97 $\mu\text{g/kg}$ и црн дроб од свињи - 0,282 $\mu\text{g/kg}$), ЗМК (црн дроб од свињи - 0,364 $\mu\text{g/kg}$ и црн дроб од говеда - 0,268 $\mu\text{g/kg}$). SPE-IAC методот на ОТА екстракција од животински ткива имаше висока согласност со ЕС 401/2006 ($R\% = 70-110\%$, $RDSr \leq 20\%$ и $RSD_R \leq 30\%$), а mLLE методот со Codex Alimentarius ($R\% 60 - 120\%$ за ОТА концентрации 1–10 $\mu\text{g/kg}$). Валидациската оценка за mLLE го квалификува овој метод како алтернативен, поевтин и побрз во однос на SPE-IAC. Согласно вредностите на ОТА во анализите од различни региони на Р. Македонија, може да се заклучи дека не постои висок ризик за микотоксикози од овој тип на ткива во јавното здравје.

Клучни зборови: Охратоксин А, екстракција, животински ткива, HPLC-FD

COMPARED ANALYSIS OF EXTRACTION METHODS OF OCHRATOXIN A FROM ANIMAL TISSUES AND THEIR SELECTIVE APPLICATION FOR QUANTITATIVE ASSESSMENT IN THE TISSUE SAMPLES GEOGRAPHICALLY ORIGINATED FROM REPUBLIC OF MACEDONIA

Abstract

Ochratoxin A (OTA) ingested by animal feeds has high affinity for accumulation in pig's kidneys. Consequently, meat products can be a potential contaminating source for human. To our best knowledge, there is no available data for risk assessment of this mycotoxicosis in R. Macedonia. The OTA extraction methods from animal tissues can have significant variations in validation qualifications. The aims of this research were: (1) to make validation assessment on two modified OTA extraction methods of animal tissues - modified liquid-liquid extraction (mLLE) and modified solid-phase extraction (mSPE), and to compare validation qualifications with SPE-IAC (SPE with immunoaffinity column), LLE, SPE-C18; (2) to make qualitative and quantitative assessment of OTA in liver (cattle) and kidney (pig) samples with different geographical origin from the territory of R. Macedonia. Two tissue types (liver and kidney) were used for SPE-IAC with three OTA concentrations (1, 5, и 10 $\mu\text{g/kg}$), one (kidney) for mLLE with two OTA concentrations (1, 5 $\mu\text{g/kg}$), LLE (5 $\mu\text{g/kg}$) and one (liver) for SPE and mSPE C18 with one OTA concentration (5 $\mu\text{g/kg}$). The qualitative and quantitative analysis was performed with HPLC-FD (high pressure liquid chromatography - fluorescent detector). The extraction methods were assessed according to validation parameters and values described in EU regulative 2002/657/EC: linearity (R^2), recovery rate (R, %), limit of detection (LOD, $\mu\text{g/kg}$), repeatability (RSD_r, %) and reproducibility (RSD_R, %). For the second aim, liver (cattle) and kidney (pig) samples were collected from three geographical regions of R. Macedonia (central-CMK, western-WMK and eastern Macedonia-EMK), in the period between March, 2014 and February, 2016. OTA extraction was performed with SPE-IAC, while qualitative and quantitative analysis with HPLC-FD. R^2 value for LLE was $>0,98$, whereas $>0,99$ for all other methods ($p<0,05$). SPE-IAC (liver) and SPE-IAC (kidney) had $R >70\%$, and mLLE $R <70\%$ for OTA 5 $\mu\text{g/kg}$ ($R=67\%$). These methods had values for RSD_r $<20\%$ and RSD_R $<30\%$. LLE, SPE-C18 and mSPE-C18 methods had $R\%$ 25,02%, 15,89% and 5,12%, respectively. From analyzed samples ($N=182$), 87% had $\text{LOD} < 0,88 \text{ g/ml}$. The highest values ($\geq \text{LOQ}$) were detected in CMK (pig kidney - 0,63 $\mu\text{g/kg}$), EMK (cattle liver - 0,97 $\mu\text{g/kg}$ and pig liver - 0,282 $\mu\text{g/kg}$), WMK (pig liver - 0,364 $\mu\text{g/kg}$ and cattle liver - 0,268 $\mu\text{g/kg}$). SPE-IAC OTA extraction method in animal tissues was highly compliant with EC 401/2006 regulative ($R\% =70-110\%$, $\text{RDSr} \leq 20\%$ and $\text{RSD}_R \leq 30\%$), whereas mLLE was compliant

with Codex Alimentarius (R% 60 – 120 % for OTA concentrations 1–10 µg/kg). The validation assessment of mLLE qualifies this method as alternative, faster and cheaper compared to SPE-IAC. Following the results of OTA analysis in animal tissues from different geographical regions of R. Macedonia, the potential risk of this mycotoxicosis on public health can be excluded.

Key words: Ochratoxin A, extraction, animal tissues, HPLC-FD

Индекс на зборови

Анализа на варијанса	ANOVA
Балканска ендемска нефропатија	БЕН
Codex alimentarius commission	CAM
Модифициран метод на течно-течна екстракција	mLLE
Модифициран метод на цврстофазната екстракција со C18-колони	mSPE
	C18
Ендемската нефропатија	ЕН
Европска Унија	EY
Фумонизин Б1	FB1
Глутатион	GSH
Имуно-афинитетни колони	IAC
The joint fao/who expert committee on food additives	JECFA
Анализа на опасности и критични контролни точки	HACCP
Кислородно реактивни радикали	KPP
Лимит на детекција	LOD
Лимит на квантификација	LOQ
Максимално дозволени концентрации	MRL
Микотоксична нефропатија	MH
Микотоксична нефропатија кај прасињата	MHP
Охратоксин А	OTA
Охратоскин Б	OTB
Повторливост	RSDr
Релативната стандардна девијација	RSD
Светската здравствена организација	WHO
Стандардната девијација	SD
Scientific committee for food	SCF
Течно-течна екстракција	LLE
Течна хроматографија под висок притисок со флуоресуентен детектор	HPLC-FD
Сума на квадрати	SS
Цврстофазна екстракција	SPE
Цврстофазна екстракција со C18-колони	SPE C 18

СОДРЖИНА

I. ВОВЕД.....	1
II. ПРЕГЛЕД НА НАУЧНАТА ЛИТЕРАТУРА.....	5
1. Општ преглед.....	5
1.1. Општи карактеристики на охратоксините.....	5
1.2. Хемиска структура на охратоксин А.....	6
1.3. Биосинтеза на охратоксин А.....	7
1.4. Токсокинетика на охратоксин А.....	9
1.4.1. Апсорпција на охратоксин А.....	9
1.4.2. Дистрибуција и акумулација на охратоксин А.....	9
1.4.3. Биотрансформација на охратоксин А.....	11
1.4.4. Елиминација на охратоксин А.....	12
1.5. Токсодинамика на охратоксин А.....	12
1.6. Токсичност на охратоксин А.....	14
1.6.1. Нефротоксичност на охратоксин А.....	14
1.6.2. Канцерогеност на охратоксин А.....	16
1.6.3. Генотоксичност на охратоксин А.....	19
1.6.4. Имунотоксичност на охратоксин А.....	20
1.6.5. Тератогеност на охратоксин А.....	21
1.6.6. Невротоксичност на охратоксин А.....	22
2. Проценка и контрола на охратоксин А изложеност кај луѓето и животните.....	24
2.1. Проценка на охратоксин А изложеност кај луѓето и животните.....	24
2.1.1 Биомаркери за утврдување на охратоксин А изложеност кај луѓето и животните.....	24
2.1.2. Анализа на глобалната контаминираност на храната со охратоксин А	25
2.1.3. Дефинирање на максимално дозволените концентрации за охратоксин А.....	26
2.1.4. Проценка на ризикот од контаминација со охратоксин А во производи од растително и животинско потекло.....	27
2.2. Достапни податоци за изложеноста на животните и луѓето од контаминација со охратоксин А.....	29
2.2.1. Изложеност на свињите од контаминација со охратоксин А	29
2.2.2. Изложеност на живината од контаминација со охратоксин А.....	30
2.2.3. Изложеност на преживните животни од контаминација со охратоксин А.....	31
2.2.4. Изложеност на луѓето од контаминација со охратоксин А.....	31

2.3. Контрола на контаминацијата кај земјоделските производи со охратоксин А.....	34
2.3.1. Превенција на контаминацијата со охратоксин А во периодот пред, за време и по жнеење.....	34
2.3.2. Примена на контролните програми во превенцијата од контаминација со охратоксин А.....	35
2.3.3. Примена на системот НАССР во контролата на изложеноста на храната кон охратоксин А.....	36
2.4. Регулативи кои се однесуваат на контаминацијата со охратоксин А.....	37
2.4.1. Регулатива за контаминацијата со охратоксин А во добиточната храна.....	37
2.4.2. Регулативи за контаминацијата со охратоксин А во животински храни и ткива.....	37
3. Аналитички аспект во утврдувањето на охратоксин А контаминацијата во животински ткива.....	39
3.1. Екстракциони техники за охратоксин А од животински ткива	39
3.1.1 Имуноафинитетни колони (IAC)	39
3.1.2 Течно-течна екстракција (LLE).....	40
3.1.3 Цврстофазна екстракција со C18-колони (SPE C18).....	41
3.2. Аналитичка техника за утврдување на охратоксин А со течна хроматографија под висок притисок со флуоресцентен детектор (HPLC-FD) во животински матрикси.....	41
III. ЦЕЛИ НА ИСТРАЖУВАЊЕТО.....	44
IV. МАТЕРИЈАЛИ И МЕТОДИ.....	45
4.1. Материјали	45
4.1.1. Материјали за екстракција на охратоксин А со имуноафинитетни колони (IAC).....	45
4.1.2. Материјали за екстракција на охратоксин А со течна-течна екстракција (LLE) и модифицирана течна-течна екстракција (mLLE).....	45
4.1.3. Материјали за екстракција на охратоксин А со цврстофазна (SPE) и модифицирана цврстофазна екстракција (mSPE C18) со C18-колони	45
4.1.4. Материјали за анализа на примероците од животински матрикси	45
4.2. Метод за определување на охратоксин А.....	45
4.2.1. Апаратура (течна хроматографија под висок притисок со флуоресцентен детектор HPLC-FD).....	45
4.2.2. Друга апаратура и прибор.....	46
4.2.3. Реагенси и растворувачи.....	47
4.2.4. Подготовка на раствори.....	47
4.2.5. Аналитички процедури	49
4.2.5.1. Екстракција и прочистување на примероците низ имуноафинитетни колони (IAC).....	49
4.2.5.2. Екстракција и прочистување на примероците со течна-течна екстракција (LLE).....	49
4.2.5.3. Екстракција и прочистување на примероците со модифициран метод на течна-течна екстракција (mLLE).....	50

4.2.5.4. Екстракција и прочистување на примероците со цврстофазната екстракција со C18-колони (SPE C18)	51
4.2.5.5. Екстракција на примероците и прочистување со модифициран метод на цврстофазната екстракција со C18-колони (mSPE C18)	51
4.2.5.6. Методи за анализа на примероците од животински матрикси.....	52
4.3. Валидациски протоколи.....	52
4.3.1. Линеарност на методот.....	52
4.3.2. Специфичност на методот.....	52
4.3.3. Лимит на детекција (LOD) и лимит на квантификација (LOQ).....	52
4.3.4. Точност на методот.....	53
4.3.5. Прецизност на методот.....	53
4.3.6. Проценување на мерна неодреденост за методот.....	53
4.4. Параметри за проценка на методот за екстракција на охратоксин А со модифициран метод на течно-течна екстракција (mLLE) и цврстофазната екстракција со C18-колони (mSPE C18)	54
4.5. Статистика.....	54
V. РЕЗУЛТАТИ.....	56
1. Валидација на методот HPLC-FD со имуноафинитетни колони (IAC) за детекција на охратоксин А.....	56
1.1. Резултати од валидациските анализи на црн дроб од говеда со примена на имуноафинитетни колони (IAC)	56
1.1.1. Линеарност	56
1.1.2. Специфичност.....	57
1.1.3. Лимит на детекција (LOD) и лимит на квантификација (LOQ).....	58
1.1.4. Точност.....	59
1.1.5. Повторливост и репродуцибилност.....	60
1.1.6. Пресметување на неодреденост.....	63
1.2. Резултати од валидациските анализи на бубрег од свињи со примена на имуноафинитетни колони (IAC)	63
1.2.1. Линеарност.....	63
1.2.2. Специфичност	65
1.2.3. Точност	66
1.2.4. Повторливост и репродуцибилност.....	67

2. Резултати од валидациските анализи на бубрег од свињи со течно-течна екстракција и модифицирана течно-течна екстракција (LLE и mLLE).....	68
2.1. Резултати од анализите на бубрег од свињи со течно-течната екстракција (LLE).....	68
2.1.1. Линеарност	68
2.1.2. Точност	70
2.2. Резултати од анализите на бубрег од свињи со модифицирана течно-течната екстракција (mLLE).....	71
2.2.1. Линеарност	71
2.2.2. Специфичност	72
2.2.3. Лимит на детекција (LOD) и лимит на квантификација (LOQ)	73
2.2.4. Точност	74
2.2.5. Повторливост и репродуцибилност	74
3. Резултати од валидациските анализи на црн дроб од говеда со цврстофазна екстракција (SPE) и модифицирана цврстофазна екстракција (mSPE) со C18-колони.....	76
3.1.Резултати од анализите на црн дроб од говеда метод со цврстофазна екстракција со C18-колони (SPE C18).....	76
3.1.1. Линеарност	76
3.1.2. Точност.....	76
3.2. Резултати од анализите на црн дроб од говеда, метод со модифициран цврстофазна екстракција со C18-колони (mSPE C18).....	78
3.2.1. Линеарност.....	78
3.2.2. Точност	79
4. Резултати од анализа на примероците од животински ткива.....	81
4.1. Статистичка дистрибуција на примероците според животинскиот вид, типот на ткивото и географското потекло.....	81
4.2. Статистичка дистрибуција на примероците според географското потекло, лимитот на детекција и лимитот на квантификација.....	81
4.3. Статистичка дистрибуција на примероците според животински вид, лимитот на детекција и лимитот на квантификација.....	82
4.4. Статистичка дистрибуција на примероците според типот на животински матрикси, лимитот на детекција и лимитот на квантификација.....	83
VI. ДИСКУСИЈА.....	84
1. Проценка на добиените резултати од валидациските студии и модифицирани методи.....	84
2. Проценка на резултатите од анализа на ткива со потекло од различни региони на Р Македонија.....	89

VII. ЗАКЛУЧОЦИ.....	91
VIII. СПИСОК НА ЛИТЕРАТУРА И ДРУГИ ИЗВОРИ.....	93

I. ВОВЕД

И покрај тоа што габите имаат едноставна структура, тие сепак се комплексни организми. Идентификувани се околу 1,5 милиони подвидови габи кои опстојуваат во почвата и растенијата (Webster, J., Weber, R. 2007). Овие организми се класифицирани во царството растенија, но сепак тие се одликуваат со специфични особини, карактеристични само за нив. Имаат сопствен ензимски систем со кој ги разложуваат хранливите материи. Нивниот клеточен ѕид е изграден од хитин. Телото има филаментозна структура, а репродукцијата се одвива со клеточна размена (Raven, P., Johenson, B. 2002).

Одредени видови, како што се *Aspergillus*, *Penicillium* и *Saccharomyces cerevisiae*, имаат значајна примена во земјоделската и фармацевската индустрија. *Saccharomyces cerevisiae* е нетоксичен и безбеден за производство на храна (пиво, вино, леб и сл.), и изобилува со протеини и витамини. *Aspergillus spp.* се користи во производството на соја сос и саке (кинески алкохолен пијалак), додека *Penicillium spp.* наоѓа примена во производството на сирење и антибиотици. Во оптимални услови, овие, но и други видови на габи, може да синтетизираат токсини како секундарни метаболити (Webster, J., Weber, R. 2007). Токсините синтетизирани од габи се познати како микотоксини. Развојот на габите и производството на микотоксини е во зависност од температурата и атмосферската влажност во средината во која што опстојуваат (релативна влажност и активност на водата - a_w). На пример, на 25 °C со 0,85 a_w и 15-16 % влажност, габите постигнуваат спорулација во период од 5 до 12 дена, иако на истата температура со 0,75 a_w , овој процес може да трае од 4 до 12 недели (Gimeno, A., Martins, M. L. 2003).

Најпознати микотоксини се: афлатоксините (Б1, Б2, Г1 и Г2), цитринин, ергот алкалоиди, охратоксин А, фумонизини, трихотецени (Т-2 токсин и деоксиниваленол), патулин и зеараленон (Bennet, M., Klinch, M. 2003). Контаминацијата со микотоксини претставува глобален проблем во безбедноста на храната. Земјоделските производи, како што се пченката, кикириката, копрата и палминиот орев се најчестите производи кои се контаминирани со микотоксини (Park, D. L. и сор. 1999). Во 2013 година, направено е истражување за глобалната присуство на најчестите микотоксини, во кое биле опфатени 4 200 примероци (пченка, жито, орев и сточна храна). Резултатите покажале дека најголема преваленција имал деоксиниваленол (59 %), по кој следеле фумонизин (55 %), зеараленон (37 %), афлатоксин (30 %) и охратоксин А (23 %). Било

заклучено дека половина од примероците се контаминирани со деоксиниваленол и фумонизини (Nährer, K., Kovalsky, P. 2014).

Микотоксините продираат во организмот на луѓето и животните преку респираторниот систем, дигестивниот систем и кожата. Акутната и хроничната токсичност на микотоксините може да предизвика нарушување во функцијата на одредени органи и системите. Според извештај на FAO, забележани се канцерогени, тератогени, мутагени и имunosупресивни ефекти на микотоксините (FAO, 2001). Меѓународната агенција за истражување на ракот (IARC) ги класифицира микотоксините во два дела и тоа еден дел во групата на канцерогени материи, а друг дел, во потенцијално канцерогени (Kuiper – Godman, T. 1999). Во шеесеттите години на минатиот век, во Англија се направени голем број биолошки студии како резултат на зголемената зачестеност на микотоксикози кај мисирките, проследена со некроза на црниот дроб. Како главни причинители биле идентификувани афлатоксините (Richard, J. 2007, Bhunia, A., Ray, B., 2010).

Негативните ефекти на микотоксините врз здравјето на луѓето и животните, детално се елаборирани во научната литература. Меѓу првите идентификувани микотоксикозни заболувања бил ерготизмот, кој првпат се појавил пред околу 500 години (Richard, J. 2007). Првите токсикози во Европа се регистрирани меѓу 14-ти и 16-ти век, а во Јапонија се појавуваат во 17-ти век (Bhunia, A., Ray, B. 2010). Подоцна, во 20-от век, се појавува смртоносна болест „Алиментарна токсична алеукемија“ (АТА), која се поврзувала со конзумирање на контаминирано жито (трихотецени) во Русија. Таа била придружена со тешка патогенеза која вклучувала некрози, хеморагии и невротоксични ефекти. Оваа патолошка слика била забележана и кај коњите, што резултирало со висока смртност (Richard, J. 2007).

Микотоксините биле огромна закана за јавното здравје, особено во земјите во развој, како што се Уганда, Кенија и Индија (Peraica, M. и сор. 1999). Појава на афлатоксикоза во 2004 година е регистрирана во источна Кенија, резултирајќи со 317 случаи на акутен хепатитис и 125 смртни случаи (Baumgartner, E. и сор. 2005). Исто така, во периодот од 2004 до 2007 година, се регистрирани повеќе афлатоксикозни епидемии кои имале акутен и летален исход (Yard, E. E. и сор. 2013).

Најзначаен начин за загрозување на јавното здравје од микотоксикози е со нивно пренесување преку контаминирани производи од животинско потекло (Völkel, I. и сор. 2011). Пример за таканаречениот „carry-over“ ефект на охратоксин А од животинско

ткиво кај луѓето е ендемската нефропатија (ЕН). Свињите се најизложени и најосетлив вид на животни кај кои микотоксините се акумулираат во ткива, особено во бубрезите, што резултира со нефропатија. Ваков случај е забележан во Р Бугарија каде што појавата на масовни нефропатии кај свињите била поврзана и потврдена со консумирање сточна храна која содржи охратоксин А (ОТА). Патоморфолошките промени на бубрезите покажале слични карактеристики со синдромот кај луѓето кој поради високата преваленца во балканските земји се нарекува балканска ендемска нефропатија (БЕН). Досега, најмалку 20 000 луѓе настрадале од оваа болест (Stoev, D. S. 2008). Во Р Србија, сличен случај е забележан кај луѓето поради традиционално конзумирање на производи од свинско и пилешко месо кои биле контаминирани со ОТА (Dragan, R. M. и сор. 2012).

За успешно управување со програмите за безбедност на храната од микотоксини, неопходно е да постои воспоставен систем за следење на целокупниот производствен процес на храната, како и на нејзините изворни компоненти. Контаминацијата на растителната храна може да се случи во сите вегетативски фази (пред, во и по жнеењето), но и во текот на складирањето и обработката. Системот за анализа на опасност и критични контролни точки (НАССР) е дизајниран во согласност со претходно наведените принципи. Оваа системска контрола може да се применува во сите фази на преработката на храна, и на тој начин да се превенира евентуална контаминација од микотоксини (Park, D. L. и сор. 1999, Garcia, R. и сор. 1999).

Дополнително, неопходно е регионалните лаборатории да ги следат и утврдат максимално дозволените концентрации (Maximum Residue Level - MRL), што претставува клучна компонента во системот за следење на микотоксините (Park, D. L. и сор. 1999). Методологијата за утврдување на овие вредности треба да се базира врз научни податоци и континуирани истражувања, со цел да се следат одредени промени во преваленцијата (Garcia, R. и сор. 1999). Оваа методологија би требало да биде усогласена и унифицирана меѓу различни лаборатории, со цел да се избегнат различни толкувања. Регулативите на Европската комисија (ЕУ) ги интегрираат сите овие принципи и преку нивно имплементирање во регионалните референтни лаборатории може да се обезбеди стандардизиран начин на анализирање и интерпретација на резултатите од терен (Egmond, V., Jonker, M. 2004). Регулативата 1881/2006/ЕС ги пропишува максимално дозволените концентрации на микотоксини во прехранбените производи, а 401/2006/ЕС ги опишува методите за мострирање на примероци и нивна

анализа. Дополнително, Директивата 96/23/ЕС го регулира следењето на остатоци во живи животни и производи од животинско потекло, додека Одлуката на Комисијата 2002/657/ЕС ги опишува правилата за валидација на аналитичките методи кои се користат во планот за следење на остатоците и контаминентите во храната.

Европската Унија обезбедува највисок квалитет на стандардите за безбедност на храна со кои се обезбедува максимално ниво на заштита во јавното здравство. Со имплементирање на овие директиви помеѓу земјите членки на ЕУ, се овозможува слободно движење и трговија на производите од животинско потекло помеѓу земјите на ЕУ (178/2002/ЕС). Воспоставувањето на овие стандарди и во земјите кои не се членки на ЕУ, би овозможило поинтегрално следење и контрола на микотоксикозите во Европа.

II. ПРЕГЛЕД НА НАУЧНАТА ЛИТЕРАТУРА

1. Општ преглед

1.1. Општи карактеристики на охратоксините

Охратоксините се секундарни метаболитички продукти на габите од видовите *Aspergillus* и *Penicillium*. Производството на токсинот зависи од неколку амбиентални услови, како што се температурата, рН и активноста на водата (a_w). Оптимален услов за раст и развој на видот *Aspergillus* е температура од 24 до 37 °C, а токсинот може да се создава и на 20 °C, со активност на водата од 0,8 a_w и рН од 3 до 10. Видовите на родот на *Penicillium* растат на температура од 20 °C, го синтетизира токсинот на 31 °C, со 0,8 a_w и рН 6-7 (Reddy, L., Bhoola, K. 2010). Токсинот може природно да се најде во јачменот, пченицата, 'ржта, пченката, оризот, грозјето, зачините, кафето и какаото.

Постојат три облици на охратоксини: охратоксин А (ОТА), охратоксин Б (ОТБ) и охратоксин Ц (ОТЦ). ОТА е најчестиот облик на охратоксини (Heussner, A. H., Bingle, L. E. H. 2015). Според IARC, ОТА се класифицира како потенцијално канцерогена супстанција за луѓето (Partanen, H. 2012).

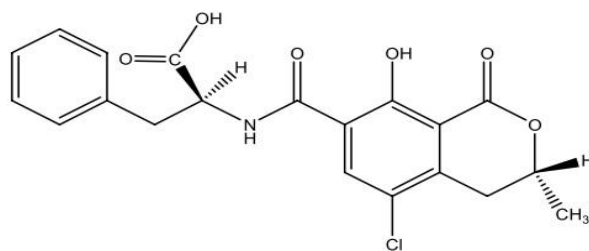
ОТА има многу повисока токсичност во однос на неколку свои метаболити (ОТА α , ОТБ, ОТЦ, и др.) (Wu, Q. и сор. 2011). Сепак, други облици на метаболити, како што се лактонски отворениот ОТА (ОР-ОТА) и ОТА-хидроквинон (ОТННҚ), имаат поголема токсичност од ОТА (Sorrenti, V. и сор. 2013). Дел од овие метаболити се идентификувани кај габи, растенија, животни и луѓе. Како главни токсични метаболити кај животните и луѓето се хидроксилните метаболити на ОТА (4-R-Hydroxyochratoxin ((4R)-4-OH-ОТА) и 4-s-Hydroxyochratoxin A (4S)-4-OH-ОТА). Метаболитите може да се изолираат и од медиум во кој е инкубиран *Aspergillus ochraceus*. Во клеточна суспензија од растенија (пченица и пченка), како главни метаболити кои се создаваат се: ОТА α , ОТА метил естер, и оксигенирана ОТА α (Wu, Q. и сор. 2011). Дел од ОТА метаболитичките деривати се прикажани во табела 1 (Heussner, A. H., Bingle, L. E. H. 2015, Khoury A., Atoui, A. 2010).

Табела 1. Листа на метаболитички деривати на ОТА

ОТА метаболитички дериват	R1	R2	R3	R4	R5
Охратоксин А	Фенилаланин	Cl	H	H	H
Охратоксин Б	Фенилаланин	H	H	H	H
Охратоксин Ц	Етил-естер, фенилаланин	Cl	H	H	H
Охратоксин А метил-естер	Метил-естер, фенилаланин	Cl	H	H	H
Охратоксин Б метил-естер	Метил-естер, фенилаланин	H	H	H	H
Охратоксин Б етил-естер	Етил-естер, фенилаланин	H	H	H	H
Охратоксин α	ОН	Cl	H	H	H
Охратоксин β	ОН	H	H	H	H
4-R-Хидроксиохратоксин А	Фенилаланин	Cl	H	ОН	H
4-s-Хидроксиохратоксин А	Фенилаланин	Cl	ОН	H	H
10-Хидроксиохратоксин А	Фенилаланин	Cl	H	H	ОН
Тирозински аналог на ОТА	Тирозин	Cl	H	H	H
Серински аналог на ОТА	Серин	Cl	H	H	H
Хидроксипролински аналог на ОТА	Хидроксипролин	Cl	H	H	H
Лизински аналог на ОТА	Лизин	Cl	H	H	H
Аланински аналог на ОТА	Аланин	Cl	H	H	H
Леуцински аналог на ОТА	Леуцин	Cl	H	H	H
d-Охратоксин А	D-Фенилаланил	Cl	H	H	H
Охратоксин А, етиламид	Фенилаланил, Етиламид	Cl	H	H	H
О-Метилиран охратоксин А	Фенилаланил, ОСН ₃ на C-8	Cl	H	H	H
Метилен естер на ОТА α	Метокси	Cl	H	H	H
Охратоксин А, декарбоксилиран	Фенилетиламин	Cl	H	H	H

1.2. Хемиска структура на охратоксин А

ОТА е кристална супстанција, материја која може да биде со бела боја или безбојна. Високорастворлива е во поларни органски растворувачи, во водени раствори на натриум бикарбонат, помалку е растворлива во вода. Моларната маса е 403,8 g/mol⁻¹, и се однесува како слаба органска киселина со рКа вредност од 7,1. Точката на топење изнесува 90 °C при рекристализација од бензен (како растворувач), или на 170 °C при рекристализација од ксилен. ОТА емитува зелена флуоресценција, при осветлување со ултравиолетово светло, во кисела средина. Во алкална средина емитува сина флуоресценција. Максималната емисија на флуоресценција е 467 nm во 96 % етанол и 428 nm во апсолутен етанол. Хемиската формула на соединението е C₂₀H₁₈O₆NCl, а хемиското име е фенилаланин-N-[(5-хлоро-3,4-дихидро-8-хидрокси-3-метил-1-оксо-1H-2-бензопиран-7-ил) -карбонил] - (R) -изокумарин. Неговата хемиска структура е прикажана во слика 1 (Khoury, A., Atoui, A. 2010) и (Anli E., Alkis, I. M. 2010).



Слика 1: Структурна формула на ОТА (Khoury, A., Atoui, A. 2010)

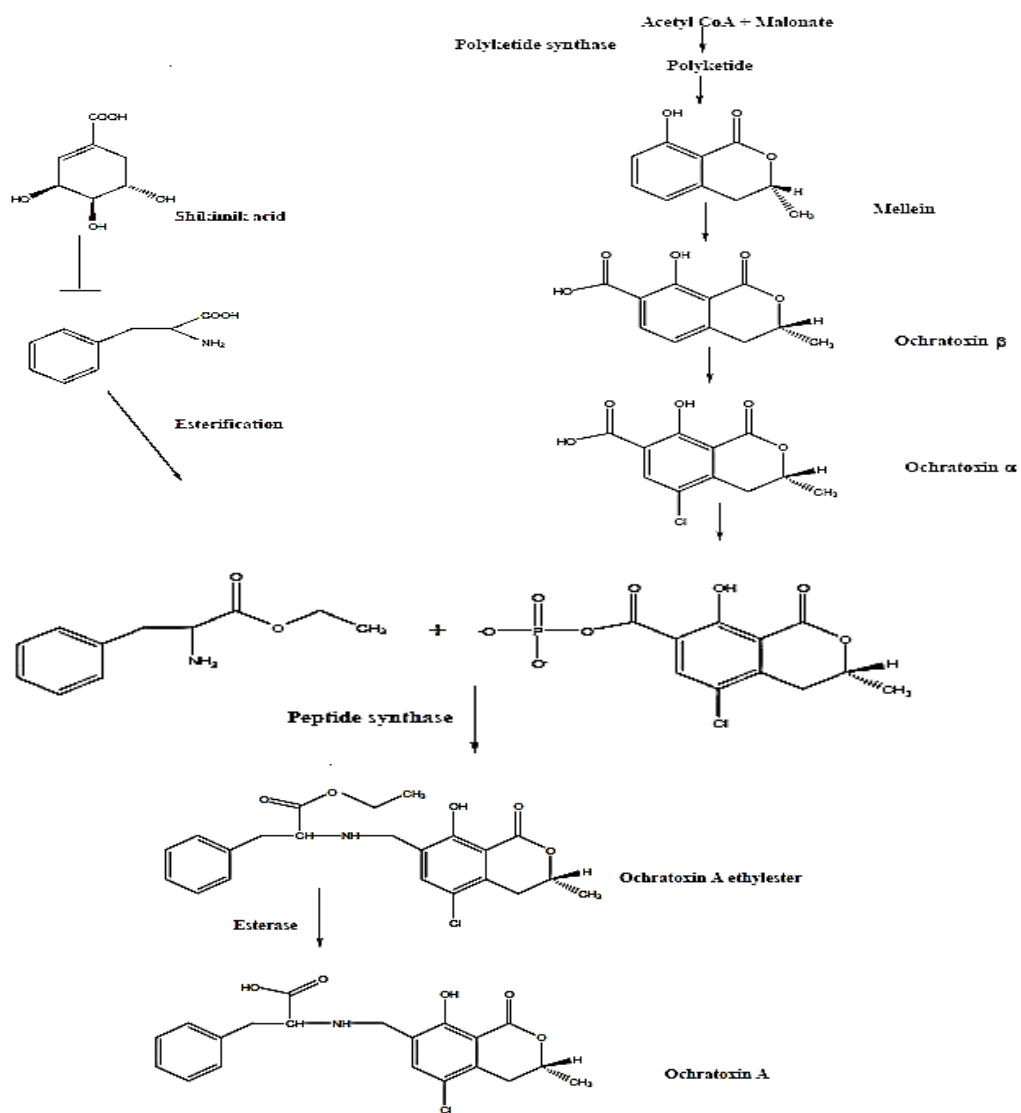
1.3. Биосинтеза на охратоксин А

Не е познат начинот на кој се синтетизира ОТА. Во експериментални студии кои се обидувале да ја проучуваат неговата биосинтеза се користеле ^{14}C - и ^{13}C - обележани прекурсори (Anli, E., Alkis, I. M. 2010, Heussner, A. H., Bingle, L. E. H. 2015). Хипотетичкиот начин на биосинтетизирање предложен од Huff и Hamilton е претставен во слика 2 (Khoury, A., Atoui, A. 2010). Воочена е разлика во биосинтетските правци кај видовите *Aspergillus* и *Penicillium* (Anli, E., Alkis, I. M. 2010). ОТА главно го создаваат *Penicillium verrucosum* и *Penicillium nordicum* видови од родот *Penicillium*. Овие два вида имаат морфолошки сличности, но се разликуваат по нивните еколошки својства. Најчесто имаат сличен дијаметар на нивните колонии кога се култивираат на медиум. *Penicillium verrucosum* има темно сива боја на агар од сахарозен екстракт на квасци (YES) и најчесто се идентификува во житарките (пченица, 'рж, овес и јачмен). *Penicillium nordicum* формира бледа, кремаста или бледојолтеникава колонија, а најчесто може да се изолира во производи од месо и сирење (Cabanès, F. J. и сор. 2010).

