



UNIWERSYTET KAZIMIERZA WIELKIEGO
WYDZIAŁ NAUK BIOLOGICZNYCH
KATEDRA FIZJOLOGII I TOKSYKOLOGII

ROZPRAWA DOKTORSKA

Karolina Ropejko

Ochratoksyna A w mleku, moczu i surowicy krwi
oraz **zearalenon** w moczu kobiet
będących w okresie laktacji

Rozprawa doktorska napisana pod kierunkiem
dr hab. Magdaleny Twarużek, prof. uczelni

Podziękowania

Składam najserdeczniejsze podziękowania Promotor pracy Pani dr hab. Magdalenie Twarużek, prof. uczelni za wszelką pomoc, wskazówki udzielone mi podczas pisania pracy, rady merytoryczne oraz cierpliwość, wyrozumiałość i poświęcony czas.

Pragnę podziękować też Panu prof. dr hab. Janowi Grajewskiemu za umożliwienie wykonania mi badań w Laboratorium Badawczym Mikotoksyn za życzliwość, która spotykała mnie na każdym kroku, rady merytoryczne i okazaną pomoc.

Dziękuję pracownikom Katedry Fizjologii i Toksykologii za wszelką pomoc okazaną mi podczas prowadzenia badań.

Dziękuję również pracownikom Banku Mleka Kobiecego w Toruniu za pomoc, a także za przekazaną wiedzę.

Ponadto dziękuję swoim najbliższym za cierpliwość i wspieranie mnie w każdym możliwym momencie.

SPIS TREŚCI

1.	WSTĘP	9
2.	GRZYBY PLEŚNIOWE I MIKOTOKSYNY	11
3.	OCHRATOKSYNA A	14
3.1.	Wytwarzanie i budowa ochratoksyny A	14
3.2.	Występowanie ochratoksyny A w żywności	17
3.2.1.	Wzory matematyczne pozwalające na wyliczenie określonych wartości charakteryzujących spożycie OTA	20
3.3.	Regulacje prawne i normy spożycia	21
3.4.	Zmodyfikowane formy ochratoksyny	23
3.5.	Toksokinetyka	25
3.5.1.	Absorbpcja	25
3.5.2.	Metabolizm i wydalanie ochratoksyny A	25
3.6.	Biomarkery narażenia	26
3.7.	Toksyczność	26
3.7.1.	Kancerogenność	26
3.7.2.	Nefrotoksyczność	26
3.7.2.1.	Bałkańska Endemiczna Nefropatia (BEN) i Endemiczna przewlekła nefropatia śródmiąższowa (CIN)	27
3.7.3.	Genotoksyczność i mutagenność	27
3.7.4.	Neurotoksyczność	27
3.7.5.	Immunotoksyczność	28
3.8.	Mechanizm działania ochratoksyny A (MOA)	28
3.9.	Ochratoksykozy	29
4.	ZEARALENON	30
4.1.	Wytwarzanie i budowa zearalenonu	30
4.2.	Metabolity zearalenonu	32
4.3.	Występowanie zearalenonu w żywności	32
4.4.	Regulacje prawne i normy spożycia	33
4.5.	Toksokinetyka	35
4.5.1.	Absorbpcja, wydalanie i metabolizm	35
4.6.	Toksyczność	35
4.6.1.	Estrogenność	36
4.6.2.	Kancerogenność i genotoksyczność	36
4.6.3.	Immunosupresyjność	37
4.7.	Mechanizm działania zearalenonu (MOA)	37
5.	AKTUALNE MOŻLIWOŚCI WYKRYWANIA OTA I ZEN W ŻYWNOSCI	38
6.	MLEKO KOBIECE	39

7.	BANKI MLEKA	44
7.1.	Historia banków mleka	44
7.2.	Banki mleka na świecie	47
7.3.	Banki mleka w Polsce	47
7.4.	Działanie banków mleka	49
8.	MIKOTOKSYNY W MLEKU	51
8.1.	Bezpieczeństwo mleka w XXI wieku	51
8.2.	Pasteryzacja a toksyny	52
9.	CEL BADAŃ	53
10.	MATERIAŁ BADAWCZY I METODY	54
10.1.	Materiał	54
10.2.	Metody	55
10.2.1.	Odczynniki i sprzęt	55
10.2.2.	Sposób uzyskania próbek do badań	58
10.2.3.	Metody oznaczania ochratoksyny A w mleku	59
10.2.4.	Metody oznaczania ochratoksyny A w moczu	59
10.2.5.	Metody oznaczania ochratoksyny A w surowicy	59
10.2.6.	Metody oznaczania zearalenonu i jego metabolitów w moczu	60
10.2.7.	Ocena czystości mikrobiologicznej mleka kobiecego	62
10.2.8.	Metody identyfikacji mikrobiologicznej mleka kobiecego	62
10.2.9.	Metoda pasteryzacji próbek mleka	62
10.2.10.	Metody chromatograficzne analizy badanych próbek	62
10.2.11.	Metoda analizy składu mleka kobiecego	64
11.	METODY STATYSTYCZNE I WYNIKI	65
11.1.	Ankieta do prowadzonych badań	65
11.2.	Określenie wpływu pasteryzacji mleka kobiecego na występowanie w nim OTA	69
11.3.	Identyfikacja mikroorganizmów w mleku kobiecym	69
11.4.	Zależność występowania OTA w mleku kobiet będących w okresie laktacji a składem badanego mleka	70
11.5.	Występowanie OTA w mleku, moczu i surowicy kobiet będących w okresie laktacji	72
11.6.	Występowanie OTA w mleku, moczu i surowicy kobiet będących w okresie laktacji w zależności od rodzaju i częstości spożywanego pokarmu	76
11.7.	Występowanie OTA w płynach ustrojowych a podstawowe parametry opisujące badane kobiety i ich dzieci karmione mlekiem	88
11.8.	Zależność pomiędzy występowaniem ZEN i jego metabolitów w moczu kobiet będących w okresie laktacji	93
12.	DYSKUSJA	98
13.	WNIOSKI	104
	Spis rysunków	106
	Spis zdjęć	107
	Spis tabel	108
	Spis wykresów	110
	Bibliografia	111
	Załączniki	127

WYKAZ STOSOWANYCH SKRÓTÓW

AAP	– <i>American Academy of Pediatrics</i> – Amerykańska Akademia Pediatrii
ACOG	– <i>American College of Obstetricians and Gynecologists</i> – Amerykańskie Kolegium Położników i Ginekologów
AF	– <i>aflatoxin</i> – aflatoksyna
AFB ₁	– <i>aflatoxin B₁</i> – aflatoksyna B ₁
AFB ₂	– <i>aflatoxin B₂</i> – aflatoksyna B ₂
AFG ₁	– <i>aflatoxin G₁</i> – aflatoksyna G ₁
AFG ₂	– <i>aflatoxin G₂</i> – aflatoksyna G ₂
AFM ₁	– <i>aflatoxin M₁</i> – aflatoksyna M ₁
AFM ₂	– <i>aflatoxin M₂</i> – aflatoksyna M ₂
ALR	– Akademia Lekarzy Rodzinnych
BDML	– <i>Benchmark Dose (Lower Confidence Limit)</i> – najniższe dawki związane z wywoływaniem ściśle określonego działania na organizm człowieka
BEN	– <i>Balkan Endemic Nephropathy</i> – bałkańska nefropatia endemiczna
CIN	– <i>Chronic Interstitial Nephropathy</i> – przewlekła nefropatia śródmiąższowa
CONTAM	– <i>Panel on Contaminants in the Food Chain</i> – Panel ds. Zanieczyszczeń w Łańcuchu Żywnościowym
DAD	– <i>diode array detector</i> – detektor z matrycą diodową
DON	– <i>Deoxynivalenol</i> – deoksyniwalenol
EFSA	– <i>European Food Safety Authority</i> – Europejski Urząd ds. Bezpieczeństwa Żywności
EMBA	– <i>European Milk Bank Association</i> – Europejskie Stowarzyszenie Banków Mleka
ESPGHAN	– <i>The European Society for Paediatric Gastroenterology, Hepatology and Nutrition</i> – Europejskie Towarzystwo Gastroenterologii Dziecięcej, Hepatologii i Żywienia
FAO	– <i>Food and Agriculture Organization of the United Nations</i> – Organizacja Narodów Zjednoczonych ds. Wyżywienia i Rolnictwa
FLD	– <i>Fluorescence Detector</i> – detektor fluorescencyjny
FSA	– <i>Food Standards Agency</i> – Brytyjska Agencja Standardów Żywności
HIV	– <i>Human Immunodeficiency Virus</i> – ludzki wirus niedoboru odporności
HBV	– <i>Hepatitis B virus</i> – wirus zapalenia wątroby typu B
HCV	– <i>Hepatitis C virus</i> – wirus zapalenia wątroby typu C
HPLC	– <i>high-performance liquid chromatography</i> – wysokosprawna chromatografia cieczowa
IARC	– <i>International Agency for Research on Cancer</i> – Międzynarodowa Agencja Badań nad Rakiem
IQR	– <i>interquartile range</i> – rozstęp ćwiartkowy
JECFA	– <i>Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives</i> – Wspólny Komitet Ekspertów ds. Dodatków do Żywności
JTK	– jednostka tworząca kolonię
LC MS/MS	– <i>liquid chromatography coupled with tandem mass spectrometry</i> – chromatografia cieczowa sprzężona z podwójną spektrometrią mas

LD ₅₀	– <i>lethal dose</i> – dawka śmiertelna
LOAEL	– <i>lowest observed adverse effect level</i> – najniższy poziom obserwowanych działań niepożądanych
LOD	– <i>limit of detection</i> – granica wykrywalności
LOQ	– <i>limit of quantification</i> – granica oznaczalności
M	– <i>mean</i> – średnia
m.c.	– masa ciała
Me	– mediana
MOA	– <i>mode of action</i> – mechanizm działania
MOE	– <i>margin of exposure</i> – margines narażenia
NOEL	– <i>no observable effect level</i> – najwyższy poziom bez obserwowanego działania toksycznego
OT	– <i>ochratoxin</i> – ochratoksyna
OTA	– <i>ochratoxin A</i> – ochratoksyna A
OTB	– <i>ochratoxin B</i> – ochratoksyna B
OTC	– <i>ochratoxin C</i> – ochratoksyna C
OT- α	– <i>ochratoxin α</i> – ochratoksyna α
PBS	– <i>Phosphate-buffered saline</i> – bufor fosforanowy
PDI	– <i>probable daily intake</i> – prawdopodobne dzienne spożycie
RHO	– współczynnik korelacji rang Spearmana
SD	– <i>standard deviation</i> – odchylenie standardowe
S-W	– Test Shapiro-Wilka
TDI	– <i>tolerable daily intake</i> – tolerowane dzienne spożycie
UNICEF	– <i>United Nations International Children's Emergency Fund</i> – Fundusz Narodów Zjednoczonych na Rzecz Dzieci
WHO	– <i>World Health Organization</i> – Światowa Organizacja Zdrowia
ZAN	– <i>zearalanone</i> – zearalanon
ZEN	– <i>zearalenone</i> – zearalenon
α -ZAL	– <i>α-zearalanol</i> – α -zearalanol
α -ZEL	– <i>α-zearalenol</i> – α -zearalenol
β -ZAL	– <i>β-zearalanol</i> – β -zearalanol
β -ZEL	– <i>β-zearalenol</i> – β -zearalenol

W dzisiejszych czasach zanieczyszczenie może pochodzić ze wszystkiego, co nas otacza. Przykłady stanowią: smog, alergeny unoszące się w powietrzu, skażona woda, a nawet pokarm, który każdy z nas codziennie spożywa. Zanieczyszczenia mogą mieć różne źródła. Jednym z nich są grzyby pleśniowe i ich metabolity, jakimi są mikotoksyny. Rozwój zainteresowania grzybami pleśniowymi i mikotoksynami przypada na lata 60. XX wieku, kiedy to tajemnicza, nowa choroba (choroba indyka X) występująca w Anglii spowodowała śmierć ogromnej liczby stad indyków. Późniejsze badania wykazały, że głównym czynnikiem, które to wywołało, było zatrucie aflatoksyną, występującą w orzeszkach ziemnych przeznaczonych do skarmiania tych zwierząt (Peraica i in. 1999b; Zain 2011). Ochratoksyna A po raz pierwszy została opisana w 1965 roku, jako metabolit gatunku *Aspergillus ochraceus* (Van der Merwe i in. 1965b), zearalenon z kolei po raz pierwszy został wyizolowany z kukurydzy inokulowanej *Fusarium* (Stob i in. 1962).

Ze względu na ich toksyczność, światowe organizacje zajmujące się szeroko pojętym zagadnieniem zdrowia ustanowiły określone poziomy spożycia poszczególnych mikotoksyn. Europejski Urząd ds. Bezpieczeństwa Żywności (EFSA) w 2013 roku określił tolerowane dzienne spożycie (TDI) deoksyniwalenolu na 1 µg/kg m.c. (EFSA 2013), FAO/WHO w 2012 ustanowił poziom TDI fumonizyn (występujących samodzielnie lub jako suma FB₁, FB₂, FB₃) na 2 µg/kg m.c. (FAO/WHO 2012), podczas gdy dla zearalenonu poziom ten wynosi 0,5 µg/kg m.c. (EFSA 2011), a dla ochratoksyny A 14 ng/kg m.c. (EFSA 2006). Poziomy te określane są poprzez analizę ryzyka narażenia. Ryzyko narażenia ma na celu określenie dawki substancji, na którą mogą być narażone organizmy żywe. Określenie tego ryzyka składa się z trzech zasad: identyfikacji i charakterystyki zagrożenia, oceny narażenia i charakterystyki ryzyka. Określane poziomy powinny być maksymalnie rygorystyczne, aby zminimalizować niebezpieczeństwo związane z konsumpcją, ale jednocześnie osiągalne poprzez stosowanie dobrej praktyki rolniczej.