Како позначајни и главни произведувачи на ОТА се идентификувани следниве видови (Frisvad, J. C и сор. 2004; Anli, E., Alkis, I.M. 2010):

- *Aspergillus cretensis*,
- *Aspergillus flocculosus*,
- *Aspergillus pseudoelegans*,
- *Aspergillus roseoglobulosus*,
- *Aspergillus westerdijkiae*,

- *Aspergillus sulphureus*,
- *Aspergillus ochraceus*,
- *Aspergillus steynii*,
- *Neopetromyces muricatus*.



Слика 2: Хипотетички начин на биосинтетизата на ОТА (Khoury, A., Atoui, A. 2010)

1.4. Токсокинетика на охратоксин А

1.4.1. Апсорпција на охратоксин А

Апсорпцијата на ОТА се утврдува според карбоксилната група на фенилаланинскиот остаток и хидроксилната група на изокумаринскиот дел. Во гастроинтестиналниот тракт, ОТА се апсорбира во желудникот и проксималниот јејунум. Врзувајќи се за плазмените протеини во крвта, ОТА се апсорбира пасивно (Ringot, D. и сор. 2006). Кај експериментални животни е забележано дека ОТА брзо се апсорбира во желудникот, а потоа преминува во цревата (Benford, D. и сор. 2001). По орално давање на ОТА кај експериментални животни, апсорбираната концентрација изнесува 66 % кај свињите, 56 % кај стаорците и зајците и 40 % кај живина. По давањето на единечна доза на ОТА, токсинот ја постигнува максималната серумска концентрација за 0,33 часа кај кокошките, 1 час кај зајците, 2 - 3 часа кај преживарите, 4 - 10 часа кај стаорците и за 10 часа кај свињите (Aish, J. L. и сор. 2004).

1.4.2. Дистрибуција и акумулација на охратоксин А

Непосредно по неговата апсорпција, токсинот се врзува за плазмените протеини, (најмногу за серумските албумини) (Ringot, D. и сор., 2006), но и за други макромолекули (Vettorazi, A. и сор. 2014). ОТА е идентификуван и во еритроцитите. Врзувањето за протеинските структури во крвта го продолжува неговиот полуживот. Во истражување со експериментални knock-out глувци, кај кои недостасуваат серумските албумини, докажано е дека ОТА има многу побрз период на елиминација (Kumagai, S. 1985, Ringot, D. и сор., 2006). Кај луѓето и животните е покажано дека 90 % од аплицираната количина на ОТА се наоѓа во крвната плазма (Studer-Rohr, I. и сор. 2000). Минимални неврзани фракции од ОТА се најдени во мали количини кај различни видови животни: 0,02 % кај луѓе и стаорци, 0,1 % кај свињи и глувци, 0,08 % кај мајмуни и 22 % кај риби (Benford, D. и сор. 2001). Според истражувањата, полуживотот на ОТА изнесува 35,5 дена кај луѓето, 21 - 35 дена кај мајмуните, 40 часа кај глувците и 3 - 5 дена кај свињите (Studer-Rohr, I. и сор., 2000). Освен за албумините на крвната плазма, ОТА има афинитет да се врзува и за два помали плазматски протеина (молекуларна маса од 20,000 Da). Нефротоксичноста на овој токсин се поврзува со неговата способност лесно да ја помине гломеруларната мембрана во нефроните, заедно со албумините или другите протеински фракции (Vettorazi, A. и сор. 2014). Кај одредени видови на животни

покажано е дека ОТА може да навлезе и во ентерохепаталната циркулација (Roth, A. и сор. 1988).

Степенот на ОТА-акумулацијата во ткивата зависи од животинскиот вид, неговата здравствена состојба, дозата и начинот на внесување. Неговиот полуживот е поголем во крвта во однос на ткивата поради големиот афинитет за серумските албумини кои му го продолжуваат полуживотот (Ringot, D. и сор. 2006). Дистрибуцијата на ОТА кај луѓето е многу слична со онаа кај свињите. Според серумските наоди на ОТА по негова апликација, дистрибуцијата во телото изнесува 7,3 % во бубрезите, 6,9 % во црниот дроб, 4,7 % во масното, а 3,8 % во мускулното ткиво (Studer-Rohr, I. и сор. 2000). Според истражување направено кај свињи, ткивата го покажуваат следниот афинитет за акумулирање на ОТА: серум>бубрег>црн дроб (Milicevic D, и сор., 2008). Кај живината, дистрибуцијата на ОТА при акумулација во ткивата покажува поинаков редослед во однос на свињите. Највисоки концентрации се акумулираат во црниот дроб, а во серумот, бубрезите и мускулите редоследно, афинитетот се намалува (Biro, K. и сор., 2002). Исто така, докажано е дека ОТА може да се излачува и пренесува преку млекото кај луѓето, зајците и стаорците (Aish, J. L. и сор. 2004). Иако, може да се најдат траги на ОТА и во млекото од преживари, сепак концентрацијата е значително помала во однос на претходно наведените видови (Mobashar, M. и сор. 2010). Преносот на ОТА од крвта во млекото на стаорците женки е релативно брз, и можат последователно да се најдат во крвта и бубрезите на новороденчињата (Aish, J. L. и сор. 2004). Докажано е дека ОТА може да се акумулира и во млекото кај жените доколку се изложени преку храната (Miraglia M. и сор. 1995).

1.4.3. Биотрансформација на охратоксин А

ОТА може да се метаболизира преку неколку метаболитички правци (Akman, S. A. и сор. 2012). Со негова биотрансформација настануваат меѓупроизводи кои може да реагираат со ДНК и да добијат канцерогени и токсични својства (Mally, A., Dekant, W. 2005). Сепак, точниот механизам преку кој се одвиваат овие реакции не е доволно истражен (Zepnik, H. и сор. 2001).

Првата фаза од биотрансформацијата опфаќа процеси кои вршат детоксификација и биоактивација на меѓупроизводот. Овој процес започнува уште во црниот дроб, а помалку токсичните меѓупроизводи се докажани кај стаорците по орално внесување на ОТА (Zepnik, H. и сор. 2003). Во урината на стаорците се идентификувани мали

концентрации на хексозни и пентозни конјугати на ОТА, претходно изолирани во хепатоцити од стаорци (Gross-Steinmeyer, K. и сор. 2002). Во друго истражување, покажано е дека по интраперитонеална апликација, во урината на стаорците може да се излачуваат ОТА, ОТа, и 4-R-OH-ОТА, а преку фецесот ОТА и ОТа (Storen, O. и сор. 1982). Неколку други метаболити се најдени и во жолчниот секрет (Li, S. и сор. 2000). Два хидроксилни метаболита на ОТА биле идентификувани во црnodробните микрозоми од стаорци, свињи и зајци кои се формирани од различни цитохроми (P 450 ензими) (Stormer, F. C. и сор. 1981). Овие метаболити се најдени и кај црnodробни микрозоми на луѓе, исто како и кај стаорците (Stormer, F. C. и сор. 1983). Кај преживарите ОТа е најден во урината како единствен ОТА-метаболит. Во истражувања со свињи, контаминирани по орален пат, ОТА и ОТа биле идентификувани во урината (Wu, Q. и сор. 2011). Во друго истражување со кокошки, контаминирани орално со ОТА, утврдено било негово излачување заедно со ОТа во урината и фецесот (Joo, Y. D. и сор. 2013).

Иако ОТА заедно со неговите метаболити, имаат канцерогени својства, овие ефекти во бубрезите не се толку значајни (Zepnik, H. и сор. 2001). Во однос на ОТА-метаболитот, ОTHQ, постојат спротивставени наоди. Според едно истражување, токсичноста на ОТА не се поврзува со неговите метаболитички меѓупроизводи, вклучително и на ОTHQ (Mally, A. и сор. 2004). Во друго истражување, напротив, се потенцира генотоксичноста на ОTHQ и неговата улога врз потенцирање на ОТА-генотоксичноста (Akman, S. A. и сор. 2012).

Биоактивациските реакции вклучуваат оксидациски механизми кои предизвикуваат липопероксидација и оштетување на ДНК (Ringot, D. и сор. 2006). ОТА се посочува како иницијатор за липидна пероксидација и создавање на кислородни радикали, но механизмите не се целосно опишани. Според претпоставките во литературата, како можен механизам се наведува влијанието на ОТА врз оксидативните ензими (пр. глутатионот, глутатион пероксидаза, супероксид дисмутаза и глутатион-S-трансфераза), преку намалување на нивната концентрација, индиректно зголемувајќи го степенот на создавање на кислородни радикали. Веќе е покажано дека во црниот дроб и во бубрезите кај експерименталните животни контаминирани со ОТА, нивото на антиоксидативни ензими е значително помало во однос на контролната група животни (Aish, J. L. et al, 2004).

Втората фаза во биотрансформацијата на ОТА кај животните и луѓето подразбира создавање конјугати. Овие реакции се важни при биотрансформација на ксенобиотиците. Создавањето на токсични метаболити директно зависи од овие процеси. Како позначајни реакции се наведуваат глукуронидната, сулфо и GSH-конјугација (Jancova, P., Siller, M. 2012). GSH-конјугацијата е значајна во намалувањето на ОТА-токсичноста, но во одредени случаи таа може да биде и потенцирана преку други, повеќе токсични метаболити (Wu, Q. и сор. 2011). Глукуронидни ОТА-конјугати се изолирани од црнодробни микрозомни кај стаорци и од жолчен секрет кај свињи. Сулфатни конјугати на ОТА се изолирани во жолчен секрет кај стаорци (Heussner, A. H., Bingle, L. E. H. 2015). Наодот на хексозни и пентозни ОТА-конјугати во урината се сигурен знак за негова акумулација во бубрезите (Wu, Q. и сор. 2011). Други автори, во експеримент со стаорци изложени на ОТА-контаминација, потврдуваат наод на GSH-конјугати во бубрезите кај мажјаците и женките, со поголема застапеност кај мажјаците. Постои можност и за создавање на OTHQ-GSH-конјугатот доколку GSH се конјугира со ОТА-квинонските метаболити (OTQ) (Tozlovanu, M. и сор. 2012).

1.4.4. Елиминација на охратоксин А

За разлика од апсорпцијата која е релативно брза, излучувањето од крвта може да трае значително подолг период во зависност од ентерохепаталната циркулација и степенот на врзување за протеините на семиналната плазма. Урината, фецесот и млекото се главен пат на излучување (Ringot, D. и сор. 2006). Кај експериментални стаорци, контаминирани со ОТА, утврдено е излучување на 12 % од дадената доза преку фецесот и 6 % преку урината заедно со ОТА (Aish, J. L. и сор. 2004).

1.5. Токсодинамика на охратоксин А

ОТА може да реагира на различен начин со биолошките структурни компоненти, предизвикувајќи бројни последователни ефекти врз клеточниот интегритет. Токсичноста и начинот на реакција на ОТА и неговите метаболити зависи од нивните хемиски својства. Хемиската структура на ОТА овозможува тој да реагира со одредени ензими и да ја инхибира синтезата на протеини, ДНК и РНК во различни ткива и органи. ОТА е структурен аналог на фенилаланинот (Phe), па може да ја замени неговата улога во структурата на протеините (Ringot, D. и сор. 2006). ОТА врши инхибиција на неколку хемиски реакции преку врзување за Phe-tRNA синтетазата (Aish, J. L. et al 2004). Тирозинскиот аналог на ОТА може специфично да ја замени аминокиселината тирозин

при реакција со ензимот tRNA синтетаза (Aish, J. L. и сор. 2004). И други ензими кои го користат Phe како субстрат може да бидат афектирани од ОТА. Така на пример, фенилаланин хидоксилазата (PheOH), кој има важна улога во протеинската синтеза, е цел на делување на ОТА. Преку фенилаланинскиот дел, ОТА се врзува за ензимот, попречувајќи ја реакцијата на хидроксилација (Zanic-Grubisic, T. и сор. 2000). Преку експериментални истражувања, потврден е ефектот на ОТА врз PheOH во црниот дроб и бубрезите на експериментални животни, со поголема изразеност во црниот дроб (Zanic-Grubisic, T. и сор. 2000). Меѓутоа, освен овие ензими, ефектот е докажан и на други, како што е цитоплазматскиот фосфоенолпируват карбоксикиназа (PECPCK) (Petzinger, E., Al-Anati, L. 2006).

Токсичноста на ОТА се потенцира и со поттикнување на оксидативниот стрес (Ringot, D. и сор. 2006). Кислородно реактивните радикали (KPP) се слободни радикали кои реагираат со нуклеинските киселини, протеините и липидите (Yoshikawa, T., Naito, Y. 2002). Преку KPP се поттикнуваат процеси на липидна пероксидација и оксидативно оштетување на ДНК (Sorrenti, V. и сор. 2013, Omar, R. F. и сор. 1990). Експериментално е докажан оксидативен стрес во проксималните тубули кај стаорци и клеточна култура на бубрежни клетки кај свињи (LLC-PK1-клетки), при додавање на ОТА. Зголемувањето на 8-оксигванинот било поврзано со зголемувањето на KPP, намалувањето на GSH и оштетувањето на ДНК. Со ова истражување се потврдило дека ОТА делува токсично на овие ткива преку поттикнување на оксидативниот стрес (Schaaf, G. J. и сор. 2002). И во друго истражување каде што било поттикнуто создавањето на KPP со ОТА биле забележани оштетувања на ДНК (Marin-Kuan M. и сор. 2011). Други автори посочуваат на поинакви механизми со кои ОТА го остварува својот токсичен ефект врз ДНК. Тие потенцираат на создавање на ДНК-адукти при орално контаминирање на глувци (2,5 mg/kg), кои директно придонесуваат за канцерогеното својство на ОТА (Tozlovani, M. et al, 2006). Ваквите промени на ДНК се забележани во бубрезите, црниот дроб и во слезината кај животните од експерименталната група. Контролната група на животни била негативна на ДНК-адуктите во овие органи. Поради тоа што најголема концентрација на ДНК-адукти била идентификувана во бубрезите, ова ткиво може да се смета како главна мета на ОТА-генотоксичноста (Pfohl-Leskowicz A. и сор. 1993).

1.6. Токсичност на охратоксин А

1.6.1. Нефротоксичност на охратоксин А

Патофизиолошки, ОТА има најизразени промени во бубрезите, односно има нефротоксични својства (Dai, J. и сор. 2004). Во однос на видовата диспозиција, свињите, кокошките, стаорците и глувците редоследно покажуваат од најголема кон најмала осетливост на овој микотоксин (Aish, J. L. и сор. 2004). Патоморфолошките промени на бубрезите се манифестираат во облик на нефроза, хронична интерстицијална фиброза или хроничен интерстицијален нефрит. Целокупниот синдром на нефротоксични промени се означуваат како микотоксична нефропатија (МН), а е забележана во северноевропските земји, како на пример Данска и Шведска, но и на Балканскиот Регион, во Бугарија, каде што се нарекува микотоксична нефропатија кај прасињата (МНП). Патоморфолошките промени кај МНП се слични со балканската ендемична нефропатија (БЕН) кај луѓето (Stoev, S. D. 2008).

Постојат повеќе научни студии и истражувања кои се основани на клинички случаи поврзани со МНП и БЕН.

Во истражувањето изведено во Данска (Elling, F., Moller, T. 1973), во периодот помеѓу 1971 – 1972 година биле опфатени свињарски фарми. Целта била да се утврди степенот на изложени животни со ОТА преку храната. Анализата вклучувала примероци од бубрези ($n = 19$) кои биле мострирани од свињарски фарми кои биле лоцирани во подрачја со голема фреквенција на ОТА-контаминација. Биле опишани следниве патоморфолошки промени како карактеристични промени за МНП: нефрозна атрофија, тубуларна дилатација, прогресивна интерстицијална фиброза и регресија на тубулите со цистоидни формации во кортексот. Овие промени не биле идентични со пријавените случаи во Бугарија, по што авторите заклучуваат дека разликите во манифестацијата на МНП помеѓу овие две држави се должи на влијанието на различни нефротоксични агенси кои може да делуваат и да го изменат дејството на ОТА. Во друго истражување спроведено од страна на Stoev (2008) МНП и БЕН кои се евидентирани во Бугарија се манифестираат со неопластични промени на бубрезите, формација на ретенциони цисти во проксималните тубули и васкуларни лезии во бубрезите. Без оглед на патоморфологијата, наодот на зголемени вредности на серумскиот креатин и уреа, намалените вредности на серумските протеини, албумини и гликоза (нарушена реапсорпција во проксималните тубули и неефективна тубуларна филтрација) може да

бидат дополнителен знак за нефротоксичните дејства на ОТА (Stoev S. D. 2009). При хронична изложеност со овој микотоксин, забележани се промени во урината (гликозурија, протеинурија, зголемување на γ -глутамил трансферазата) и серумот (намалување на вредноста во холестеролот и вкупните серумски протеини) (Brien, E. O., Dietrich, D. R. 2004).

Stoev, S. D. и сор. во 2002 година имаат спроведено истражување во живинарски фарми во Бугарија. При третман на експерименталната група животни, со одредена концентрација на ОТА, биле утврдени намалени вредности на серумскиот холестерол и урична киселина. Патоморфолошки, бубрезите биле зголемени, едематозни и бледи. Патохистолошките промени биле изразени со дегенеративни промени на тубулоцитите во проксималните тубули, пролиферација на интерстицијалното ткиво, хиперемичност на перитубуларните капилари, со последична едематозност (конгестија). Акумулацијата на ОТА во бубрезите била со значително повисоки вредности во однос на контролната група.

Од страна на Morsy, F. и сор. било направено истражување на стаорци, при што ОТА бил аплициран интраперитонеално на експерименталната група животни (0,85 $\mu\text{g/kg}$), во период од 2, 4 и 8 недели по првата апликација. Првите знаци (2 недели) биле манифестирани со појава на гломеруларни дегенеративни промени и хеморагии во интерстициумот. Во вториот период (4 недели), патохистолошки се забележувала васкуларна дегенерација и фокална некроза на тубуларните епителни клетки. Во третиот период (8 недели) била забележана појава на хијалини цилиндри и клеточен отпадок во луменот на тубулите кои биле резултат на васкуларната дегенерација, некрозите, дегенеративните промени на тубуларниот епител и гломерулите. Кај одреден дел од животните постоеле внатрешни крварења (Morsy, F. и сор. 2012).

Во друго истражување спроведено на свињи, покрај контролната, животните биле поделени во три експериментални групи на кои им биле аплицирани два микотоксина, одделно и комбинирано (ОТА - 5 ppm (5 000 $\mu\text{g/kg}$), фумонизин-FB1 - 10 ppm (10 000 $\mu\text{g/kg}$). Во ОТА-групата биле забележани истите биохемиски наоди како и во претходно опишаните истражувања (зголемени вредности за серумскиот креатин и уреа, намалени вредности за серумските албумини и вкупни протеини). Овие промени не биле забележани во FB1-групата. Интересно е да се потенцира дека во групата која била третирана комбинирано со овие два микотоксина (ОТА + FB1), патоморфолошките

промени на бубрезите биле најизразени со акцент на васкуларните оштетувања. Оттука, се претпоставува дека различната патоморфологија на нефропатиите во различни географски подрачја може да биде како последица на комбинираниот токсичен ефект на ОТА со некој друг токсин (Stoev, S. D. и сор. 2012).

Во своето истражување Kumar, M. и сор. (2002) ги демонстрираат ефектите на два микотоксина врз зајци како експериментални животни. Преку храната биле аплицирани ОТА (0,75 µg/kg) и цитринин (15 µg/kg), во период од 60 дена на двете експериментални групи. Патоморфолошките промени, очекувано, биле лоцирани во бубрезите.

Кај луѓето, ЕН претставува хронична тубулоинтерстицијална болест која доведува до ренопатија и хипертензија. Појавата на уроепителни тумори се чест наод кај ЕН кои се придружени со појава на ДНК-адукти (Pfohl-leszkowicz, A. 2009). Кај пациенти изложени на ЕН, ОТА се излачува преку урината, а може да се детектира и во крвта. Вакви случаи се пријавени во Бугарија, Хрватска, Србија, Романија, Грција и Тунис. Во балканските земји каде што инциденцијата за БЕН е голема, забележана е зголемена фреквенција во детекцијата на ОТА во прехранбените производи (International Research on Cancer, 2007). На пример, во региони на Хрватска и Словенија каде што е забележана зголемена инциденција за појава на БЕН, детектирани се зголемени концентрации на ОТА во пченката и пченицата (Aish, J. L. и сор. 2004).

1.6.2. Канцерогеност на охратоксин А

Канцерогените својства на ОТА, во најголема фреквенција се појавуваат во црниот дроб и бубрезите, кај повеќето животински видови. На пример, во истражување со стаорци изложени на ОТА, биле забележани онкогенетски промени во бубрезите кај сите испитувани примероци (100 %), а во црниот дроб кај нешто повеќе од половина примероци (55 %). (Aish, J. L. и сор. 2004).

Во истражувањето на Voogman, G.A. и сор., како експериментален модел биле искористени стаорците. Експерименталните животни биле поделени во родови групи (мажјаци - женки), на кои им биле аплицирани различни концентрации на ОТА: 21, 27 и 201 µg/kg на единица телесната маса, преку орално додавање со пченкарно масло, во период од две години. Кај мажјаците биле забележани тубулоцитни аденоматозни карциноми по деветмесечна експозиција. По 15 месеци третман, тубулоцитната карциноматозна хиперплазија била во напреден стадиум. Овој облик на карцином покажувал голема склоност за метастазирање во белите дробови, а многу помала во

црниот дроб (забележани кај два мажјака и една женка). Женките покажале помала инциденција кон појава на овие карциноматозни промени. Ова истражување ја потенцира сличноста на тубулоцитните карциноми кај стаорците со онаа кај луѓето (Boorman, G.A. и сор. 1992).

Од страна на Qi, X. и сор., канцерогените ефекти на ОТА се демонстрирани преку стаорци. Експерименталните животни биле поделени во две групи. На едната група ѝ била аплицирана доза на ОТА од 70 $\mu\text{g/kg}$ на единица телесна маса, а на другата - 210 $\mu\text{g/kg}$ на единица телесна маса. Во првите четири недели по аплицирањето на ОТА, не биле забележани промени во бубрезите. По 13 недели биле забележани значителни оштетувања во бубрезите, но не и во црниот дроб. И во двете групи, во ткивните изолати од бубрезите била забележана зголемена експресија на клеточно-јадрен пролиферирачки антиген (PCNA), што е сигурен индикатор за клеточна пролиферација, но и за канцерогеност. Во црниот дроб, зголемена експресија на PCNA била забележана по четири недели од првата апликација на ОТА. Промени во паренхимот не биле забележани, ниту по тринаесеттата недела од третманот. Во наодите била забележана намалената експресија на туморскиот супресивен ген p53, и зголемена концентрацијата на липокалин-2 во четвртата недела од третманот. Во тринаесеттата недела неговата концентрација нагло пораснала, што претставува индикатор за хронично бубрежно оштетување. Авторот заклучува дека канцерогеноста е резултат на зголемената клеточна пролиферација (Qi, X. и сор. 2014). Во истражувањето спроведено од страна на Pfohl-leszkowicz, A. и Manderville, R. A. (2007), целта била да се потврди хипотезата дека ОТА може да учествува и во неопластичните промени во тестисите. Ваков наод е прикажан во истражување со неонатални глувци кои биле изложени со ОТА во доза од 2,5 μg на килограм телесна маса. По извесно време од првичната апликација била забележана појава на ДНК-адукти во тестикуларното ткиво. Слични резултати се објавени и во друго истражување кое вклучувало возрасни категории на глувци, каде што ДНК-адуктите биле лоцирани во бубрезите и тестисите (Srinivasa, J. 2011).

Покрај на стаорци и глувци, истражување било направено и на кокошки на кои им била дадена количина на ОТА од 5 000 $\mu\text{g/kg}$ преку храната, при што се забележува угинување во експерименталната група по 10 месеци. Патоанатомски биле забележани аденокарциноматозни промени на дијафрагматската и абдоминалната површина на црниот дроб. По 18 месеци, во бубрезите се забележани малигни лимфосаркоматозни формации, а на 20 месеци овие промени се лоцирани во уретерите кај мажјаците. На 24

месеци, идентификувани се бенигни аденоматозни промени во бубрезите. Во заклучоците се наведува улогата на ОТА во онкогенетската патофизиологија која се одвива во изложените органи (Stoev, S. D. 2010).

Во 1960 година, извршени се 33 обдукции на пациенти кои биле изложени на БЕН. Во 16 случаи биле забележани тумори на уринарниот тракт. Во сите ендемски подрачја на БЕН, во периодот меѓу 1968 и 1970 година, дијагностицирани се тумори од ист тип. Во периодот меѓу 1965 и 1974 година, била направена споредбена анализа во однос на појавата на бубрежни тумори кај населението на Враца од Бугарија. Во ова истражување биле опфатени 15 села со висока инциденција за БЕН и 12 села со ниска инциденција за БЕН. Според очекувањата, бројот на дијагностицирани тумори значително бил поголем кај населението од месноста со поголема инциденција на БЕН. Ваков заклучок е добиен и во Србија со истражување спроведено во 1979 година (International Agency on Research Cancer, 1993). Во ендемските подрачја на БЕН, зголемена е појавата на ДНК-адукти во примероци кои потекнуваат од пациентите. Се смета дека дневното внесување на ОТА, во количина од 70 $\mu\text{g/kg}$, може да иницира онкогенетски процеси (Reddy, L., Bhoola, K. 2010).

1.6.3. Генотоксичност на охратоксин А

Генотоксичните ефекти на ОТА се демонстрирани преку неколку научни истражувања.

Генотоксичниот потенцијал на ОТА е демонстриран во истражување со стаорци (Wistar) кои биле третирани интраперитонеално со ОТА, во концентрација од 0,5 µg/kg телесна маса, на 7, 14 и 21 ден. По 7 дена од првичниот третман биле утврдени забележливи промени во ДНК (појава на адукти) кои биле уште повеќе изразени по 14 дена од третманот. Во заклучокот се наведува дека морфолошките лезии кои настануваат во овој период се последица на значителните промени во ДНК-структурата меѓу 7 и 14 ден (Želježić, D. и сор., 2006).

Во друго истражување се користени стаорци (F344) како експериментални животни. Целта била да се утврди дозната зависност на ОТА во предизвикувањето на генотоксичните ефекти и да се споредат овие ефекти со охратоксин Б (ОТБ). Стаорците биле поделени во две групи. Во едната биле формирани подгрупи на кои им биле аплицирани една од соодветните дози на ОТА: 0, 250, 500, 1 000, 2 000 µg/kg, во однос на телесната маса. Во другата група на стаорци бил аплициран ОТБ. Кај ОТА-групата стаорци, биле забележани генетски оштетувања (ДНК-откинувања) во бубрезите, црниот дроб и слезината. При вклучување на полот во анализата, било заклучено дека кај мажјаците постои поголема инциденција за појава на ваков тип генотоксичност. Не била забележана појава на ДНК-адукти. Било предложено дека оксидативниот стрес може да го нагласи генотоксичниот ефект на ОТА преку негова биотрансформација (Mally, A., Dekant, W. 2005a). Целта на научното истражување на Hibi, D. и сор., спроведено врз стаорци (Gps delta), била да се истражи типот на генотоксичен ефект кој го предизвикува ОТА во бубрежната кора (кортекс) и срцевината (медула). Стаорците биле третирани со ОТА преку храната, во количина од 5 ppm (5 000 µg/kg), во времетраење од 4 недели. Било заклучено дека генотоксичните ефекти во надворешната медула на бубрегот се многу повеќе изразени во однос на кортексот. Канцерогената формација е објаснета преку делециски мутации предизвикани од ОТА. Биле забележани и двојни откинувања во ДНК-веригите, што предизвикува летален ефект кај клетките (Hibi, D. и сор. 2015).

ДНК-адуктите се придружен ефект на ОТА-генотоксичноста, што е во директна корелација со зголемената фреквенција на генетски мутации. Може да се заклучи дека генотоксичноста е најмногу изразена кај стаорците и глвците, поточно во бубрезите

како целни органи, но исто така, опфатени се црниот дроб и слезината. Потврдена е појава на ДНК-адукти и кај пациентите со БЕН (Pfohl-leszkowicz, A., Manderville, R. A. 2007).

1.6.4. Имунотоксичност на охратоксин А

Имунотоксичните својства на ОТА се препишуваат на неговото фенилаланинско соединение. ОТА стапува во реакција со ензимот фенилаланин-tRNA синтетаза при што ја попречува нормалната протеинска синтеза. Ги афектира органите кои се вклучени во имунолошкиот систем (фабрициева бурза, тимус, слезина, коскена срцевина), намалувајќи ја нивната маса и бројот на лимфоидни клетки. ОТА има интеракција и со регулаторните фактори на имунолошкиот систем (цитокени). Целокупниот ефект на ОТА, преку влијаење на органите и компонентите на имунолошкиот систем, ја супресира неговата функцијата (Petzinger, E., Al-Anati, L. 2006).

Имунотоксичните ефекти на ОТА се прикажани преку повеќе истражувања. Во истражување спроведено на стаорци мажјаци (Wistar). Стаорците биле поделени во контролна и експериментални групи кои биле третирани со една од следниве дози на ОТА, во период од 28 дена: 50, 150 или 450 $\mu\text{g/kg}$ во однос на телесната маса. Во резултатите било објавено дека не постојат промени во слезината и тимусот кај експерименталната група животни. Било забележано намалување на активноста на НК-клетките, додека во групата која била третирана со доза од 50 $\mu\text{g/kg}$ биле намалени само Т-лимфоцитите. Во заклучокот било забележано дека ОТА го афектира имунолошкиот систем во суптоксични дози што доведува до појава на нефротоксичност (Alvarez, L. и сор. 2004). Во друго истражување, исто така спроведено на стаорци, стаорците биле поделени на контролна и експериментална група. На експерименталната група преку храната им бил додаван ОТА во доза од 4 ppm (4 000 $\mu\text{g/kg}$). По 72 часа било забележано истенчување на кожата во експерименталната група на животни. Хуморалната имунолошка одбрана била значително намалена. Вкупниот леукоцитен и лимфоцитен број бил намален во шесттата и осмата недела од првата апликација. Не била забележана промена во бројот на моноцитите, еозинофилните или базофилните леукоцити. И ова истражување, во своите заклучоци, го забележува имуносупресивниот ефект на ОТА (Satheesh, C. C. и сор. 2005). Solcan, C. и сор. (2015) спровеле истражување на кокошки со цел да се демонстрираат ефектите на ОТА во лимфоидното интестинално ткиво и цитотоксичниот ефект врз интестиналниот епител.