Mikotoksyny występujące w paszy można dekontaminować (unieczynnić). W tym celu wykorzystuje się kilka metod:

- oddzielanie mechaniczne zanieczyszczonego produktu od czystego;
- segregacja gęstości – metoda ta polega na sortowaniu zanieczyszczonych ziaren przy wykorzystaniu flotacji;
- inaktywacja termiczna – metoda polegająca na obróbce termicznej produktu;
- naświetlanie – metoda polega na wystawianiu zanieczyszczonego produktu na działanie fal UV;
- ekstrakcja rozpuszczalnikiem;
- wykorzystanie mikroorganizmów;
- ozonowanie – degradacja opiera się na reakcji mikotoksyn z ozonem;

- amonifikacja – degradacja przy użyciu amoniaku;
- stosowanie dodatków do żywności (np. wodorosiarczyn);
- stosowanie czynników wiążących lub sorbentów (CAST 2003).

Pracę poświęcono badaniom nad występowaniem ochratoksyny A (OTA) i zearalenonu (ZEN) w płynach ustrojowych kobiet będących w okresie laktacji. Mikotoksyny te produkowane są głównie przez grzyby z rodzaju *Aspergillus*, *Penicillium* (OTA) i *Fusarium* (ZEN).

W niniejszej pracy szczegółowo zostały opisane dwie mikotoksyny powszechnie występujące w środowisku – ochratoksyna A i zearalenon, ich występowanie, toksokinetyka, wpływ na zdrowie ludzi i zwierząt. W części praktycznej przedstawione zostały wyniki prowadzonych badań, które skupiały się na występowaniu OTA w mleku, moczu i surowicy krwi, a także ZEN w moczu kobiet będących w okresie laktacji, w tym dawczyń z Banku Mleka Kobiecego. Badania zostały wykonane przy współpracy z Regionalnym Bankiem Mleka Kobiecego w Toruniu. Bank Mleka Kobiecego został otworzony 28 maja 2013 roku z inicjatywy Samorządu Województwa Kujawsko-Pomorskiego, Wojewódzkiego Szpitala Zespołonego im. L. Rydygiera w Toruniu oraz Fundacji Bank Mleka Kobiecego w ramach realizacji Programu Promocji Karmienia Piersią pt.: „Mamy mleko dla wcześniaka w województwie kujawsko-pomorskim” (Wesołowska i in. 2017a).

Ponadto ocenie została poddana dieta badanych kobiet. W ankiecie uwzględnione zostały pokarmy, produkty lub ich składowe, które potencjalnie mogą być zanieczyszczone przez mikotoksyny, w szczególności przez OTA i ZEN. Są to m.in. zboża oraz produkty, które mogą z nich powstawać – pieczywo, płatki zbożowe, gluten pszenny, piwo, kasze, ryż, produkty pochodzenia zwierzęcego – podroby, jaja, mleko, sery, a także produkty pochodzenia roślinnego – wino i sok winogronowy, lukrecja, kakao, czekolada, kawa, przyprawy, orzechy, suszone owoce czy rośliny strączkowe. Dieta kobiet w okresie laktacji powinna być zbilansowana pod względem kaloryczności i energii. Powinna zawierać przede wszystkim produkty zbożowe (w tym pełnoziarniste), mleko i jego przetwory, chude mięso, tłuste ryby, oleje roślinne, warzywa i owoce, a także ograniczoną ilość słodczy, słodkich napojów, produktów smażonych, tłustych mięs, kremowych ciast, ostrych przypraw, cebuli, kapusty, grochu, czy fasoli (Wierzejska 2017).

Niektóre kobiety, których płyny ustrojowe zostały poddane analizom były dawczyniami z Banku Mleka Kobiecego. Dzięki tego typu instytucjom możliwe jest karmienie dzieci naturalnym pokarmem, jakim jest mleko kobiece. Zawiera ono szereg niezbędnych składników odżywczych. Niestety istnieje duże prawdopodobieństwo transferu mikotoksyn wraz z mlekiem do organizmów karmionych dzieci. Dzieci są bardziej podatne na niekorzystne działanie mikotoksyn. Dzieje się tak ze względu na ich fizjologię – szybszą przemianę materii, niedorozwinięte narządy wewnętrzne i stosunkowo nieefektywne mechanizmy detoksykacji.

Stanowi to jeden z argumentów, dla których należy ograniczyć spożywanie pokarmów potencjalnie skażonych mikotoksynami. Innym przeciwskazaniem do spożywania skażonych mikotoksynami pokarmów jest ich wpływ na organizmy ludzi i zwierząt. Mikotoksyny powodują nowotwory, uszkodzenia układu: immunologicznego, wydalniczego, neurologicznego, pokarmowego i innych.

2

GRZYBY PLEŚNIOWE I MIKOTOKSYNY

Grzyby pleśniowe, „pleśnie” to potoczna nazwa grzybów strzępkowych występujących w środowisku. Pełnią one olbrzymią funkcję w środowisku i w przemyśle spożywczym (Barabasz i Pikulicka 2017).

W przemyśle spożywczym wykorzystywane są do produkcji serów pleśniowych, kiełbasy, niektórych odmian piwa i wina, a nawet leków i antybiotyków. Alkaloidy sporyszu stosowane są w leczeniu choroby Parkinsona i migreny, jako inhibitor prolaktyny, w niewydolności naczyń mózgowych i niewydolności żyłnej (Flieger i in. 1997). Tradycyjna hiszpańska kiełbasa o nazwie „Salchichón”, jej odmiana „Fuet” (Bernáldez i in. 2013) lub salami powstają poprzez wykorzystanie w ich produkcji *Penicillium nalgiovense* (Dupont i in. 2017). We Francji istnieje słodkie i drogie wino produkowane przy użyciu grzybów *Botrytis cinerea*, a w Japonii sake i koji produkowane z wykorzystaniem *Aspergillus oryzae* (Dupont i in. 2017). Niestety, grzyby pleśniowe mogą produkować szkodliwe mikotoksyny.

Mikotoksynami określane są toksyczne, wtórne metabolity grzybów pleśniowych, najczęściej należących do rodzaju *Aspergillus spp.*, *Penicillium spp.*, *Fusarium spp.*, *Claviceps spp.*, *Alternaria spp.*, *Neotyphodium spp.*, *Stachybotrys spp.*, *Myrothecium spp.*, *Phoma spp.* i *Diplodia spp.* (Sprynskyy i in. 2012). Mikotoksyny nie pełnią żadnych znaczących funkcji w metabolizmie grzybów. Głównie produkowane są przez dojrzałe już grzyby pleśniowe (Edite Bezerra da Rocha i in. 2014). Mają one małą masę cząsteczkową, poniżej 1000 Da (Heshmati i in. 2017). Najczęściej występują w surowcach – kukurydzy, jęczmieniu, pszenicy, ryżu, owsie, sorgo, soi, a także w produktach spożywczych (Sprynskyy i in. 2012).

Mikotoksyny znane były już w średniowieczu; źródła podają, że w tym okresie kojarzono choroby z obecnością alkaloidów sporyszu i występowaniem ergotyzmu. Zjawisko to można było zaobserwować głównie w Wielkiej Brytanii, Skandynawii, Rosji i całej Europie kontynentalnej (Pitt i Miller 2016). Alakloidy sporyszu pochodziły od *Claviceps purpurea*, a ze względu na objawy towarzyszące zatruciom choroba ta została nazwana „ogniem świętego Antoniego” (Cameron i French 1960).

Ogólny wzrost zainteresowania mikotoksynami nastąpił jednakże w latach 60. XX wieku, gdy w Anglii pojawiła się nieznana wówczas choroba spowodowana działaniem aflatoksyn. Nazwano ją „chorobą indyka X” (Peraica i in. 1999b; Zain 2011). Aflatoksyny pochodziły od orzeszków ziemnych zainfekowanych grzybem *Aspergillus flavus*. Podczas epidemii, po zatruciu mikotoksyną, życie straciło ok. 100 000 piskląt. Po tych wydarzeniach, dokładnie w 1962 r., zaczęto używać zwrotu „mikotoksyny” (Zain 2011).

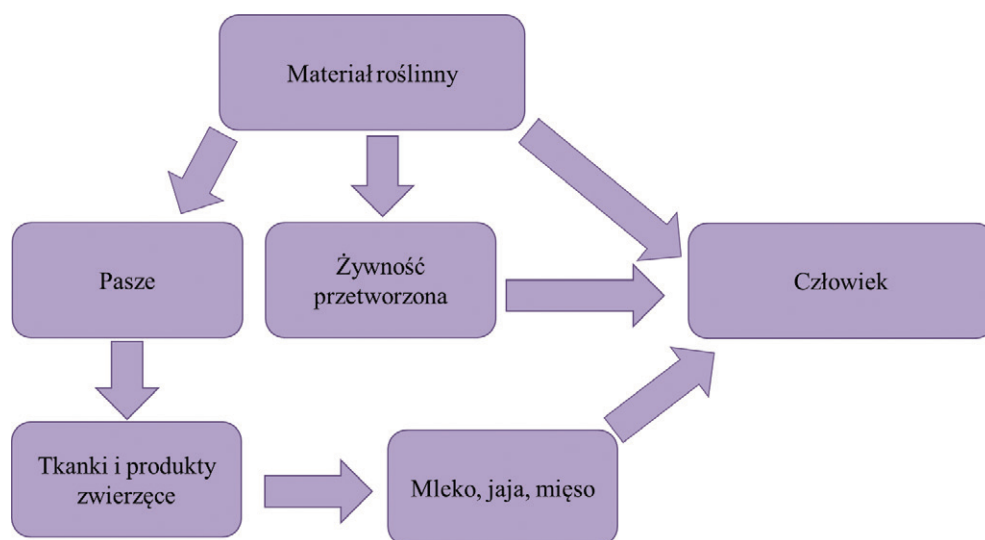
W dzisiejszych czasach mikotoksyny mają ogromne znaczenie w agrobiznesie na całym świecie, wpływają na eksport, ograniczają produkcję zwierzęcą i roślinną oraz wpływają na zdrowie ludzi (Edite Bezerra da Rocha i in. 2014).

Dotychczas w środowisku zidentyfikowano ponad 400 różnych mikotoksyn (Casal i in. 2014; Iqbal i in. 2014b). Są to głównie ochratoksyny, aflatoksyne, zearalenon, fumonizyny, trichoteceny, alkaloidy sporyszu czy patulina (Iqbal i in. 2014b; Ben Salah-Abbès i in. 2020).

Produkty mogą zostać zanieczyszczone przez grzyby pleśniowe podczas obróbki wstępnej, na etapie suszenia i przechowywania żywności, a w niektórych przypadkach nawet na etapie uprawy roślin (Pokrzywa i in. 2007; Edite Bezerra da Rocha i in. 2014). Produkcja mikotoksyn natomiast zależy od wielu czynników, do których należą między innymi: klimat, temperatura, wilgotność, gatunek grzyba pleśniowego czy produkt, na którym się rozwijają (Zain 2011).

Mikotoksyny do organizmów żywych dostają się głównie przez drogę pokarmową (przez spożycie zainfekowanej żywności), układ oddechowy (wdychanie) lub bezpośredni kontakt ze skórą (Peraica i in. 1999b; Zain 2011). Należy jednak pamiętać, że do łańcucha pokarmowego ludzi oraz zwierząt mogą przedostać się zarówno pośrednio – zanieczyszczenie finalnego produktu występuje, jeśli którykolwiek składnik został zainfekowany przez toksyczne grzyby pleśniowe – jak i bezpośrednio, gdy grzyby pleśniowe zainfekowały finalny produkt spożywczy lub paszę (Edite Bezerra da Rocha i in. 2014).

Na rysunku 1 przedstawiono schemat drogi zakażenia mikotoksynami.



Rysunek 1. Schemat drogi zakażenia mikotoksynami

Przez spożycie zanieczyszczonych mikotoksynami produktów, zarówno w przypadku zwierząt, jak i ludzi może dojść do zatrucia – mikotoksykozy. Ich najczęstszymi objawami są: zmniejszanie wydajności, zmniejszanie masy ciała, immunosupresyjność i zwiększenie częstości występowania nowotworów (Fink-Gremmels 1999). Mikotoksyny wykazują działanie hepatotoksyczne, hematotoksyczne, immunotoksyczne, genotoksyczne, estrogenne, kancerogenne (Sprynskyy i in. 2012). Szkodliwość mikotoksyn na zdrowie ludzi i zwierząt zależy od toksyczności danej mikotoksyny, wieku organizmu, stanu odżywienia czy współdziałanie z środkami chemicznymi, na które dany organizm jest narażony (Peraica i in. 1999b).

Mikotoksyny można podzielić ze względu na rodzaj podłoża, na którym następuje ich wzrost i rozwój. Rozróżnia się mikotoksyny polowe – atakujące zboża podczas wzrostu na polu, a także magazynowe (przechowalnicze) – rozwijające się podczas magazynowania ziaren i nasion. Do grupy mikotoksyn polowych można zaliczyć te wytwarzane przez grzyby

pleśniowe z rodzaju *Fusarium* (trichoteceny, zearalenon), natomiast do grupy mikotoksyn magazynowych można zaliczyć te produkowane przez grzyby pleśniowe z rodzaju *Aspergillus* i *Penicillium* (aflatoksyny, ochratoksyny, cytryninę i patulinę) (Wróbel 2014).

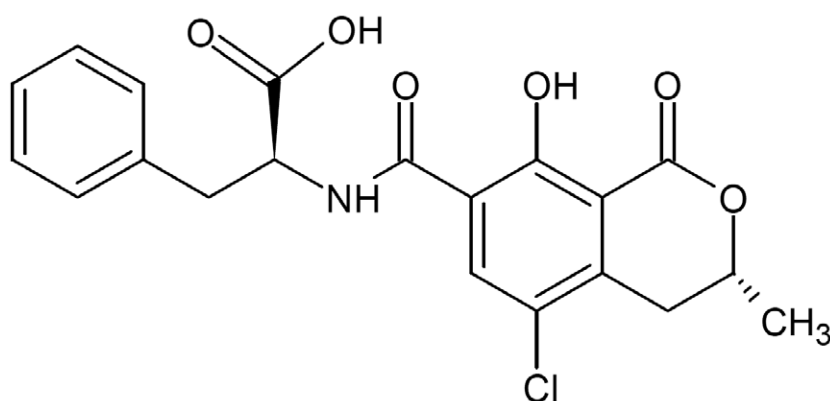
Patulina jest mikotoksyną występująca najczęściej w spleśniałych owocach (zwłaszcza jabłkach), może powodować uszkodzenie wątroby, śledziony i nerek, jest również środkiem immunosupresyjnym, który hamuje wiele aspektów funkcji makrofagów. Ochratoksyna A wykazuje nefrotoksyczność. Podobne działanie wykazuje cytrynina, podczas gdy aflatoksyny są silnie hepatotoksyczne, immunosupresyjne, rakotwórcze i mutagenne, a zearalenon wiązany jest z hiperestrogenizmem (Mostrom 2016).

OCHRATOKSYNA A

3.1. Wytwarzanie i budowa ochratoksyny A

Ochratoksyna A, wtórny metabolit grzybów pleśniowych, jest wytwarzana przez grzyby z rodzaju *Aspergillus* i *Penicillium* (Peraica i in. 1999b; Pascale i Visconti 2000; Vulić i in. 2014; Taghizadeh i in. 2017; Hajok i in. 2019). OTA jest związkiem opisanym wzorem: 7-karboksy-5-chloro-8-hydroksy-3,4-dihydro-3-R-metyloizokomaryna-7-L-β-feniloalanina (Engelhardt i in. 2003; Wu i in. 2011), to inaczej dihydroksyizokumaryna połączona przez grupę 7-karboksygrupową do L-fenilo-alaniny przez wiązanie amidowe (Van der Merwe i in. 1965b) o wzorze sumarycznym $C_{20}H_{18}ClNO_6$ i masie atomowej 403,8 g/mol. Jej struktura to białe, krystaliczne ciało stałe, o temperaturze wrzenia 168°C – 173°C, słabo rozpuszcza się w wodzie (Tao i in. 2018), natomiast jest dobrze rozpuszczalna w większości rozpuszczalników organicznych, takich jak chloroform, etanol, metanol i ksylen (Vieira i in. 2015). Wykazuje fluorescencję zieloną (dł. fali 213 nm) i niebieską (dł. fali 332 nm) w świetle UV (Vieira i in. 2015).

Na rysunku 2 przedstawiono wzór strukturalny OTA.



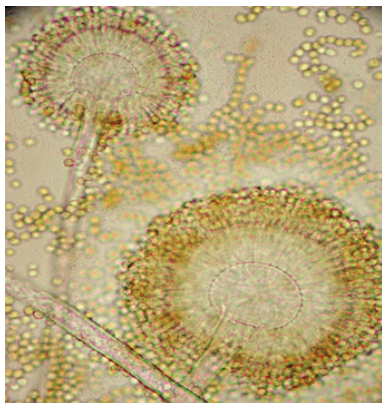
Rysunek 2. Wzór strukturalny OTA

W klimacie tropikalnym i subtropikalnym prekursorami produkcji OTA są grzyby z rodzaju *Aspergillus*, natomiast w klimacie umiarkowanym i chłodnym grzyby z rodzaju *Penicillium* (Vecchio i in. 2012; Wang i in. 2016). Przykłady grzybów pleśniowych produkujących OTA zostały przedstawione w tabeli 1.

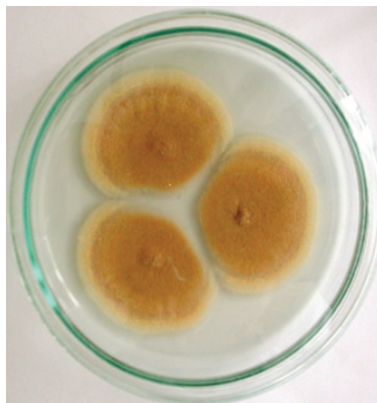
Na zdjęciach 1 – 4 przedstawiono dominujące gatunki grzybów produkujących OTA.

Tabela 1. Gatunki grzybów pleśniowych zdolnych do produkcji OTA

Gatunek grzyba pleśniowego	Źródło
<i>Aspergillus ochraceus</i> <i>Penicillium viridicatum</i>	Palli i in. 1999
<i>Aspergillus circumdati</i> <i>Aspergillus nigri</i> <i>Aspergillus flavi</i> <i>Penicillium verrucosum</i> <i>Penicillium nordicum</i>	Coronel i in. 2009
<i>Aspergillus ochraceus</i> <i>Aspergillus carbonarius</i> <i>Aspergillus westerdijkiae</i> <i>Penicillium verrucosum</i>	Biasucci i in. 2010
<i>Penicillium polonicum</i>	Stefanovic i in. 2011
<i>Aspergillus ochraceus</i> <i>Aspergillus carbonarius</i> <i>Aspergillus melleus</i> <i>Aspergillus sclerotiorum</i> <i>Aspergillus niger</i> <i>Aspergillus sulphureus</i>	Zain 2011
<i>Aspergillus alliaceus</i> <i>Aspergillus auricomus</i> <i>Aspergillus carbonarius</i> <i>Aspergillus glaucus</i> <i>Aspergillus melleus</i> <i>Aspergillus niger</i> <i>Penicillium nordicum</i> <i>Penicillium verrucosum</i>	Edite Bezerra da Rocha i in. 2014
<i>Aspergillus fumigatus</i> <i>Aspergillus niger</i>	Gniadek i in. 2017
<i>Aspergillus ochraceus</i> <i>Aspergillus sulphureus</i> <i>Aspergillus niger</i> <i>Penicillium nordicum</i> <i>Penicillium verrucosum</i>	Kamali i in. 2017
<i>Aspergillus ochraceus</i> <i>Aspergillus carbonarius</i> <i>Aspergillus niger</i> <i>Penicillium verrucosum</i>	Jiang i in. 2018



Zdjęcie 1. Konidofor z konidiami *Aspergillus ochraceus* (kolekcja Katedry Fizjologii i Toksykologii UKW)



Zdjęcie 2. Kolonie *Aspergillus ochraceus* na podłożu CYA (kolekcja Katedry Fizjologii i Toksykologii UKW)



Zdjęcie 3. Konidofor z konidiami *Penicillium verrucosum* (kolekcja Katedry Fizjologii i Toksykologii UKW)



Zdjęcie 4. Kolonie *Penicillium verrucosum* na podłożu CYA (kolekcja Katedry Fizjologii i Toksykologii UKW)

Produkcja OTA przez *Aspergillus ochraceus* następuje w temperaturze od 24°C do 37°C (przy czym temperatura optymalna wynosi 31°C), pH 3 – 10 i aktywności wodnej 0,8, natomiast w przypadku *Penicillium verrucosum* parametry te wynoszą odpowiednio: temperatura optymalna 20°C, pH 6 – 7 i aktywność wodna 0,86 (Reddy i Bhoola 2010) podczas zbioru, suszenia i wzrostu roślin (Hajok i in. 2019).

Podstawową przyczyną powstawania OTA jest nieodpowiednie przechowywanie produktów rolnych (Fazekas i in. 2005).

Warto zwrócić uwagę na fakt, iż OTA na określonych produktach może być wytwarzana przez grzyby pleśniowe w różnych warunkach środowiskowych – przykładowo *Aspergillus carbonarius* i *Aspergillus niger* rosną w wysokich temperaturach, co sprawia, że są odporne na promieniowanie UV. Dlatego są powszechnie spotykane w winogronach i owocach, które potrzebują wysokiej temperatury do wzrostu (Pitt 2002).

Po raz pierwszy OTA została opisana w 1965 roku jako metabolit *Aspergillus ochraceus* (Van der Merwe i in. 1965b). Dopiero w późniejszych latach stopniowo opisywane były inne grzyby pleśniowe odpowiedzialne za produkcję OTA w różnych produktach (Malir i in. 2016). Szczegółowe opisy zostały przedstawione w tabeli 2.

Tabela 2. Chronologiczne opisanie grzybów pleśniowych produkujących OTA (Malir i in. 2016)

Rok	Gatunek grzyba	Surowiec/Produkt
1965	<i>Aspergillus ochraceus</i>	Mąka kukurydziana
1969	<i>Penicillium viridicatum</i>	Kukurydza
1994	<i>Aspergillus niger</i>	Kukurydza
2004	<i>Aspergillus lacticoffeatus</i> <i>Aspergillus sclerotioniger</i>	Kawa
2006	<i>Aspergillus circumdati</i> <i>Aspergillus westerdijkiae</i> <i>Aspergillus steynii</i>	Kawa

3.2. Występowanie ochratoksyny A w żywności

OTA z powodu sprzyjających warunków pogodowych i mikroklimatycznych występuje niemal na całym świecie. Występuje w surowcach i produktach, które są przechowywane w nieodpowiedni sposób (Zain 2011; Kószegi i Poór 2016).

Powszechnie występuje w materiałach takich, jak:

- zboża: pszenica, jęczmień, kukurydza, owies (Pascale i Visconti 2000),
- ryż, proso, żyto (SCOOP 2002),
- produkty zbożowe i ich pochodne – mąka, chleb, makaron, płatki zbożowe (SCOOP 2002; Coronel i in. 2009),
- kakao i produkty kakaowe (Coronel i in. 2009),
- kawa (palona i zielona), piwo, winogrona, wino (czerwone i białe), sok winogronowy, przyprawy (Fink-Gremmels 2005; Clark i Snedeker 2006; Coronel i in. 2009; Wai-Cheung Chung i in 2009),
- mleko (Zain 2011; Taghizadeh i in. 2017),
- rośliny strączkowe (Wai-Cheung Chung i in 2009),
- suszone owoce (Coronel i in. 2009), w szczególności rodzyнки (Sarigiannis i in. 2014),
- orzechy (zwłaszcza ziemne) (SCOOP 2002),
- leki ziołowe (Shim i in. 2014),
- barwniki spożywcze (Solfrizzo i in. 2015),
- woda butelkowana (Mata i in. 2015),
- podroby (Kotowski i in. 1993, Milićević i in. 2008),
- płyny fizjologiczne ludzi: mleko kobiece (Jonsyn i in. 1995, Postupolski 2006, Kamali i in. 2017), mocz (Pena i in. 2006, Muñoz i in. 2017), a także krew (Assaf i in. 2004, Degen i in. 2007, Ali i in. 2018).

OTA w obiegu wtórnym – „carry over” trafia przez skażoną paszę do organizmów zwierząt gospodarskich, a następnie przez konsumpcję mięsa, podrobów, jaj czy mleka może przedostać się do organizmów ludzi (Grajewski 2003). Przedostaje się także bezpośrednio po spożyciu skażonego pokarmu roślinnego.

Naukowcy z całego świata badają występowanie OTA w wielu produktach, spożywanych przez ludzi i zwierzęta. W tabeli 3 przedstawione zostały przykłady wyników badań opisujące występowanie OTA w wybranym pożywieniu dla ludzi i zwierząt na całym świecie.



OTA jest stabilna termicznie, jednakże pewne parametry obróbki cieplnej powodują spadek jej stabilności. Obróbka cieplna w temperaturze 150°C przez godzinę powoduje redukcję OTA o ok. 30%, natomiast traktowanie jej temperaturą powyżej 180°C powoduje spadek stabilności o ok. 70% – 90% (EFSA 2020). Smażenie w temperaturze 150°C – 160°C podrobów, tłuszczu czy kiełbasy obniża toksyczność OTA o ok. 20% (Weidenböner 2001). Pieczenie chleba powoduje spadek OTA maksymalnie do 40% (Scudamore i in. 2003), podczas gdy pieczenie produktów cukierniczych w 200°C przez 40 min powoduje spadek o 64%, a w 140°C w trakcie tego samego czasu o 21%. (Vidal i in. 2015). Istotną redukcję zaobserwowano również podczas pieczenia kiełbas. Pieczenie przez 60 minut w temperaturze 190°C spowodowało redukcję OTA średnio o 70,4%, w temperaturze 200°C w czasie 60 minut spadek o 80,7%, podczas gdy w 220°C w tym samym czasie o 76,3%. Gotowanie w czasie 30 minut redukowało OTA o średnio 7,4%, natomiast smażenie w ciągu 30 minut – 12,6% (Pleadin i in. 2014). Prażenie i pieczenie w wysokiej temperaturze 220°C – 250°C także powoduje spadek stabilności OTA, co może stanowić pewną barierę bezpieczeństwa w odniesieniu np. do kawy (Boudra i in. 1995; Vieira i in. 2015). Zjawisko to jest niezwykle ważne ze względu na to, że kawa jest jednym z najczęściej spożywanych napojów na świecie (Micek i in. 2019).