Вкупниот број на животни ($N = 80$) бил поделен во контролна и три експериментални групи кои биле третирани со една од следниве дози на ОТА преку поилка, во период од 28 дена: 1, 20 и 50 $\mu\text{g/kg}$ во однос на телесната маса. Биле забележани промени во бројот на леукоцитите и тромбоцитите во функција на времето и дозата. На 14-тиот ден, во групата третирана со 50 $\mu\text{g/kg}$, била забележана супресија на миелоидната крвна лоза, а бил зголемен бројот на лимфоцитите. Овие промени биле уште повеќе изразени во 21-виот и 28-миот ден од третманот што според авторите, индицира на хронично предизвикување на ефектите кај ОТА. Moura, M. и сор. (2004), на еднодневни пилиња додавале ниска доза на ОТА, интраперитонеално. Било забележано намалување во бројот на лимфоцитите и зголемување во бројот на моноцитите и хетерофилите. Првото позначително намалување на лимфоцитниот број бил забележан во првите три часа од апликацијата, што според авторите, индицира на времето за кое ОТА го постигнува својот максимален имуносупресивен ефект. Во заклучоците е наведено дека хроничното изложување на пилињата со ОТА доведува до проширување на имуносупресивните ефекти, како на пример појава на лимфопенија во органите на имунолошкиот систем. Покрај истражувањата извршени кај животни, Assaf, H. и сор. (2004) демонстрирале имунотоксични ефекти на ОТА кај луѓето. За таа цел биле употребени клеточни култури (Bcl-xL) во кои бил додаден ОТА. Ефектите се манифестирале преку појава на апоптоза, намалување на концентрацијата на вкупни протеини, без модифицирање на генската транскрипција. Слични промени со апоптоза биле утврдени и кај Т-лимфоцитите кај луѓе, која била предизвикана од нарушување на митохондријалната функција. Во заклучоците е наведено дека долготрајното делување на мали дози ОТА може да ги поттикнат овие имунотоксични ефекти.

1.6.5. Тератогеност на охратоксин А

Тератогените ефекти на ОТА се истражувани кај ембриони од кокошки и кај пилиња (Hassan, U. Z. et al, 2012). Оплодените јајца од кокошка биле поделени по групи (контролна и експериментални) и инјектирани со една од следниве концентрации на ОТА, пред инкубацијата: 0,01, 0,03, 0,05, 0,10, 0,50 и 1,00 $\mu\text{g OTA/egg}$. Кај групата со најголема доза на ОТА биле забележани следниве тератогени ефекти: анофталмија, микрофталмија, мандибуларна хипоплазија, максиларен ретрогнатизам, тело со мала големина, ексвисцерален раст, и егзенцефалија. Експерименталните групи третирани со 0,01 и 0,03 $\mu\text{g OTA/egg}$ не покажале тератогени промени, додека оние со повисоки дози (0,1, 0,5 и 1,00 $\mu\text{g OTA/egg}$) имале намален процент на испилување и зголемен процент

на морталитет. Дефекти во затворањето на невралната туба кај ембрионите биле забележани во групите третирани со 0,1, 0,5 и 1,00 μg ОТА/egg. Исто така, постојат податоци за тератогени ефекти кај зајци. Експерименталните групи биле третирани со една од следниве дози на ОТА во пченкарно масло, по пат на гастрично интубирање, еднаш неделно: 0,025, 0,050, и 0,100 $\mu\text{g}/\text{kg}$, на единица телесна маса, меѓу 6 и 18 недела од бременоста. Фетални малформации биле забележани кај групата третирана со 0,100 $\mu\text{g}/\text{kg}$, а тие биле манифестирани со рудиментирана опашка или аплазија, нецелосно окостување на черепот и ребрата, хидроцефалус, микрофталмија, и аплазија на бубрезите. Во заклучоците, авторите наведуваат дека минималната орална доза за предизвикување на тератогени ефекти кај зајците е 0,05 $\mu\text{g}/\text{kg}$ ОТА (Wangikar, P.B. и сор. 2004).

Во истражувањето пак изведено на ембриони од рибата зебра, авторите во своите заклучоци наведуваат дека ОТА предизвикува значителни промени, како што се деформитети, намален раст и зголемена леталност кај ембрионите (Наџ, М. и сор. 2016).

1.6.6. Невротоксичност на охратоксин А

Невротоксичните ефекти на ОТА биле демонстрирани на стаорци кои биле поделени во контролна и експериментална група, и третирани со концентрација од 290 $\mu\text{g}/\text{kg}$ телесна маса. Биле забележани оштетувања во вентралниот меѓумозок, хипокампусот, и малиот мозок. Подолготрајната изложеност била проследена со акумулација во мозочното ткиво што предизвикало нарушување во развивањето на мозочните клетки кај младите, преку намалување на ДНК-масата во клеточното јадро. Авторите сугерираат дека овие промени може да бидат поврзани и со други системски патофизиолошки механизми (Doi, K., Uetsuka, K. 2011).

Во ова истражување спроведено од Doi, K. и Uetsuka, K. (2011) се демонстрира поврзаноста помеѓу Паркинсоновата болест и интоксикацијата со ОТА. Во заклучоците се наведува дека овој микотоксин го намалува прагот за допамин во стријатумот на мозочните структури, го намалува антиоксидативниот капацитет и го нарушува процесот на репарирање во оштетената ДНК. Авторите предлагаат заклучок со кој ја поврзуваат појавата на Паркинсоновата болест со ОТА.

Покрај тоа, постојат научни податоци и за влијанието на ОТА во настанувањето на Алцхајмеровата болест кај стаорците. Покрај контролната, стаорците биле поделени во

три експериментални групи, секоја третирана орално со една од следниве дози на ОТА: 0 $\mu\text{g/kg}$, 30 $\mu\text{g/kg}$ и 60 $\mu\text{g/kg}$ телесна маса. Биле забележни повеќе неврални оштетувања кои авторите ги поврзуваат со појавата на Алцхајмеровата болест (Abed, A. R., 2016).

Невротоксичните ефекти на ОТА во култури од неврони кои потекнуваат од стаорци и луѓе (SH-SY5) биле демонстрирани од Zhang, X. и сор. 2009. Покрај контролните групи, биле формирани по две експериментални групи кои биле третирани со ОТА концентрација од 0,25 mol/L или со 0,5 mol/L. И двете концентрации предизвикале невротоксични ефекти кои биле придружени со некроза и клеточна апоптоза. Авторите се на мнение дека овие промени може да бидат првата фаза во појавата на Алцхајмеровата или Паркинсоновата болест.

2. Проценка и контрола на охратоксин А изложеност кај луѓето и животните

2.1. Проценка на охратоксин А изложеност кај луѓето и животните

2.1.1 Биомаркери за утврдување на охратоксин А изложеност кај луѓето и животните

Според Светската здравствена организација (WHO), биомаркерите се мерливи параметри во биолошкиот систем, кои се индикатори за неговата состојба (физиолошка или патолошка). Биомаркерите може да индицираат на состојба или промена која се случува на макроскопско, микроскопско, биохемиско или молекуларно ниво (Strimbu, K. и Tavel, A. J., 2011). Преку нив, може да се следат различни процеси во биолошкиот систем, како на пример, одредени третмани, терапии, патофизиолошки процеси, етиолошки агенси и сл. Во епидемиологијата, се користат за истражување на начинот на ширење и исходот на заразните болести. Биомаркерите може да индицираат на диспозиција кон одредена болест или да бидат дијагностички индикатор за постоењето на болеста. Првиот облик на биомаркери се особено важни во токсикологијата со кој може да се утврди степенот на експозиција или диспозиција на биолошкиот систем кон одреден токсичен агенс. Со мерење на неговата концентрација во надворешната средина (воздух, вода или храна) може да се добие заклучок за степенот на изложеност на биолошкиот систем кон агенсот, додека со директно мерење на концентрацијата на токсинот во системот (телесни течности, ткива) се добива информација за ефективната доза која може да иницира појава на болест. Биомаркерите за токсиколошките болести се користат за следење, дијагностицирање и прогнозирање на исходот на болеста (Mayeux, R. 2004). При утврдување на степенот на изложеност на луѓето и животните кон одредени природни токсини се користат биомаркери со кои се следи контаминацијата на прехранбените производи или сточната храна, начинот и зачестеноста во земање на одредени облици на храна, загадувањето на воздухот со агенсот и токсикинетиката во биолошкиот систем. Дополнително, се врши мерење на концентрацијата на агенсот (ОТА) и неговите метаболити, во телесните течности и ткивата. Овие биомаркери се класифицираат во две групи: биомаркери за внатрешната доза и биомаркери на ефективната доза. Биомаркерите за внатрешната доза ја прикажуваат концентрацијата на токсинот во телото, а се мерат во телесните течности или во ткивата. Сепак, овој параметар не може да даде целосен одговор за ефектите кои ги предизвикува во телото. Предвид треба да се земат процесите на биотрансформација

кои ја релативизираат најдената концентрација на токсинот. Дополнително, кај различни индивидуи, метаболизирањето на ОТА може да резултира со создавање на различни секундарни производи кои може да ја зголемат или намалат неговата токсичност. Ефективната доза е многу позначаен параметар со кој се добива точен податок за концентрацијата на ОТА и неговите метаболити кои може да предизвикаат одредени промени. Како биомаркери за следење на промените од ефективната доза, би можеле да се користат ДНК-адуктите. Одредени автори го оспоруваат овој биомаркер поради тоа што ДНК-адуктите не секогаш се појавуваат во целните органи, но нивното потврдување го индицира канцерогениот ефект на овој микотоксин. Глутатионските конјугати на ОТА се друг облик на биомаркери кои се сигурен индикатор за онкогенетските промени во црниот дроб и бубрезите. Друг, помалку специфичен биомаркер за ОТА е β 2-микроглобулин (β 2M). Тој е протеинска молекула со мала молекуларна маса која при филтрирање во бубрежниот гломерул скоро целосно се реапсорбира и метаболизира, па не би можела да се најде во конечната урина. Како последица на нефротоксичниот ОТА-ефект, оваа молекула ќе има нарушен метаболизам во проксималните тубуларни клетки и ќе може да се детектира во конечната урина. Меѓутоа, таа брзо се распаѓа при $\text{pH} < 6.0$, и на собна температура, па не може да се смета за специфичен биомаркер. Може да се утврди на површината на клетките во физиолошка смрт, па затоа неговата детекција има мала специфичност (Duarte, S. C. и соп. 2011).

2.1.2. Анализа на глобалната контаминираност на храната со охратоксин А

Во научната литература може да се најдат неколку истражувања во врска со контаминацијата на прехранбените сировини и производи со ОТА.

Една од истражувањата опфаќа прехранбени сировини (житарки) во кои квалитативно било истражувано присуството на ОТА. Резултатите се изразени во проценти од вкупниот број на проби, во кои ОТА била квалитативно потврдена: Полска, 1998 година (пченица, 48 %), Данска, 1999 (пченица, 82 %), Африка, 1998 (пченка, 100 %), Јапонија, 2001 – 2003, (орж, 90 %) и Мароко, 2005 година (ориз, 90 %). Највисока застапеност на ОТА во прехранбените сировини и производи има во Европа и Балканот, каде што просечната концентрација достигнува 5 000 $\mu\text{g/kg}$ (Duarte, S. C и соп. 2011; Denli, M. and Perez, J. F. 2010).

Во истражување спроведено во периодот меѓу 2009 - 2011 година, во кое биле анализирани 7 049 примероци за присуство на ОТА (пченка, соја, пченица, сушени

житарки, готови производи од житарки) било заклучено дека готовите производи од житарки кои потекнуваат од Јужна Азија имаат најголема застапеност на ОТА (95 %), по која следат Јужна Европа (53 %) и Централна Европа (37 %) (Inês, R. and Naehrer, K., 2012).

Во друго истражување спроведено во периодот помеѓу 2004 - 2013 година биле собрани повеќе од 19 000 примероци кои биле анализирани за присуство на ОТА. Во резултатите, редоследно биле прикажани регионите каде што ОТА била квалитативно детектирана: Јужна Азија (55 %), Источна Европа (49 %), Африка (36 %) и Средниот Исток (35 %) (Schatzmayr, G., Streit, E. 2013).

Во истражувањето на Nährer, K., Kovalsky, P. кое било спроведено во 2013 година и опфатило вкупно 4 218 примероци од разни земјоделски производи, целта била да се изврши квалитативна детекција на ОТА. Биле прикажани следните резултати: Африка (56 %), Јужна Азија (55 %), Југоисточна Европа (46 %), Северна Европа (40 %), Источна Европа (37 %), Среден Исток (31 %), Централна Европа (28 %) и Југоисточна Азија (25 %) (Nährer, K., Kovalsky, P. 2014).

Во 2015 година на вкупно 8 271 примероци од земјоделски производи кои главно се користат како сточна храна (пченка, пченица, сојно брашно и силажа), како и во претходните истражувања била извршена квалитативна детекција на ОТА во примероците. Во резултатите биле прикажани следниве наоди: Централна Америка (76 %), Јужна Азија (81 %), Среден Исток (62 %), Источна Европа (55 %) и Јужна Европа (35 %) (Kovalsky, P. 2015).

2.1.3. Дефинирање на максимално дозволените концентрации за охратоксин А

Една од фазите во воспоставувањето на системите за безбедност на храната е утврдувањето на максимално дозволени концентрации на контаминенти кои нормално може да се сретнат во суровините или завршните производи. И покрај високите критериуми на овие системи, сепак не може целосно да се елиминира појавата на природните контаминенти, како што е ОТА. Воспоставувањето на максимално дозволени концентрации (MRL), кои се важна компонента во проценувањето на ризик во синџирите на храна, се базира на научни истражувања. Покрај националните лаборатории, овие вредности може да се интерпретираат и на меѓународно ниво, со што се унифицираат критериумите за извоз и меѓународна трговија (Park, D. L. и сор. 1999). Така на пример, во ЕУ постои унифицирана регулатива (2006/576/EC) за MRL на ОТА

во сточната храна. Поради непостоењето на регулатива за животински ткива, секоја држава изготвува сопствен план за мониторинг и воспоставува национални регулативи за MRL на ОТА.

2.1.4. Проценка на ризикот од контаминација со охратоксин А во производи од растително и животинско потекло

Животните кои се исхрануваат со земјоделски производи, како што се житарките и нивни споредни производи, имаат висок ризик да бидат контаминирани со ОТА која природно може да се најде во овие храни. Составот на добиточната храна кај живината е со 40 - 80 % учество на житарките, 0 - 10 % растителни масла и 0 - 50 % протеински концентрати. Кај преживните животни, добиточната дажба се состои од житарки (0 - 70 %) и кабеста храна (30 - 100 %). Свињите и живината се најподложни на контаминација со ОТА преку добиточната храна поради тоа што нивната дажба претежно се состои од житарки (EFSA, 2004).

Застапеноста на ОТА во добиточната храна има директно влијание врз изразеноста на симптомите и на интоксикацијата. Непосредно по конзумирањето на ваков тип храна, токсинот се акумулира во телесните течности и целните органи кај животните (Denli, M., Perez, J. F, 2010). Пренесувањето на токсичното дејство од контаминираната добиточна храна, на производите од животинско потекло во англиската терминологија се означува како „carry-over“ (Völkel, I. и сор. 2011). Ова би значело дека добиточната храна има исто толкава важност врз здравјето на луѓето како што би имала и за животните. Ваквиот индиректен начин на интоксикација може да ја зголеми инциденцијата за бубрежни и канцерогени заболувања во јавното здравство, а еднакво векторско учество може да имаат преживните и непреживните животни (Denli, M., Perez, J. F, 2010; EFSA, 2004).

Микотоксинот ОТА е официјално вклучен во програмите за безбедност на храната во ЕУ преку легислативни мерки (Völkel, I.и сор. 2011). Надвор од ЕУ, дел од државите немаат конкретни легислативи за следење на контаминацијата на добиточната храна со микотоксини, што остава простор последиците од пренесувачкиот ефект на ОТА да имаат регионален карактер (Duarte, S. C. и сор. 2012). Глобалните истражувања за ОТА-контаминацијата покажуваат дека Европа е дефинитивно најмногу изложена, особено Северните, Јужните и Источните Региони (EFSA, 2004). Голем број случаи на микотоксични нефропатии се утврдени во Данска, Шведска и Бугарија (Stoev, D. S.

2008). Во Шведска, зголемената инциденција на нефропатија кај свињите била поврзана со зголемениот степен на контаминација на добиточната храна со ОТА (JECFA Food Additives Series 28).

Во Данска е регистрирана слична ситуација, каде што од 100 000 кланични примероци, 10 - 80 проби од бубрези биле дијагностицирани со микотоксична нефропатија (EFSA, 2004). Како превентивна мерка, труповите биле подложени на задолжителна визуелна проверка за постоење на нефропатолошки промени, пред да бидат процесирани во преработка (Denli, M., Perez, J. F. 2010). Според JECFA (Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives), зголемената инциденција на ендемската нефропатија (ЕН) кај луѓето во Србија, Хрватска, Романија, Бугарија и БиХ, се поврзува со зголеменото присуство на ОТА во прехранбените производи и сточната храна (JECFA Food Additives Series 28). Според истражување на JECFA, спроведено во 1964 година, 16 000 нефропатски случаи биле регистрирани во Србија, Хрватска и БиХ, и 3 000 во Бугарија и Романија (Kettner, H. 1965).

БЕН претставува заболување кое има мултифакторијална етиологија. Научни истражувања посочуваат дека ОТА не е единствен во причинување на нефротоксичните и канцерогените промени во бубрезите. Се смета дека тој претставува главен кофактор на други етиолошки агенси, како што се тешките метали или елементите во трагови (Grollman, A. P, Jelaković, B. 2007). ОТА за првпат е поврзан со појавата на БЕН откако се увидени сличности со микотоксичната нефропатија кај прасињата (МНП) (Tatu, C. A. и сор. 1998; Stoev, D. S. 2008). ОТА е потврден како причинител на МНП во Данска, откако се регистрирани зголемени концентрации во добиточната храна од ендемските подрачја (Stoev, S. D., Denev, S. A. 2013). Во истражување спроведено во Бугарија, бил донесен истиот заклучок, каде што концентрациите на ОТА во добиточната храна биле во опсегот од 38 до 552 $\mu\text{g/kg}$ во 1993, и 42 - 427 $\mu\text{g/kg}$ во 1994 година (Stoev, S. D., 2008). Во друго истражување било демонстрирано дека не постои значајна разлика во ОТА-концентрациите на добиточната храна која потекнува од ендемски и неендемски подрачја за БЕН. Оттука, бил донесен заклучок дека етиолошката слика за микотоксичните заболувања не се поврзува исклучиво со ОТА, туку и со други природни токсини кои може да се најдат во добиточната храна, но постои можност и за генетска диспозиција (Abouzied, M. M. и сор. 2002).

2.2. Достапни податоци за изложеноста на животните и луѓето од контаминација со охратоксин А

2.2.1. Изложеност на свињите од контаминација со охратоксин А

Како и кај останатите животни, така и кај свињите, високиот внес на микотоксини преку храната, резултира со негова акумулација во серумот и ткивата. Во 1984 година, спроведено е истражување во Полска за степенот на акумулирање на ОТА во ткивата кај свињите. Од 225 400 кланични примероци, 151 400 биле со патоморфолошки промени карактеристични на МНП. Највисоката концентрација која била утврдена во бубрезите изнесувала 23 $\mu\text{g/kg}$ (Szebiotko, K. 1984). Во периодот меѓу 2006 и 2007 година, во Србија е направено истражување за појавата на МНП и степенот на акумулација на ОТА во изложените животни. Истражувањето било извршено на кланични трупови ($n = 90$), каде што се идентификувани патоморфолошки промени карактеристични за ОТА. Измерените концентрации на ОТА изнесувале меѓу 0,17 и 52,5 $\mu\text{g/kg}$. Бубрезите биле бледи и атрофирани, а заедно со патохистолошките наоди, одговарале на симптомите на МНП (Milicevic, D. 2009b). Во табела 2 се прикажани научни истражувања за ОТА во различни животински ткива и телесни течности.

Покрај нефротоксичните ефекти, ОТА влијае врз растот и репродуктивните карактеристики кај животните (Denli, M., Perez, J. F. 2010; Malagutii, L. и сор. 2005).

Исто така, забележани се и последици за нормалниот фетален развој кај маториците (Marin, D. E. и сор. 2009).

Табела 2: Научни истражувања за ОТА во различни животински ткива и телесни течности

Година	Држава	Примерок	Автори
1980	Шведска	Крв	(Hult et al.)
1993	Норвешка	Крвна плазма Крвен серум	(Langseth, W. и сор. 1993)
2001	Романија	Бубрег Црн дроб Мускули	(Curtui, V.G. и сор. 2001)
2002	Данска	Бубрег Мускули Бубрег	(Jørgensenm K., Petersen, A. 2002)
2006	Италија	Црн дроб Мочен меур Слезина Крвен серум	(Ceci, E. и сор. 2007)
2008	Србија	Бубрег Црн дроб	(Milićević et al.)
2010	Бразил	Крвен серум	(Kruger et al.)

2.2.2. Изложеност на живината од контаминација со охратоксин А

ОТА има висока токсичност за живината (Ariyo A. L. и сор. 2013). Таа се изразува преку нефротоксичност, намалување на прирастот и апетитот, зголемување на морталитетот, намалување во квалитетот и квантитетот на јајцата (Denli, M. и Perez, J. F. 2010; Battaccone, G. и сор. 2010). Во научно истражување изведено со бројлери кои биле изложени со ОТА преку храната, било заклучено дека експерименталната група има намалена телесна маса и намален внес на храна во однос на контролната група (Battaccone, G. и сор. 2010; Sakthivelan, S. M. и Rao, S. G. V. 2010). Најголема акумулација е забележана во бубрезите и црниот дроб кај бројлерските пилиња (Biró, K. 2002).

Во истражување, изведено во Пакистан (Iqbal, S. Z. и сор. 2014), биле опфатени проби од пилешко месо (n = 115) и јајца (n = 80), каде што степенот на контаминација кај

последователните примероци изнесувал 41 %, односно 35 %. Најголемата концентрација од земените ткива е утврден во црниот дроб ($4,70 \mu\text{g/kg}$).

Научно истражување во Србија изведено со живина ($n = 270$) ја утврдувало инциденцијата на ОТА во различни региони на државата (Milicevic, D. R. и сор. 2011). Наодите покажале дека концентрацијата на акумулирана ОТА во црниот дроб е статистички повисока во однос на бубрезите и мускулниот желудник. Биле утврдени следните средни вредности и стандардни девијации од примероците на ткива: црн дроб ($0,58 \pm 1,04 \mu\text{g/kg}$), бубрези ($0,51 \pm 1,38 \mu\text{g/kg}$), бапка ($0,51 \pm 1,75 \mu\text{g/kg}$).

2.2.3. Изложеност на преживните животни од контаминација со охратоксин А

Се смета дека преживните животни имаат поголема отпорност кон ОТА во однос на другите видови на животни. Оваа особина, највероватно се должи на преджелудочната микропопулација која е способна овој микотоксин да го претвори во неговата помалку токсична форма, ОТА (Mobashar, M. и сор. 2010). Според научните податоци, говедата може да поднесат дневна доза од 12 mg/kg , без никакви последици за нивното здравје (Hult, K. и сор. 1976). Според други научни извори, говедата може да детоксифицираат повторливи дневни дозина ОТА од 33 до 72 mg/kg , а овците од 3 до 7 mg/kg . Младите преживари не го поседуваат овој капацитет поради недоволно развиената микропопулација и тие утинуваат 24 часа по аплицирање на доза од 11 до $25 \mu\text{g/kg}$ (Mobashar, M. и сор. 2010).

И покрај поголемата отпорност на преживарите кон ОТА, сепак други автори потенцираат дека продолжената изложеност преку храната може да резултира со акумулирање во ткивата и појава на последователни негативни здравствени ефекти (Battaccone, G. и сор. 2010). Кај овците, овие ефекти се забележливи при значително пониски дози, па во заклучоците на авторите се наведува дека ОТА-контаминираната храна, сепак не би можела да се смета за целосно безопасна за овие видови на животни (Blank, R. и сор. 2003).

2.2.4. Изложеност на луѓето од контаминација со охратоксин А

Полуживотот на ОТА во крвната плазма и серумот е значително подолг во однос на ткивата, поради афинитетот за врзување со серумските протеини. Coronel, M. B. и сор. (2010) спровеле истражување во повеќе држави, а биле анализирани примероци од 7 664 пациенти за присуство на ОТА. Највисока застапеност била забележана во Шведска,

каде што 74 % од примероците биле позитивни. Концентрациите на ОТА се движеле меѓу 0,15 и 9,15 $\mu\text{g/L}$, со средна вредност од 0,45 $\mu\text{g/L}$. Најниска средна концентрација била утврдена во Јапонија, а највисока во Аргентина.

Во истражувањето спроведено во Италија целта била да се утврди корелацијата помеѓу плазмената ОТА-концентрација, навиките на исхрана, С-реактивниот протеин (CRP) и оценка за ризикот од кардиоваскуларна болест. Биле вклучени 150 мажи и 177 жени ($N = 327$), на возраст помеѓу 38 и 48 години. Квалитативно, било утврдено дека 99,1 % од примероците биле позитивни на ОТА, но само 5,2 % биле со концентрација повисока од минималниот праг (0,5 $\mu\text{g/L}$). Просечниот дневен внес на ОТА изнесувал $0,452 \pm 0,468 \mu\text{g/kg}$ (т.м.). Во заклучоците било наведено дека постои позитивна корелација помеѓу внесувањето на ОТА со храната, ризикот за кардиоваскуларни болести, како и зголемената вредност на CRP (Di Giuseppe, R. и сор. 2012).

Mun, K. и сор. (2006) спровеле истражување во земјоделски региони на Чиле (Colbu'n, San Vicente de Tagua-Tagua), каде што се анализирани 88 примероци, од кои 66 биле позитивни на ОТА. Средните концентрации на ОТА во примероците на крвна плазма од различните региони, се движеле помеѓу 0,44 и 0,77 $\mu\text{g/L}$. Во регионот San Vicente de Tagua-Tagua, средната вредност на ОТА кај жените била значително повисока во однос на мажите. Била утврдена ниска корелација помеѓу ОТА-плазмената концентрација и конзумирањето на житарки и пилешко месо.

Во Западна Канада, во периодот помеѓу 1990 и 1991 година била истражена изложеноста на луѓето на ОТА контаминација. Резултатите покажале дека од вкупно 159 испитани примероци на крв во 1990 година, 63 биле позитивни на ОТА, а во 1991 година, од 160 примероци на крв, 23 биле позитивни на ОТА. Концентрацијата на ОТА во 1990 година се движела помеѓу 0,16 и 35,3 $\mu\text{g/L}$, а во 1991 година помеѓу 0,8 и 8,96 $\mu\text{g/L}$. Во заклучоците било наведено дека не постои корелација во однос на бубрежната функција и полот кај пациентите (Kimberly, O. 1994).

Според Domijan, A.M. и сор. (1999), просечниот внес на ОТА преку храната (110 - 360 $\mu\text{g/kg}$ т.м.) во периодот помеѓу 1997 и 1998 година во Загреб - Хрватска.

Во два региона на Бугарија (Горно Пештене и Бели Извор) биле собирани примероци (крвен серум и урина) од локалните жители ($n = 16$). Од вкупно анализираниите примероци, 25 % биле позитивни на ОТА со концентрација во урината поголеми од 1

ng/mL. Средната квантитативна вредност и за двата региона била $1,59 \pm 0,44 \mu\text{g/L}$. Од примероците на урина, 98 % биле квалитативно позитивни на ОТА со вредности помеѓу 0,01 и $1,91 \mu\text{g/L}$. Во заклучоците се наведува дека овие наоди биле во согласност со претходните истражувања спроведени во Бугарија, и посочуваат дека балканската популација е со повисок степен на изложеност во однос на другите европски земји (Castegnaro, M. и сор. 2003).

Во истражување спроведено во периодот помеѓу 2005 и 2006 година биле опфатени 78 испитаници (18 БЕН позитивни пациенти, 38 деца на БЕН позитивните пациенти и 22 контроли). Биле следени концентрациите на ОТА во крвниот серум и $\beta 2$ -микроглобулинот во урината. БЕН позитивните пациенти, како што и било очекувано, имале значително повисоки концентрации на ОТА во крвниот серум во однос на останатите испитаници, со концентрации меѓу 0,4 и $3,9 \mu\text{g/L}$. $\beta 2$ -микроглобулинот се анализираше кај возрасни потомци на БЕН позитивните и контролните испитаници. Било забележано дека постои висока корелација помеѓу концентрацијата на ОТА во крвниот серум и излучувањето на $\beta 2$ -микроглобулинот во урината, кој е индикатор на нарушена бубрежна функција. Подоцна, во 2009 година, забележано било дека 13 од 38 потомци на БЕН позитивни пациенти, развиле симптоми на БЕН (Yordanova, P. и сор. 2010).

Во Либија биле анализирани 85 примероци на урина од луѓе. Резултатите покажале дека 15,29 % од анализираниите примероци биле позитивни на ОТА, со концентрација помеѓу 0,20 и $2,60 \mu\text{g/L}$. Средната концентрација на ОТА кај жените изнесувала $0,57 \mu\text{g/L}$, а кај мажите $0,70 \mu\text{g/L}$ (Sassi, A.A. и сор. 2010). Во жители од Шпанија (Lleida), исто така биле анализирани примероци на урина во кои постоела позитивна идентификација на ОТА и ОТА. Концентрациите на ОТА биле во опсегот помеѓу 0,057 и $0,562 \mu\text{g/L}$, а за ОТА помеѓу 0,056 и $2,894 \mu\text{g/L}$ (Coronel, M.B. и сор. 2011).

Во Италија биле анализирани примероци од мајчино млеко кај жени доилки. Концентрацијата на ОТА кај позитивните примероци била во опсегот помеѓу 0,08 и $0,54 \mu\text{g/L}$. Во заклучоците се наведува дека ОТА може да се излучува преку мајчиното млеко, загрозувајќи го здравјето на бебињата, но истовремено, овие наоди наведуваат за степенот на изложеност на популацијата во Италија кон ОТА (Miraglia, M. и сор. 1995). Исто такво истражување за присуство на ОТА во млекото кај мајки доилки е спроведено од страна на Skaug, M. A. и сор. (2001). Од 80 испитанички, 21 % биле позитивни на ОТА, со концентрација на ОТА помеѓу 10 ng/L ($0,01 \mu\text{g/L}$) и 128 ng/L ($0,128 \mu\text{g/L}$).

Испитаничките кои во својата исхрана вклучувале паштети од црн дроб, имале зголемени концентрации на ОТА во нивното млеко.

Во истражувањето пак на Maaroufi, K. и сор. (1995) се потенцира поврзаноста на ОТА со нефропатијата која има ендемски карактер во Тунис.

2.3. Контрола на контаминацијата кај земјоделските производи со охратоксин А

2.3.1. Превенција на контаминацијата со охратоксин А, а во периодот пред, за време и по жнеење

Клучно во заштитата на земјоделските производи од контаминација со ОТА или било кој друг микотоксин е да се отстранат факторите кои создаваат оптимални услови за раст на габите. Оштетените плодови или делови од растенијата кои настануваат поради механички, термички или други видови стресови, создаваат оптимална средина за развивање на габите, синтеза и акумулирање на микотоксините (Varga, J. и сор. 2010). Во периодот пред жнеењето важно е да се спроведуваат мерки, како што се: заштита од инсекти и габи, минимизирање на механичките оштетувања на растенијата во текот на култивацијата преку редовна проверка, обезбедување на доволно количини на вода и обезбедување на оптимални услови за складирање (Codex Alimentarius Commission-CAM, 2003).

Според САМ, предложени се конкретни мерки за заштита на културите од ОТА контаминација во фазата на жнеењето. Во следниот текст се наведени препораките опишани во САМ (Codex Alimentarius Commission-CAM, 2003).

- Собирните садови во кои се транспортираат зрнестите култури од полето до објектите за сушење и складирање треба да бидат чисти и суви, без присуство на инсекти или габи;
- Зрнестите култури треба да се заштитат од механички оштетувања или од онечистување од почвата;
- Видливо инфицираните делови од растенијата и плодовите треба да бидат отстранети со цел да се спречи ширење и на останатите здрави култури;
- Треба да се мери влагата во неколку точки на складираниот куп на зрнести култури;
- Житните култури треба да бидат соодветно исушени, со влага не повисока од 15 %, со цел да се превенира габичен раст;

- Оштетените зрна треба да се отстрануваат од купот.

Генерално, важат истите принципи во фазата по жнеењето, која повеќе ги опфаќа мерките за складирање (Codex Alimentarius Commission-CAM, 2003). И во овој случај, оштетените зрна може да претставуваат извор на контаминација со габи и микотоксини (Varga, J. и сор. 2010).

- Свежо ожнеаните зрнести плодови не смеат да бидат влажни или лепливи;
- Кога има високо количество влага треба да се избегне сушењето на сонце кое може да го поттикне растот и развојот на габите;
- Објектите за чување на ожнеаните зрнести плодови треба да бидат заштитени од атмосферски влијанија и да бидат технички исправни (исправна покривна конструкција, добра термичка изолација, заштита од глодари и инсекти, итн.);
- Оштетените зрна треба да се одвојуваат од здравиот куп;
- Треба редовно да се следи евентуалната појава на микотоксини;
- Целокупната опрема која доаѓа во допир со складираните житарки треба да биде чиста, сува и да нема остатоци од габичен раст и микотоксини;
- Треба да постои систем за редовно следење на температурата и влагата во објектот за складирање;
- Треба да постои евиденциски систем во кој ќе се опишуваат и забележуваат одделните чекори на жнеењето и условите на складирањето со цел да се детектираат одредени пропусти и недостатоци при евентуална појава на микотоксини.

Доколку се утврди контаминација со микотоксини во фазата на складирање и обработка, неопходно е да се прекине производниот процес и да се пристапи кон механичко и хемиско чистење на целокупната опрема (Park, D. L. и сор. 1999).

2.3.2. Примена на контролните програми во превенцијата од контаминација со охратоксин А

Со контролните програми за безбедност на храната може да се процени и следи ризикот од контаминација на прехранбените производи со ОТА, а со тоа и изложеноста на човековата популација на микотоксикози. Овие програми треба да обезбедат пообјективно мострирање на репрезентативниот примерок и да ја намалат

субјективизацијата во протоколарниот процес. Поради ова, неопходно е да се изврши валидација на секоја методологија која ќе биде имплементирана во програмата.

Во различни држави, методологиите за валидација и имплементација на овие програми се вршени со различен пристап, но генерално ја постигнале истата цел (Park, D. L. и сор. 1999). Во Франција, програмите за безбедност на храната од ОТА се имплементирани врз основа на истражување спроведено со бубрези од свињи, во 1997 година (Dragacci, S. и сор. 1999), според ЕУ директивата 96/23/ЕС, а се валидираат еднаш годишно. Валидацијата се изведува со точно одредени методи и матрикси (Dragacci, S. и сор. 1999). Во Полска, официјалната контрола за ОТА била спроведена со научно истражување, во периодот помеѓу 2003 и 2012 година. Истражувањето ги вклучило следните животински видови: свињи, говеда, овци, коњи, кокошки, мисирски, патки, гуски и риби (Wisniewska-Dmytrow, H. и сор. 2013).

Без оглед на аналитичкиот пристап, методологијата мора да обезбеди правилен начин на изолација, идентификација и квантификација на истражуваниот контаминент. За валидирање на кој било аналитички метод, неопходно е спроведување на широк спектар експериментални истражувања кои се изведуваат со цел да се утврдат параметрите кои ќе обезбедат најголема веродостојност на методот. Постојат официјални меѓународни институции кои ги пропишуваат и го следат спроведувањето на стандардите и условите за валидација на одредени лабораториски методи, како што се: Европската организација за стандардизација, Европскиот комитет за стандардизација (CEN), и Интернационалната асоцијација на официјални аналитички хемичари (AOAC International) (Gilbert, J. 1999). Комисијата на ЕУ го врши легислативниот и регулативниот дел во однос на аналитичките методи за безбедност на храната кој се имплементирани во ЕУ (2002/657/ЕС).

2.3.3. Примена на системот НАССР во контролата на изложеноста на храната кон охратоксин А

НАССР-системот е конструиран за да ги идентификува критичните точки во производствениот процес на хранливи производи преку имплементирање на стандардизирани протоколи за следење. Во однос на растителната храна, овој систем обезбедува целосна следственост на производството, опфаќајќи ги фазите на култивирање, жнеење, транспортирање, складирање и крајна обработка до финален производ за исхрана, со што се минимизираат ризиците за контаминација со

микотоксини (FAO, 2001). Фазите пред жнеењето се доста непредвидливи и тешки да се контролираат, па многу пореално е критичните контролни точки (ККТ) да се идентификуваат и следат во фазите по жнеењето. На пример, сушењето на житарките може да се смета за ККТ, која ќе се мониторира преку мерењето на процентот на влага и активноста на водата (Codex Alimentarius Commission, 2003).

Воспоставувањето на НАССР-протоколот за заштита од микотоксини, за првпат е донесен во производството на сушени месни производи. Во научно истражување, идентификувано е дека како најголем ризик во овој производствен процес се патогените квасци и токсичните мувли, преку нивните секундарни метаболитички производи (Asefa, D. T. и сор. 2011). Во ова истражување биле употребени два сушени месни производи (Fenalar – сушена-димена нога од јагне; и сушена-димена шунка). Било посочено дека патогените квасци се појавуваат во фазата на димење (ККТ1), додека токсичните мувли се појавуваат во процесот на сушење (ККТ2). Во заклучоците на истражувањето се посочува дека обучувањето на вработените за контрола на овие две ККТ е важно за успешно спроведување на НАССР-системот во заштитата против микотоксикози.

2.4. Регулации кои се однесуваат на контаминацијата со охратоксин А

2.4.1. Регулации за контаминацијата со охратоксин А во добиточната храна

Во табела 3 се приложени дозволените вредности на ОТА во добиточната храна, според регулативата на Европската комисија (2006/576/EC).

Табела 3: Дозволените вредности на ОТА во сточната храна (Европска комисија, 2006, 2006/576/EC)

Житарки и нивни производи	0,25 mg/kg
Крмни смески и концентрати за свињи	0,05 mg/kg
Крмни смески и концентрати за живина	0,01 mg/kg

2.4.2. Регулации за контаминацијата со охратоксин А во животински храни и ткива

Европската комисија на ЕУ нема донесено регулатива за ОТА во животински храни и ткива. Во одредени држави постои регулатива за овие вредности кои се прикажани во табела 4 (Duarte S. C. и сор. 2012).

Табела 4: Максимално дозволени вредности (MRL) за ОТА во производи во животински храни и ткива (Duarte S. C. и сор. 2012)

Држава	Животински храни и ткива	
Македонија	Црн дроб од говеда	10 µg/kg
Данска	Бубрег од свињи	10 µg/kg
Словенија	Млеко и месо	5 µg/kg
Италија	Свинско месо и негови производи	1 µg/kg
Романија	Бубрег од свиња, црн дроб и месо	5 µg/kg

Одредувањето на дневно дозволените количини на ОТА кои не предизвикуваат краткорочни и долгорочни последици за здравјето на луѓето го вршат различни институции кои функционираат на национално или меѓународно ниво. Комитетот на ЈЕСФА пропишува дека релативната неделна количина на ОТА треба да изнесува 112 ng/kg во однос на единица телесната маса (т.м.), односно 16 ng/kg т.м. дневно. Научниот комитет на Европската комисија за храна (SCF - Scientific Committee for Food) пропишува нешто пониски дневно дозволени вредности од 1,2 до 14,0 ng/kg т.м.. Според канадските експерти, дневната толерантна доза може да изнесува од 1,2 до 5,7 ng/kg т.м., со ниво на ризик 10^{-5} , а според нордиските, оваа вредност може да биде 5 ng/kg т.м. (Codex Alimentarius Commission, 1999). Во Италија слични регулативи се донесени во 1999 година, кои се однесуваат на свинското месо и преработките од свинско месо (Ceci, E. и сор. 2007). Во Франција, регулативите за следење на микотоксини во храната се воведени во 1997 година, според ЕУ директивата 96/23/ЕС, а се спроведуваат на годишно ниво (Dragacci, S. и сор. 1999). Во Данска, контролни програми за следење на ОТА се воведени во 1978 година. Според истражувањата спроведени во оваа земја, потенцирано е дека постои сооднос помеѓу концентрациите на ОТА во месото и бубрезите кај свињите. Според данскиот модел на следење на контаминацијата со ОТА, во кланичните трупови каде што најдената концентрација на ОТА изнесува 25 µg/kg, концентрацијата во месото не би требала да содржи повеќе од 40 % од концентрацијата во бубрезите (< 10 µg/kg). Според SCF и ЈЕСФА, граничната вредност од 10 µg/kg може да гарантира безбедност на храната од животинско потекло во јавното здравство (Jørgensen, K., Petersen, A. 2002).

3. Аналитички аспект во утврдувањето на охратоксин А контаминацијата во животински ткива

Лабораториските процедури за анализа на ОТА во животински ткива може да имаат варијации во методологијата, но главно тие се одвиваат во три фази. Најпрво, се започнува со екстракција на токсинот од ткивото со органски растворувач, кој потоа се прочистува, за да се изврши на крај негово квалитативно и квантитативно мерење (Gomra, L. 2013). За првата фаза може да се користат нехлорирани (етил ацетат) и хлорирани (хлороформ и дихлорметан) растворувачи. Нехлорираните се повеќе препорачливи како помали загадувачи на средината, но нивната негативна страна е што вршат неспецифично екстрахирање на ОТА заедно со други материи (поларни супстанции), кои може да попречат во квантитативната проценка. За втората фаза, одредени автори препорачуваат користење на цврстофазна екстракција (SPE) со специфични имуно-афинитетни колони (IAC) (Monaci, L. и sor. 2004; Pittet, A. 2005). Иако, овој метод овозможува високо и стабилно ниво на отчитување на ОТА (Jørgensen, K., Petersen, A. 2002), сепак, други истражувања покажуваат дека слични резултати може да се добијат и со течно-течна екстракција (LLE), со употреба на нехлорирани растворувачи (етил ацетат), и покрај тоа што во процесот се создаваат споредни поларни материи кои може да го отежнат квантифицирањето (Monaci, L. и sor. 2004).

Постојат различни квалитативни и квантитативни методи за детекција на ОТА кои биле користени во научни истражувања. Во квалитативни методи спаѓаат тенкослојната хроматографија - TLC и ELISA, а во квантитативни спаѓаат гасната хроматографија - GC, течната хроматографија (HPLC), течната хроматографија со масена спектрометрија (LC-MS). Квантитативната анализа на ОТА во животински матрикси со течна хроматографија под висок притисок, со флуоресуентен детектор (HPLC-FD) е најприменувана техника која покажува висока сензитивност за ОТА (Pittet, A. 2005, Jørgensen, K., Petersen, A., 2002, Milicevic, D. и sor. 2009a, Mara, G. и sor. 2013).

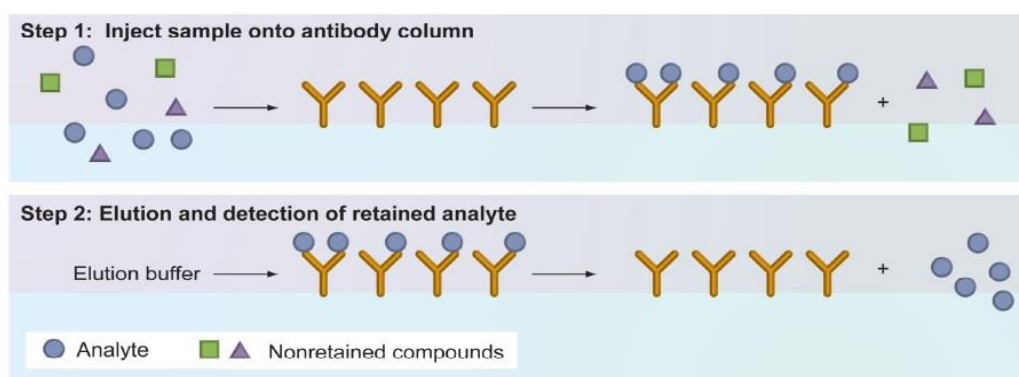
3.1. Екстракцијони техники на охратоксин А од животински ткива

3.1.1 Имуноафинитетни колони (IAC)

Имуноафинитетни колони се вид на цврстофазна екстракција (SPE) кој се применува за прочистување на примерокот. Стационарната фаза на колоната се состои од антитела кои се специфични за целното соединение, селективно врзувајќи го при контакт со примерокот (Moser, A., Hager, D., 2010). Анализот се одвојува преку додавање на

растворувач кој ги денатурира антителата (слика 3). Постојат неколку типови на комерцијални ИАС кои се достапни за фазата на прочистување (Pittet, A. 2005).

Имуноафинитетни колони се користи за прочистување на различни животински ткива како што се: бубрег, црн дроб, мускул, мочен меур, црева и лимфни јазли (Сеси, Е. и сор. 2007; Jorgensen K.; Petersen A. 2002).



Слика 3: Принцип на ИАС (Извор: Moser, A., Hager, D., 2010)

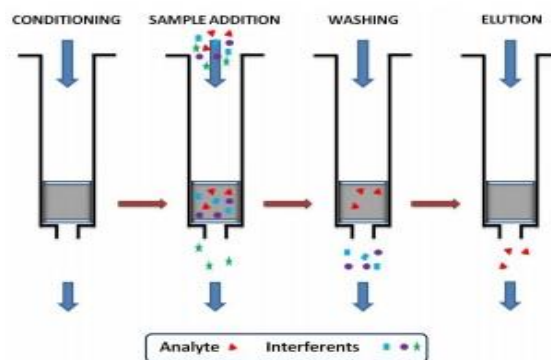
3.1.2 Течно-течна екстракција (LLE)

Течностите со различен поларитет не се раствараат една во друго. ОТА може да се екстрахира од водена фаза во растворач со помала поларност (хлороформ, дихлорометан и етилацетат) (Монаси и сор. 2004, Valenta H, 1998). Густината на етилацетатот изнесува 0,90 g/cm³, додека густината на водата, хлороформот и дихлорометанот изнесуваат 1 g/cm³, 1,49 g/cm³ и 1,33 g/cm³, последователно (Sigma, Aldrich). Растворливоста на етилацетатот, хлороформот и дихлорометанот во вода (g/100 g) изнесува, 8,70 g, 0,82 g, 1,6 g, последователно.

Техниката на прочистување за LLE (бубрег, црн дроб и мускулно ткиво) била употребена од Монаси и сор. (2004), Giacomo и сор. (2006), Milicevic и сор. (2009a). По екстракцијата на ОТА од животинските ткива, тие го користеле етилацетатот како главен растворувач во прочистувањето. Во процедурата за прочистување биле користени натриум бикарбонат и фосфорна киселина 85 % до постигнување на крајна pH вредност од 2,5.

3.1.3 Цврстофазна екстракција со C18-колони (SPE C18)

Цврстофазната екстракција (SPE C18) се користи прочистување на ОТА покрај IAC и LLE. Стационарната фаза на SPE-колониите содржи порозен силикон. На неговата површина се задржува аналитот, но и одредени нечистотии, кои потоа се одвојуваат со користење на растворувач (слика 4) (Pittet, A. 2005).



Слика 4: Шематски приказ на SPE C18-колониите и принципот на реакцијата (Извор: Lucsi, P. и сор. 2012)

Прочистување на ОТА во црн дроб од говеда се врши со SPE C18 (Monaci, L. et al 2004)

3.2 Аналитичка техника за утврдување на охратоксин А со течна хроматографија под висок притисок со флуоресцентен детектор (HPLC-FD) во животински матрикси

Техниката HPLC-FD обезбедува висока сензитивност за анализирање на ОТА, овозможувајќи детекција на исклучително ниски концентрации (Pittet, A. 2005, 56).

Раздвојувањето на ОТА најчесто се врши со реверзно-фазните хроматографски колони (RP) C18. (RP) C18-аналитички колони со различна должина и дијаметер се користени за анализа на ОТА во научните истражувања за животински ткива. Grajewski, J. и сор. (2012), Curtui, V.G. и сор. (2001), Cesi, E. и сор. (2007) користеле C18-хроматографски колони со должина од 250 mm и дијаметер од 5 μ m; Milicevic, D. R. и сор. (2009a), Dragacci, S. и сор. (1999), Matrella, R., Monaci, L. (2006), Monaci, L. и сор. (2004) го вршеле раздвојувањето со C18-хроматографски колони со должина од 150 mm и дијаметер од 5 μ m. Jørgensen, K., Petersen, A. (2002) користеле C18-колони со должина од 125 mm и дијаметер 3 μ m.

ОТА е слаба киселина, па затоа мобилната фаза треба да биде закиселена со цел да се добие поквалитетен хроматограм. Растворот на ацетонитрил со вода има многу поголема сепаратиска ефикасност во споредба со други раствори на мобилна фаза, како што е метанол-вода (Valenta H, 1998). Ацетонитрил/вода/оцетна киселина се користи како мобилна фаза за определување на охратоксините во животински ткина, растворени во различен сооднос (ацетонитрил/вода/оцетна киселина (570:410:20, V/V/V), Curtui, V. G. и сор. (2001), ацетонитрил/вода/оцетна киселина (49.5:49.5:1 V/V/V), Ceci, E. и сор. (2007), ацетонитрил/вода/оцетна киселина, (50:49:1 V/V/V), Jørgensen, K., Petersen, A. 2002).

Во научната литература се прикажени различни вредности (λ_{ex}) и (λ_{em}) за ОТА : 330 (λ_{ex}) и 460 (λ_{em}) nm (Grajewski, J. и сор. 2012), 330(λ_{ex}) и 440 (λ_{em}) nm (Curtui, V.G. и сор. 2001), 333 (λ_{ex}) и 477 (λ_{em}) nm, (Ceci, E. и сор. 2007, 385 (λ_{ex}) и 440 (λ_{em}) nm (Jørgensen, K., Petersen, A. 2002), 334 (λ_{ex}) и 460 (λ_{em}) nm, (Milicevic, D. R. и сор. 2009a, Monaci, L. и сор. 2004 и Matrella, R., Monaci, L. 2006).

Постојат голем број научни истражувања кои ја користеле HPLC-FD за детекција на ОТА во ткива од животинско потекло (табела 6).

Табела 6 : Научни истражувања кои го користат HPLC-FD-методот за детекција на охратоксин А во ткива од животинско потекло:

	Животински вид	Ткиво	Автори
1.	Свињи, говеда, овци, коњи, кокошки, мисирки, гуски, патки и риби	Бубрези, црн дроб, мускули	(Wisniewska-Dmytrow, Н. и сор. 2013)
2.	Диви свињи	Бубрези	(Grajewski, J. и сор. 2012)
3.	Свињи	Бубрези, црн дроб и мускули	(Curtui, V. G. и сор. 2001)
4.	Свињи	Бубрези	(Hou, Y. и сор. 2001)
5.	Свињи	Бубрези, мочен меур, црева, желудник, црн дроб, лимфни јазли и мускули	(Ceci, E. и сор. 2007)
6.	Свињи	Бубрези, мускули	(Jorgensen, K., Petersen, A. 2002)
7.	Свињи	Бубрези	(Dragacci, S. и сор. 1999)
8.	Свињи	Бубрези и црн дроб	(Milicevic, D. R. и сор. 2009a)
9.	Кокошки	Црн дроб, бубрези, желудник	(Milicevic, D. R. и сор. 2012)
10.	Свињи	Црн дроб, бубрези, мускули	(Monaci, L. и сор. 2004)
11.	Свињи	Бубрези, мускули	(Matrella, R. Monaci, L. 2006)

II. ЦЕЛИ НА ИСТРАЖУВАЊЕТО

Истражувањето беше фокусирано на две главни цели:

1. Споредбена анализа на екстракциски техники на охратоксин А од животински ткива и валидација со селекциски пристап на резултатите:

1.) Проценка на три најчесто употребувани екстракциски техники за ОТА, опишани во научната литература (SPE со IAC, LLE, SPE со C18) и нивна споредба со два модифицирани протокола (mLLE и mSPE C18). Поаѓајќи од позитивните и негативните карактеристики на овие техники, целта е да се изврши анализа на нивната ефективност според параметрите кои се предложени во Одлуката на Комисијата (2002/657/EC);

2.) Валидација на HPLC-FD-методот (2002/657/EC) за утврдување на ОТА во животински ткива со екстракциски техники за ОТА, следствено на резултатите од претходната анализа.

2. Квантитативна проценка на охратоксин А кај примероци од животински ткива со географско потекло од Р Македонија

1.) Собирање на примероци од животински ткива со различно географско потекло во Р Македонија;

2.) Квалитативна и квантитативна проценка на ОТА во примероците на ткиво;

3.) Проценка на изложеноста на популацијата во Р Македонија на ОТА;

4.) Споредбена анализа на резултатите со статистички податоци од студии на други балкански и европски држави.

IV. МАТЕРИЈАЛИ И МЕТОДИ

4.1 Материјали

4.1.1 Материјали за екстракција на охратоксин А со имуноафинитетни колони (IAC)

Се вршеше анализа на матрикси од црн дроб (говеда) кои беа збогатени со ОТА стандарден раствор на ниво од 1, 5 и 10 $\mu\text{g/kg}$ и на матрикси од бубрег (свињи) кои беа збогатени со ОТА стандарден раствор на ниво од 1 и 5 $\mu\text{g/kg}$.

4.1.2. Материјали за екстракција на охратокси А со течно-течна екстракција (LLE) и модифицирана течно-течна екстракција (mLLE)

Анализата беше изведена на матрикс бубрег (свињи) за двете техники. За LLE се користеше ОТА стандарден раствор од 5 $\mu\text{g/kg}$, а за mLLE се користеше ОТА стандарден раствор од 1 и 5 $\mu\text{g/kg}$.

4.1.3 Материјали за екстракција на охратоксин А со цврстофазна (SPE) и модифицирана цврстофазна екстракција (mSPE) со C18-колони

Анализата беше изведена на матрикс црн дроб (говеда) кои беше збогатен со ОТА стандарден раствор на ниво од 5 $\mu\text{g/kg}$.

4.1.4. Материјали за анализа на примероците од животински матрикси

Анализите се изведуваа на матрикси од црн дроб и бубрези, во периодот од март 2014 до февруари 2016 година. Примероците се чуваа во замрзната состојба на $-18\text{ }^{\circ}\text{C}$ сè до анализирањето.

4.2. Метод за определување на охратоксин А

4.2.1 Апаратура (течна хроматографија под висок притисок со флуоресцентен детектор HPLC-FD)

Waters Alliance HPLC system e2695 Separation module опремен со 2475 Waters Multi λ флуоресцентен детектор

Хроматографски услови

Колона: Analytical column Supelco (RP C18 150 mm, 4.6 I.D., 5 μm)

Мобилна фаза: Мобилната фаза содржеше изократска смеса на вода:ацетонитрил:глицинска оцетна киселина, 99:99:2 (V/V/V).

Брзина на проток: 1,0 mL/min

Волумен на инјектирање: 100µl

Детекција: флуоресцентен детектор (апсорпција λ_{ex} = 333 nm и емисија λ_{em} = 460 nm).

За идентификација е користено ретенционото време (t_R) на ОТА стандардот. Времето на анализа е 10 минути.

4.2.2 Друга апаратура и прибор

Апарати и прибор за припрема и анализа:

- Аналитичка вага, Sartorius BP 221S
- Азот евапоратор, VLM, Германија
- pH-метар, Sartorius
- Ултразвучна бања со термостат и временски регулатор, Cole Parmer 8891
- Хомогенизатор (T-25 digital Ultra Turrax IKA)
- Мулти ротатор, Grant Bio PTR-60
- Мешалка, Tehnica
- Центрифуга MPV-352R
- Вортекс, Heildolph
- Набрана филтер-хартија, Vicam
- Мембрански филтер, 0,2 µm, Sartorius
- Микрофибер филтер-хартија, Vicam
- Манифолд за поставување на имуноафинитетна колона, Vicam
- Темни вијали од 2 ml, Supelco
- Силанизирани вијали од 4 ml, Supelco
- Варијабилен пипетор од 20 до 200 µl, 100 - 1000 µl,
- Одмерни тиквички од 5,10,25,50 и 100 ml
- Мензури од 50, 100 и 500 ml
- Ерленмаери од 250 ml
- Стаклени инки
- Епрувети
- Пипети од 5 и 10 ml
- Имуноафинитетни колони, *Ochrarep*® R-Biopharm
- SPE C18-колони (100 mg/ml пакување), Rida® R-Biopharm

4.2.3. Реагенси и растворувачи

- Вода (HPLC-чистота), Sigma
- Метанол (HPLC-чистота), Sigma
- Ацетонитрил (RC-isocratic) Carlo Erba
- Дихлорметан (Carlo Erba)
- Етил ацетат (Carlo Erba)
- Натриум хлорид, NaCl, (Carlo Erba)
- Натриум хидроген фосфат, Na₂HPO₄, Merck
- Натриум бикарбонат H₃PO₄, Merck
- Калиум хидроген фосфат, KH₂PO₄, Merck
- Бензен (Merck),
- Глацијална оцетна киселина 100 %
- Фосфорна киселина, H₃PO₄ 85 %

4.2.4 Подготовката на раствори

Стандардни раствори

Подготовката на стандардните раствори е направена според следнава формула:

$$C_1 \times V_1 = C_2 \times V_2$$

C₁: Концентрацијата на основен-раствор;

C₂: Крајна концентрација на растворот;

V₁: Волумен кој се зема од концентрираниот основен раствор;

V₂: Крајен волумен на растворот;

Основен-стандарден раствор (5,0 µg/mL): Аликвот од ОТА стандардот (50 µg/mL Supelco®) беше растворен во мешавина на бензен со оцетна киселина (99:1, v/v), во темна тиквичка од 10 mL. Основниот раствор се чуваше во разладена состојба на -18 °C, а пред употреба, од него се подготвуваше ОТА стандарден раствор со концентрација од 1 000 ng/mL.

Основниот стандарден раствор на ОТА (1 000 ng/mL): 2,5ml основен-раствор (5,0 µg/mL) се ставаат во силанизиран вијал и се упаруваат до суво под струја од азот. На сувиот остаток му се додаваат 2,5ml филтрирана мобилна фаза, и се меша на вортекс. Од овој

раствор 2,0 ml се префрлаат во темна тиквичка од 10 ml и се додава филтрирана мобилна фаза до ознаката (Мобилната фаза е филтрирана низ 0,2 μ m филтер).

ОТА-раствор од 100 ng/mL: 1 ml од 1 000 ng/ml раствор се става во темна тиквичка од 10 ml и се дополнува до ознаката со филтрирана мобилната фаза.

Од подготвените раствори (50, 20, 10, 5, 2,5, 1 and 0,5 ng/ml) беа земани следниве последователни волумени (5 ml, 2 ml, 1 ml, 0,5 ml, 250 μ l, 100 μ l and 50 μ l) од 100 ng/ml. За подготовка на раствор од концентрација 0,1 ng/ml беа употребени 50 μ l од калибрацискиот раствор 20 ng/ml.

Подготовка на Пуфер

Подготовката на пуферите направени според формула:

Маса (g) = концентрација (mol/L) x волумен (L) x моларна маса (g/mol),

2M NaCl : 116,8 g се раствараат во 1 L со дестилирана вода,

0,5 M H_3PO_4 : 34 mL 85 % H_3PO_4 се раствараат до 1 L со 2M NaCl,

PBS пуфер : 8 g NaCl, 1,16 g Na_2HPO_4 , 0,2 g KH_2PO_4 and 0,2 g KCl се раствараат до 1 L со дестилирана вода) и потоа pH се дотерува до 7,3 со 0,2 M NaOH (се раствораат 8 g NaOH во 1L вода.

0,5 mol L^{-1} NaHCO_3 : 42 g NaHCO_3 се раствараат во 1 L дестилирана вода

7 M H_3PO_4 : 47,6 mL 85 % H_3PO_4 се раствараат до 100 mL дестилирана вода

4.2.5 Аналитички процедури

4.2.5.1. Екстракција и прочистување на примероците низ имуноафинитетни колони (IAC)

Методологијата за IAC беше преземена од предходно научно истражување (Jorgensen, K., Petersen, A. 2002)

- Се издвојуваат 25 грама примерок во стаклена чаша за екстракција;
- За матрикс црн дроб, на 25 g примерок, се додаваат 100 mL раствор за екстракција (дихлорметан : етил ацетат, 1:3) и 10 mL 0,5 M H_3PO_4 во 2 M NaCl. За матрикс од бубрег, на секои 25 g примерок, се додава 100 mL раствор за екстракција (етил ацетат) и 10 mL 0,5 M H_3PO_4 во 2 M NaCl;
- Примероците се блендираат неколку минути со хомогенизатор и се мешаат на хоризонтална мешалка во период од 30 min;
- Хомогенизираната смеса се филтрира преку филтер-хартија, а потоа, аликвот од филтратот (10 mL) се упарува до суво под струја од азот;
- Сувиот остаток се раствара во 2 mL метанол и 30 mL PBS-пуфер, а новодобиениот раствор се филтрира со микрофибер филтер-хартија;
- 20 mL од добиениот филтрат се пропуштаат низ имуноафинитетна колона која потоа се мие со 20 mL дестилирана вода;
- ОТА-екстрактот се елуира со 4 mL метанол во стаклена епрувета, а потоа се упарува под струја од азот;
- Сувиот остаток се раствара во 1 mL мобилна фаза во стаклена виала од 2 mL. Така приготвениот примерок е подготвен за анализа на HPLC-FD.

4.2.5.2. Екстракција и прочистување на примероците со течно-течна екстракција (LLE)

Методологијата за LLE беше преземена од предходно научно истражување (Monaci, L. и сор., 2004).

- 20 g бубрег се хомогенизира со 6 mL 1 mol L⁻¹ раствор на фосфорна киселина со хомогенизатор (Ultra Turrax T25), во време од пет минути, при што треба да се постигне рН-вредност од 2,5;
- Аликвота од хомогенизираниот примерок (2,5 g), се префрла во епрувета за центрифугирање, а екстракцијата се врши со 5 mL етил ацетат, 5 min, на 4 000 rpm;
- Органската фаза се отстранува, остатокот повторно се екстрахира, како што е опишано во претходниот чекор, а органските фази потоа се собираат;
- Волуменот на органските фази се сведува на околу 3 mL, па потоа се врши повторна екстракција со 3 mL 0,5 mol L⁻¹ NaHCO₃, рН 8,4 (доколку се формира емулзија, примерокот се разладува за да се овозможи разделување на фазите);
- Водениот екстракт се закиселува до рН 2,5 користејќи 7 mol L⁻¹ H₃PO₄, а потоа се става во ултразвучна бања со цел да се отстрани создадениот CO₂;
- ОТА повторно се екстрахира со 3 mL етил ацетат;
- Органската фаза се упарува под струја од азот;
- Сувиот остаток се раствара во 300 µL мобилна фаза и веднаш се анализира на HPLC (Monaci, L. и сор., 2004).

4.2.5.3. Екстракција и прочистување на примероците со модифициран метод на течно-течна екстракција (mLLE)

Методологијата за (mLLE) беше преземена од претходно научно истражување (Jorgensen, K., Petersen, A. 2002; Monaci, L. и сор. 2004). Овој методот е различен во однос на екстракцијата на ОТА од LLE-методот, како што е опишано во насловот 4.2.5.2. Екстракцијата на ОТА од животински ткива е иста како за IAC-методот, опишан во насловот 4.2.5.1, но прочистувањето се разликува во следниве процедури:

- Се издвојуваат 20 грама примерок во стаклена чаша за екстракција;
- За примероците бубрег, на секои 20 g примерок, се додава 100 mL раствор за екстракција (етил ацетат) и 10 mL 0,5 M H₃PO₄ во 2 M NaCl;
- Примероците се блендираат неколку минути со хомогенизатор и се мешаат со хоризонтална мешалка во период од 30 min;

- Хомогенатот се филтрира низ филтер-хартија. Се одвојува аликвота од 10 mL и се испарува до 3 mL, а потоа се екстрахира со 3 mL 0,5 M NaHCO₃, pH 8,4.
- Водениот екстракт се закиселува со pH 2,5 користејќи 7 mol L⁻¹ H₃PO₄;
- ОТА повторно се екстрахира во 3 mL етил ацетат;
- Органската фаза се упарува под струја од азот.
- Органската фаза се раствора со 300 µL мобилна фаза.