Tabela 3. Przykładowe wyniki badań opisujące występowanie OTA w różnych materiałach

	Produkt	Kraj	Wyniki	Źródło
Produkty przeznaczone do spożycia dla zwierząt	Kukurydza (rok 2011)	Polska	Próbki pozytywne: 2/30 Wartość maksymalna: 32,5 µg/kg	Kosicki i in. 2016
	Kukurydza (rok 2012)		Próbki pozytywne: 3/19 Wartość maksymalna: 86 µg/kg	
	Kukurydza (rok 2013)		Próbki pozytywne: 3/32 Wartość maksymalna: 5,09 µg/kg	
	Kukurydza (rok 2014)		Próbki pozytywne: 4/32 Wartość maksymalna: 11,9 µg/kg	
	Kiszonka z kukurydzy (rok 2011)	Polska	Próbki pozytywne: 10/20 Wartość maksymalna: 7,47 µg/kg	Kosicki i in. 2016
	Kiszonka z kukurydzy (rok 2012)		Próbki pozytywne: 1/17 Wartość maksymalna: 1,67 µg/kg	
	Kiszonka z kukurydzy (rok 2013)		Próbki pozytywne: 7/15 Wartość maksymalna: 10,2 µg/kg	
	Kiszonka z kukurydzy (rok 2014)		Próbki pozytywne: 4/20 Wartość maksymalna: 1,16 µg/kg	
	Ziarna zbóż (rok 2011)	Polska	Próbki pozytywne: 31/75 Wartość maksymalna: 155 µg/kg	Kosicki i in. 2016
	Ziarna zbóż (rok 2012)		Próbki pozytywne: 13/57 Wartość maksymalna: 18,8 µg/kg	
	Ziarna zbóż (rok 2013)		Próbki pozytywne: 7/44 Wartość maksymalna: 15,7 µg/kg	
	Ziarna zbóż (rok 2014)		Próbki pozytywne: 17/70 Wartość maksymalna: 37,5 µg/kg	
	Pasza (rok 2011)	Polska	Próbki pozytywne: 38/68 Wartość maksymalna: 88 µg/kg	Kosicki i in. 2016
	Pasza (rok 2012)		Próbki pozytywne: 109/144 Wartość maksymalna: 30,6 µg/kg	
	Pasza (rok 2013)		Próbki pozytywne: 69/86 Wartość maksymalna: 20 µg/kg	
	Pasza (rok 2014)		Próbki pozytywne: 70/114 Wartość maksymalna: 14,7 µg/kg	

cd. tabeli 3

Produkty przeznaczone do spożycia dla ludzi	Krew świń	Polska	Próbki pozytywne: 63/105 Wartość maksymalna: 122 µg/l	Kotowski i in. 1993
		Serbia	Próbki pozytywne: 28/90 Wartość średnia 3,70 µg/kg	Milićević i in. 2008
	Nerki świni	Serbia	Próbki pozytywne: 30/90 Wartość średnia 1,26 µg/kg	Milićević i in. 2008
	Wątroba świni	Serbia	Próbki pozytywne: 24/90 Wartość średnia 0,63 µg/kg	Milićević i in. 2008
	Podroby (żołądek, wątroba, nerki) kurczaków	Serbia	Żołądek: Próbki pozytywne: 15/90 Wartość średnia: 2,18 µg/kg Wątroba: Próbki pozytywne: 23/90 Wartość średnia: 1,62 µg/kg Nerki: Próbki pozytywne: 17/90 Wartość średnia: 1,19 µg/kg	Milićević i in. 2012
	Mięso kurczaków	Dania	Próbki pozytywne: 36/65 Wartość maksymalna: 0,18 µg/kg	Jørgensen 1998
		Czechy	Próbki pozytywne: 8/12 Wartość maksymalna: 0,38 µg/kg	Ostry i in. 2015
		Pakistan	Próbki pozytywne: 47/115 Wartość maksymalna: 4,70 µg/kg	Iqbal i in. 2014a
	Mięso gęsi	Dania	Próbki pozytywne: 12/30 Wartość średnia: 0,03 µg/kg	Jørgensen 1998
	Mięso kaczki	Dania	Próbki pozytywne: 11/19 Wartość maksymalna: 0,09 µg/kg	Jørgensen 1998
	Wieprzowina	Kanada	Quebec: Próbki pozytywne: 1/1 Wartość maksymalna: 0,06 µg/kg Calgary: Próbki pozytywne: 1/1 Wartość maksymalna: 0,2 µg/kg	Tam i in. 2011
	Burgery wołowe (hamburgery)	Kanada	Quebec: Próbki pozytywne: 1/1 Wartość maksymalna: 0,44 µg/kg Calgary: Próbki pozytywne: 1/1 Wartość maksymalna: 0,22 µg/kg	Tam i in. 2011
	Kiełbasa	Kanada	Quebec: Próbki pozytywne: 1/1 Wartość maksymalna: 0,12 µg/kg Calgary: Próbki pozytywne: 1/1 Wartość maksymalna: 0,06 µg/kg	Tam i in. 2011
	Salami	Włochy	Próbki pozytywne: 4/12 Wartość średnia: 0,06 µg/kg	Pietri i in. 2006
	Szynka suszona	Włochy	Próbki pozytywne: 12/30 Wartość średnia: 4,06 µg/kg	Pietri i in. 2006
	Jaja	Pakistan	Próbki pozytywne: 28/80 Wartość maksymalna: 2,98 µg/kg	Iqbal i in. 2014a
	Mleko krowie	Francja	Próbki pozytywne: 3/264 Wartość maksymalna 6,6 ng/L	Boudra i in. 2007
		Sudan	Próbki pozytywne: 1/5 Wartość maksymalna: 2,73 µg/l	Elzupir i in. 2009
		Norwegia	Próbki pozytywne: 6/40 Wartość maksymalna 0,058 µg/l	Skaug 1999
	Nabiał	Niemcy	Próbki pozytywne: 19/195 Wartość maksymalna: 0,86 µg/kg	EC 2002
		Norwegia	Próbki pozytywne: 15/85 Wartość maksymalna: 0,119 µg/kg	EC 2002
	Ser twarde	Włochy	Próbki pozytywne: 6/40 Wartość maksymalna: 54,07 µg/kg	Biancardi i in. 2013
	Lody	Kanada	Quebec: Próbki pozytywne: 1/1 Wartość maksymalna: 0,02 µg/kg Calgary: Próbki pozytywne: 1/1 Wartość maksymalna: 0,03 µg/kg	Tam i in. 2011
	Masło kakaowe	Kamerun	Próbki pozytywne: 24/36 Wartość maksymalna: 1,88 µg/kg	Mounjouenpou i in. 2012
	Masło orzechowe	Wielka Brytania	Próbki pozytywne: 2/6 Wartość średnia: 1,35 µg/kg	FSA 2002
	Mleko dla niemowląt	Turcja	Próbki pozytywne: 25/38 Wartość maksymalna 4,50 µg/kg	Baydar i in. 2006
	Mleko kobilece	Włochy	Próbki pozytywne: 198/231 Wartość maksymalna 0,057 µg/l	Turconi i in. 2004
	Mleko w proszku	Portugalia	Próbki pozytywne: 10/15 Wartość maksymalna: 0,212 µg/kg	Alvito i in. 2010

3.2.1. Wzory matematyczne pozwalające na wyliczenie określonych wartości charakteryzujących spożycie OTA

Zastosowanie poniższych wzorów pozwala wyliczyć dawki spożycia OTA wraz z pożywieniem, co umożliwi eliminację określonych produktów z codziennej diety:

1. średnia dzienna dawka spożycia OTA z pożywienia (Hajok i in. 2019):

$$ADD = \frac{C \cdot IR \cdot EF \cdot ED}{BW \cdot AT}$$

Gdzie:

ADD – średnia dzienna potencjalna dawka spożycia ochratoksyny A [$\text{mg kg}^{-1} \text{dzień}^{-1}$]

C – zawartość ochratoksyny A w pożywieniu [$\mu\text{g/kg}$]

IR – wskaźnik spożycia [g/dzień lub L/dzień w przypadku płynów]

EF – częstotliwość ekspozycji [365 dni^{-1}]

ED – czas ekspozycji [ok. 70 lat]

BW – masa ciała [ok. 70 kg]

AT – średni czas ekspozycji ($EF \times ED$)

2. prawdopodobne dzienne spożycie OTA na podstawie jej występowania w moczu (Gerding i in. 2014):

$$PDI [\mu\text{g/kg} \times \text{m.ciała/dzień}] = \frac{C \cdot V \cdot 100}{W \cdot E}$$

Gdzie:

PDI – prawdopodobne dzienne spożycie OTA

C – stężenie OTA w moczu [$\mu\text{g/L}$]

V – średnia objętość dziennej produkcji moczu [$1,5 \text{ l/dzień}$]

W – masa ciała [kg]

E – średni wskaźnik wydalania z moczem [$2,5\%$ dla ochratoksyny A]

3. spożycie OTA na podstawie jej występowania w moczu – równanie Klaassena'a (Palli i in. 1999; Malir i in. 2013; Fan i in. 2019):

$$K_0 [\mu\text{g/kg} \times \text{m.ciała/dzień}] = \frac{Cl_p \cdot C_p}{A}$$

Gdzie:

K_0 – spożycie OTA

Cl_p – klirens (współczynnik oczyszczania) osocza [$0,99 \text{ mL/kg} \times \text{m.ciała/dzień}$]

C_p – stężenie OTA w osoczu [$\mu\text{g/L}$]

A – biodostępność toksyny [dla ochratoksyny – 50%]

4. spożycie OTA na podstawie jej występowania w osoczu (Peraica i in. 1999a):

$$\text{Dzienne spożycie} = C_p \cdot 1,34$$

Gdzie:

C_p – stężenie OTA w osoczu [$\mu\text{g/L}$]

5. tolerowane dzienne spożycie OTA na podstawie jej występowania w osoczu (Heyndrickx i in. 2015):

$$TDS [\mu\text{g/kg} \times \text{m.ciała/dzień}] = \frac{OTA \cdot V}{ER \cdot BW \cdot 1000000}$$

Gdzie:

OTA – stężenie OTA w moczu [pg/L]

V – średnia objętość dziennej produkcji moczu [$1,5 \text{ l/dzień}$]

ER – współczynnik wydalania OTA z moczem [50%]

BW – masa ciała [kg]

3.3. Regulacje prawne i normy spożycia

Ze względu na powszechność występowania i bardzo wysoką toksyczność OTA organizacje zajmujące się zdrowiem na całym świecie starają się ustalić maksymalne poziomy jej spożycia, które nie przyniosą negatywnych konsekwencji dla organizmów.

W tabeli 4 przedstawione zostały ustanowione przez Komisję Europejską maksymalne dopuszczalne wartości OTA, które mogą występować w pożywieniu.

Tabela 4. Dopuszczalne normy ochratoksyny A w wybranych produktach spożywczych (Rozporządzenie Komisji (WE) nr 1881/2006 z późn. zm. i Zalecenie Komisji nr 2006/576/WE z późn. zm.)

Produkt	Najwyższa dopuszczalna wartość [$\mu\text{g}/\text{kg}$]
Ziarna zboża (nieprzetworzone)	5,0
Zboża i produkty zbożowe	0,25
Produkty z przetworzonych zbóż	3,0
Gluten pszenny	8,0
Suszone owoce winorośli (koryntki, rodzynki i sułtanki)	10,0
Kawa rozpuszczalna	10,0
Kawa palona	5,0
Wino	2,0
Sok winogronowy	2,0
Przyprawy i mieszanki przypraw: <i>Piper</i> spp. (czarny i biały pieprz), <i>Myristica fragrans</i> (gałka muszkatołowa), <i>Zingiber officinale</i> (imbir), <i>Curcuma longa</i> (kurkuma)	15,0
Przyprawy: <i>Capsicum</i> spp. (jego suszone owoce, całe lub mielone, w tym papryka chili, mielone chili, pieprz kajeński i papryka)	20,0
Korzeń lukrecji	20
Wyciąg z lukrecji	80
Przetworzona żywność na bazie zbóż oraz żywność dla niemowląt i małych dzieci	0,5
Produkty dietetyczne do specjalnych celów medycznych, przeznaczone specjalnie dla niemowląt	0,5
Mieszanki paszowe dla świń	0,05
Mieszanki paszowe dla drobiu	0,1
Mieszanki paszowe dla kotów i psów	0,01

Agencja Unii Europejskiej, która zajmuje się doradztwem naukowym na temat zagrożeń związanych z łańcuchem żywnościowym – EFSA określiła maksymalne dopuszczalne tygodniowe spożycie OTA wynoszące 120 ng/kg m.c. (EFSA 2006), natomiast Wspólny Komitet Ekspertów ds. Dodatków do Żywności – JECFA ustalił tygodniowe spożycie OTA na 100 ng/kg m.c. (JECFA 2008).



Dawka śmiertelna (LD_{50}) doustna OTA dla świń wynosi 1 mg/kg m.c., dla drobiu 3,3 mg/kg m.c. (EFSA 2004), dla myszy 46 – 58 mg/kg m.c., szczurów 20 – 30 mg/kg m.c., psów 0,2 mg/kg m.c. (FAO/WHO 2001). Ponadto dawka LD_{50} dootrzewnowa wynosi dla myszy 22 – 40 mg/kg m.c. i dla szczurów 13 mg/kg m.c., natomiast dawka LD_{50} po podaniu dożylnym wynosi dla myszy 26 – 34 mg/kg m.c. i dla szczurów 13 mg/kg m.c. (FAO/WHO 2001).

Oprócz określenia maksymalnych dopuszczalnych wartości spożycia OTA organizacje określają poziomy LOAEL, czyli najniższe poziomy, które powodują niepożądane efekty, oraz NOEL, czyli maksymalne poziomy, przy których nie obserwuje się działania toksycznego. Wartość LOAEL w przypadku 90-dniowego badania żywienia wynosi u świń 8 μ g/kg m.c./na dzień, powodując minimalne zmiany morfologiczne w nerkach, zmiany w enzymach nerkowych i zaburzenia czynności nerek. U szczurów wartość LOAEL wynosi również w przypadku 90-dniowego badania żywienia 15 μ g/kg m.c. (EFSA 2020). Natomiast poziomy NOEL ustanowione przez Komitet Ekspertów WHO i FAO dla różnych organizmów zostały przedstawione w tabeli 5.

Panel CONTAM zgodnie z wytycznymi EFSA uznał, że do oceny ryzyka działania OTA w organizmach należy stosować metody marginesu ekspozycji (MOE) – stosunek poziomu NOAEL lub BMDL dla krytycznego wpływu na teoretyczną, przewidywaną lub szacowaną dawkę ekspozycji lub stężenie (Benford i in. 2010). Zwiększone występowanie mikroskopowych zmian w nerkach obserwowane podczas 3-miesięcznego badania żywienia świń uznano za najbardziej odpowiednie nienowotworowe skutki oddziaływania OTA, uzyskano w nim wskaźnik BDML wynoszący 4,73l g/kg m.c./dzień. Panel CONTAM dla tej wartości BDML wyznaczył wartość MOE, która wynosi 200 (EFSA 2020).

Tabela 5. Wartości NOEL OTA dla różnych gatunków (FAO/WHO 2001)

Gatunek	Czas badania [dni]	Dawka [mg/kg m.c./dzień]	Wartość NOEL [mg/kg/m.c./dzień]	Wywoływany efekt
Szczury – samce	3	5	<5	Zmniejszony klirens kwasu para-amino-hipurowego
	4 – 10	4	<4	Zmniejszona liczba trombocytów
	10	0,5 – 2	<0,5	Zwiększona objętość moczu; zwiększone stężenie azotu mocznikowego we krwi
	14	0,24 – 2,4	~0,48	Opóźniony wzrost; zwiększone stężenie azotu mocznikowego we krwi
			~0,96	Zwiększona masa nerek
			< 0,24	Zmniejszona objętość moczu; zmiany w nerkach
58 – 84	0,24 – 2	<0,14	Zmniejszona aktywność enzymu nerkowego	
Szczury – samice	90	0,015 – 0,37	~0,075	Zmniejszony przyrost masy ciała
			~0,016	Zmniejszona masa nerek
			0,37	Wzrost gładkiego retikulum endoplazmatycznego, zmiany w szorstkim retikulum endoplazmatycznym
Psy – samce	14	0,1 – 0,2	<0,1	Martwica kanalików nerkowych; martwica limfoidalna

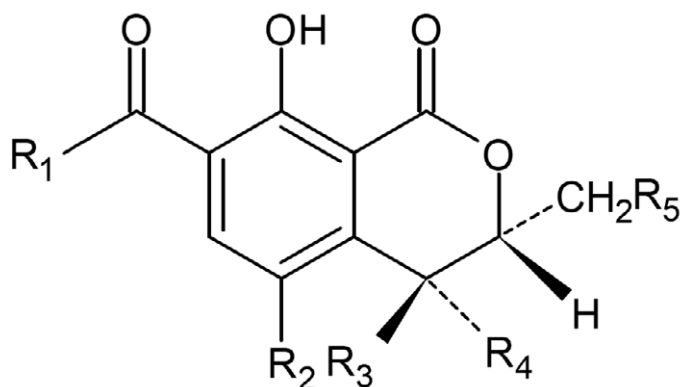
3.4. Zmodyfikowane formy ochratoksyny

Ochratoksyny oprócz najbardziej toksycznej formy A mogą występować w postaci mniej toksycznych form B i C (Van der Merwe i in. 1965a). W warunkach naturalnych powszechnie spotykana jest ochratoksyna A, ochratoksyna B występuje rzadko, podczas gdy ochratoksyna C nie występuje naturalnie w środowisku (Hwang i Draughon 1994). OTB jest niechlorowaną formą OTA (Tang i in. 2019) i różni się od niej podstawnikiem chloru przez wodór przy węglu 5 (Heussner i in. 2007). Występuje w ziarnach pszenicy i innych zbóż; zwykle kolonizuje się w klimacie umiarkowanym i tropikalnym (Elaridi i in. 2019). Jej masa atomowa wynosi 369,4 g/mol, a wzór strukturalny $C_{20}H_{19}NO_6$ (Heussner i Bingle 2015). Z kolei OTC jest estrem etylowym OTA (Tang i in. 2019) o masie atomowej 431,9 g/mol i wzorze strukturalnym $C_{22}H_{22}ClNO_6$ (Heussner i Bingle 2015).

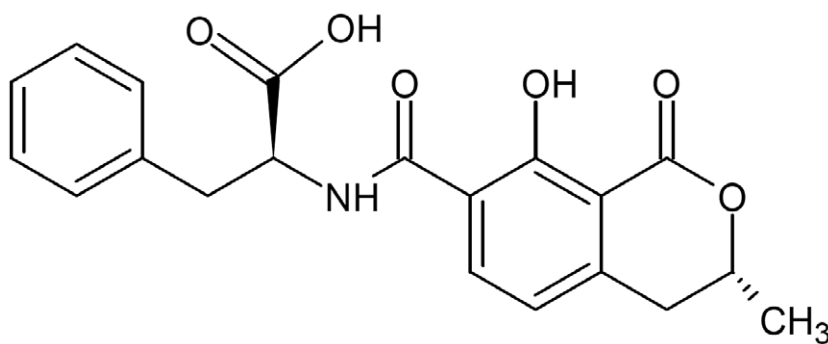
Pomimo niższej toksyczności OTB i OTC wykazują działanie nefrotoksyczne, hepatotoksyczne, właściwości genotoksyczne i są teratogenne (Qileng i in. 2018).

OTC jest szybko przekształcana w OTA w organizmach po podaniu doustnym. Badania wykazują, że pojedyncza dawka doustna OTC podana szczurom po 48 godzinach we krwi wykazuje podobny poziom OTA jak równoważna dawka OTA 60 minut po podaniu (EFSA 2020).

Rysunek 3 przedstawia ogólny wzór strukturalny OT, natomiast rysunek 4 wzór strukturalny OTB. W tabeli 6 przedstawiono inne wybrane formy OT (Khoury i Atoui 2010; Heussner i Bingle 2015).



Rysunek 3. Ogólna struktura OT

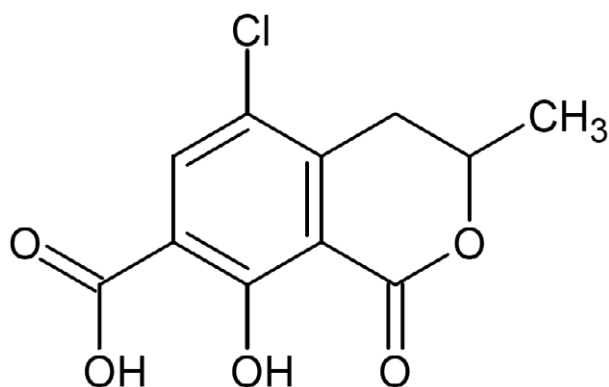


Rysunek 4. Wzór strukturalny OTB

Tabela 6. Wybrane formy OT (Khoury i Atoui 2010; Heussner i Bingle 2015)

Nazwa	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄	R ₅
Ester metylowy ochratoksyny A	Feniloalanina, Ester metylowy	Cl	H	H	H
Ester metylowy ochratoksyny B	Feniloalanina, Ester metylowy	H	H	H	H
Ester etylowy ochratoksyny B	Feniloalanina, Ester etylowy	H	H	H	H
Ochratoksyna β	OH	H	H	H	H
5'-Hydroksyochratoksyna A	Feniloalanina, OH przy 5 węglu	Cl	H	H	H
7'-Hydroksyochratoksyna A	Feniloalanina, OH przy 7 węglu	Cl	H	H	H
9'-Hydroksyochratoksyna A	Feniloalanina, OH przy 9 węglu	Cl	H	H	H
4R-Hydroksyochratoksyna A	Feniloalanina	Cl	H	OH	H
4S-Hydroksyochratoksyna A	Feniloalanina	Cl	OH	H	H
4R-Hydroksyochratoksyna B	Feniloalanina	H	H	OH	H
4S-Hydroksyochratoksyna B	Feniloalanina	H	OH	H	H
10-Hydroksyochratoksyna A	Feniloalanina	Cl	H	H	OH
Analog tyrozynowy ochratoksyny A	Tyrozyna	Cl	H	H	H
Analog serynowy ochratoksyny A	Serynowy	Cl	H	H	H
Analog lizynowy ochratoksyny A	Lizyna	Cl	H	H	H
Analog hydroksyprolinowy ochratoksyny A	Hydroksyprolina	Cl	H	H	H
Analog leucynowy ochratoksyny A	Leucyna	Cl	H	H	H

Ponadto, OTA posiada swoją mniej toksyczną (ok. 100 razy) formę (Heussner i Bingle 2015) – ochratoksynę α, której wzór strukturalny przedstawiono na rysunku 5. Powstaje ona w wyniku rozerwania wiązania peptydowego OTA (Klapec i in. 2012). Dzieje się tak, gdy wiązanie amidowe między feniloalaniną a kwasem dihydroizokumarowym ulegnie hydrolizie (EFSA 2020). Uważa się, że OT-α głównie wytwarzana jest przez mikrobiom jelitowy u zwierząt innych niż przeżuwacze, w tym u ludzi oraz przez mikrobiom żwacza u przeżuwaczy (EFSA 2020).



Rysunek 5. Wzór strukturalny OT-α

3.5. Toksokinetyka

3.5.1. Absorbpcja

OTA jest szybko absorbowana w układzie krwionośnym, zwłaszcza po podaniu doustnym. Maksymalne poziomy we krwi OTA osiąga w ciągu kilku godzin (EFSA 2020). W przypadku świń wchłanianie OTA występuje w 66%, u szczurów i królików w 56% oraz u kurczaków w 40% (Walker i Larsen 2005, EFSA 2020). W układzie krwionośnym łączy się z albuminą, a następnie wchłaniana jest przez przewód pokarmowy (Chang i Chu 1977; Scott 2005; Dohnal i in. 2013). Dla przykładu, po doustnym podaniu 50 ng/g m.c. OTA w zaledwie 0,02% pozostanie niezwiązana z albuminą u ludzi, w 0,08% u małą, w 0,1% u myszy i świń oraz w 22% u ryb (EFSA 2020).

Badania przeprowadzone na szczurach wykazały, że OTA może być absorbowana we wszystkich odcinkach układu pokarmowego. Najwyższą absorbcją wykazuje się jednakże bliższa część jelita cienkiego – jelito czcze (EFSA 2020). Dodatkowo jelita bardziej absorbują OTA w warunkach niższego pH (Kumagai 1988). Badania biochemiczne wykazują, że OTA przed absorbcją może być deestryfikowana (Fuchs i in. 1984).

3.5.2. Metabolizm i wydalanie ochratoksyny A

OTA trudno wydalic z organizmu. Transportowana jest glównie przez żyłę wrotną (Kumagai i Aibara 1982). Po wchłonięciu z jelita przedostaje się do kanalików proksymalnych, a tylko niewielka jej część ulega filtracji kłębuszkowej i wydalana jest z moczem (Ringot i in. 2006). Wpływ na wydalanie OTA z organizmu ma płeć, a nawet konkretny genotyp. Równie ważna jest mikroflora jelitowa, która może przyczynić się do metabolizmu OTA do mniej toksycznej OT- α (u szczurów) (Galtier 1978). W przypadku ludzi zaobserwowano podobną sytuację – w dwunastnicy OTA może zostać rozszczepiona przez enzymy jelitowe lub enzymy proteolityczne – karboksypeptydazy czy chymotrypsynę i przekształcona do mniej toksycznej formy OT- α (Pitout 1969). W przypadku przeżuwaczy OTA przez karboksypeptytazę A i chymotrypsynę w jelicie ślepyim przekształcana jest do OT- α i fenyloalaniny (Boudra i in. 2013).

OTA jest przeważnie wydalana z organizmu z moczem, kałem (Støren i in 1982, EFSA 2020), pośrednio z żółcią (Roth 1988) lub mlekiem (Scott 2005).

Z kałem lub moczem OTA (jak również inne ochratoksyny) wydalana jest częściowo niezmieniona, w formie licznych powiązań i częściowo w formie niezidentyfikowanych metabolitów (Grajewski 2003).

Ponadto OTA charakteryzuje się długim okresem półtrwania w organizmach ludzi – około 35 dni (EFSA 2006). U szczurów okres ten trwa 3 – 10 dni (w zależności od rasy), u świń 5 – 6 dni, a u naczelných innych niż ludzie 19 – 21 dni (EFSA 2020).

Niektóre szczepy bakterii posiadają zdolność do eliminacji OTA z organizmów żywych. Dzieje się tak dzięki hydrofobowemu połączeniu OTA z komórkami bakterii (Turbic 2002). Do bakterii tych należą: bakterie kwasu mlekowego – *Lactobacillus*, *Streptococcus* oraz *Bifidobacterium* (Škrinjar i in. 1996), *Butyrivibro fibriosolvens* (Westlake i in. 1987), *Acinetobacter calcoaceticus* (Hwang i Draughon 1994), *Phenylbacterium immobile* (Wegst i Lingens 1983), a także drożdże: *Saccharomyces cerevisiae* (Böhm i in. 2000).