(Jorgensen, K., Petersen, A. 2002, Monaci, L. и сор. 2004)

4.2.5.4. Екстракција и прочистување на примероците со цврстофазната екстракција со C18-колони (SPE C18)

Методологијата за SPE (C18) која се применуваше за анализа на матрикси од црн дроб (говеда) беше преземена од претходно научно истражување (Monaci, L. и сор. 2004). Екстракцијата на ОТА од животински ткива е иста како и за LLE-методот, опишан во насловот 4.2.5.2, но прочистувањето со SPE C18-колони се разликува во следниве процедури:

- Закиселениот воден екстракт на ткивото (pH 2.5 со 7 mol H₃PO₄) се пропушта да помине низ цврстофазната колона (SPE) која претходно е кондиционирана со 2 mL метанол и 2 mL вода. Колоната се промива со 1 mL закиселена вода, со H₃PO₄ и 1.5 mL CH₂Cl₂.
- Елуирањето на ОТА од примероците се врши со 7 mL CH₂Cl₂ во стаклена епрувета, а потоа се упарува под струја од азот и се раствора со 300 µL мобилна фаза (Monaci, L. и сор. 2004).

4.2.5.5 Екстракција и прочистување на примероците со модифициран метод на цврстофазната екстракција со C18-колони (mSPE C18)

Методологијата за SPE (RIDA C18) која се применуваше за анализи на матрикси од црн дроб (говеда) беше преземена од претходно научно истражување (Jorgensen, K., Petersen, A. 2002, Monaci, L. и сор. 2004). Екстракцијата на ОТА од ткива е направена на ист начин како што е опишано и во mLLE-методот, но прочистувањето е направено според SPE C18-методот, опишан во насловот во 4.2.5.4.

4.2.5.6. Методи за анализа на примероците од животински матрикси

Методологијата за IAC беше преземена од предходно научно истражување (Jorgensen, K., Petersen, A. 2002), како што е напишано во наслов 4.2.5.1.

4.3 Валидациски протоколи

Валидацискиот протокол се изведуваше според Одлуката на Комисијата на ЕУ (2002/657/EC). Општите критериуми според кои се вршеше валидацијата се основаа на параметрите за линеарност, специфичност, лимит на детекција (LOD), лимит на квантификација (LOQ), точност, прецизност.

4.3.1. Линеарност на методот

Калибрациската крива за матрикс од црн дроб (говеда) беше изготвена со осум стандардни раствори, со следниве последователни концентрации: 0,1; 0,5; 1,0; 2,5; 5,0; 10,0; 20,0; и 50,0 ng/mL, при што сите стандардни раствори беа инјектирани шесткратно.

Калибрациската крива за матрикс од бубрези (свињи) беше изготвена од шест стандардни раствори, со следниве последователни концентрации: 0,1; 0,5; 1,0; 2,5; 5,0; и 10,0 ng/mL при што сите стандардни раствори беа инјектирани шесткратно.

4.3.2. Специфичност на методот

Специфичноста на методот овозможува разгранучување помеѓу целниот аналит и другите компоненти кои претставуваат интерференции (компонентите на матриксот кои не се цел на испитувањето). Специфичноста се проверува преку споредба на хроматограмите од примероци на животински ткива во кој нема ОТА, со хроматограмите од примероци на животински ткива во кои има точно определена концентрација на ОТА.

4.3.3 Лимит на детекција (LOD) и лимит на квантификација (LOQ)

LOD претставува најниската концентрација на аналитот кој може да се утврди во матриксот. LOQ ја утврдува најниската вредност на аналитот која може да се квантифицира во матриксот.

LOD и LOQ беа пресметани според доленаведените формули:

$$LOD = 3.3 \times SD / \text{наклонот на кривата}$$

$$LOQ = 10 \times SD / \text{наклонот на кривата}$$

За пресметување на стандардната девијација (SD), беа употребени матрикси од црн дроб (говеда) збогатени со ОТА концентрација 0,1 ng/mL ОТА.

4.3.4. Точност на методот

Како референтни вредности за матриксите од црн дроб (говеда), беа користени MRL вредностите за ОТА во ткива од животинско потекло, од истражувања спроведени во Италија, Романија и Данска (1, 5 и 10 µg/kg) (Duarte, C. и сор. 2012). За матриксите од бубрези (свињи), беа употребени MRL за ОТА во истражувања спроведени во Романија и Данска (5 и 10 µg/kg) (Duarte, C. и сор. 2012). Точноста на методот беше проценета со анализирање на збогатени матрикси на црн дроб на три стандардни концентрации (1, 5 и 10 µg/kg), со по 12 повторувања. За матриксите од бубрези (свињи), точноста беше проценета со анализирање на збогатени матрикси на бубрези на две стандардни концентрации (5 и 10 µg/kg), со по 12 повторувања.

Аналитичкиот принос, стандардната девијација (SD) и релативната стандардна девијација (RSD) беа пресметани за три стандардни концентрации (1, 5 и 10 µg/kg) за примероците црн дроб (говеда) и за две стандардни концентрации (5 и 10 µg/kg) за бубрези (свињи).

Аналитичкиот принос (%) : $100 \times \text{измерена количина на ОТА} / \text{додадена количина на ОТА}$

4.3.5. Прецизност на методот

Прецизноста се проценува преку повторливи и репродуцибилни мерења (Singh, R. 2013). Повторливоста (RSD_r) се изразува преку RSD-вредностите од мерењата за точност во три и две стандардни концентрации за матриксите од црн дроб (говеда) и од бубрези (свињи), последователно. Репродуцибилноста (RSD_R) беше проценета со користење на истите матрикси, методи, опрема и персонал, со шесткратни повторувања, во два различни дена. Вредностите за RSD_R беа пресметани според добиените вредности од мерењата спроведени во двата дена.

4.3.6. Проценување на мерна неодреденост за методот

Неодреденоста се проценува со пресметување на грешките кои настануваат во различните фази на анализата според следниве параметри: грешка на стандардот,

репродукцибилност, мерна неодреденост од калибрациона права, неодреденост од волумен (од пипетор 1000 μL) и неодреденост од маса (вага). Употребената методологија за пресметување е преземена од прирачникот NIST Uncertainty Guideline (Taylor, B., Kuzyatt, C. 1994). За проценување на мерната неодреденост при проценување на репродукцибилноста кај матриксите од црн дроб (говеда) и од бубрези (свињи), беше пресметана варијансата на концентрацијата од 5 $\mu\text{g/kg}$ во два различни дена. Неодреденоста на калибрацијата беше пресметана според средната вредност на RSD од осум стандардни концентрации (0,1; 0,5; 2,5; 5,0; 1,0; 10,0; 20,0 и 50,0 ng/mL).

4.4. Параметри за проценка на методот за екстракција на охратоксин А со модифициран течно-течна екстракција (mLLE) и цврстофазна екстракција со C18-колони (mSPE C18)

Калибрациската крива беше изработена со подготвување на пет стандардни раствори во следниве концентрации: 0,5; 1,0; 2,5; 5,0 и 10,0 ng/mL .

Модифицирана LLE-методологија беше проценета врз основа на модифициран метод (Jorgensen, K., Petersen, A. 2002; Monaci, L. и сор. 2004). Проценката на специфичноста, точноста и прецизноста на mLLE се изведуваше со две концентрации (1 и 5 $\mu\text{g/kg}$). За матриксите од бубрези (свињи) беа изведени два сета на мерења со по 12 повторувања на две стандардни концентрации (1 и 5 $\mu\text{g/kg}$). За секоја од нив беше пресметан аналитичкиот принос, релативната стандардна девијација (RSD_r) и релативната стандардна девијација за репродукцибилноста (RSD_R).

Модифицирана SPE C18-методологија беше проценета врз основа на модифициран метод (Jorgensen, K., Petersen, A. 2002; Monaci, L. и сор., 2004). Проценката (специфичноста, точноста и прецизноста) на mSPE C18 беше изведена со матрикот црн дроб (говеда) кои беше збогатен со ОТА-стандарден раствор на ниво од 5 $\mu\text{g/kg}$ (6 повторувања).

4.5. Статистика

За изработување на калибрационите криви при валидациските анализи беше користен моделот на линеарна регресивна анализа. Резидуалните вредности беа пресметани за изведување на вредностите за LOD и LOQ, за mLLE-методот.

Линеарната регресија воспоставува линеарна корелација помеѓу апсцисната (x) – концентрација на анализот и ординатната вредност (y) – отчитаната вредност на инструментот. Оваа релација се изразува преку формулата $y = mx + c$, каде што m го претставува градиентот на линијата, а c е пресекот со y -оската.

Регресивната анализа се изразува преку коефициент на корелација (r) кој го изразува степенот на корелација помеѓу y и x -вредностите (мултипен R ; multiple R). Вредноста на $r = 1.0$, означува 100 % корелација помеѓу вредностите на апсцисата и ординатата, а $r = 0.0$, 0 % корелација, соодветно.

Во анализата на варијанса (ANOVA) беа користени следниве параметри:

Сума на квадрати (SS) – која ја претставува варијабилноста на добиените вредности. Резидуалната вредност претставува сума на квадрираните резидуали, која треба да биде помала во споредба со сумата на квадратите од регресијата. Доколку регресивната линија се совпаѓа со вредностите на анализите, резидуалите ќе имаат ниска вредност.

Средна вредност на квадрати (MS) – едноставно ја претставува сумата на квадрати поделена со степените на слобода (df). Доколку постои висока линеарна корелација, регресивната MS -вредност ќе биде значително поголема во однос на резидуалната MS -вредност.

F-вредност – ја претставува варијансата при ANOVA-анализите. Во сите случаи каде што F-вредноста се карактеризираше со ниска вредност на индексот за веројатност ($P < 0,05$), вредностите на x и y во регресивната крива се сметаа за силно корелирани.

Резидуали – ја претставуваат разликата помеѓу вредноста на опсервацијата и y -вредноста на линеарната регресивна крива. Тие ја рефлектираат поврзаноста помеѓу линеарната регресивна крива и добените вредности од анализите (Barwick, V. 2003).

V. РЕЗУЛТАТИ

1. Валидација на методот HPLC-FD со имуноафинитетни колони (IAC) за детекција на охратоксин А

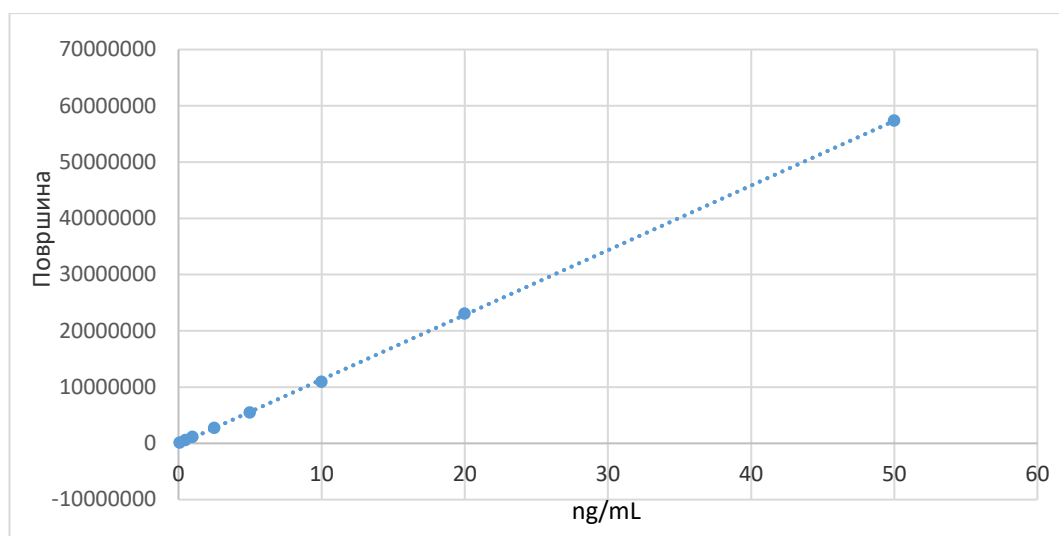
1.1. Резултати од валидациските анализи на црн дроб од говеда со примена на имуноафинитетни колони (IAC)

1.1.1. Линеарност

Со цел проценување на линеарноста на ОТА-екстракцискиот метод со IAC од црн дроб од говеда, извршено е мерење на осум ОТА-стандардни концентрациски раствори 0,1, 0,5, 1,0, 2,5, 5,0, 10,0, 20,0 и 50,0 ng/mL (табела 7). На слика 5 се прикажани калибрациона крива за ОТА. Според формулата за регресивна анализа ($y = bx + a$), вредноста на коефициентот на корелација (R^2) беше $> 0,99$ ($P < 0,05$). Наклонот на кривата (b) изнесуваше 1 149 378, а отсечка на y -оската (a) имаше вредност од 152 916 ($y = 1\,149\,378x - 152\,916$).

Табела 7: Вредности на концентрации за индивидуалните мерења на секој стандарен концентрациски раствор за проценување на линеарноста на методот со црн дроб (говеда)

ng/ml	0,1	0,5	1,0	2,5	5,0	10,0	20,0	50,0
Мерење	Концентрации							
1.	0,23	0,63	1,11	2,56	4,85	9,62	20,23	50,26
2.	0,23	0,62	1,10	2,52	4,85	9,61	20,19	51,25
3.	0,23	0,62	1,11	2,47	4,87	9,60	20,17	50,18
4.	0,23	0,62	1,10	2,48	4,86	9,59	20,14	49,72
5.	0,23	0,62	1,10	2,49	4,86	9,56	20,12	49,43
6.	0,23	0,62	1,10	2,51	4,84	9,57	20,12	49,29
Средна вредност (ng/ml)	0,23	0,62	1,10	2,51	4,86	9,59	20,16	50,02



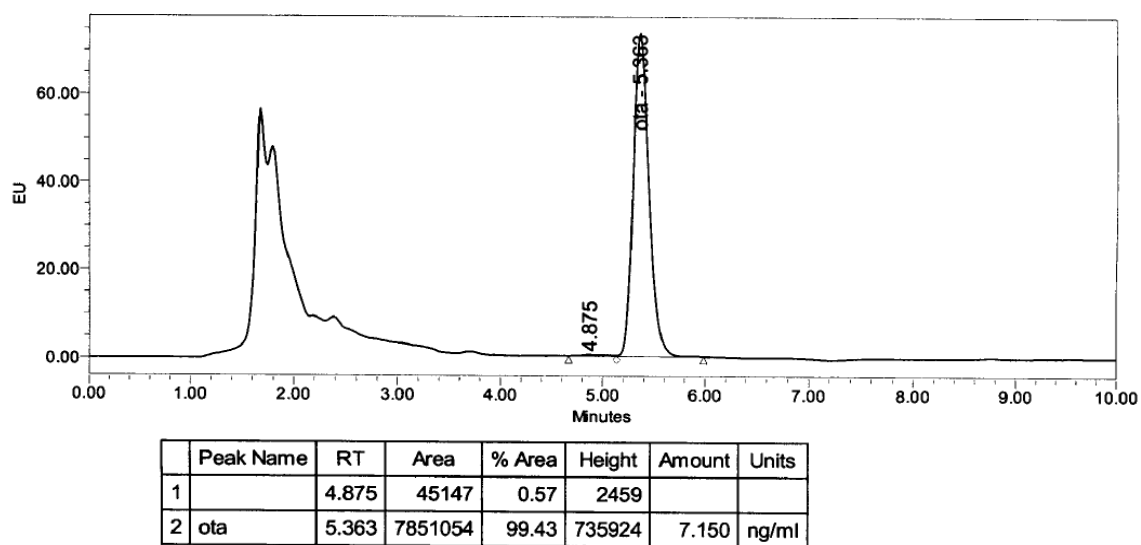
Слика 5. Калибрациона крива на стандардни концентрациски раствори на ОТА (0,1, 0,5, 1,0, 2,5, 5,0, 10,0, 20,0 и 50,0 ng/mL) за проценување на линеарноста на ОТА-екстракцискиот методот со IAC од матрикс од црн дроб (говеда)

1.1.2. Специфичност

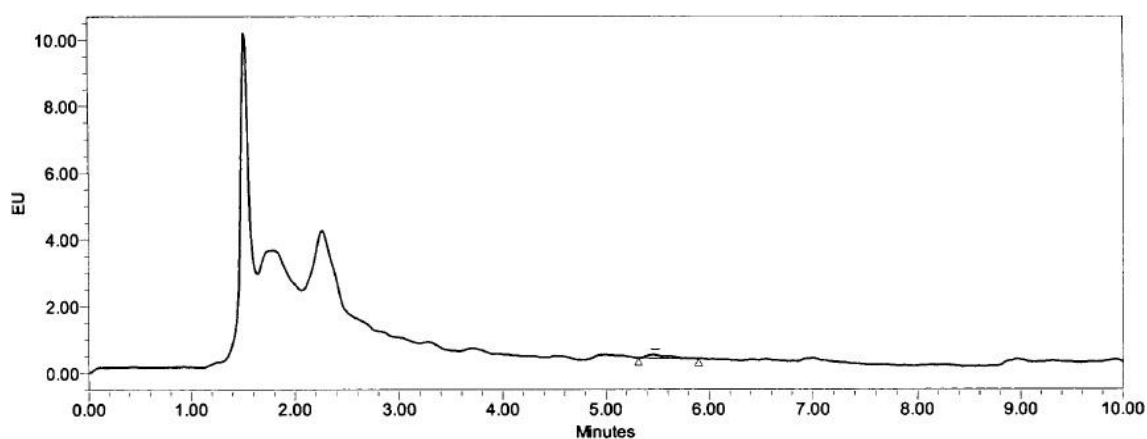
Беа подготвени два контролни примерока, од кои едниот беше позитивна (слика 6), а другиот негативна контрола (слика 7).

Примерокот за позитивна контрола беше збогатен со стандарден раствор на ОТА на ниво од 5,0 µg/kg; додека примерокот за негативна контрола беше подготвен за анализа без додавање на ОТА. Растворот за негативната контрола не покажа присуство на ОТА и други интерферирачки компоненти.

Со анализа на двата примерока на HPLC-FD беше утврдено ретенционото време за ОТА од позитивната контрола, при што пикот излезе на 5,36 минути.



Слика 6. Хроматограм на матрикс од црн дроб (говедо) збогатен со стандарден раствор на ОТА на ниво од 5 µg/kg (позитивна контрола), екстрахиран со IAC



Слика 7. Хроматограм на примерок од црн дроб (говедо) кој не содржи ОТА (негативна контрола), со примена на IAC-екстракција

1.1.3. Лимит на детекција (LOD) и лимит на квантификација (LOQ)

LOD и LOQ беа определени преку измерена површина на дваесет индивидуални мерења на ОТА-стандарден раствор со концентрација од 0,1 µg/kg (табела 8).

LOD = 0,088 µg/kg и LOQ = 0,268 µg/kg.

Табела 8. Вредности за измерена површина на индивидуални мерења на ОТА-стандарден раствор со концентрација од 0,1µg/kg, со дескриптивна статистика

Мерење	Површина на хроматограм
1	126 900
2	129 786
3	128 654
4	143 428
5	142 678
6	138 369
7	140 971
8	134 402
9	132 526
10	109 844
11	130 651
12	130 565
13	133 898
14	61 210
15	55 481
16	55 959
17	135 489
18	146 897
19	132 125
20	121 565
Средна вредност	121 569,9
SD	28 771,3851
RSD (%)	23,6665368

1.1.4. Точност

Со цел да се изврши проценување на точноста на IAC-методот за екстракција на ОТА во црн дроб од говеда, примероци од црн дроб беа збогатени со стандарден раствор на ОТА на три концентрациски нивоа (1, 5 и 10 µg/kg). За секое ниво беа припремени по 12 примероци за анализа. За потребите на проценката беа пресметани средни вредности, стандардна девијација, релативна стандардна девијација (повторливост) (RSDr) и аналитичкиот принос. Во табела 9 се прикажани резултатите од индивидуалните мерења

и пресметаната вредност за претходно наведените статистички дескриптивни параметри.

Табела 9. Резултати од индивидуалните мерења на примероци од црн дроб (говеда) збогатени на три концентрациски нивоа со ОТА со дескриптивна статистика за проценка на точноста на методот

Мерење No.	Концентрации (µg/kg)		
	1,0	5,0	10,0
1	0,82	5,11	10,26
2	0,81	5,12	10,24
3	0,81	5,12	10,21
4	0,78	5,13	8,35
5	0,77	5,12	8,35
6	0,77	5,12	8,33
7	0,75	5,38	7,90
8	0,75	5,38	7,90
9	0,73	5,39	7,89
10	0,72	4,87	10,97
11	0,72	4,87	10,97
12	0,71	4,87	10,97
Средна вредност (µg/kg)	0,76	5,12	9,36
SD (±µg/kg)	0,04	0,19	1,34
RSDr (%)	5,00	3,70	14,26
Аналитички принос (%)	76,20	102,50	93,62

1.1.5. Повторливост и репродукцибилност

За проценување на прецизноста на IAC-методот за ОТА во црн дроб од говеда, извршени се шест индивидуални мерења на примероци од црн дроб (говеда) кои се збогатени со ОТА-стандарден раствор на три концентрациски нивоа и тоа 1, 5 и 10 µg/kg. За проценување на репродукцибилноста на резултатите, извршено е мерење во два одделни денови. Вредностите од поединечните мерења за проценување на репродукцибилноста во првиот и вториот ден се прикажани во табела 10 и 11. За проценување на прецизноста на IAC-методот за ОТА во црн дроб од говеда беа искористени вредностите за релативната стандардна девијација (повторливост) (RSDr) од табела 9 за 1, 5 и 10 µg/kg

(5,00 %, 3,70 % и 14,26 %, последователно) и вредностите за релативната стандардна девијација (репродуцибилност) (RSD_R) од табели 10 и 11 за 1, 5, и 10 $\mu\text{g/kg}$ (2,77 %, 0,16 % и 11,18 %; 2,15 %, 5,48 % и 17,88 %, последователно).

Табела 10. Вредности од индивидуални мерења на примероци од црн дроб (говедо) збогатени на три концентрациски нивоа со ОТА-стандарден раствор екстрахирани со IAC, прв ден, со дескриптивна статистика

Мерење No.	Концентрации ($\mu\text{g/kg}$)		
	1,0	5,0	10,0
1	0,82	5,11	10,26
2	0,81	5,12	10,24
3	0,81	5,12	10,21
4	0,78	5,13	8,35
5	0,77	5,12	8,35
6	0,76	5,12	8,33
Средна вредност ($\mu\text{g/kg}$)	0,79	5,12	9,29
SD ($\pm \mu\text{g/kg}$)	0,02	0,01	1,04
RSD_R (%)	2,77	0,16	11,18
Аналитички принос (%)	78,00	102,38	92,90

Табела 11. Вредности од индивидуални мерења на примероци од црн дроб (говедо) збогатени на три концентрациски нивоа со ОТА-стандарден раствор екстрахирани со IAC, втор ден, со дескриптивна статистика

Мерење No.	Концентрации (µg/kg)		
	1,0	5,0	10,0
1	0,75	5,38	7,89
2	0,75	5,38	7,90
3	0,73	5,39	7,88
4	0,72	4,87	10,97
5	0,72	4,87	10,96
6	0,71	4,87	10,96
Средна вредност (µg/kg)	0,73	5,13	9,43
SD (± µg/kg)	0,02	0,28	1,69
RSD_R (%)	2,15	5,48	17,88
Аналитички принос (%)	73,00	102,52	94,30

1.1.6. Пресметување на неодреденост

Анализата и квантификацијата на мерната неодреденост беше направена според следните параметри: грешка на стандард (SD), репродуцибилност SD(R), мерна неодреденост од калибрациона крива, неодреденост од волумен (од пипетор 1000 μL), неодреденост од маса (вага). Во табела 12 е прикажана пресметката на одделните параметри.

Табела 12. Анализа и квантификација на изворите на неодреденост

Параметар	Вредност	Изразување во %	Пресметка	Крајна вредност
Грешка на стандард (SD)	$\pm 0,407$	$0,407/50 \times 100$	$0,814/1,73$	0,470
Репродуцибилност SD(R)	0,280	$0,280/5 \times 100$	5,6	5,6
Мерна неодреденост од калибрациона крива	0,62165	0,62165	$0,62165/2$	0,311
Неодреденост од волумен (од пипетор 1000 μL)	1,51	$1,51/500 \times 100$	$(1,51/500 \times 100) \times \sqrt{3}$	0,174
Неодреденост од маса (вага)	0,0131	0,0131	$0,0131/2$	0,007

Мерната неодреденост $u^2(y)$ беше пресметана според последователните крајни вредности за параметрите од горенаведената табела ($u_1^2 - u_5^2$). $u = 11,26\%$ (за $k = 2$ со 95 % ниво на веројатност)

1.2. Резултати од валидациските анализи на бубрег од свињи со примена на имуноафинитетни колони (IAC)

1.2.1. Линеарност

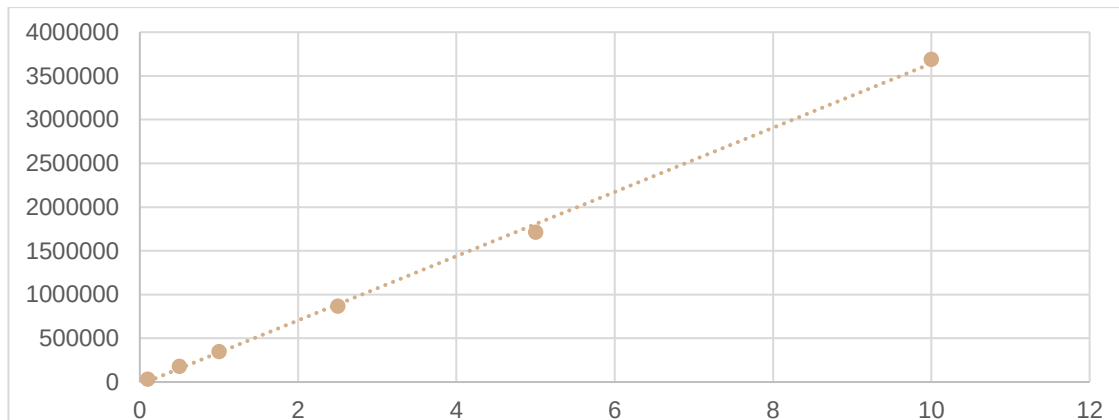
Со цел проценување на линеарноста на ОТА-екстракцискиот метод со IAC за бубрег од свињи, извршена е мерење на шест ОТА-стандардни концентрациски раствори 0,1, 0,5, 1,0, 2,5, 5,0 и 10,0 ng/mL (табела 13). На слика 8 се прикажани калибрациона крива за ОТА. Според формулацијата за регресивна анализа ($y = bx + a$), вредноста на коефициентот на корелација (r^2) беше $> 0,99$ ($P < 0,05$). Наклонот на кривата (b)

изнесуваше 367 137, а отсечка на y -оската (а) имаше вредност од 29 882 ($y = 367\,137x - 29\,882$).

Табела 13. Вредности на концентрации за индивидуалните мерења на секој стандарден концентрациски раствор за проценување на линеарноста на ОТА-екстракцискиот методот со IAC од бубрег од свињи

ng/ml	0,1	0,5	1,0	2,5	5,0	10,0
Мерење	Конценратции					
1.	0,18	0,57	0,99	2,43	4,44	10,46
2.	0,19	0,59	1,03	2,53	5,46	10,73
3.	0,17	0,60	1,04	2,55	5,50	11,09
4.	0,17	0,55	1,05	2,41	5,05	9,59
5.	0,15	0,48	0,99	2,35	4,90	9,34
6.	0,17	0,63	1,07	2,41	3,16	9,59
Средна вредност ng/ml	0,17	0,57	1,03	2,45	4,75	10,13

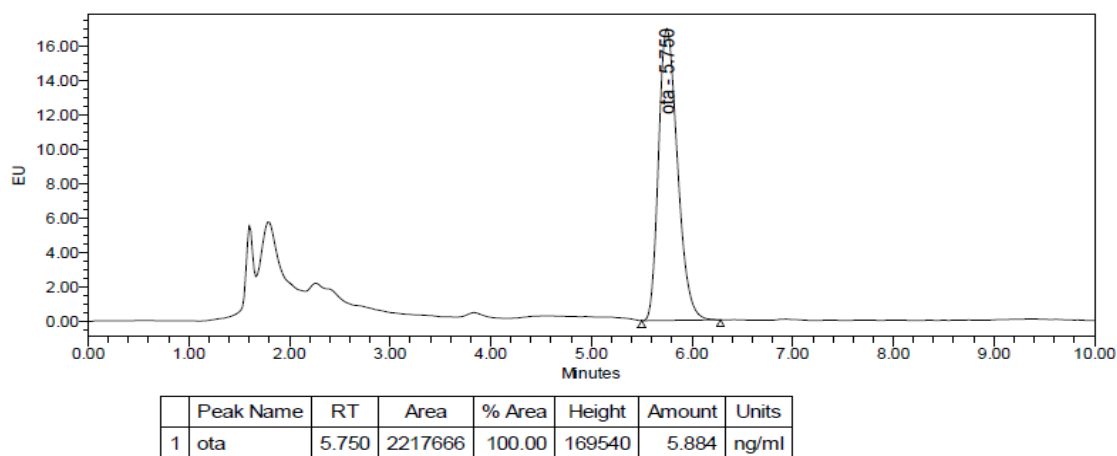
Слика 8. Калибрациона крива на стандардни концентрациски раствори на ОТА (0,1, 0,5, 1,0, 2,5, 5,0 и 10,0 ng/mL) за проценување на линеарноста на ОТА-екстракцискиот методот со ИАС од бубрег од свињи



1.2.2. Специфичност

Специфичноста се проверена преку два контролни примерока (едниот позитивна, а другиот негативна контрола). Примерокот за позитивна контрола беше збогатен со стандарден раствор на ОТА на ниво од 5 $\mu\text{g/kg}$, додека примерокот за негативна контрола беше приготвен без додавање на ОТА. Негативната контрола не покажа присуство на ОТА и други интерферирачки компоненти.

Со нивна анализа на HPLC-FD беше утврдено ретенционото време (RT) за ОТА од позитивната контрола, на 5,750 минути (слика 9).



Слика 9. HPLC-FD-хроматограм на примерок од бубрег во кој е додадена ОТА-концентрација од 5,0 $\mu\text{g/kg}$ (позитивна контрола) екстрахиран со ИАС.

1.2.3. Точност

Со цел да се изврши проценување на точноста на IAC-методот за екстракција на ОТА во бубрежна матрица од свињи, примероци од бубрези беа збогатени со стандарден раствор на ОТА на две нивоа (1 и 5 µg/kg). За секое ниво беа припремени по 12 примероци за анализа. При тоа се пресметани средни вредности, стандардна девијација, релативна стандардна девијација (повторливост) (RSDr) и аналитичкиот принос. Во табела 14 се прикажани резултатите од индивидуалните мерења и пресметаната вредност за претходно наведените статистички дескриптивни параметри.

Табела 14. Вредности од индивидуалните мерења на две концентрациски нивоа со дескриптивна статистика за проценување на точноста на ОТА-екстракцискиот метод со IAC од бубрег од свињи

Мерење No.	Концентрации (µg/kg)	
	1,0	5,0
1	1,16	4,20
2	1,12	4,19
3	1,10	4,38
4	1,14	3,99
5	1,02	4,30
6	1,01	4,04
7	0,85	4,00
8	0,99	3,53
9	0,92	3,51
10	0,96	3,63
11	1,08	3,65
12	1,10	3,08
Средна вредност (µg/kg)	1,04	3,88
SD (± µg/kg)	0,10	0,39
RSDr (%)	9,20	10,12
Аналитички принос (%)	104,00	77,50

1.2.4. Повторливост и репродуцибилност

За проценување на прецизноста на IAC-методот за ОТА во бубрег од свињи извршени се шест индивидуални мерења на примероци од бубрег (свињи) збогатени со стандарден раствор на ОТА на ниво од 1 и 5 µg/kg. За проценување на репродуцибилноста на резултатите, извршено е мерење во два одделни дена. Вредностите од поединечните мерења за проценување на репродуцибилноста во првиот и вториот ден се прикажани во табела 15 и 16. За проценување на прецизноста на IAC-методот за ОТА во бубрег од свињи беа искористени вредностите за релативната стандардна девијација (повторливост) (RSD_r) од табела 14 за 1, и 5 µg/kg (9,20 % и 10,11 %, последователно), како и вредностите за релативната стандардна девијација (репродуцибилност) (RSD_R) од табели 15 и 16 за 1,0 и 5,0 µg/kg (5,74 % и 3,55 %; 9,70 % и 8,31 %, последователно).