Biotransformacja OTA u ludzi obejmuje niewielką konwersję do hydroksyloowanych lub odchlorowanych produktów cytochromu P450, metabolitów fazy II (głównie estry między cukrami – pentozy i heksozy) i grupy karboksylowej fenyloalaniny, które zostały wykryte w ludzkich hepatocytach (Gross-Steinmeyer i in. 2002).

3.6. Biomarkery narażenia

W odniesieniu do biomarkerów narażenia na działanie OTA opracowano metody oparte na badaniach płynów ustrojowych (krew, mocz, mleko kobiece). Powiązanie przyjmowania pokarmu z ilością OTA we krwi jest stosunkowo trudne z powodu długiego okresu półtrwania OTA oraz wiązania się OTA z białkami (EFSA 2019).

Dane pochodzące z raportu JECFA obrazują, że stężenie OTA we krwi wynosi od 0,1 do 10 ng/ml (EFSA 2006). Oznaczenie OTA w moczu wydaje się być bardziej odpowiednim markerem narażenia, ponieważ metody wykrywania są czulsze (ok. 0,01 ng/ml). OTA przenika do mleka kobiecego, dlatego analiza próbek mleka może służyć jako dodatkowy marker narażenia (EFSA 2019).

3.7. Toksyczność

OTA dystrybuowana jest do każdego narządu organizmu, natomiast jej toksyczność zależy od gatunku i podawanej dawki (EFSA 2020). OTA działa nefrotoksycznie, hepatotoksycznie, teratogenicznie, mutagenicznie i immunosupresyjnie (Pascale i Visconti 2000; Wu i in. 2011; Awad i in. 2012; Ali i in. 2016; Sueck i in. 2018). Badania wykazują, że OTA zakłóca proces krzepnięcia krwi (Doerr i in. 1974) i metabolizowania węglowodanów (Suzuki i in. 1975). Ponadto OTA działa embriotoksycznie, genotoksycznie, neurotoksycznie (O'Brien i Dietrich 2005, Malir i in. 2013), a nawet mielotoksycznie – u myszy powoduje hipokomórkowość szpiku kostnego i zmniejszoną liczbę pluripotencjalnych komórek macierzystych szpiku (Boorman i in. 1984). Dowiedzione zostało również, że OTA hamuje przenoszenie elektronów, które jest zależne od bursztynianu, co sugeruje toksyczność mitochondrialną (Wei i in. 1985).

3.7.1. Kancerogenność

Początkowo Międzynarodowa Agencja Badań nad Rakiem (IARC) w 1987 roku zakwalifikowała OTA do grupy 3 (niezaklasyfikowana jako kancerogenna dla ludzi) (IARC 1987), natomiast wraz z upływem lat i poszerzaniem wiedzy na temat toksyczności OTA została zakwalifikowana w 1993 roku do grupy 2B (prawdopodobnie rakotwórcza dla ludzi), co czyni ją kancerogenną (IARC 1993).

Uznaje się, że OTA jest czynnikiem, który wywołuje nowotwory i guzy układu moczowego u ludzi (Palli i in. 1999) i innych organizmów. W 1978 roku badania wykazały, że OTA indukuje guzy nerek i wątroby u myszy (Kanisawa i Suzuki 1978), natomiast w 1984 roku została uznana za kancerogenną dla myszy (Bendele i in. 1985).

3.7.2. Nefrotoksyczność

Głównymi narządami narażonymi na toksyczność OTA są nerki (Kamali i in. 2017).

Stwierdzono, że OTA może indukować wydzielanie się kolagenu w uszkodzonych komórkach nabłonkowych kanalików proksymalnych, tym samym upośledzając funkcje ludzkich nerek (Sauvant i in. 2005) – niszczona jest integralność błony komórkowej, chromatyna zostaje skondensowana i pojawia się otoczka jądrowa. Ponadto obraz histologiczny ujawnił powiększenie się błony cewkowej i pojawienie się włókien kolagenowych (Malir i in. 2016). W 1999 roku OTA została uznana za czynnik indukujący apoptozę w komórkach proksymalnych nerek (Schwerdt i in. 1999). Podatność nerek na kumulowanie OTA związana jest z wychwytywaniem jej przez transportery anionów organicznych w nerkach, w szczególności transporter anionów organicznych 1 (EFSA 2019).

3.7.2.1. Bałkańska Endemiczna Nefropatia (BEN) i Endemiczna przewlekła nefropatia śródmiąższowa (CIN)

OTA uważana jest za jeden z czynników etiologicznych odpowiedzialnych za BEN (Bałkańską Endemiczną Nefropatię) (Wu i in. 2011; Ali i in. 2016). BEN jest chronicznym cewkowo-śródmiąższowym schorzeniem nerek, które może prowadzić do ich niewydolności. Po raz pierwszy zostało opisane w 1956 roku w Bułgarii (Stefanovic i in. 2011). Jego pierwszymi objawami klinicznymi są między innymi plastyczna lub normochroniczna anemia, łagodna proteinuria, następnie stopniowo wzrasta poziom azotu i kreatyniny we krwi oraz występuje nadciśnienie (Fuchs i Peraica 2005). W późniejszym stadium BEN nerki ulegają zmniejszeniu i następuje zwłóknienie śródmiąższowe. W ostatnim stadium choroby następuje niewydolność nerek, enzymuria, wielomocz. Towarzyszy temu czerwony język, zwiększone pragnienie i gorzki posmak w ustach. Innymi zgłaszanymi objawami są bóle głowy i bóle lędźwiowe, osłabienie, niedokrwistość, glikozuria, białkomocz, alkalizacja moczu, podwyższone stężenie kreatyniny w surowicy oraz zwiększenie stężenia immunoglobulin M i E (IgM, IgE) (Malir i in. 2016). W przypadku BEN występują również objawy takie jak: zaburzona zdolność koncentracji, zmniejszona szybkość filtracji kłębuszkowej, kwasica, leukocyturia aseptyczna (Gifford i in. 2017). W przebiegu BEN częstym symptomem jest zwiększone wydalanie beta-2-mikroglobulin (Hall i in. 1972).

BEN przypomina inne schorzenie dotyczące nerek – przewlekłą nefropatię śródmiąższową (CIN) występującą w krajach afrykańskich – w tym przypadku OTA również uznawana jest za jeden z jej czynników etiologicznych (Grosso i in. 2003). Po raz pierwszy jej podobieństwo do BEN zostało opisane w 1995 roku. Autorzy tej publikacji podali, że u zdrowych osób stężenia OTA wynosiły od 0,1 do 2,3 ng/ml w surowicy lub osoczu, a u pacjentów z CIN wartości OTA wynosiły od 0,7 do 1136 ng/ml w surowicy lub osoczu (Maaroufi i in. 1995). U ludzi mieszkających w obszarach endemicznych stężenie OTA w osoczu może przekraczać 100 nmol/l, podczas gdy w przypadku osób zdrowych zakres ten wynosi od kilkuset pmol/l do kilku nmol/l (Kószegi i Poór 2016).

3.7.3. Genotoksyczność i mutagenność

Genotoksyczność i mutagenność OTA przejawia się przez indukowanie aberracji chromosomalnej *in vivo* (Manolova i in. 1990). Genotoksyczność OTA zaczęto badać w 1989 roku (Malir i in. 2016). Charakteryzuje się ona tworzeniem adduktu DNA (De Groene i in. 1996; Malir i in. 2016) oraz zdolnością do wywoływania przerw w łańcuchach DNA i wymiany siostrzanych chromatyd (Föllmann i in. 1995). Oprócz tego OTA hamuje syntezę DNA, RNA i białek (Schilter i in. 2005). Hamowanie syntezy białek spowodowane jest konkurencją z fenyloalaniną w reakcji katalizowanej fenyloalanylo-tRNA (Bunge i in. 1978). OTA przyczynia się do hamowania oddychania mitochondrialnego, co w konsekwencji prowadzi do komórkowego wyczerpania nakładów ATP oraz posiada zdolność wywoływania mutacji genów w komórkach bakterii (Grajewski 2003). W komórkach nerkowych i wątrobowych szczurów odnotowano dowody na uszkodzenie oksydacyjne DNA spowodowane OTA (EFSA 2020).

3.7.4. Neurotoksyczność

Wyniki badań *in vitro* i *in vivo* u myszy pokazują, że OTA ma negatywny wpływ na mózdek, hipokamp, skorupę i jądro ogoniaste, rdzeń kręgowy, śródmózgowie, korę mózgową

(Sava i in. 2006) i prążkowie (Doi i Uetsuka 2011). W hipokampie u myszy została wykazana zmniejszona proliferacja neuronalnych komórek macierzystych, co może być przyczyną problemów z pamięcią i depresją obserwowanych w przypadku ludzi narażonych na działanie OTA (Sava i in. 2007).

Istnieją też badania, które sugerują, że OTA może przyczynić się do rozwoju chorób neurodegeneracyjnych, takich jak choroba Alzheimera i Parkinsona (Zhang i in. 2009), a także dysfunkcji mózgu (Doi i Uetsuka 2011).

3.7.5. Immunotoksyczność

Immunosupresyjna aktywność OTA u zwierząt charakteryzuje się zmniejszeniem wielkości narządów odpornościowych, do których należą grasica, śledziona oraz węzły chłonne. Dodatkowo zmniejsza się ilość i funkcje komórek odpornościowych, następuje obniżenie odpowiedzi przeciwciał i modulacja produkcji cytokin (Al-Anati i Petzinger 2006). Skutkuje to zwiększeniem podatności na występowanie infekcji (Duarte i in. 2011). OTA wpływa na funkcje odpornościowe na poziomie syntezy przeciwciał oraz na aktywność komórek NK (natural killer) (Lea i in. 1989), powoduje także zubożenie komórek limfoidalnych w śledzionie i węzłach chłonnych psów (Szczech i in. 1973). Spożycie OTA powoduje leukocytopenię i limfopenię u kurczaków (Chang i in. 1979). OTA powoduje także zubożenie limfoidalne w grasicy, kaletce Fabrycjusza i śledzionie indyków (Dwivedi i Burns 1985)

3.8. Mechanizm działania ochratoksyny A (MOA)

OTA jest toksyczna dla komórek, w których zachodzi apoptoza (in vitro) oraz dla proksymalnych komórek kanalików nerkowych (in vivo). OTA jest transportowana przez OAT1 (organiczny transporter anionowy 1), a kodowana przez białko kodujące – SLC22A6, które ulega ekspresji głównie w nerkach, co tłumaczy wysoką toksyczność OTA w stosunku do tego narządu (EFSA 2020).

W badaniach in vitro w wielu komórkach odnotowano związek między stresem oksydacyjnym a utratą potencjału błony mitochondrialnej związanej z apoptozą indukowaną przez OTA. OTA może również indukować apoptozę niezależną od mitochondriów, ponieważ w ludzkich komórkach TH9 następuje wzrost czynnika martwicy nowotworów α (TNF α) oraz aktywacja enzymu kaspazy 8. Istnieją dowody na to, że kompleks Fe $^{3+}$ i OTA może produkować rodniki hydroksylowe w obecności NADPH i reduktazy NADPH-cytochrom-P-450 (EFSA 2020).

W komórkach HepG2 OTA powoduje ekspresję genów związanych z zapaleniem, stresem oksydacyjnym, przeżywalnością komórek, metabolizmem energetycznym i ksenobiotycznym (EFSA 2020).

W komórkach kanalików nerkowych świni (LLC-PK1) działanie OTA zmniejsza ilość dysmutazy ponadtlenkowej (enzym) oraz zmienia jej aktywność, zmniejsza ekspresję S-transferazy, a jednocześnie zwiększa ilość reaktywnych form tlenu. W badaniach komórek nerek świni (PK15) zaobserwowano, że stosunek glutationu (GSH) do disiarczku glutationu (GSSG) przez działanie OTA zmniejsza się (EFSA 2020). Stres oksydacyjny wywołany OTA został również zaobserwowany u świni i szczurów.

3.9. Ochratoksykozy

Ochratoksykozy to mikotoksykozy (ostre lub przewlekłe zatrucia mikotoksynami), które występują częściej u zwierząt niż u ludzi. Przeżuwacze są mało wrażliwe na działanie OTA, co tłumaczone jest hydrolizą OTA do mało toksycznej OT- α w przedżołądku (Grajewski 2003). W przypadku kurcząt podanie doustne OTA powoduje patologiczne zmiany w wątrobie i nerkach (Khan i in. 2014). W przypadku ochratoksykoz u indyków występuje zmniejszone tempo wzrostu, zapalenie pęcherzyków płucnych, nefropatia czy odmowa jedzenia, podczas gdy u kurcząt występuje zmniejszone tempo wzrostu, nefropatia, zapalenie pęcherzyków płucnych, słaba pigmentacja i odmowa karmienia (Schaeffer i Hamilton 1986). U świń po doustnym podaniu OTA następuje zmniejszony apetyt wielomocz, polidypsja i zmniejsza się masa ich ciała (Tapia i Seawright 1984).



ZEARALENON

4.1. Wytwarzanie i budowa zearalenonu

Zearalenon był znany kiedyś jako F-2 lub mikotoksyna RAL (Peraica i in. 1999b; Bennett i Klich 2003). To lakton kwasu 6-(10-hydroksy-6-oksy-trans-1-undecenylo-beta-rezorcyłowego) o wzorze sumarycznym $C_{18}H_{22}O_5$ (rys. 5) (Urry i in. 1966). Po raz pierwszy (jeszcze jako F-2) został wyizolowany z kukurydzy inokulowanej *Fusarium* (Stob i in. 1962) – ZEN produkowany jest głównie przez grzyby z rodzaju *Fusarium* (SCOOP 2003).