Табела 15. Вредности од индивидуални мерења на два ОТА-концентрации во прв ден за проценување на прецизност на IAC-екстракциски метод од бубрег од свињи со декриптивна статистика

Мерење No.	Концентрации (µg/kg)	
	1,0	5,0
1	1,16	4,20
2	1,12	4,19
3	1,10	4,38
4	1,14	3,99
5	1,02	4,30
6	1,01	4,04
Средна вредност	1,09	4,18
SD(± µg/kg)	0,06	0,15
RSD _r (%)	5,74	3,55
Аналитички принос (%)	109,20	83,67

Табела 16. Вредности од индивидуални мерења на два ОТА-концентрации во втор ден за проценување на прецизност на IAC-екстракциски метод од бубрег од свињи, со дескриптивна статистика

Мерење No.	Концентрации (µg/kg)	
	1,0	5,0
1	0,85	4,00
2	0,99	3,53
3	0,92	3,51
4	0,96	3,63
5	1,08	3,65
6	1,10	3,08
Средна вредност	0,98	3,60
SD(± µg/kg)	0,01	0,30
RSD_R (%)	9,70	8,31
Аналитички принос (%)	98,33	71,33

2. Резултати од валидациските анализи на бубрег од свињи со течно-течна екстракција и модифицирана течно-течна екстракција (LLE и mLLE)

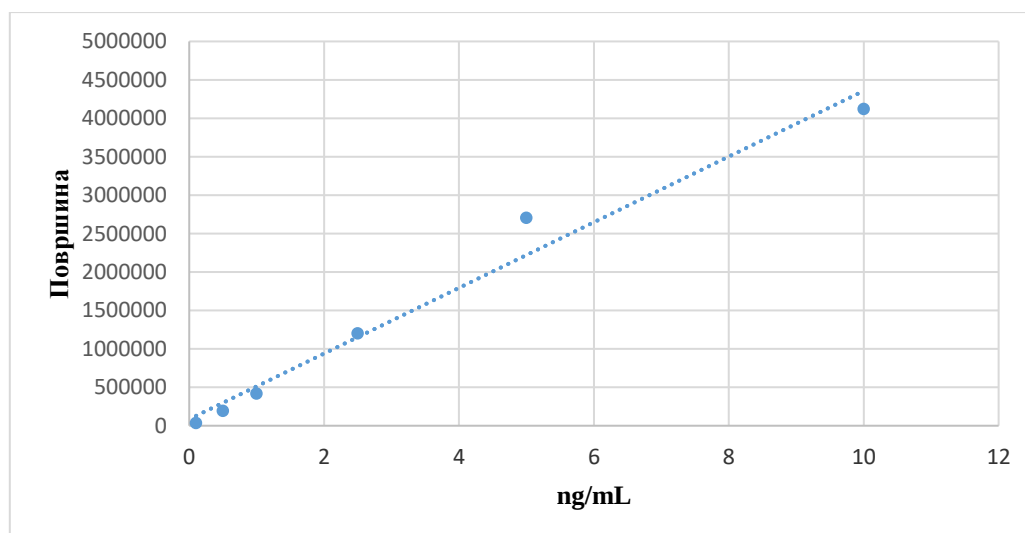
2.1. Резултати од анализите на бубрег од свињи со течно-течната екстракција (LLE)

2.1.1. Линеарност

Со цел проценување на линеарноста на ОТА-екстракцискиот метод со LLE од бубрег од свињи, извршена е анализа на шест ОТА-стандардни концентрациски раствори 0,1, 0,5, 1,0, 2,5, 5,0 и 10,0 ng/mL, (табела 17). На слика 10 се прикажани калибрациона крива за ОТА. Според формулацијата за регресивна анализа ($y = bx + a$), вредноста на коефициентот на корелација (R^2) беше $> 0,98$ ($P < 0,05$). Наклонот на кривата (b) изнесуваше 427 161, а отсечка на y -оската (a) имаше вредност од 85 052 ($y = 427\,161x + 85\,052$).

Табела 17. Вредности на концентрации за индивидуалните мерења на секој стандарден концентрациски раствор за проценување на линеарноста на ОТА-екстракцискиот методот со LLE од бубрег од свињи

ng/ml	0,1	0,5	1,0	2,5	5,0	10,0
Мерење	Конценратции					
1.	0,11	0,27	0,89	2,74	5,75	10,22
2.	0,13	0,22	0,75	2,34	7,18	8,99
3.	0,11	0,25	0,84	2,61	6,35	9,85
4.	0,12	0,25	0,87	2,74	7,60	10,07
5.	0,11	0,25	0,56	2,63	3,77	8,08
Средна вредност						
ng/ml	0,12	0,25	0,78	2,61	6,13	9,44



Слика 10. Калибрациона крива за шест ОТА-стандардни концентрациски раствори (0,1, 0,5, 1,0, 2,5, 5,0 и 10,0 ng/mL) приготвени во мобилната фаза за проценување на линеарноста на ОТА-екстракцискиот методот со LLE од бубрег од свињи

2.1.2. Точност

За проценување на аналитичкиот принос, осум примероци од бубрег се збогатени со стандарден раствор на ОТА на ниво од 5,0 µg/kg и екстрахирани се со LLE-методот. Мерењата имаа средна вредност од 1,25 µg/kg, стандардна девијација од ± 0,37 µg/kg, а следствено, аналитичкиот принос имаше вредност од 25,02 %. Вредностите за поединечните мерења и за дескриптивната статистика се претставени во табела 18.

Табела 18. Вредности на индивидуални мерења на ОТА во збогатени примероци со ОТА-стандарден раствор на ниво од 5,0 µg/kg со дескриптивна статистика за проценување на точноста на ОТА-екстракцискиот метод со LLE од бубрег од свињи

Мерење	Концентрација 5,0 µg/kg
1	1,93
2	1,54
3	1,24
4	1,46
5	0,96
6	1,01
7	0,85
8	1,01
Средна вредност (µg/kg)	1,25
SD (± µg/kg)	0,37
RSDr (%)	29,39
Аналитички принос (%)	25,02

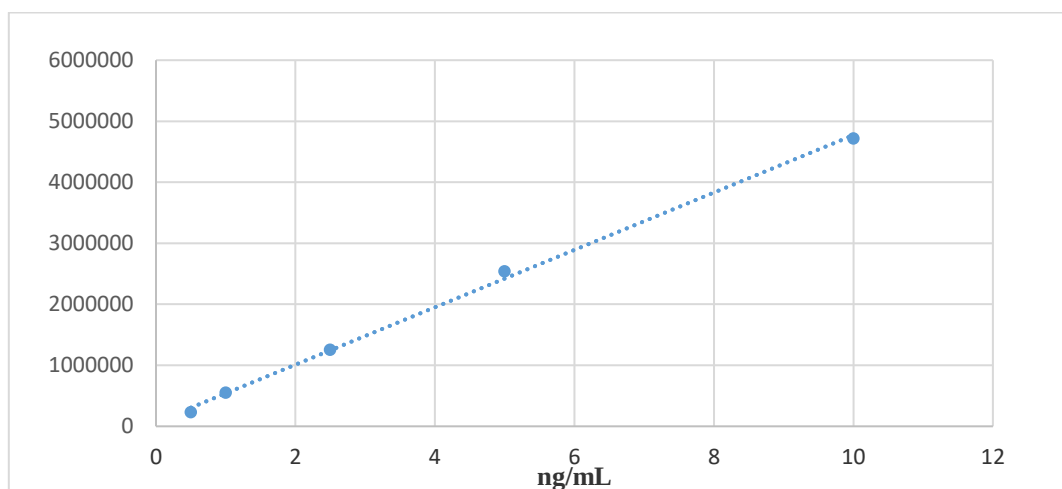
2.2. Резултати од анализата на бубрег од свињи со модифицирана течно-течната екстракција (mLLE)

2.2.1. Линеарност

За проценување на линеарност на mLLE методот за екстрахирање на ОТА, извршени се пет индивидуални мерења на пет ОТА-стандардни концентрациски раствори 0,5, 1,0, 2,5, 5,0 и 10,0 ng/mL (табела 19). На слика 11 се прикажани калибрациони криви за ОТА. Според регресивната анализа на добиените вредности беше утврден коефициентот на корелација (R^2) со вредност од 0,99 ($P < 0,05$). Наклонот на кривата (b) според формулацијата за линеарна регресија ($y = bx + a$) изнесуваше 470 190, а отсечка на y-оската (a) имаше вредност од 69 739 ($y = 470\,190x + 69\,739$).

Табела 19. Вредности на концентрации за индивидуални мерења на секој стандарден концентрациски раствор за проценување на линеарноста на ОТА-екстракцискиот методот со mLLE од бубрег од свињи

ng/ml	0,5	1,0	2,5	5,0	10,0
Мерење	Концентрации				
1.	0,28	0,84	2,52	5,26	9,32
2.	0,26	0,54	2,42	3,46	7,38
3.	0,17	1,06	1,40	3,05	7,31
4.	0,21	1,12	1,71	3,89	8,97
5.	0,26	0,80	2,40	5,80	8,98
Средна вредност ng/ml	0,24	0,87	2,09	4,29	8,39

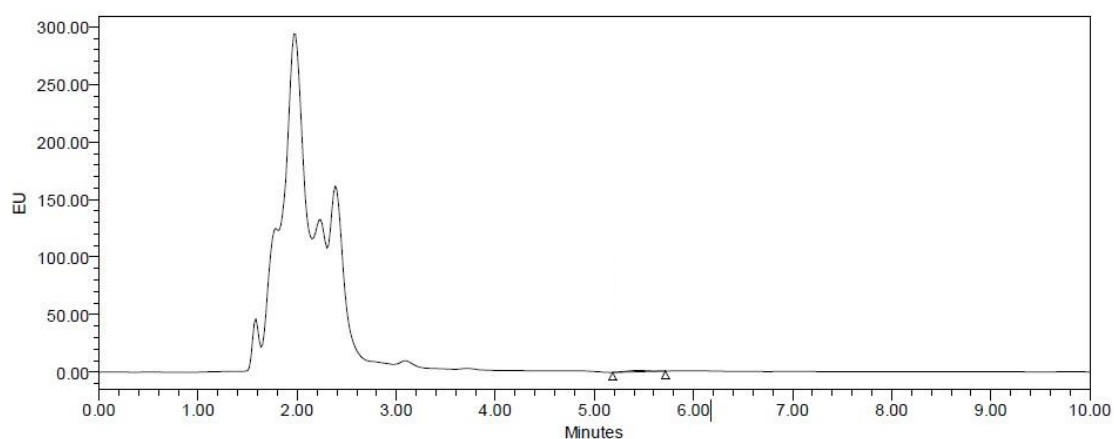


Слика 11. Калибрациона регресиона крива на пет калибрациони стандардни концентрации (0,5, 1,0, 2,5, 5,0 и 10,0 ng/mL) за mLLE-методот за ОТА во бубрег од свињи

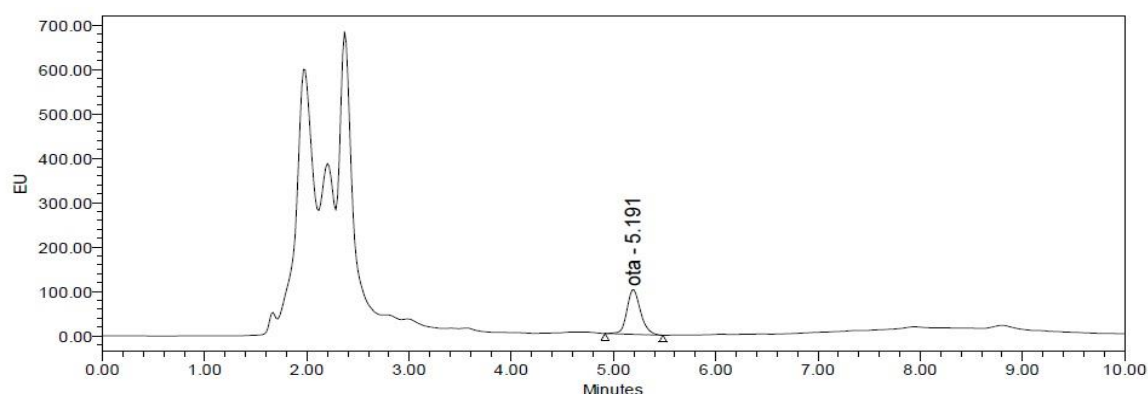
2.2.2. Специфичност

За проценување на специфичноста на mLLE-методот беше проведено преку споредување на примероци на животинска ткиви без ОТА (негативна проба), со хроматограмите од примероци на животински ткива спајкувани со 5 $\mu\text{g/kg}$ ОТА (позитивна проба).

Во слика 12 (негативна проба) и 13 (позитивна проба) се прикажани хроматограми на двата примерока.



Слика 12. Хроматограм на негативна проба бубрег од свиња со примена на mLLE



	Peak Name	RT	Area	% Area	Height	Amount	Units
1	ota	5.191	9309693	100.00	1011434	18.792	ng/ml

Слика 13. Хроматограм на примерок од бубрег од свиња во кој е додадена ОТА на ниво од од 5,0 µg/kg (позитивна контрола) со примена на mLLE.

2.2.3. Лимит на детекција (LOD) и лимит на квантификација (LOQ)

LOD и LOQ за mLLE-методот беа пресметани користејќи ја линеарната регресија според научен труд (Shrivasta A., Gupta V. 2011). Според вредностите за наклонот на кривата (наклонот на кривината: 470 190,3665) и стандардната девијација на y -резидуалите (SD: 74 365,11911), (табела 20) вредностите на LOD и LOQ изнесуваа 0,47 µg/kg и 1,58 µg/kg, последователно.

Табела 20: Добиени резидуални вредности од калибрационата крива за пресметување на LOD и LOQ за mLLE-методот на ОТА-екстракција од бубрег (свињи)

Примероци	Очекувани вредности(y)	y-резидуали
1	4 771 642,872	-56 200,87231
2	2 420 691,04	114 396,9602
3	1 245 215,124	6 941,876451
4	539 929,5738	10 476,4262
5	304 834,3905	-75 614,39055
SD	1 825 586,381	74 365,11911

LOD беше пресметан според следнава формулација:

$$\text{LOD} = 0,47 \text{ } \mu\text{g/kg}, \text{LOQ} = 1,58 \text{ } \mu\text{g/kg}$$

2.2.4. Точност

Со цел да се изврши проценување на точноста на mLLE-методот за ОТА во бубрег од свињи, примероци од бубрези беа збогатени со стандарден раствор на ОТА на две концентрациски нивоа (1 и 5 µg/kg) и тоа по 12 примероци за секоја концентрација. При тоа беа пресметани средни вредности, стандардна девијација, релативна стандардна девијација (повторливост) (RSDr) и аналитичкиот принос. Во табела 21 се прикажани резултатите од индивидуалните мерења и пресметаната вредност за претходно наведените статистички дескриптивни параметри.

Табела 21. Добиени вредности од индивидуалните мерења на збогатени примероци бубрези на две концентрациски нивоа на ОТА (1,0 и 5,0 µg/kg) за проценување на точноста на mLLE-методот за ОТА во бубрежна матрица од свињи

Мерење No.	Концентрации (µg/kg)	
	1,0	5,0
1	1,01	2,93
2	1,12	3,27
3	0,75	3,57
4	0,82	4,26
5	0,97	3,89
6	0,92	3,89
7	1,03	2,73
8	0,97	2,70
9	0,78	3,40
10	0,84	3,43
11	0,95	2,94
12	0,90	2,91
Средна вредност (µg/kg)	0,92	3,33
SD (± µg/kg)	0,11	0,48
RSDr (%)	11,85	14,57
Аналитички принос (%)	92,00	67,00

2.2.5. Повторливост и репродукцибилност

За проценување на прецизноста на mLLE-методот за ОТА во матрикс од бубрег од свињи, по шест примероци бубрези од свињи се збогатени со ОТА на две

концентрациски нивоа и тоа 1,0 и 5,0 µg/kg. За проценување на репродукцибилноста на резултатите, извршено е мерење во два одделни дена. Резултатите од мерењата на на примероците, во двата одделни дена се прикажани во табела 22 и 23. За проценување на прецизноста на mLLE-методот за ОТА во бубрежна матрица од свињи беа искористени вредностите за релативната стандардна девијација (повторливост) (RSD_r) од табела 21 за 1,0 и 5,0 µg/kg (11,85 % и 14,57 %, последователно), и вредностите за релативната стандардна девијација (репродукцибилност) (RSD_R) од табели 22 и 23 за 1 и 5 µg/kg (14,30 % и 13,20 %; 9,99 % и 10.60 %, последователно).

Табела 22. Вредности од индивидуални мерења на две ОТА-концентрации во прв ден за проценување на прецизност на mLLE за ОТА во бубрег од свиња

Мерење No.	Концентрации (µg/kg)	
	1,0	5,0
1	1,01	2,93
2	1,12	3,27
3	0,75	3,57
4	0,82	4,26
5	0,97	3,89
6	0,92	3,89
Средна вредност (µg/kg)	0,93	3,63
SD (± µg/kg)	0,13	0,48
RSD_R (%)	14,30	13,22
Аналитички принос (%)	93,20	72,69

Табела 23. Вредности од индивидуални мерења на две ОТА-концентрации во втор ден за проценување на прецизност на mLLE за ОТА од бубрег од свиња

Мерење No.	Концентрации (µg/kg)	
	1,0	5,0
1	1,03	2,70
2	0,97	3,40
3	0,78	3,43
4	0,84	2,94
5	0,95	2,91
6	0,90	2,73
Средна вредност (µg/kg)	0,91	3,02
SD (± µg/kg)	0,09	0,32
RSD_R (%)	9,99	10,60
Аналитички принос (%)	91,20	60,33

3. Резултати од валидациските анализи на црн дроб од говеда со цврстофазна екстракција (SPE) и модифицирана цврстофазна екстракција (mSPE) со C18-колони

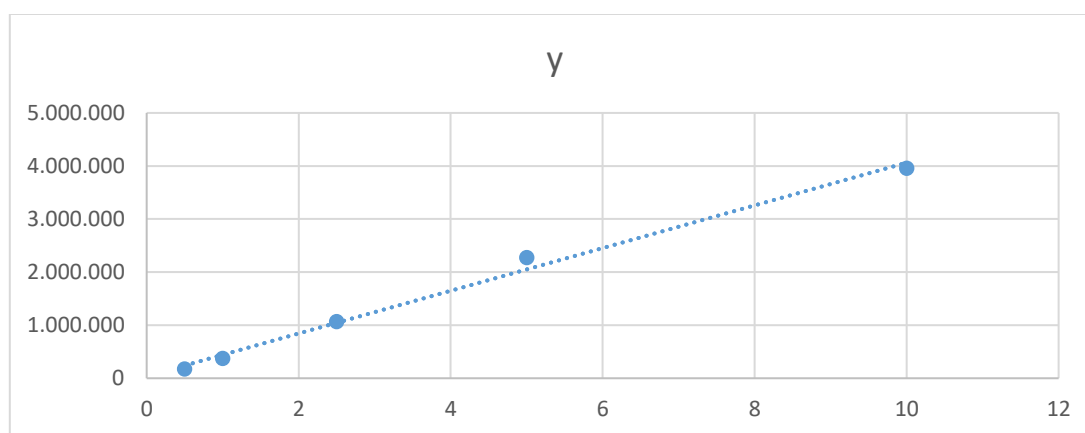
3.1. Резултати од анализите на црн дроб од говеда со цврстофазна екстракција со C18-колони (SPE C18)

3.1.1. Линеарност

Со цел проценување на линеарноста на ОТА-екстракцискиот метод со SPE C18 од црн дроб од говеда, извршено е анализирање на пет ОТА-стандардни концентрациски раствори 0,5, 1,0, 2,5, 5,0 и 10,0 ng/mL (табела 24). Добиените вредности графички се претставени на слика 14. Според формулата за регресивна анализа ($y = bx + a$), вредноста на коефициентот на корелација (R^2) беше $> 0,99$ ($P < 0,05$). Наклонот на кривата (b) изнесуваше 402 295, а отсечка на y-оската (a) имаше вредност од 38 942 ($y = 402\,295x + 38942$).

Табела 24. Вредности на концентрации за индивидуални мерења на секој стандарден концентрациски раствор за проценување на линеарноста на ОТА-екстракцискиот методот со SPE од црн дроб од говеда

ng/ml	0,5	1,0	2,5	5,0	10,0
Мерење	Концентрации				
1.	0,32	0,75	2,36	4,77	11,40
2.	0,35	0,91	2,60	7,73	9,66
3.	0,38	1,01	2,89	6,86	10,57
4.	0,27	0,73	1,97	4,30	8,35
5.	0,38	0,71	2,91	4,12	8,70
Средна вредност					
ng/ml	0,34	0,82	2,55	5,56	9,74



Слика 14. Калибрациона крива за пет ОТА стандардни концентрациски раствори (0,5, 1,0, 2,5, 5,0 и 10,0 ng/mL) приготвени во мобилната фаза за проценување на линеарноста на ОТА-екстракцискиот методот со SPE од црн дроб (говеда)

3.1.2. Точност

Извршени се четири индивидуални мерења на ОТА во примероци црн дроб збогатени на ниво од 5,00 $\mu\text{g/kg}$, и екстрахирана со SPE C18-методот. Индивидуалните мерења

имаа средна вредност од 0,79 µg/kg, стандардна девијација од ± 0,92 µg/kg, а следствено, аналитичкиот принос имаше вредност од 15,89 % (табела 25).

Табела 25. Измерени вредности за ОТА-концентрација од 5,0 µg/kg со SPE C18-методот (црн дроб, говеда)

Мерење	Концентрација 5,00 µg/kg
1	0,05
2	0,07
3	0.02
4	1.98
5	1.08
6	1.56
Средна вредност (µg/kg)	0,79
SD (± µg/kg)	0,92
RSDr (%)	116,5
Аналитички принос (%)	15,89

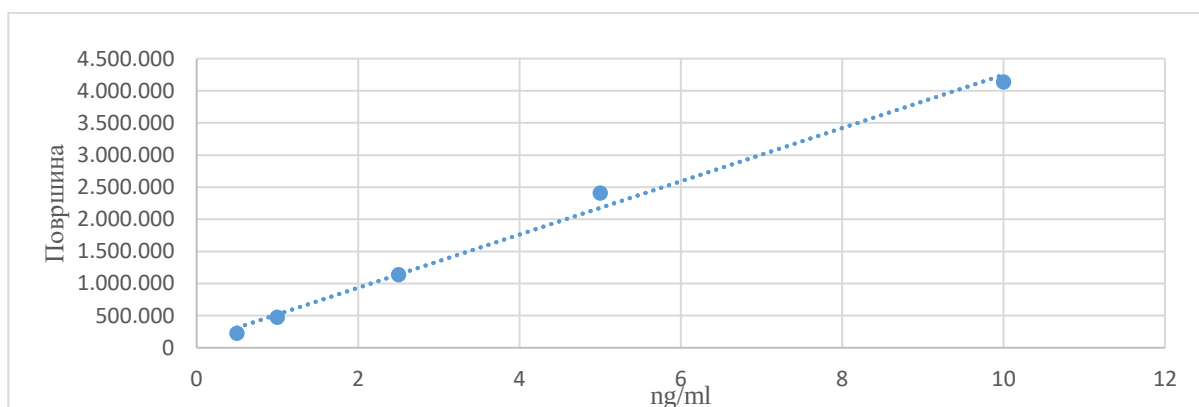
3.2. Резултати од анализите на црн дроб од говеда метод со модифициран цврстофазна екстракција со C18-колони (mSPE C18)

3.2.1. Линеарност

Со цел проценување на линеарноста на ОТА-екстракцискиот метод со mSPE C18 од црн дроб од говеда, извршено е анализирање на пет ОТА-стандардни концентрациски раствори (0,5, 1,0, 2,5, 5,0 и 10,0 ng/mL) (табела 26). Добиените вредности графички се претставени на слика 15. Според формулацијата за регресивна анализа ($y = bx + a$), вредноста на -коефициентот на корелација (R^2) беше $> 0,99$ ($P < 0,05$). Наклонот на кривата (b) изнесуваше 414 359, а пресретнување со отсечка на y-оската (a) имаше вредност од 104 665.

Табела 26. Вредности на концентрации за индивидуални мерења на секој стандарден концентрациски раствор за проценување на линеарноста на ОТА-екстракцискиот методот со mSPE C18 од црн дроб од говеда

ng/ml	0,5	1,0	2,5	5,0	10,0
Мерење	Концентрации				
1.	0,23	0,87	2,77	5,88	10,65
2.	0,21	0,53	2,67	3,84	8,29
3.	0,21	0,82	2,64	6,50	10,10
4.	0,68	1,54	2,02	4,27	10,43
5.	0,18	0,73	2,37	7,35	9,22
Средна вредност	0,25	0,78	2,61	6,13	9,44
ng/ml					



Слика 15. Калибрациона крива за пет ОТА-стандардни концентрациски раствори (0,5, 1,0, 2,5, 5,0 и 10,0 ng/mL) приготвени во мобилната фаза за проценување на линеарноста на ОТА-екстракцискиот методот со mSPE C18 од црн дроб од говеда

3.2.2. Точност

За проценување на аналитичкиот принос, извршени се шест индивидуални мерења на примероци од црн дроб на говеда збогатени со ОТА на ниво од 5 µg/kg, и екстрахирана со mSPE C18-методот. Индивидуалните мерења имаа средна вредност од 0,26 µg/kg, стандардна девијација од $\pm 0,11$ µg/kg, а следствено, аналитичкиот принос имаше вредност од 5,17 %. Вредностите за поединечните мерења и за дескриптивната статистика се претставени во табела 27.

Табела 27. Измерени вредности за ОТА-концентрација од 5,0 µg/kg со mSPE C18-методот (црн дроб од говеда)

Мерење	Концентрација 5,0 µg/kg
1	0,13
2	0,13
3	0,27
4	0,29
5	0,36
6	0,36
Средна вредност (µg/kg)	0,26
SD (± µg/kg)	0,11
RSDr (%)	40,73
Аналитички принос (%)	5,17

4. Резултати од анализа на примероците од животински ткива

4.1. Статистичка дистрибуција на примероците според животинскиот вид, типот на ткивото и географското потекло

За спроведување на овој дел од истражувањето, во текот на 2014, 2015 и почетокот на 2016 година (до март, 2016) беа собрани примероци на животински ткива, од различни видови на животни ($N = 182$). Според животинскиот вид, примероците беа дистрибуирани по следниот десцендентен редослед: свињи 52 % ($n = 94$), јагниња 28 % ($n = 51$), говеда 15 % ($n = 30$), риби 2 % ($n = 4$), и живина 2 % ($n = 3$). Според ткивното потекло, примероците беа дистрибуирани по следниот десцендентен редослед: црн дроб - 57 % ($n = 103$), бубрези - 43 % ($n = 79$). Според географското потекло, примероците беа дистрибуирани по следниот десцендентен редослед: Централна Македонија - 40 % ($n = 73$), Источна Македонија - 39 % ($n = 71$), Западна Македонија - 21 % ($n = 38$). Според географското потекло на примероците од бубрези, десцендентната дистрибуција беше со следниот редослед: Централна Македонија - 44 % ($n = 35$), Источна Македонија - 19 % ($n = 28$), Западна Македонија - 14 % ($n = 16$). Дистрибуцијата на примероците црн дроб според географското потекло беше со следниот редослед: Централна Македонија - 37 % ($n = 38$), Источна Македонија - 42 % ($n = 43$), Западна Македонија - 22 % ($n = 22$).

4.2. Статистичка дистрибуција на примероците според географското потекло, лимитот на детекција и лимитот на квантификација

Во табела 28 е прикажана нумеричката дистрибуција на примероците според географското потекло и LOD ($0,08 \mu\text{g/kg}$), LOQ ($0,268 \mu\text{g/kg}$). Најголем дел од примероците (86 %, $n = 156$) беа со вредност на ОТА, пониска од LOD, а нивната процентуална дистрибуција според географскиот регион на потекло беше во следниот редослед: Централна Македонија (42 %, $n = 65$), Источна Македонија (39 %, $n = 60$), Западна Македонија (20 %, $n = 31$).

Значително помал дел од примероците (8 %, $n = 14$) имаа вредности на ОТА кои спаѓаа во LOD-LOQ, а нивната процентуална дистрибуција според географскиот регион на потекло беше во следниов редослед: Централна Македонија (29 %, $n = 4$), Источна Македонија (42 %, $n = 6$), Западна Македонија (29 %, $n = 4$). Примероците од Источна Македонија (42 %, $n = 5$) имаа најголема застапеност на вредности $> \text{LOQ}$.

Табела 28. Дистрибуција на примероците според географско потекло $\leq$ LOD, LOD-LOQ и $\geq$ LOQ концентрацијата на ОТА

Географски регион	< LOD	LOD-LOQ n	$\geq$ LOQ
Централна Македонија	65	4	4
Источна Македонија	60	6	5
Западна Македонија	31	4	3
ВКУПНО:	156	14	12

Највисоки вредности беа детектирани на ОТА кои беа $\geq$ LOQ со географско потекло од Централна Македонија (црн дроб од свињи - 0,63 $\mu\text{g/kg}$), Источна Македонија (црн дроб од говеда - 0,97 $\mu\text{g/kg}$ и црн дроб од свињи - 0,282 $\mu\text{g/kg}$), Западна Македонија, (црн дроб од свињи - 0,364 $\mu\text{g/kg}$ и црн дроб од говеда - 0,268 $\mu\text{g/kg}$).

4.3. Статистичка дистрибуција на примероците според животински вид, лимитот на детекција и лимитот на квантификација

Во табела 29 е прикажана нумеричката дистрибуција на примероците според животинскиот вид. Најголем дел од примероците (86 %, $n = 156$) беа со вредност на ОТА, пониска од LOD, а нивната процентуална дистрибуција според животински вид беше во следниов редослед: свињи - 52 % ($n = 81$), јагниња - 28 % ($n = 43$), говеда - 16 % ($n = 25$), риби - 3 % ($n = 4$), и живина - 2 % ($n = 3$). Значително помал дел од примероците (8 %, $n = 14$) имаа вредности на ОТА кои спаѓаа во опсегот на LOD-LOQ, а нивната процентуална дистрибуција според животинскиот вид беше во следниов редослед: свињи - 50 % ($n = 7$), јагниња - 35 % ($n = 6$), говеда - 7 % ($n = 1$). Примероците од свињи (50 %, $n = 6$), имаа најголема застапеност на вредности $>$ LOQ.

Табела 29. Дистрибуција на примероците според животинскиот вид и $<$ LOD, LOD-LOQ, $\geq$ LOQ за ОТА

Животински Вид	< LOD	LOD-LOQ N	$\geq$ LOQ
Свињи	81	7	6
Јагниња	43	6	2
Говеда	25	1	4
Риби	4	0	0
Живина	3	0	0
ВКУПНО:	156	14	12

4.4. Статистичка дистрибуција на примероците според типот на животински матрикси, лимитот на детекција и лимитот на квантификација

Во табела 30 е прикажана нумеричката дистрибуција на примероците според типот на животинските матрикси. Најголем дел од примероците (86 %, $n = 156$) беа со вредност на ОТА, пониска од LOD, а нивната процентуална дистрибуција според животински матрикси беше во следниот редослед: црн дроб - 54 % ($n = 85$), бубрег - 46 % ($n = 71$). Значително помал дел од примероците (8 %, $n = 14$) имаа вредности на ОТА кои спаѓаа во опсегот на LOD – LOQ, а нивната процентуална дистрибуција според типот на матрикс беше во следниов редослед: црн дроб - 43 % ($n = 6$), бубрег - 57 % ($n = 8$). Примероците од црн дроб (100 %, $n = 12$), имаа најголема застапеност на вредности > LOQ.

Табела 30. Дистрибуција на примероците според типот на животински матрикси а < LOD, LOD-LOQ, $\geq$ LOQ

Животински Матрикси	< LOD	LOD – LOQ N	$\geq$ LOQ
Црн дроб	85	6	12
Бубрег	71	8	0
ВКУПНО:	156	14	12

VI. ДИСКУСИЈА

1. Проценка на добиените резултати од валидациските студии и модифицирани методи

Согласно целите на оваа докторска дисертација, извршени беа серии на валидациски студии за проценка на линеарноста, специфичноста, точноста, прецизноста, лимитот на детекција (LOD) и лимитот на квантификација (LOQ) на IAC-екстракциските методи на ОТА од матрикси со животинско потекло. За проценување на овие валидациски параметри беше користена регулатива на европската комисија на ЕУ (ЕС 401/2006) која се однесува на методите за мострирање и анализирање на примероци за присуство на микотоксини во храната. Линеарноста на методот треба да биде со вредност на коефициент на корелација (r^2) $> 0,998$ (Singh R., 2013). Според критериумите за точност на методот, вредностите на аналитичкиот принос од последователни мерења на одредени концентрации од аналитот треба да имаат вредности во опсегот помеѓу 70 % и 110 %. Во однос на проценката на прецизноста, регулативата предвидува вредностите за повторливоста ($RDSr$) и репродуцибилноста (RSD_R) да бидат 20 %, односно 30 %, последователно. За добивање на вредноста за репродуцибилност се вршат мерења во два различни дена на истите концентрации од аналитот. Европската Унија нема регулатива која ги пропишува вредностите за MRL во различни животински матрикси, но индивидуално, земјите членки, и оние кои се надвор од ЕУ, имаат утврдено свои сопствени регулативи и вредности. Така на пример, во Македонија, вредноста на MRL за црн дроб изнесува 10 $\mu\text{g/kg}$, а во Италија, вредноста на MRL за свинското месо и негови производи, изнесува 1 $\mu\text{g/kg}$ (Duarte, S.C. et al 2012).

Во анализите беа вклучени методите за ОТА-екстракција со имуноафинитетна колона (IAC), течно-течна екстракција (LLE), модифицирана течно-течна екстракција (mLLE), цврстофазна екстракција со C18 (SPE C18) и модифицирана цврстофазна екстракција со C18 (mSPE C18). За IAC беа користени матрикси од црн дроб (говеда) и бубрег (свињи), со цел да се проценат валидациските параметри за секој од нив. За LLE и mLLE беа користени матрикси од бубрег (свињи), додека за SPE и mSPE беа користени матрикси од црн дроб (говеда). Од валидациските параметри кои беа добиени при анализирање на црн дроб од говеда, со примена на IAC-екстракција на ОТА, сите беа во согласност со ЕС 401/2006. Линеарноста на калибрационата крива (слика 5) имаше висока вредност на коефициентот на корелација ($R^2 > 0,99$), чија F-вредност беше статистички значајна ($P <$

0,05). На слика 6 и 7 се прикажани хроматограми од анализа на позитивна контрола на ОТА со концентрација од 5,00 µg/kg и негативна контрола, при што може да се забележи дека немаа појава на други компоненти како интерферирачки супстанции. Со дванаесетте последователни мерења на примероци збогатени на три концентрациски нивоа на ОТА (1, 5 и 10 µg/kg) (табела 9), ги добивме последователните аналитички приноси: 76,20 %, 102,50 %, и 93,62 %, кои спаѓаат во опсегот на ЕС 401/2006 и индицираат на точност на методот. Вредностите за $RDSr$ и RSD_R беа добиени со анализирање на збогатени примероци на три концентрациски нивоа (1, 5 и 10 µg/kg). Вредностите на $RDSr$, за последователните концентрации изнесуваа 5,00 %, 3,7 % и 14,26 % (табела 9), со што може да се забележи дека спаѓаат во референтниот опсег. Вредностите на RSD_R за последователните ОТА-стандардни концентрации, во првиот ден, изнесуваа 2,77 %, 0,16 % и 11,18 % (табела 10), а за вториот 2,15 %, 5,48 %, и 17,88 % (табела 11). Според добиените вредности на овие два параметра може да се увиди дека тие се во согласност со ЕС 401/2006, потврдувајќи ја прецизноста на методот. Вредностите за LOD и LOQ кои ги добивме со примена на ОТА-екстракцискиот метод од говедски црн дроб, изнесуваа 0,088 µg/kg и 0,268 µg/kg, последователно. Овие резултати индицираат на тоа дека IAC-методот за ОТА-екстракција, со примена на HPLC-FD-методот на квантитативно мерење, има можност за детектирање на ОТА-концентрации пониски од 1,00 µg/kg.

Валидациските параметри при анализирање на бубрег од свињи, со примена на IAC за екстракција на ОТА, беа во согласност со европската регулатива. Од коефициентот на корелација кој изнесуваше $R^2 > 0,99$, можеме да заклучиме дека методот е линеарен (слика 8). Дванаесетте последователни мерења на примероците бубрези од свиња збогатени со ОТА на две концентрациски нивоа (1 µg/kg и 5 µg/kg) дадоа вредности за аналитичкиот принос од 104,00 % и 77,50 %, последователно (табела 14). Точноста на методот е во согласност со ЕС 401/2006. Со последователните мерења примероци бубрези збогатени со ОТА на две концентрациски нивоа од 1 µg/kg и 5 µg/kg, беа пресметани вредностите за повторливоста ($RDSr$) (9,20 % и 10,20 %) (табела 14) и RSD_R прв ден (5,74 % и 3,55 %) (табела 15) и втор ден (9,70 % и 8,31 %) (табела 16). Согласно критериумите на ЕС 401/2006 добиените вредности имплицираа на висока прецизност на методот.

При проценувањето на методот на течно-течна екстракција (LLE) на ОТА од бубрези од свињи, коефициентот на корелација изнесуваше $R^2 > 0,98$. Вредноста на аналитичкиот принос (25,02 %) во повторливи мерења на примероци, со стандардна ОТА-концентрација во примероците од 5 µg/kg (табела 18), не е во согласност со критериумите за проценување на точноста на методот, пропишани во ЕС 401/2006.

Методот на модифицираната течно-течна екстракција (mLLE) од бубрези од свињи покажа висока линеарност на калибрационата крива ($R^2 > 0,99$). Кај негативната контрола не беа забележани дополнителни пикови, освен ОТА (слика 12). Аналитичкиот принос за последователни мерења на ОТА во бубрези збогатени со ОТА на две концентрациски нивоа 1 µg/kg и 5 µg/kg покажаа вредности од 92,00 % и 67,00 %, последователно (табела 21). Согласно ЕС 401/2006, единствено вредноста за аналитички принос на ОТА-стандардната концентрација од 5 µg/kg не беше во пропишаниот опсег за минималната вредност (70 %). Аналитичкиот принос за двете стандардни концентрации е во согласност со вредностите пропишани според Codex Alimentarius (60 – 120 % за концентрации 1–10 µg/kg) (Hou, Y. и сор. 2015). Вредностите на RDSr, изведени од последователните мерења на ОТА во бубрези збогатени со ОТА на две концентрациски нивоа од 1 µg/kg и 5 µg/kg (11,85 % и 14,57 %, последователно, табела 21) беа во согласност со предвидените вредности (≤ 20 %) според ЕС 401/2006. RSDR-вредностите добиени со последователните мерења на истите ОТА-концентрации во првиот (14,30 % и 13,20 %, последователно, табела 22) и вториот ден (9,99 % и 10,60 %, последователно, табела 23) беа под максималната вредност (≤ 30 %) предвидена според ЕС 401/2006. Следствено, добиените вредности за повторливоста и репродуцибилноста и нивната складност со европската регулатива, индицираа на висока прецизност за методот. Вредноста на LOD за свинскиот бубрег изнесуваше 0,47 µg/kg, додека LOQ - 1,58 µg/kg. Овие вредности укажуваат на тоа дека mLLE-методот на екстракција, заедно со детекцијата HPLC-FD, добар метод е за ОТА- концентрации $> 1\mu\text{g/kg}$.

Методите за екстракција на ОТА со примена на SPE и mSPE од матрикс од црн дроб од говеда, покажаа висока линеарност на калибрационата крива ($R^2 > 0,99$ и $> 0,99$). Сепак, методот на SPE и mSPE беа проценети со ниска точност поради вредностите на аналитичкиот принос изведен од последователните мерења на ОТА- концентрации од 5 µg/kg (15,89 %, табела 25) и (5,17 %, табела 27), последователно. Поради неможноста за добивање на аналитички принос, не беа направени понатамошни анализирања за

повторливоста, репродукцибилноста, LOD и LOQ. Линеарноста на методите индицираат дека стандардите имаат висока корелација со вредностите од анализите, но останатите валидациски параметри наведуваат на тоа дека екстракциските методи не се соодветни екстракција на ОТА од животински матрикси.

Методите на ОТА-екстракција со примена на IAC и mLLE беа компатибилни со (ЕС 401/2006). LLE и SPE-методите беа неуспешни во екстракцијата од животински матрикси. Методот со примена на mLLE кој имаше модифицирана процедура, при екстракцијата на ОТА од животински матрикси, индицираше на повисока ефикасност. Методологијата која беше користена за LLE и SPE C18-екстракциските протоколи беше преземена од претходни научни истражувања (Monaci, L. et al. 2004), во кои биле забележани ниски вредности за аналитичкиот принос, како и во ова истражување. Авторите образложило дека голем удел во нискиот аналитички принос има една од фазите на екстракција, но не можеле да прецизираат точно која. Следствено, друга научна студија обработува модифицирана процедура на екстракција со IAC, која придонела за повисоки вредности на аналитичкиот принос преку намалување на недостатоците на употребуваните матрици за екстракција (Jørgensen, K; Petersen, A. 2002). Модифицираниот LLE метод (mLLE) кој вклучува матрикс од бубрези за чија екстракција се користи 100 mL етил ацетат и 10 mL 0,5 M H_3PO_4 во 2 M раствор на NaCl, проследено со фаза на прочистување, покажува повисоки вредности за аналитичкиот принос. Сепак, хроматограмските записи добиени со овој метод не би можеле да се споредуваат според квалитетот на добиените вредности во однос на оние кои би се добиле со IAC-методот. Ова се должи на помалата сензитивност и специфичност на mLLE-методот. Добиените пикови на хроматограмот немаат острина и чистина. Практично, методот е несоодветен при збогатување со многу ниски концентрации на аналитот. Поради оваа причина, пресметките за LOD и LOQ беа направени според калибрационата крива (Shrivastava, A. Gupta, V. 2011). Како што може да се забележи во табела 4, утврдените MRL-вредности се $\geq 1 \mu\text{g/kg}$, па mLLE-методот би можел да се користи како функционален метод во овие случаи. И, покрај неговите недостатоци, тој е доста успешен за екстракција на ОТА од животински матрикси и е економски поисплатлив и попрактичен за лабораториска примена во споредба со IAC, LLE и SPE C18. Во табела 31 се прикажани неколку вакви примери на научни студии:

Табела 31 : Вид на екстракцијата за различни животински ткива и вредности на аналитички принос ($\mu\text{g/kg}$) на ОТА во различни студии

Животински Вид	Екстракцијата	Аналитичен Принос	Референции
свиња	IAC	Мускул $71 \% \pm 19$ Бубрег $53 \% \pm 10$	(Jorgensen, K; Petersen A. 2002)
свиња	SPE	Бубрег $95,18 \%$	(Mara, G. и сор. 2013)
свиња	LLE SPE	Бубрези $86 \% \pm 15$, Мускул $74 \% \pm 8$, Црн дроб 70% .	(Monaci, L. и сор. 2004)
свиња	IAC	Бубрег $74-92 \%$	(Hou, L. и сор. 2015)
свиња	IAC	Бубрег, мочен меур, црева, слезина, црн дроб, лимфни јазли, мускул $85 \% \pm 15$	(Ceci, E. и сор. 2007)
свиња	LLE	Мускул, $90,32 \pm 0,02 \%$ Црн дроб $92,17 \pm 0,03 \%$ Бубрег $95,14 \pm 0,04 \%$	(Giacomo, L. и сор. 2016)
свиња	LLE	Бубрези и црн дроб 71%	(Milicevic, D. и сор. 2009)
свиња	LLE	Бубрег и мускул $86 \% \pm 15$	(Matrella, R. и сор. 2006)

Во табела 32, прикажани се вредностите на LOD и LOQ ($\mu\text{g/kg}$) за ОТА, екстрахиран од различни животински матрикси, кои се пресметани според различни студии. Најниски вредности се добиени според студијата на Giacomo, L. et al. (2016) кој користел ED за екстракција на ОТА (LOD $0,02 \mu\text{g/kg}$ и LOQ $0,001 \mu\text{g/kg}$). Во истата студија, со користење на LLE-методот на екстракција, добиени се вредности на LOD и LOQ - $0,012 \mu\text{g/kg}$ и $0,025 \mu\text{g/kg}$, последователно.

Добиените вредности за LOD и LOQ во валидациските студии на оваа докторска дисертација, добиени за црн дроб од говеда, со користење на IAC-методот изнесуваа $0,088 \mu\text{g/kg}$ и $0,268 \mu\text{g/kg}$, последователно. Тие се во согласност со истражувањата кои се прикажани во табела 32. Вредностите на LOD и LOQ кои се добиени со користење на mLLE-методот на екстракција ($0,47 \mu\text{g/kg}$ и $1,58 \mu\text{g/kg}$, последователно) се повисоки споредбено со другите студии од табела 32. LLE-методот нема доволно висока сензитивност за екстракција на ОТА, но земајќи ја предвид MRL-вредноста во животински матрикси која во повеќето држави не е пониска од $1 \mu\text{g/kg}$ (Duarte, S. C. и сор. 2012), овој метод би можел да биде корисен во аналитичката практика.

Табела 32 : LOD и LOQ вредности ($\mu\text{g/kg}$) на ОТА добиени од животински матрикси, во различни студии

Вид на Ткиво и Животно	LOD	LOQ	Референции	Методи
Бубрег (свиња)	0,02	0,06	(Jorgensen, K; Petersen, A. 2002)	IAC
Мускул (свиња)	0,03	0,09	(Jorgensen, K; Petersen, A. 2002)	IAC
Бубрег (свиња)	0,05	0,16	(Dragacci, S. и сор. 1999)	IAC
Бубрег (свиња)	0,14	0,52	(Monaci, L. и сор. 2004)	LLE
Мускул (свиња)	0,15	0,67	(Monaci, L. и сор. 2004)	LLE
Бубрег (свиња)	0,03	0,1	(Hou, L. и сор. 2015)	IAC
Бубрег, црн дроб, мускул (свиња, говедо, овца, кокошка, мисирка, патка, гуска и риба)	-	0,2	(Wisniewska Dmytrow, H. и сор. 2013)	IAC
Бубрег, мочен меур, црева, слезина, црн дроб, лимфни јазли, мускул (свиња)			(Ceci, E. и сор. 2007)	IAC
Бубрег, црн дроб, мускул (свиња)	0,002	0,001	(Giacomo, L. и сор. 2016)	enzymatic digestion (ED) coupled to high-performance liquid chromatography with a fluorescence detector (HPLC-FLD)
Бубрег, црн дроб, мускул (свиња)	0,012	0,025	(Giacomo, L. и сор. 2016)	LLE

2. Проценка на резултатите од анализа на ткива со потекло од различни региони на Р Македонија

Добиените вредности за ОТА од анализираните примероци на животински матрикси, со потекло од различни географски региони на Р Македонија ($N = 182$), имаа пониски вредности од MRL. И, покрај тоа што балканската ендемична нефропатија (БЕН) и микотоксичната ендемија нефропатија (МЕН) е нотирана во соседните земји (Србија, Бугарија, БиХ, Хрватска и Романија за БЕН, и Бугарија за МЕН) (Khoury A., Atoiu A. 2010; Abouzied M. и сор. 2002; Stoev и сор. 2009), според добиените резултати од анализите на животински матрикси (црн дроб и бубрези од свињи, говеда, јагниња, риби, и живина), со потекло од различни региони на Македонија, опфатени во оваа дисертација, не можевме да имплицираме на контаминација или експозиција на животните со ОТА. Највисоките ОТА-концентрации кои ги детектиравме во матриксите од бубрези ($0,2 \mu\text{g/kg}$) и црн дроб ($0,97 \mu\text{g/kg}$) беа со пониски вредности од MRL утврдени според легислативата на Македонија ($10 \mu\text{g/kg}$ за црн дроб), но и според легислативите за повеќето европски земји, опишани од Duarte S. C. и сор. (2012).

Највисока акумулација на ОТА била забележана во матрикси од црн дроб, бубрези и мускули (Milicevic, D. et al. 2008). Најчесто, ОТА е детектирана во примероци на крвен серум, како што е прикажано во истражувањата, приложени во понатамошниот текст. Според сите овие наоди, постои индикација за поголема акумулација на ОТА во бубрези, отколку во ткивата на црниот дроб и мускулите (табела 33). Како што може да се забележи и во табела 33, досегашните студии, најчесто користеле крв и бубрези како материјал за детекција на ОТА-контаминација.

Табела 33 : ОТА вредности ($\mu\text{g/kg}$) добиени од животински матрикси, во различни студии

Животински вид	Број на примероци	Потекло	Највисоки ОТА Концентрации $\mu\text{g/kg}$	Референции
Свиња	279	Шведска	280 (крв)	(Hult, K. и сор. 1980)
Свиња	216	Норвешка	12,5 (крв)	(Langseth, W. и сор. 1993)
Свиња	52	Романија	13,4 (крвен серум) 3,18 (бубрег) 0,61 (црн дроб)	(Curtui, V. и сор. 2001)
Свиња	300	Данска	0,15 (мускул) 0,50 (бубрег) 0,29 (мускул)	(Jorgensen, K; Petersen, A. 2002)
Свиња	42	Италија	0,59 (бубрег) 0,04 (мускул)	(Matrella, R. и сор. 2006)
Свиња	90	Србија	220,8 (крв) 52,5 (бубрег) 0,84 (црн дроб)	(Milicevic, D. и сор. 2008)
Свиња	60	Србија	33,3 (крвен серум) 19,5 (бубрег) 22,0 (црн дроб) 7,02 (бубрег)	(Milicevic, D. и сор. 2009c)
Живина	90	Србија	3,9 (црн дроб) 9,94 (мускулен желудник)	(Milicevic, D. и сор. 2011)
Диви свињи	101	Полска	2,34 (бубрег) 15,8 (крвен серум)	(Grajewski, J. и сор. 2012)
Свиња	18	Словенија Хрватска	2,75 (далматинска пршута) 2,86 (крашка пршута)	(Pleadin, J. и сор. 2014)
Свиња	40	Кина	0,323 (бубрег)	(Hou Y. и сор. 2015)

VII. ЗАКЛУЧОЦИ

- Според извршените валидациски анализи, на методите за екстракција на ОТА од бубрези од свињи и црн дроб од говеда, би можеле да заклучиме дека истите се во согласност со критериумите на 2002/657/EC и 401/2006/EC;
- Методот на IAC-екстракција и HPLC-FD-детекција и квантификација на ОТА беа успешно валидирани и имплементирани во рутинската аналитичка процедура во лабораторијата за резидуи и контаминенти во храна при ФВМС;
- Споредбените анализи на методите за екстракција на ОТА: IAC, LLE, SPE C18, mLLE и mSPE C18, индицираа на највисоки перформанси за IAC-методот;
- mLLE-методот на ОТА-екстракција од бубрег од свињи покажа задоволително исполнување на критериумите според EC401/2006, но перформансот беше помал во однос на IAC. Според добиените вредности од нашите анализи, индикативно е дека овој метод не е доволно сензитивен за ниски концентрации на аналитот (ОТА), но може да се употреби како поевтин метод доколку се очекуваат вредности $> LOD$;
- LLE, SPE C18 и mSPE C18-методите на ОТА-екстракција од животински матрикси не покажаа високи перформанси;
- Од квалитативната и квантитативната анализа на ОТА во животински матрикси, со потекло од различни географски региони во Р Македонија, увидовме дека најголем дел од примероците (86 %) беа под вредноста за LOD, односно добиените вредности на ОТА не беа веродостојни за дополнителна статистичка обработка и беа квалификувани како негативни на ОТА;
- Од анализираните примероци на животински матрикси, единствено црниот дроб од говедата имаа вредности на ОТА повисоки од LOD, но во нив не беше детектирана вредност повисока од MRL за црн дроб од говеда, според легислативата во Р Македонија ($< 10 \mu\text{g/kg}$);
- Највисоки вредности на ОТА во анализираните матрикси, без оглед на LOD, беа детектирани во Источна Македонија (црн дроб од говеда) и Централна Македонија (црн дроб од свињи) на Р Македонија;
- Со истражувањата спроведени во оваа докторска дисертација би можеле да предложиме дека животинските ткива со потекло од Р Македонија имаат незначително

ниска контаминација со ОТА. Од приложеното би можело да се заклучи дека во констатацијата во Р Македонија не постојат индиции за зголемена преваленција за микотоксични болести и синдроми, споредбено со соседните држави Р Бугарија и Р Србија, кај кои постои висока преваленција за МНП и БЕН.

VIII. СПИСОК НА ЛИТЕРАТУРА И ДРУГИ ИЗВОРИ

- Abed, A. R. (2016). Neurotoxic and Histological Effects of Ochratoxin A in Rats. *International Journal of Multidisciplinary Research and Information*, Vol:2-(1):244-250
- Abouzied, M. M., Horvath, A. D., Podlesny, P. M., Regina, N. P., Metodiev, V.D., Kamenova-Tozeva, R.M.,....Ganev, V.S. (2002). Ochratoxin A Concentrations in Food and Feed from a Region with Balkan Endemic Nephropathy. *Food Additives and Contaminants*, 19(8), 755-64. <http://doi.org/10.1080/02652030210145036>
- Aish, J. L., Rippon, H.E., Barlow T., & Hattersley S.J. (2004). Mycotoxins in food, Detection and Control. (N. Magan & M. Olsen, Eds.). pp(309-327). Woodhead Publishing Ltd.(ISBN 1 85573 728 0)
- Akman, S. A., Adams, M., Case, D., Park, G., & Manderville, R. A. (2012). Mutagenicity of Ochratoxin A and its Hydroquinone Metabolite in the SupF gene of the Mutation Reporter Plasmid Ps189. *Toxins*, 4(4), 267–280. <http://doi.org/10.3390/toxins404026>
- Alvarez, L., Gill, A.G., Ezpeleta, O., Garcia-Jalon, J.A., and Lopez De Cerain, A. (2004). Immunotoxic Effects of Ochratoxin A in Wistar Rats After Oral Administration. *Food and Chemical Toxicology*, 42(5), 825-834. <http://doi.org/10.1016/j.fct.2004.01.005>
- Anli, E., Alkis M., (2010), Ochratoxin A and Brewing Technology: A Review. *J. Inst. Brew.* 116(1), 23–32, Ochratoxins
- Ariyo, A. L., Peter, A. O., Abdulazeez, S. N. and Olatunde, O. H. (2013). Avian Mycotoxicosis in Developing Countries. *Mycotoxin and Food Safety in Developing Countries*, 93–120. Intech. <http://doi.org/10.5772/56050>
- Asefa, D. T., Kure, C. F., Gjerde, R. O., Langsrud, S., Omer, M. K., Nesbakken, T. And Skaar, I. (2011). A HACCP Plan for Mycotoxigenic Hazards Associated With Dry-Cured Meat Production Processes. *Food Control*, 22(6), 831–837. <http://doi.org/10.1016/j.foodcont.2010.09.014>
- Assaf, H., Azouri, H., and Pallardy, M. (2004). Ochratoxin A induces Apoptosis in Human Lymphocytes Through Down Regulation of Bcl-xL. *Toxicological Sciences*, 79(2), 335-344. <http://doi.org/10.1093/toxsci/kfh123>
- Azziz-Baumgartner, E., Lindblade, K., Gieseke, K., Rogers, H. S.,....Chege, W.

- Bowen, A.(2004), Case-control study of an acute aflatoxicosis outbreak, Kenya, 2004, *Environmental Health Perspectives*, 113 (12), 1779-1783,DOI:10.1289/ehp.8384
- Barwick, V.(2003). Preparation of Calibration Curves, A guide to Best Practice. *LGC*.1-27.
 - Battacone, G., Nudda, A. and Pulina, G. (2010). Effects of Ochratoxin A on Livestock Production. *Toxins*, 2(7), 1796–1824. <http://doi.org/10.3390/toxins2071796>
 - Benford, D., Boyle, C., Dekant, W., Fuchs, R., Gaylor, D. W., Hard, G., McGregor, D.B., Pitt, J.I. Plestina, R., Shephard, G., Solfrizzo, M, Verger, P. J. P., Walker, R., Jecfa (Food additive series 47), <http://www.inchem.org/documents/jecfa/jecmono/v47je04.htm>
 - Bennet, W. J. and Klinch, M. (2003), Mycotoxins, *Clinical Microbiology Reviews*, p. 497–516 Vol. 16, No. 3,DOI: 10.1128/CMR.16.3.497–516.2003
 - Biró, K., Solti, L., Barna-Vetró, I., Bagó, G., Glávits, R., Szabó, E. and Fink-Gremmels, J. (2002). Tissue Distribution of Ochratoxin A as Determined by HPLC and ELISA and Histopathological Effects in Chickens. *Avian Pathology : Journal of the W.V.P.A*, 31(2), 141–148. <http://doi.org/10.1080/03079450120118621>
 - Brien, E. O., and Dietrich, D. R. (2004). Mycotoxins Affecting The Kidney. Hook J. et al. (Ed.), *Toxicology of Kidney* ,895–936. Konstanzer Online –Publikations-System(KOPS)
 - Cabanes,F.J.,Bragulat,M.R.,Castellá,G.Ochratoxin A Producing Species in the Genus *Penicillium*.*Toxins*, 2, 1111-1120; Doi:10.3390/toxins2051111
 - Castegnaro, M., Garren, L., Grosso, F., Nikolov, I., Vrabcheva, T., Dragacci, S., ... Alfort, M. (2003). Analysis of Ochratoxin A in Serum and Urine of Inhabitants From an Area With Balkan Endemic Nephropathy : A One Month Follow Up Study. *Medicine and Biology*,10(2), 62–68.UC 616-036.21:616.61(497):[612.461.1+616.15
 - Ceci,E., Bozzo, G., Bonerba, E., Di Pinto, A. and Tantillo, M.G. (2007). Ochratoxin A Detection by HPLC in Target tissues of Swine and Cycological and Histological Analysis. *Food Chemistry*, 105(1), 364-368. <http://doi.org./10.1016/j.foodchem.2006.12.019>
 - Codex Alimentarius Commission. (2003). Code of Practice for the Prevention and

Reduction of Mycotoxin Contamination in Cereals, Including Annexes on Ochratoxin A, Zearlenone Funonisis and Tricothecenes CAC/RCP 51-2003. *Prevention and Reduction of Food and Feed Contamination*, 51, 1–8.

- Codex Alimentarius Commission. “Codex Alimentarius Commission Codex Alimentarius Commission.” *Joint FAO/WHO Food Standards Programme Codex Committee on Food Additives and Contaminants*, Thirty-first July (1999): 1–10.
- Corcuera, L.-A., Ibáñez-Vea, M., Vettorazzi, A., González-Peñas, E., & Cerain, A. L. de. (2011). Validation of a UHPLC-FLD analytical method for the simultaneous quantification of aflatoxin B1 and ochratoxin a in rat plasma, liver and kidney. *Journal of Chromatography. B, Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences*, 879(26), 2733–40.
DOI: 10.1016/j.jchromb.2011.07.039
- Coronel, M. B., Marin, S., Tarragó, M., Cano-Sancho, G., Ramos, A. J. and Sanchis, V. (2011). Ochratoxin A and its Metabolite Ochratoxin alpha in Urine and Assessment of the Exposure of Inhabitants of Lleida, Spain. *Food and Chemical Toxicology*, 49(6), 1436–1442. <http://doi.org/10.1016/j.fct.2011.03.039>
- Coronel, M.B., Sanchis, V. Ramos, A.J. and Marin,S., (2010). Review Ochratoxin A : Presence in Human Plasma and Intake Estimation. *Food Science and Technology International- Ciencia Y Tecnologia de Los Alimentos Internacional*, 16(1), 5-18, <http://doi.org./10.1177/1082013209353359>
- Curtui, V.G., Gareis,M., Usleber,E. and Martlbauer, E., (2001). Survey of Romanian, Slaughtered Pigs for the Occurrence of Mycotoxins: Ochratoxin A, Ochratoxin B and Zearlenone. *Food additives and Contaminants* 18(8), 730-738. <http://doi.org/10.1080/02652030110035101>
- Denli, M. And Perez, J. F.. “Ochratoxins in Feed, a Risk for Animal and Human Health: Control Strategies.” *Toxins* 2.5 (2010): 1065–1077,doi:10.3390/toxins2051065
- Di Giuseppe, R., Bertuzzi, T., Rossi, F., Rastelli, S., Mulazzi, A., Capraro, J., ... Pietri, A. (2012). Plasma Ochratoxin A Levels, Food Consumption, and Risk Biomarkers of a Representative Sample of Men and Women from the Molise Rregion in Italy. *European Journal of Nutrition*, 51(7), 851–860. <http://doi.org/10.1007/s00394-011-0265-5>

- Doi, K., and Uetsuka, K. (2011). Mechanisms of Mycotoxin-Induced Neurotoxicity Through Oxidative Stress-Associated Pathways. *International Journal of Molecular Sciences*, 12(8), 5213–5237. <http://doi.org/10.3390/ijms12085213>
- Domijan, A.M., Perecia, M., Fuchs, R., Luccic, A., Balija, M., Bosanac, I., Institue, (1999). Ochratoxin A in Blood of Healthy Population in Zagreb. *Arhiv Za Higijenu Rada I Toksikologiju*, 50(3), 263-271.
- Dragacci, S., Grosso, F., Bire, R., Fremy, J.M. and Coulon, S. (1999). A French Monitoring Programme for Determining Ochratoxin-A Occurrence in Pig Kidneys. *Natural Toxins*, 7(4). 167-173. [http://doi.org/10.1002/\(SICI\)1522-7189\(199907/08\)](http://doi.org/10.1002/(SICI)1522-7189(199907/08)7(4)<167::AID-NAT167>3.0.CO;2-1)
- Dragan, R.M. Stefanovic, S., Jankovic, S., Radicevic, T.(2012). Risk Analysis and Exposure Assessment of Ochratoxin-A in Serbia, *Vet, World*, Vol.5(7):412-416doi: 10.5455/vetworld.2012.412-416
- Duarte, S C., Pena A., and Lino, C. M. (2011).“Human Ochratoxin A Biomarkers--From Exposure to Effect.” *Critical Reviews in Toxicology* 41.3: 187–212. DOI:10.3109/10408444.2010.529103
- Duarte, S. C., Lino C.M., and Pena, A. (2010). “Mycotoxin Food and Feed Regulation and the Specific Case of Ochratoxin A: A Review of the Worldwide Status.” *Food Additives & Contaminants. Part A, Chemistry, Analysis, Control, Exposure & Risk Assessment* 27.10: 1440–1450. DOI:10.1080/19440049.2010.497166
- Duarte, S. C., Lino, C. M. and Pena, A. (2012).“Food Safety Implications of Ochratoxin A in Animal-Derived Food Products.” *Veterinary Journal* 192.3: 286–292. DOI:10.1016/j.tvjl.2011.11.002
- EFSA (2004).“Opinion of the Scientific Panel on Contaminants in Food Chain on a Request from the Commission Related to Ochratoxin A (OTA) as Undesirable Substance in Animal Feed.” *The EFSA Journal* 101: 1–36.
- Elling, F., and Moller, T. (1973). Mycotoxic Nephropathy in Pigs. *Bulletin of the World Health Organization*, 49(4), 411–418
- European Commission. “Commission Recommendation (2006/576/EU) of 17 August 2006 on the Presence of Deoxynivalenol, Zearalenone, Ochratoxin A, T-2 and HT-2 and Fumonisin in Products Intended for Animal Feeding.” *Official Journal of the European Union* 49.L 229 (2006): 7–9.