Nazwa zearalenon powstała z połączenia terminów *zea mays* (kukurydza), *resorcylic acid lactone* (lakton kwasu rezorcyłowego), „en” dla obecności wiązania podwójnego i „on” dla grupy ketonowej (Urry i in. 1966).

ZEN jest niesteroidową mikotoksyną estrogenową (Tsakmakidis i in. 2006), biosyntetyzowaną szlakiem poliketydu (Zinedine i in. 2007). Jego masa molowa wynosi 318,364 g/mol. Jest słabo polarnym związkiem występującym w postaci białych kryształów wykazujących niebiesko-zieloną fluorescencję przy wzbudzeniu fal 360 nm oraz zieloną przy wzbudzeniu UV 260 nm (Scudamore 2008).

Temperatura topnienia ZEN wynosi 164°C – 165°C, a jego rozpuszczalność w wodzie 0,002 g/100 ml (Scudamore 2008). Dobrze jednak rozpuszcza się w wielu roztworach alkalicznych, takich jak benzen, acetonitryl, aceton czy alkohole (Hidy i in. 1977). Ulega degradacji pod wpływem promieniowania UV w środowisku alkalicznym (Kong i in. 2012). Strukturą chemiczną przypomina naturalne estrogeny, takie jak 17β-estradiol (Kuiper-Goodman i in. 1987).

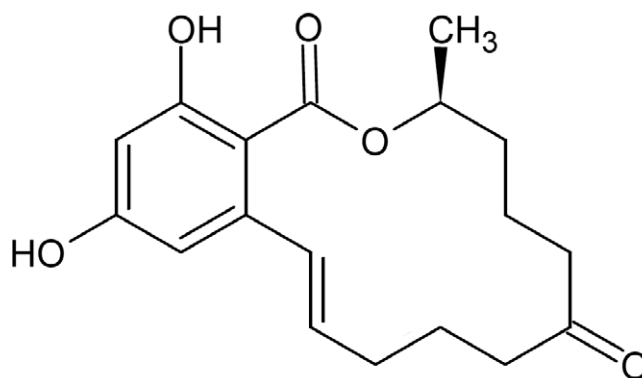
W tabeli 7 przedstawiono przykłady grzybów pleśniowych produkujących zearalenon, na rysunku 6 wzór strukturalny ZEN, natomiast na zdjęciu 5 obraz mikroskopowy grzyba produkującego ZEN – *Fusarium graminearum*.

Tabela 7. Gatunki grzybów pleśniowych produkujących ZEN

Gatunek grzyba pleśniowego	Źródło
<i>Fusarium graminearum</i>	Peraica i in. 1999b
<i>Fusarium graminearum</i> <i>Fusarium culmorum</i> <i>Fusarium equiseti</i> <i>Fusarium crookwellense</i>	Bennett i Klich 2003
<i>Fusarium graminearum</i> <i>Fusarium culmorum</i> <i>Fusarium sporotrichioides</i>	Zain 2011
<i>Fusarium graminearum</i> <i>Fusarium culmorum</i> <i>Fusarium roseum</i>	Hueza i in. 2014

cd. tabeli 7

<i>Fusarium graminearum</i> <i>Fusarium culmorum</i> <i>Fusarium sporotrichioides</i>	D'Mello i Macdonald 1997
<i>Fusarium graminearum</i> <i>Fusarium culmorum</i> <i>Fusarium avenaceum</i> ,	Bottalico i Perrone 2002
<i>Fusarium cerealis</i> <i>Fusarium culmorum</i> <i>Fusarium equiseti</i> <i>Fusarium graminearum</i> <i>Fusarium pallidoroseum</i>	Flores-Flores i in. 2015
<i>Fusarium graminearum</i> <i>Fusarium culmorum</i>	Kwaśniewska i in. 2015



Rysunek 6. Wzór strukturalny ZEN

Zdjęcie 5. Konidia *Fusarium graminearum*
(kolekcja Katedry Fizjologii i Toksykologii UKW)



4.2. Metabolity zearalenonu

ZEN posiada dwa główne metabolity: α -zearalenol (α -ZEL) i β -zearalenol (β -ZEL), które powstają w wyniku biotransformacji ZEN (Zinedine i in. 2007; Ueberschär i in. 2016). α -ZEL powstaje w organizmach zwierząt, które są bardziej wrażliwe na toksyny – np. świnie, natomiast β -ZEL w organizmach zwierząt mniej wrażliwych – bydło (Fink-Gremmels i Malekinejad 2007). Innymi metabolitami ZEN są α -zearalanol (α -ZAL) i β -zearalanol (β -ZAL) (Minervini i in. 2006).

Ponadto ze względu na podwójne wiązanie w pierścieniu laktonowym (C_{11} i C_{12}) ZEN może występować w formie dwóch izomerów: trans i cis. Forma cis wykazuje większe powinowactwo do receptorów estrogenowych niż forma trans (Mirocha i in. 1978).

4.3. Występowanie zearalenonu w żywności

ZEN produkowany jest przez grzyby pleśniowe głównie w klimacie umiarkowanym (Zinedine i in. 2007). Występuje w pszenicy, kukurydzy, jęczmieniu, sorgo (Lombard 2014), ryżu, prosie, soi (Zinedine i in. 2007) i mieszankach paszowych (Jodlbauer i in. 2000). Ponadto ZEN został wykryty w płatkach zbożowych, suszonych owocach, chlebie, oleju, piwie, słodzie, mące (Zinedine i in. 2007), winie, przyprawach (Rivera-Núñez i in. 2019). Spożycie skażonej paszy lub surowców przez zwierzęta może spowodować przedostanie się ZEN do ich mleka, jaj i mięsa, a tym samym po spożyciu przez ludzi kumulować się w ich organizmach (Rivera-Núñez i in. 2019; Rogowska i in. 2019a).

Zarówno ZEN jak i jego pochodne, mogą znaleźć się w żywności w wyniku celowego działania, np. podanie α -ZEL, jako czynnika wzrostu zwierzętom lub niezamierzonego – samoistnego zanieczyszczenia grzybami pleśniowymi pożywienia (Rivera-Núñez i in. 2019).

W tabeli 8 przedstawione zostały przykładowe wyniki badań opisujące występowanie ZEN w żywności.

Tabela 8. Przykładowe wyniki badań opisujące występowanie ZEN w żywności

Produkt	Kraj	Wyniki	Źródło
Podroby (żołądek, serce, wątroba) kurczaka	Chiny	Żołądek: Próbki pozytywne: 20/20 Wartość średnia: 71,6 μ g/kg Serce: Próbki pozytywne: 20/20 Wartość średnia: 64,6 μ g/kg Wątroba: Próbki pozytywne: 30/30 Wartość średnia: 62,9 μ g/kg	Wang i in. 2018
Mięso kurczaka	Pakistan	Próbki pozytywne: 60/115 Wartość maksymalna: 5,1 μ g/kg	Iqbal i in. 2014a
Mięso mielone	Egipt	Próbki pozytywne: 5/20 Wartość średnia: 7,2 μ g/kg	El-Hoshy 1999
Mięso wołowe	Egipt	Próbki pozytywne: 5/25 Wartość średnia: 8,7 μ g/kg	El-Hoshy 1999
Mięso wieprzowe	Chorwacja	Próbki pozytywne: 11/11 Wartość maksymalna: 4,31 μ g/kg	Pleadin i in. 2015

cd. tabeli 8

Ryby (karaś)	Chiny	Próbki pozytywne: 2/7 Wartość maksymalna: 14,8 µg/kg	Sun i in. 2015
Suszone produkty rybne	Chiny	Próbki pozytywne: 5/9 Wartość maksymalna: 317,3 µg/kg	Sun i in. 2015
Burger wołowy (Hamburger)	Egipt	Próbki pozytywne: 3/20 Wartość średnia: 4,8 µg/kg	El-Hoshy 1999
Kiełbasa	Egipt	Próbki pozytywne: 5/20 Wartość średnia: 6,3 µg/kg	El-Hoshy 1999
Jajka	Chiny	Próbki pozytywne: 32/72 Wartość średnia: 29,1 µg/kg	Wang i in. 2018
Ser Kareish	Egipt	Próbki pozytywne: 6/25 Wartość średnia: 8,9 µg/kg	El-Hoshy 1999
Ser twardy	Egipt	Próbki pozytywne: 5/20 Wartość średnia: 10,4 µg/kg	El-Hoshy 1999
Mleko	Egipt	Próbki pozytywne: 4/20 Wartość średnia: 6,9 µg/kg	El-Hoshy 1999
	Chiny	Próbki pozytywne: 7/30 Wartość średnia: 0,0149 µg/kg	Huang i in. 2014
Mleko dla dzieci	Włochy	Próbki pozytywne: 17/185 Wartość maksymalna: 0,76 µg/l	Meucci i in. 2011
Mleko kobiece	Włochy	Próbki pozytywne: 15/178 Wartość średnia: 2,7 µg/l	Valitutti i in. 2018
	Włochy	Próbki pozytywne: 47/47 Wartość średnia: 1,13 µg/l	Massart i in. 2016
Mleko w proszku	Egipt	Próbki pozytywne: 6/20 Wartość średnia: 6,4 µg/l	El-Hoshy 1999
	Chiny	Próbki pozytywne: 2/8 Wartość średnia: 0,0116 µg/kg	Huang i in. 2014

4.4. Regulacje prawne i normy spożycia

Podobnie jak w przypadku OTA światowe organizacje zajmujące się szeroko pojętymi zagadnieniami z zakresu zdrowia starają się określić poszczególne wartości ZEN dopuszczalne do spożycia. JECFA określiło maksymalne tolerowane dzienne spożycie ZEN przez ludzi wynoszące 0,5 µg/kg m.c. (EFSA 2011). Niemniej jednak średnie dzienne narażenia w przypadku dorosłych wynosi 4 – 29 ng/kg m.c./dzień, natomiast w przypadku dzieci wartość ta wynosi 6 – 55 ng/kg m.c./dzień. Głównymi źródłami narażenia są kukurydza, pszenica oraz produkty na nich bazujące (SCOOP 2003). Ponadto Komisja Europejska określiła dopuszczalną wartość ZEN w paszach przeznaczonych do karmienia dorosłych świń na poziomie wynoszącym 0,25 mg/kg i do karmienia młodych prosiąt – 0,1 mg/kg (tab. 9). Dawka doustna LD₅₀ ZEN dla myszy, szczurów i świńek morskich wynosi powyżej 2000 mg/kg m.c. (EFSA 2011). W przypadku ZEN poziom LOAEL przez WHO/FAO został określony na 200 µg/kg m.c./dzień, natomiast poziom NOEL na 40 µg/kg m.c./dzień w 15-dniowym badaniu świń (IPCS 2000). Szczegółowe poziomy NOEL zostały przedstawione w tabeli 10.



Tabela 9. Dopuszczalne poziomy zearalenonu w wybranych produktach spożywczych oraz produktach przeznaczonych do żywienia zwierząt (mieszanki paszowe) (Rozporządzenie Komisji (WE) nr 1881/2006 i Zalecenie Komisji nr 2006/576/WE z późn. zm.)

Produkt	Najwyższa dopuszczalna wartość [µg/kg]
Nieprzetworzone zboża, inne niż kukurydza	100
Nieprzetworzona kukurydza	350
Zboża przeznaczone do bezpośredniego spożycia przez ludzi, mąka zbożowa, otręby, jako produkt końcowy wprowadzony na rynek do bezpośredniego spożycia przez ludzi oraz zarodki	75
Olej kukurydziany rafinowany	400
Kukurydza przeznaczona do bezpośredniego spożycia przez ludzi, przekąski kukurydziane i płatki śniadaniowe na bazie kukurydzy	100
Chleb (w tym małe produkty piekarnicze), ciasta, herbatniki, przekąski zbożowe i zboża śniadaniowe, z wyłączeniem przekąsek kukurydzianych i zbóż śniadaniowych opartych na kukurydzy	50
Przetworzona żywność na bazie zbóż (z wyłączeniem przetworzonej żywności opartej na kukurydzy) oraz żywność dla niemowląt i małych dzieci	20
Przetworzona żywność oparta na kukurydzy, przeznaczona dla niemowląt i małych dzieci	20
Mieszanki paszowe dla prosiąt, loszek, szczeniąt, kociąt, psów i kotów przeznaczonych do reprodukcji	0,1
Mieszanki paszowe dla dorosłych psów i kotów innych niż przeznaczone do reprodukcji	0,2
Mieszanki paszowe dla macior i tuczników	0,25
Mieszanki paszowe dla cieląt, bydła mlecznego, owiec (w tym jagniąt) i kóz (w tym kozłąt)	0,5

Tabela 10. Wartości NOEL dla ZEN-u dla różnych gatunków zwierząt (IPCS 2000)

Gatunek	Czas badania	Dawka [mg/kg m.c./dzień]	Wartość NOEL [mg/kg/m.c./dzień]	Wywoływany efekt
Myszy – samice w ciąży	1 dzień	20	< 20	Zwiększona liczba zgonów płodów
Szczury – samce i samice	56 dni	0,85	< 0,85	Zmniejszona płodność; zaburzenia spermatogenezy
Szczury – samce	5 tygodni	20	< 20	Zwiększone stężenie prolaktyny w surowicy
Indyk – samce	56 dni	4	< 4	Zmniejszona produkcja jaj
Świnia – samice w ciąży	2	0,09	< 0,09	Zmniejszona masa przysadki, tarczycy, nerek, śledziony, rdzenia kręgowego

4.5. Toksokinetyka

4.5.1. Absorbcja, wydalanie i metabolizm

ZEN po podaniu doustnym szybko zostaje wchłonięty przez organizm; w przypadku ścian jelit zwierząt monogastrycznych oraz przewodu pokarmowego człowieka zearalenon jest w szczególności metabolizowany przez enterocyty do głównych metabolitów α - i β -ZEL i α - i β -ZAL, które następnie ulegają biotransformacji (D'Mello i in. 1999). Badania wykazują istnienie dwóch ścieżek biotransformacji ZEN u zwierząt. Pierwsza opiera się na hydroksylacji prowadzącej do powstania α - i β -ZEL przy katalizowaniu przez dehydrogenazy 3α - i 3β -hydroksysteroidowe (HSD). Forma α ma większe powinowactwo do receptorów estrogenów, w związku, z czym jest bardziej toksyczna niż ZEN, natomiast forma β ma mniejsze powinowactwo do tych receptorów, co czyni ją praktycznie nieszkodliwą. Druga ścieżka biotransformacji opiera się na sprzężeniu ZEN i jego metabolitów z kwasem glukuronowym katalizowanym przez urydyno-5-difosfo-glukuronozylotransferazę (UDPGT) (Zinedine i in. 2007).