- Frisvad, J. C., Frank, J. M., Houbraken, J. A. M. P., Kuijpers, A. F. A., Samson, R. A., (2004). New ochratoxin A producing species of *Aspergillus* section *Circumdati*, *Studies In Mycology*. 50, 23–43
- Giacamo, L., Michele, V., Guido, F., Danilo. M., Luigi, I and Valentina, M. (2016). Determination of Ochratoxin A in Pig Tissues Using Enzymatic Digestion Coupled with High Performance Liquid Chromatography with Fluorescence Detector. *MethodsX*, 3, 171-177.
<http://dx.doi.org/10.1016/j.mex.2016.03.006>
- Gilbert J. (1999) Quality Assurance in Mycotoxin Analysis, Food, Nutrition and Agriculture, FAO Food and Nutrition Division, 33-36
- Gimeno, A. and Martins, M. L. (2003), Mycotoxins and Mycotoxicosis in Animals and Human, *Special Nutrients*, 11-15
- Gompa, L. 2013, “OCHRATOXIN A”: Evaluation of Methodologies for Determination of Ochratoxin A in Food Commodities, Contamination Levels in Different Products Available in the US Market and Evaluation of Fungal Microbiota Associated with some of the Products. *Dissertation & Theses in Food Science and Technology*, 1–147. Retrieved from <http://digitalcommons.unl.edu/foodscidiss/33>
- Grajewski, J., Twarużek, M. and Kosicki, R. (2012). High Levels of Ochratoxin A in Blood Serum and Kidneys of Wild Boars *Sus Scrofa* in Poland. *Wildlife Biology*, 18(3), 272–279. <http://doi.org/10.2981/11-059>
- Grollman, A. P. and Jelaković, B. “Role of Environmental Toxins in Endemic (Balkan) Nephropathy. October 2006, Zagreb, Croatia.” *Journal of the American Society of Nephrology : JASN* 18.11 (2007): 2817–2823.
- Gross-Steinmeyer, K., Weymann, J., Hege, H. G., & Metzler, M. (2002). Metabolism and Lack of DNA Reactivity of the Mycotoxin Ochratoxin A in Cultured Rat and Human Primary Hepatocytes. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50(4), 938–945. <http://doi.org/10.1021/jf0111817>
- Haq, M., Gonzalez, N., Mintz, K., Jaja-chimedza, A., Jesus, C. L. De, Lydon, C., ... Berry, J. P. (2016). Teratogenicity of Ochratoxin A and the Degradation Product , Ochratoxin α , in the Zebrafish (*Danio rerio*) Embryo Model of Vertebrate Development, 8–11. <http://doi.org/10.3390/toxins8020040>
- Heussner, A. H., and Bingle, L. E. H. (2015), Comparative Ochratoxin Toxicity: A Review of the Available Data, (1965), 4253-4282.

- Hibi, D., Kijima, A., Kuroda, K., Suzuki, Y., Ishii, Y., and Jin, M. (2013). Molecular Mechanisms Underlying Ochratoxin A Induced Genotoxicity: Global Gene Expression Analysis Suggests Induction of DNA Double-Strand Breaks and Cell Cycle Progression, 38(1), 57-69.
- Hou, Y., Zhou, J., Li, Y., Xie, J., Zhou, L. and Lv, F. (2015). Determination of Ochratoxin A in Pig Kidneys by Immunoaffinity Cleanup and Ultra-High Performance Liquid Chromatography. *Journal of AOAC International*, 98(6), 1566–1570. <http://doi.org/10.5740/jaoacint.15-170>
- Hult, K., Hokby, E., Gatenbeck, S. and Rutqvist, L. (1980). Ochratoxin A in Blood from Slaughter Pigs in Sweden: Use in Evaluation of Toxin Content of Consumed Feed, 39(4), 828–830
- Hundhausen, C., Boesch-Saadatmandi, C., Matzner, N., Lang, F., Blank, R., Wolfram, S., ... Rimbach, G. (2008). Ochratoxin A Lowers mRNA Levels of Genes Encoding for Key Proteins of Liver Cell Metabolism. *Cancer Genomics and Proteomics*, 5(6), 319–332.
- Inês, R. and Naehrer, K. “A Three-Year Survey on the Worldwide Occurrence of Mycotoxins in Feedstuffs and Feed.” *Toxins* 4.9 (2012): 663–675. DOI:10.3390/toxins4090663
- International Agency for Research on Cancer (IARC). (1993). Ochratoxin A. IARC Monographs on The Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans. Some Naturally Occurring Substances: Food Items and Constituents, Heterocyclic Aromatic Amines and Mycotoxins, 56, 496.
- Iqbal, S. Z., Nisar, S., Asi, M. R. and Jinap, S. (2014). Natural Incidence of Aflatoxins, Ochratoxin A and Zearalenone in Chicken Meat and Eggs. *Food Control*, 43, 98–103. <http://doi.org/10.1016/j.foodcont.2014.02.046>
- Jancova, P., and Siller, M. (2012) Phase II Drug Metabolism, Topics on Drug Metabolism. (D.J. Paxton, Ed.). Intech ISBN: 978-953-51-0099-7
- Joo, Y.D., Kang, C.W., An, B.K., Ahn, J.S., and Borutova, R. (2013). Effects of Ochratoxin A and Preventive Action of a Mycotoxin-Deactivation Product in Broiler Chickens, *Veterinarija Ir Zootechnika*. 61(83), 22-29.
- Jørgensen, K. and Petersen, A. (2002). Content of Ochratoxin A in Paired kidney

- and Meat Samples from Healthy Danish Slaughter Pigs. *Food Additives and Contaminants*, 19(6), 562–7. <http://doi.org/10.1080/02652030110113807>
- Kettner, H. “The Endemic Nephropathy of South-Eastern Europe.” *Bulletin of the World Health Organization* 32 (1965): 431–448. ISSN:00429686
 - Khoury, A., Atoui, A. (2012). Ochratoxin A: General Overview and Actual Molecular Status, *Toxins*, 2, 461-493; Doi:10.3390/toxins2040461
 - Kimberly, O. (1994). The Incidence of Ochratoxin A in Swine and Human Serum and Predictions of its Concentration in Tissue. *Thesis Paper*, 4-117
 - Klarić, M. Š., Rašić D., Peraica M., (2013), Deleterious Effects of Mycotoxin Combinations Involving Ochratoxin A, *Toxins*, 5, 1965-1987; Doi:10.3390/toxins5111965
 - Kovalsky, P. (2016). Mycotoxin Report , Mycotoxin Survey 2015. Biomin Holding GmbH Getzersdorf, Austria.
 - Krogh, P., Elling, F., Friis, C., Hald, B., Larsen, A.E., Lillehøj, E.B., Madsen, A., Mortensen, H.P., Rasmussen, F., and U Ravnkov. (1979). Porcine Nephropathy Induced by Long-Term Ingestion of Ochratoxin A. *Veterinary Pathology* 16 (4): 466–75. doi:10.1177/030098587901600410.
 - Kruger, C. D., Cavaglieri, L. R., Direito, G. M., Keller, K. M., Dalcero, A. M., da, R. R. C. A., ... da Rosa, C. A. R. (2010). Ochratoxin A in Serum of Swine from Different Brazilian States. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, 22(5), 753–756. <http://doi.org/10.1177/104063871002200516>
 - Kuiper-Goodman D., Grant D.L. Ochratoxin-A, WHO Food Additive Series 28 <http://www.inchem.org/documents/jecfa/jecmono/v28je19.htm>
 - Kuiper-Goodman, T. (1999), Approaches To The Risk Analysis of Mycotoxins In The Food Supply, 23,10, FAO Food and Nutrition Division
 - Kumagai, S. (1985). Ochratoxin A: Plasma Concentration and Excretion into Bile and Urine in Albumin-Deficient Rats. *Food and Chemical Toxicology*, 23(10), 941–943. [http://doi.org/10.1016/0278-6915\(85\)90112-7](http://doi.org/10.1016/0278-6915(85)90112-7)
 - Kumar, M., Dwivedi, P., Sharma, A. K., Telang, A. G., Patil, R. D., and Singh, N. D. (2008). Immunotoxicity of Ochratoxin and Citrinin in New Zealand White Rabbits. *World Rabbit Science*, 16, 7–12
 - Langseth, W., Nymoen, U. and Bergsjø, B. (1993). Ochratoxin A in Plasma of Norwegian Swine Determined by an HPLC Column-Switching Method, 1,216-221

- Lopez-Garcia, R., Park, D. L. and Phillips, T. D. (1999), Integrated Mycotoxin Management Systems, FAO Food and Nutrition Division
- Lucci, P., Pacetti, D., Núñez, O. and Frega, N. G. (2012). Current Trends in Sample Treatment Techniques for Environmental and Food Analysis. *Chromatography , the Most Versatile Method of Chemical Analysis*, 127–164. <http://doi.org/DOI:10.5772/47736>
- Maaroufi, K., Achour, A., Hammami, M., El May, M., Betbeder, A. M., Ellouz, F., ... Bacha, H. (1995). Ochratoxin A in Human Blood in Relation to Nephropathy in Tunisia. *Human and Experimental Toxicology*, 14(7), 609–614. Retrieved from <http://www.scopus.com/inward/record.url?eid=2-s2.0-0028980266&partnerID=tZOtx3y1>
- Malagutti, Luca, Zannotti, Michele, Scampini, Andrea and Sciaraffia, F. (2005). Effects of Ochratoxin-A on Heavy Pig Production. *Anim. Res.*, 54, 179–184. <http://doi.org/10.1051/animres:2005019>
- Mally, A., & Dekant, W. (2005). DNA Adduct Formation by Ochratoxin A: Review of the Available Evidence. *Food Additives and Contaminants*, 22 Suppl 1(July 2015), 65–74. <http://doi.org/10.1080/02652030500317544>
- Mally, A., Zepnik, H., Wanek, P., Eder, E., Dingley, K., Ihmels, H., ... Dekant, W. (2004). Ochratoxin A: Lack of Formation of Covalent DNA Adducts. *Chemical Research in Toxicology*, 17(2), 234–242. <http://doi.org/10.1021/tx034188m>
- Malviya, R., Bansal, V., Pal, O. and Sharma, P. (2009). High Performance Liquid Chromatography: A Short Review. *In Vitro*, 2(November), 47–55. [http://doi.org/10.1016/S0969-6997\(11\)00073-1-](http://doi.org/10.1016/S0969-6997(11)00073-1-)
- Manual on the Application of the HACCP System in Mycotoxin Prevention & Control, (2001), Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO) and The International Agency for Atomic Energy (IAEA), 2, Rome
- Mara., G., Savu, C., Dobrea, M, Milca, I and Georgescu.D.(2013) Comparative Assesment of ELISA and HPLC for Ochratoxin A Detection in Pork Kidney Samples, *Bulletin of the University of Agricultural Sciences and Veterinary Medicine Cluj-Napoca*. Veterinary Medicine 70-(2),10
- Marin, D. E., Tabuc, C. and Burgehelea, M. (2009). Ochratoxin : Nature , Origin , Metabolism and Toxic Effects in pigs, 5–17.
- Marin-Kuan, M Ehrlich, V., Delatour, T., Cavin, C., and Schilter, B. (2011).

Evidence for a Role of Oxidative Stress in the Carcinogenicity of Ochratoxin A, 2011. <http://doi.org/10.1155/2011/645361>

- Matrella, R. and Monaci, L. (2006). Ochratoxin A Determination in Paired Kidneys and Muscle Samples from Swines Slaughtered in Southern Italy, 17, 114–117. <http://doi.org/10.1016/j.foodcont.2004.08.008>
- Milicevic, D., Juric, V., Stefanovic, S., Jovanovic, M. and Jankovic, S. (2008). Survey of Slaughtered Pigs for Occurrence of Ochratoxin A and Porcine Nephropathy in Serbia. *International Journal of Molecular Sciences*, 9(11), 2169–2183. <http://doi.org/10.3390/ijms9112169>
- Milicevic, D., Juric, V., Stefanovic, S., Veskovic-Moracanin, S. And Jankovic, S. (2009). Analysis of Ochratoxin A in Pig Tissues Using High Pressure Liquid Chromatography (HPLC) and Liquid Chromatography Tandem Mass Spectrometry (LC/MS/MS) as Confirmative Methods. *Zbornik Matice Srpske Za Prirodne Nauke*, (117), 51–61. <http://doi.org/10.2298/ZMSPN0917051M>
- Milicevic, D., Juric, V., Vukovic, D. and Mandic, M. (2009). Natural Occurrences of Ochratoxicosis in Slaughtered Pigs from Different Regions of Serbia, *Veterinary World* 2(8), 293–298.
- Milicevic, D., Juric, V., Vukovic, D., Mandic, M., Baltic M. (2009). Residue of Ochratoxin A in swine tissues –risk assessment, *Arch Oncol* 2009;17(3-4):56-60, DOI: 10.2298/AOO0904056M
- Milićević, D.R., Stefanović, S., Janković, S., Radičević, T., (2012). Risk analysis and exposure assessment of Ochratoxin A in Serbia, *Vet. World*, 2012, Vol.5(7):412-416, DOI: 10.5455/vetworld.2012.412-416
- Miraglia, M., De Dominicis, A., Brera, C., Corneli, S., Cava, E., Menghetti, E., and Miraglia, E. (1995). Ochratoxin A Levels in Human Milk and Related Food Samples: An Exposure Assessment. *Natural Toxins*, 3(6), 436–444. <http://doi.org/10.1002/nt.2620030606>
- Mobashar, M., Hummel, J., Blank, R., & Südekum, K. H. (2010). *Ochratoxin a in Ruminant – A Review on its Degradation by Gut Microbes and Effects on Animals. Toxins* (Vol. 2). <http://doi.org/10.3390/toxins204809>
- Monaci L, Tantillo, G. and Palmisano, F. (2004). Determination of Ochratoxin A in Pig Tissues by Liquid – Liquid Extraction and Clean-up and High-performance Liquid Chromatography. *Anal Bioanal Chem*, 378, 1777–1782.

<http://doi.org/10.1007/s00216-004-2497-1>

- Morsy, F., Gamal el Din, A., Frrag, A.R.H., Badawi, M.A. and Shaffie Nermeen M., (2012). Macedonian Journal of Medical Sciences, 5(1).40-48. <http://dx.doi.org/10.3889/MJMS.1857-5773.2012.0195>
- Moser, A. and Hage, D. (2010) Immunoaffinity Chromatography: An Introduction to Applications and Recent Developments. *Bioanalysis* 24(4), 769-790. <http://doi.org/10.4155/bio.10.31.Immunoaffinity>
- Moura, M., Machado C. H. and Freire R.B. (2004). Effects of Ochratoxin A on Broiler Leukocytes. *Brazilian Journal of Poultry Science*, 6(3), 187–190, ISSN 1516-635X
- Mun, K., Vega, M., Rios, G., Mun, S. and Madariaga, R. (2006). Preliminary Study of Ochratoxin A in Human Plasma in Agricultural Zones of Chile and its Relation to Food Consumption, 44, 1884–1889. <http://doi.org/10.1016/j.fct.2006.06.008>
- Nährer, K. & Kovalsky, P. (2014), BIOMIN Mycotoxin Survey, A Summary of the Major Threats, 1-4, Australia
- Nährer, K., and Kovalsky P., “A Summary of the Major Insights.” *BIOMIN Mycotoxin Survey* 9 (2014)
- Park, D. L., Njapau, H., and Boutrif, E. (1999), Minimizing Risks Posed by Mycotoxins Utilizing the HACCP Concept, FAO Food and Nutrition Division
-
- Partanen, H. (2012) Transplacental Transfer of Food Contaminants. *Dissertations in Health Sciences, Publications of the University of Eastern Finland*, 110 ISSN (pdf): 1798-5714
- Peraica, M., Radic, B., Lucic, A. and Pavlovic, M. (1999), Toxic Effects of Mycotoxins in Humans, *Bulletin of the World Health Organization*, 77 (9), 755, ISSN:00429686
- Pfohl-leszkowicz, A. (2009). Ochratoxin and Aristolochic Acid Involvement in Nephropathies and Associated Urothelial Tract Tumours, (8), 465–483. <http://doi.org/10.2478/10004-1254-60-2009-2000>
- Pfohl-leszkowicz, A., and Manderville, R. A. (2007). Review Ochratoxin A : An Overview on Toxicity and Carcinogenicity in Animals and Humans. *Molecular Nutrition and Food Research*, 51, 61–99. <http://doi.org/10.1002/mnfr.200600137>
- Pfohl-Leszkowicz, A., Grosse, Y., Kane, A., Creppy, E. E., and Dirheimer, G.

- (1993). Differential DNA Adduct Formation and Disappearance in Three Mouse Tissues After Treatment With the Mycotoxin Ochratoxin A. *Mutation Research – Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, 289(2), 265–273. [http://doi.org/10.1016/0027-5107\(93\)90077-S](http://doi.org/10.1016/0027-5107(93)90077-S)
- Pittett A.,(2005) Modern methods and trends in mycotoxin analysis, Mitt. Lebensm. Hyg. 96, 424–444
 - Qi,X., Yu., T., Zhu,L.,Gao, J., He, X., Huang, K.,... Xu,W.(2014)Ochratoxin A induces Rat Renal Carcinogenicity With Limited Induction of Oxidative Stress Responses. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 280(3), 543-549. <http://doi.org./1016/j.taap.2014.08.030>
 - Raven, H. P., and Johnson, B. G. (2002), *Biology, Sixth Edition, Part IX, Viruses and Simple Organisms*, 719-729, Boston
 - Ray, B. and Bhunia, A. (2010), *Fundamental Food Microbiology, Mycotoxicoza*, 278
 - Richard, J. (2007), Some Major Mycotoxins and Their Mycotoxicoses - An Overview, *International Journal of Food Microbiology* 119 (2007) 3–4, DOI:10.1016/j.ijfoodmicro.2007.07.019
 - Ringot, D., Chango, A., Schneider, Y. J., and Larondelle, Y. (2006). Toxicokinetics and Toxicodynamics of Ochratoxin A, an update. *Chemico-Biological Interactions*, 159(1), 18–46. <http://doi.org/10.1016/j.cbi.2005.10.106>
 - Roseanu, A., Jecu, L., Badea, M. and Evans, R. W. (2010). Mycotoxins: An Overview on their Quantification Methods. *Rom. J. Biochem.*, 47, 79–86
 - Roth, A., Chakor, K., Edmond Euke, C., Kane, A., Roschenthaler, R., and Dirheimer, G. (1988). Evidence For An Enterohepatic Circulation of Ochratoxin-a in Mice. *Toxicology*, 48, 293–308
 - Robinson, K. A. and Robinson, J. F. (2000). LC_Rubinson.pdf. In *Contemporary Instrumental Analysis* (pp. 628–671), ISBN:0137907265
 - Sakthivelan, S. M. and Rao, S. G. V. (2010). Effect of Ochratoxin A on Body Weight, Feed Intake and Feed Conversion in Broiler Chicken. *Veterinary Medicine International*, 2010, 590432. <http://doi.org/10.4061/2010/590432>
 - Sassi, A. A., Sowar, A. R., Barka, M. A. And Zgheel, F. S. (2010). Presence of Ochratoxin A in Human Urine from Al-Jafara Region , Libya : A preliminary study, *Journal of Basic & Applied Mycology* 1, 35–38.

- Saathesh C.C., Sharma, A., Dwivedi P., Prasanna K., Patil, R.D. and Rahul S. (2005), Immunosuppressive Effect of Ochratoxin A. pdf. *Journal of Animal and Veterinary Advances*, 4(6), 603-609
- Schaaf, G. J., Nijmeijer, S. M., Maas, R. F. M., Roestenberg, P., De Groene, E. M., and Fink-Gremmels, J. (2002). The role of oxidative stress in the ochratoxin A-mediated toxicity in proximal tubular cells. *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Basis of Disease*, 1588(2), 149–158. [http://doi.org/10.1016/S0925-4439\(02\)00159-X](http://doi.org/10.1016/S0925-4439(02)00159-X)
- Schatzmayr, G., and Streit, E. “Global Occurrence of Mycotoxins in the Food and Feed Chain: Facts and Figures.” *World Mycotoxin Journal* 6.3 (2013): 213–222.
- Shrivastava, A. and Gupta, V. B. (2012). Review Article HPLC : Isocratic or Gradient Elution and Assessment of Linearity In Analytical Methods. *Journal of Advanced Scientific Research*, 3(2), 12–20. ISSN:0976-9595
- Shrivastava, A. And Gupta, V. (2011). Methods for the Determination of Limit of Detection and Limit of Quantitation of the Analytical Methods. *Chronicles of Young Scientists*, 2(1), 21–25. <http://doi.org/10.4103/2229-5186.79345>
- Solcan, C., Pavel, G., Floristean, V., Chiriac, I., Şlencu, B., and Solcan, G. (2015). Effect of Ochratoxin A on the Intestinal Mucosa and Mucosa-associated Lymphoid Tissues in Broiler Chickens. *Acta Veterinaria Hungarica*, 63(1), 30–48. <http://doi.org/10.1556/AVet.2015.004>
- Sorrenti, V. et al.(2013), Toxicity of Ochratoxin A and Its Modulation by Antioxidants: A Review, *Toxins*, 5, 1742-1766; Doi:10.3390/toxins5101742
- Stoev, S. D., Stefanov, M., Denev, S., Radic, B., Domijan, A. M., & Peraica, M. (2004). Experimental mycotoxicosis in chickens induced by ochratoxin A and penicillic acid and intervention with natural plant extracts. *Veterinary Research Communications*, 28(8), 727–746. DOI: 10.1023/B:VERC.0000045960.46678.d3
- Stoev, D. S. (2008), Complex Etiology, Prophylaxis and Hygiene Control in Mycotoxic Nephropathies in Farm Animals and Humans. *Int J Mol Sci*, 9, 578-605 ISSN 1422-0067
- Stoev, S. D. (2010). Studies on Carcinogenic and Toxic Effects of Ochratoxin A in Chicks, *Toxins*, 649–664. <http://doi.org/10.3390/toxins2040649>

- Stoev, S.D., Gundasheva, D., Zarkov, I., Mirchev, T., Zapryanova, D., Denev, S., Mitev, Y., Daskalov, H., Dutton, M., Mwanza, M., Schneider Y.J. (2012) Experimental Mycotoxic Nephropathy In Pigs Provoked By A Mouldy Diet Containing Ochratoxin A And Fumonisin B1, *Experimental and Toxicologic Pathology*, 64, 733–741, DOI:10.1016/j.etp.2011.01.008
- Stoev, S. D. and Denev, S. A. (2013) “Porcine/Chicken or Human Nephropathy as the Result of Joint Mycotoxins Interaction.” *Toxins* 5.9: 1503–1530. DOI:10.3390/toxins5091503
- Stoev, S. D., Dutton, M. F., Njobeh, P. B., Mosonik, J. S., and Steenkamp, P. A. (2009). Mycotoxic Nephropathy in Bulgarian Pigs and Chickens: Complex Aetiology and Similarity to Balkan Endemic Nephropathy. *Food Additives & Contaminants*, 1–17. <http://doi.org/10.1080/02652030903207227>
- Stoev, S., Daskalov, H., Domijan, A., and Sponta, M. P. (2002). Spontaneous Mycotoxic Nephropathy in Bulgarian Chickens with Unclarified Mycotoxin Aetiology, *Vet Res* <http://doi.org/10.1051/vetres>
- Storen, O., Halvor, H., Stormer, F. (1982). Metabolism Of Ochratoxin A By Primary Cultures Of Rat Hepatocytes. *Applied And Environmental Microbiology*, 44(4), 785-789
- Stormer, F. C., Storen, O., Hansen, C. E., Pedersen, J. I., Hvistendahl, G., & Aarsen, A. J. (1981). Formation of (4R)- and (4S)- Hydroxyochratoxin A from Ochratoxin A by Liver Microsomes From Various Species. *Applied Environmental Microbiology*, 42(6), 1051–1056.
- Strimbu, K. and Tavel, A. J. “What Are Biomarkers?” *Curr Opin HIV AIDS* 5.6 (2011): 463–466. doi:10.1097/COH.0b013e32833ed177.
- Studer-Rohr, I., Schlatter, J., and Dietrich, D. R. (2000). Kinetic Parameters and Intraindividual Fluctuations of Ochratoxin A Plasma Levels in Humans *Archives of Toxicology* 74 (9), 510.
- Szebiotko, K. (1984). Mycotoxic Porcine Nephropathy and Spontaneous Occurrence of Ochratoxin A Residues in Kidneys and Blood of Polish Swine, *Appl Environ Microbiol.* 47(6), 1213-1212.

- Tatu, Calin A. Et al. “The Etiology of Balkan Endemic Nephropathy: Still More Questions than Answers.” *Environmental Health Perspectives* 106.11 (1998): 689–700. DOI:10.2307/3434257
- Taylor. B.N. and Kuyat, C.E. (1994), NIST Technical Note 1297 Guidelines for Evaluating and Expressing the Uncertainty of NIST Measurement Results Technology.
- The Commission of the European Communities, (1996), Council Directive 96/23/EC On Measures To Monitor Certain Substances and Residues Thereof In Live Animals and Animal Products and Repealing Directives 85/358/EEC and 86/469/EEC and Decisions 89/187/EEC and 91/664/EEC, Official Journal of European Union, L 125, p.10-32
- The Commission of the European Communities, (2002), Commission Decision 2002/657/EC, implementing Council Directive 96/23/EC concerning the performance of analytical methods and the interpretation of results, Official Journal of European Union, L 221, p. 8-36
- The Commission of the European Communities, (2002), Regulation (EC) No 178/2002 of the European Parliament and the Council, laying down the general principles and requirements of food law, establishing the European Food Safety Authority and laying down procedures in matters of food safety, Official Journal of European Union, L.31, p.1-24
- The Commission of the European Communities, (2006), Commission Regulation (EC) No 401/2006, laying down the methods of sampling and analysis for the official control of the levels of mycotoxins in foodstuffs (Text with EEA relevance) Official Journal of European Union, L 70, p 12-34
- The Commission of the European Communities, (2006), Commission Regulation (EC) No 1881/2006, setting maximum levels for certain contaminants in foodstuffs (Text with EEA relevance), Official Journal of European Union, L 364, p. 5-24
- Tozlovanu, M., Canadas, D., Pfohl-Leszkowicz, A., Frenette, C., Paugh, R. J., and Manderville, R. A. (2012). Glutathione Conjugates of Ochratoxin A as Biomarkers of Exposure. *Arhiv Za Higijenu Rada I Toksikologiju*, 63(4), 417–27. <http://doi.org/10.2478/10004-1254-63-2012-2202>

- Tozlovanu, M., Faucet-Marquis, V., Pfohl-Leszkowicz, A., and Manderville, R. A. (2006). Genotoxicity of the Hydroquinone Metabolite of Ochratoxin A: Structure-Activity Relationships for Covalent DNA Aduction. *Chemical Research in Toxicology*, 19(9), 1241–1247. <http://doi.org/10.1021/tx060138g>
- Van, E. (2013). Mycotoxins: Risks, Regulations and European Co-operation. *Zbornik Matice Srpske Za Prirodne Nauke*, 25(125), 7–20. <http://doi.org/10.2298/ZMSPN1325007V>
- Varga, J., Kocsubé, S., Péteri, Z., Vágvölgyi, C. and Tóth, B. (2010). Chemical, Physical And Biological Approaches to Prevent Ochratoxin Induced Toxicoses In Humans And Animals. *Toxins*, 2(7), 1718–1750. <http://doi.org/10.3390/toxins2071718>
- Valenta, H. 1998. Chromatographic methods for the determination of ochratoxin A in animal and human tissues and fluids, *Journal of Chromatography A*, 815 (1998) 75–92
- Vettorazi, A., Gonzalez-Penas, E., and Lopez de Cerain A. (2014). Ochratoxin-A Kinetics: A Review of Analytical Methods and Studies in Rat Model. *Food and Chemical Toxicology*, 72, 273–288. DOI:10.1016/j.fct.2009.05.003
- Völkel, I., Schröer-Merker, E., Czerny, C. P. (2011), The Carry-Over Of Mycotoxins In Products of Animal Origin With Special Regard to Its Implications for the European Food Safety Legislation, *Food and Nutrition Sciences*, 2011, 2, 852-867, DOI: 10.4236/fns.2011.28117
- Wangikar, P. B., Dwivedi, P., and Sinha, N. (2004). Effect in Rats of Simultaneous Prenatal Exposure to Ochratoxin A and Aflatoxin B1. I. Maternal Toxicity and Fetal Malformations. *Birth Defects Research Part B - Developmental and Reproductive Toxicology*, 71(6), 343–351. <http://doi.org/10.1002/bdrb.20021>
- Wangikar, P. B., Sinha, N., Dwivedi, P. and Sharma, A. K. (2007). Teratogenic Effects of Ochratoxin A and Aflatoxin B 1 Alone and in Combination on Post-Implantation Rat Embryos in Culture, *J Turkish-German Gynecol Assoc*, Vol. 8(4); 2007:357-364.
- Webster, J. and Weber, R. (2007), *Introduction to Fungi*, New York, 1-2
- Wisniewska-Dmytrow, H., Zmudzki, J., Burek, O. and Pietruszka, K. (2013). Official Control of Ochratoxin A in Food of Animal Origin in Poland Between 2003

- and 2012. *Bulletin of the Veterinary Institute in Pulawy*, 57(4), 519–523. <http://doi.org/DOI 10.2478/bvip-2013-0090>
- Wu, Q., Dohnal, V., Huang, L., Kuča, K., Wang, X., Chen, G., & Yuan, Z. (2011). Metabolic Pathways of Ochratoxin A. *Current Drug Metabolism*, 12(1), 1–10. <http://doi.org/10.2174/138920011794520026>
 - Yang, J., Kalhan, S. C., & Hanson, R. W. (2009). What Is The Metabolic Role of Phosphoenolpyruvate Carboxykinase? *Journal of Biological Chemistry*, 284(40), 27025–27029. <http://doi.org/10.1074/jbc.R109.040543>
 - Yard, E. E., Daniela, J. H., Lewisa, L. S., Rybaka, M. E., Paliakova, E. M., Kimb, A. A, Montgomery, J. M., Bunnell, R., Abudoc, M. U., Akhwalec, W., Breiman, R. F. and Sharif, S. K.(2013), Human Aflatoxin Exposure in Kenya, 2007: A Cross-Sectional Study, Food Addit Contam, Part A, Chem Anal Control Expo Risk Assess; 30(7): 1322–1331
 - Yordanova, P., Wilfried, K., Tsoleva, S. and Dimitrov, P. (2010). Ochratoxin A and Beta2-Microglobulin in BEN Patients and Controls. *Toxins*, 2(4), 780–792. <http://doi.org/10.3390/toxins2040780>
 - Zahoor-ul-Hassan, Khan, M. Z., Saleemi, M. K., Khan, A., Javed, I. and Bhatti, S. A. (2012). Toxicopathological Effects of in Ovo Inoculation of Ochratoxin A (OTA) in Chick Embryos and Subsequently in Hatched Chicks. *Toxicologic Pathology*, 40(1), 33–9. <http://doi.org/10.1177/0192623311425058>
 - Zanic-Grubisić, T., Zrinski, R., Cepelak, I., Petrik, J., Radić, B., and Pepeljnjak, S. (2000). Studies of Ochratoxin A-Induced Inhibition of Phenylalanine Hydroxylase and its Reversal by Phenylalanine. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 167(2), 132–9. <http://doi.org/10.1006/taap.2000.8987>
 - Želježić, D., Domijan, A. M., & Peraica, M. (2006). DNA Damage by Ochratoxin A in Rat Kidney Assessed by the Alkaline Comet Assay. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, 39(12), 1563–1568. <http://doi.org/10.1590/S0100-879X2006001200006>
 - Zepnik, H., Pähler, A., Schauer, U., & Dekant, W. (2001). Ochratoxin A-Induced Tumor Formation: Is There a Role of Reactive Ochratoxin A Metabolites? *Toxicological Sciences*, 59(1), 59–67. <http://doi.org/10.1093/toxsci/59.1.59>
 - Zepnik, H., Völkel, W., & Dekant, W. (2003). Toxicokinetics of the Mycotoxin Ochratoxin A in F 344 Rats After Oral Administration. *Toxicology and Applied*

Pharmacology, 192(1), 36–44. [http://doi.org/10.1016/S0041-008X\(03\)00261-8](http://doi.org/10.1016/S0041-008X(03)00261-8)

- Zhang, X., Boesch-Saadatmandi, C., Lou, Y., Wolffram, S., Huebbe, P. and Gerald, R. (2009). Ochratoxin A Induces Apoptosis in Neuronal Cells, *Genes Nutr.* 4, 41–48. <http://doi.org/10.1007/s12263-008-0109-y>