ZEN i jego pochodne mają krótki okres półtrwania wynoszący mniej niż 24 godziny (Rivera-Núñez i in. 2019), a wydalane są pośrednio z żółcią, kałem i moczem (Zinedine i in. 2007).

Istnieją gatunki grzybów, które są zdolne do metabolizowania ZEN. Należy do nich *Gliocladium roseum* (Takahashi-Ando i in. 2002). Innym przykładem organizmów zdolnych do degradacji ZEN są drożdże *Trichosporon mycotoxinivorans* (Vekiru i in. 2010).

4.6. Toksyczność

ZEN jest mikotoksyną wykazującą działanie genotoksyczne, immunotoksyczne, teratogenne, cytotoksyczne, hematotoksyczne i hepatotoksyczne (Zinedine i in. 2007). Działanie ZEN w organizmach żywych zależy od statusu immunologicznego organizmu oraz stanu układu rozrodczego (okres dojrzewania, etap ciąży) (Alm i in. 2006).



ZEN w wątrobie indukuje zmiany histopatologiczne z późniejszym rozwojem raka wątroby (Marin i in. 2019). Wyniki badań potwierdzają, że ZEN może wpływać na zmiany profilu metabolicznego komórek sterydozależnych, takich jak komórki ziarniste muralne pęcherzyka jajnikowego (Malekinejad i in. 2006). Działanie ZEN powoduje zaburzenia krzepliwości krwi, a także modyfikuje parametry krwi (Gil-Serna i in. 2014).

4.6.1. Estrogenność

ZEN jest mikotoksyną o silnym działaniu estrogenowym (Jodlbauer i in. 2000; Takagi i in. 2014; Rogowska i in. 2019b) oraz anabolicznym (Jodlbauer i in. 2000; Takagi i in. 2014). ZEN i jego pochodne wykazują efekty estrogenowe u różnych gatunków zwierząt. Najbardziej wrażliwymi na jego działanie są świny (Minervini i in. 2006; Tsakmakidis i in. 2006) i przeżuwacze (Minervini i in. 2006), natomiast najbardziej odpornymi są ptaki (Minervini i in. 2006).

Do efektów estrogenowych należą: zaburzenia płodności, takie jak niepłodność lub zmniejszona płodność, obrzęk sromu, wypadanie pochwy i przerost sutka u kobiet oraz feminizacja atrofii jąder i powiększenie gruczołów sutkowych u mężczyzn (Peraica i in. 1999b), a także przedwczesne dojrzewanie płciowe (szczególnie w przypadku młodych dziewcząt) (Sáenz de Rodriguez i in. 1985, Kuiper-Goodman i in. 1987). W przypadku samic świń występuje zaczerwienienie i obrzęk sromu, powiększenie macicy, tworzenie torbieli na jajnikach i powiększenie gruczołów sutkowych, natomiast w przypadku samców świń – zanik jąder i zmniejszone stężenie plemników (Binder i in. 2017). Wyższe stężenia ZEN powodują stałą ruję, pseudociążę i bezpłodność (Shier i in. 2001). ZEN odpowiedzialny jest również za zespół hiperestrogeny (Lindsay 1985). Objawami działania ZEN w organizmach krów są: obrzmiały srom, zaburzenia w cyklach rujowych, niepłodność, zapalenia macicy i gruczołu mlekowego, poronienia, zatrzymanie łożyska, zapalenia błony śluzowej pochwy (Gliński i in. 2011), natomiast w organizmach świń typowymi objawami są: powiększenie macicy, przerost gruczołu sutkowego, przedłużająca się ruja, bezpłodność, obniżone libido, zwiększona częstość ciąży rzekomej, poronienia, małe mioty, wypadanie odbytnicy (Mostrom 2011).

Dzięki swojej budowie ZEN może wiązać się z receptorami estrogenowymi, zaburzając w ten sposób równowagę hormonalną i funkcjonowanie całego układu hormonalnego (Kiang i in. 1978). Z tego powodu określany jest mianem mikoestrogenu (Bennett i Klich 2003). Badania wykazały, że stężenie ZEN w diecie wynoszące od 1,0 ppm do 5,0 ppm może prowadzić do hiperestrogenizmu i wystąpienia objawów klinicznych u świń (Haschek i Haliburton 1986).

4.6.2. Kancerogenność i genotoksyczność

ZEN może przyczyniać się do rakotwórczych mutacji związanych z drugorzędnymi cechami płciowymi kobiet (Kwaśniewska i in. 2015). IARC w 1993 roku zakwalifikowało ZEN do grupy 3 – substancje niemożliwe do zaklasyfikowania, jako rakotwórcze dla człowieka (IARC 1993). ZEN powoduje częstsze występowanie raka przełyku (z powodu jego przyjmowania wraz z pokarmem), stymuluje też wzrost komórek nowotworowych piersi, a u myszy indukuje spontaniczne guzy sutków (Kuiper-Goodman i in. 1987). Genotoksyczność ZEN i jego metabolitów objawia się poprzez fragmentację DNA, indukcję adduktów DNA i aberracje chromosomalne (Abid-Essek i in. 2003). Badania wykazują, że ZEN może indukować mikrojądra w komórkach szpiku kostnego i komórkach nerek u małp (Ouanes i in. 2003).

4.6.3. Immunosupresyjność

ZEN powoduje spadek masy ciała i może zaburzać funkcje narządów limfatycznych, powodując atrofię grasicy – mikotoksyna ta może zmieniać fenotypy limfocytów grasicy, jak również śledziony, a także zmniejszać produkcję nadtlenu wodoru przez makrofagi otrzewnowe oraz zaburzać odpowiedź immunologiczną humoralną zależną od limfocytów T (Hueza i in. 2014). U myszy ZEN zmniejsza odpowiedź blastogenezy na mitogen, zmniejsza ilość immunoglobulin, zmniejsza aktywację makrofagów i produkcję cytokin (Ben Salah-Abbès i in. 2010). ZEN zakłóca syntezę immunoglobulin oraz powoduje spadek poziomu immunoglobulin klasy G i klasy M w surowicy krwi. Istnieją także badania, które wykazują, że spożycie skażonej paszy powoduje zwiększenie stężenia ZEN w surowicy zwierząt będących w okresie laktacji. Tym samym ZEN i jego metabolity mogą wpływać na wydzielanie immunoglobulin do siary lub mleka. Badania dowodzą także, że karmienie loch skażoną ZEN paszą powodowało obniżenie stężenia immunoglobulin klasy A w siarze, a także obniżenie stężenia immunoglobulin klasy A i G w surowicy karmionego przez nie potomstwa. ZEN ma wpływ także na komórki odpowiedzi immunologicznej, ich żywotność, proliferację, nekrozę i apoptozę (Bulgaru i in. 2021).

4.7. Mechanizm działania zearalenonu (MOA)

Zarówno badania *in vivo*, jak i *in vitro* wykazują, że ZEN i jego metabolity wiążą się z receptorami estrogenowymi α (ER- α) oraz β (ER- β) z wyższym powinowactwem w stosunku do receptorów estrogenowych α . Indukuje w ten sposób efekty zbliżone do estrogenów. Dzieje się tak na skutek aktywacji transkrypcji genów przez elementy, które reagują na estrogen (EFSA 2011).

Wyższą aktywność estrogenową wykazują α -ZEN i α -ZAN w porównaniu do ZEN i β -ZEN. Oprócz różnic związanych ze stereoizometrią istnieją różnice w powinowactwie wiązań. Badania wykazują, że względne powinowactwo α -ZEN do receptorów estrogenowych różnych gatunków to świnia>szczur>kurczak (EFSA 2011).

Testy proliferacji z ludzkimi komórkami raka sutka MDF-7 wykazują, że ZEN indukuje postęp cyklu komórkowego, α -ZEN jest najsilniejszym w indukowaniu proliferacji komórek, a β -ZEN blokuje cykl komórkowy w komórkach ziarnistych. ZEN działa jako antagonist estrogenu w mózgu (EFSA 2011). Ekspozycja komórek Caco-2 (linia komórkowa nabłonka ludzkiego raka jelita grubego) na 1 – 60 μ M ZEN przez 72 godziny indukuje zaburzenie cyklu komórkowego, hamowanie syntezy białek i DNA oraz wzrost tworzenia MDA (aldehydu malonowego) w zależności od stężenia (EFSA 2011). Te same komórki narażone na działanie 0 – 100 μ M ZEN i jego dwóch głównych metabolitów α -ZEN oraz β -ZEN przez 24 – 48 godzin ulegają apoptozie (EFSA 2011). Wykazano również, że ekspozycja komórek Caco-2 na ZEN przez 24 powoduje destabilizację lizosomalną. Ekspresja linii komórkowej ludzkiego nowotworu wątroby HepG2 na 1 – 100 μ M ZEN wykazują proliferację komórek i syntezę białka (EFSA 2011).

AKTUALNE MOŻLIWOŚCI WYKRYWANIA OTA I ZEN W ŻYWNOCICI

W dzisiejszych czasach, wraz z rozwojem technologii, wzrastają także możliwości wykrywania mikotoksyn w żywności. Dominującą techniką detekcji mikotoksyn (w szczególności OTA i ZEN) w żywności i paszach jest chromatografia. W oparciu o rozdziały chromatograficzne można uzyskać oznaczenia zarówno jakościowe, jak i ilościowe. Wadą tej techniki jest długi czas przygotowywania próbki do badań, a także drogi sprzęt oraz czas potrzebny na analizę wyników. Dodatkową trudnością jest współwystępowanie kilku mikotoksyn w tej samej próbce (Agriopoulou i in. 2020).

Wśród technik chromatograficznych technika TLC (thin-layer chromatography) ma wyższe granice wykrywalności w analizie ilościowej w porównaniu do HPLC (Valenta 1998).

Najbardziej stosowaną techniką jest chromatografia gazowa, ponieważ ze względu na to, że mikotoksyny są substancjami nielotnymi konieczne jest poddanie ich derywatyzacji. Natomiast detektorem, najczęściej stosowanym w analizie chromatografii gazowej jest detektor spektrometrii mas (MS). Inną techniką analityczną stosowaną do oznaczania i wykrywania mikotoksyn jest HPLC. Wykorzystuje się w niej detektory z fluorescencją (FLD), z UV, ze spektrometrią mas i tandemową spektrometrią mas (MS/MS) (Zhang i in. 2018).

Do wykrywania OTA głównie stosuje się technikę HPLC z FLD, która charakteryzuje się wysoką czułością. OTA wykazuje naturalną fluorescencję, dlatego nie jest konieczne stosowanie derywatyzacji (Agriopoulou i in. 2020).

Wiele badań wskazuje na przydatność HPLC – FLD do analizy aflatoksyn, ZEN oraz deoksyniwalenolu (DON). Istnieje także możliwość połączenia kilku systemów, np. do jednoczesnego oznaczania AF, DON, OTA i ZEN w otrębach pszennych można zastosować system HPLC – DAD – FLD (Irakli i in. 2017).

Ponadto dostępne są również szybkie metody diagnostyczne do wykrywania mikotoksyn. Opierają się one głównie na testach immunochemicznych. Jednym z nich jest test ELISA, który pozwala na wykrycie AF, ZEN, OTA, DON, toksyn T2 i HT2 oraz fumonizyn w produktach rolnych (Agriopoulou i in. 2020).

W wykrywaniu mikotoksyn mogą także pomagać biocujniki (optyczne, piezoelektryczne, elektrochemiczne) (Agriopoulou i in. 2020).

6

MLEKO KOBIECE

Karmienie piersią jest najzdrowszą formą żywienia nowo narodzonych dzieci. To pokarm pierwszego wyboru nie tylko dla dzieci urodzonych w terminie, ale również dla urodzonych przedwcześnie (Bharadva i in. 2014; Florea 2014; Jeleń i in. 2014; Leung i Yau 2015; Barbarska i in. 2017). Mleko matki zapewnia noworodkom prawidłowy wzrost oraz rozwój psychofizyczny (Laskowska i Książyk 2011). Sam akt karmienia piersią natomiast wytwarza specyficzną więź pomiędzy matką a dzieckiem (Murphy 1999; Laskowska i Książyk 2011; Florea 2014; Kowalska i in. 2015).

W ciągu pierwszych 3 miesięcy życia codzienne zapotrzebowanie niemowląt na energię wynosi około 107 kcal/kg/dzień. 100 ml dojrzałego mleka kobiecego zawiera ok. 70 kcal. Aby zaspokoić codzienne zapotrzebowanie na energię dziecko powinno spożywać około 525 – 875 ml mleka – przy założeniu, że jest to dziecko w wieku do 3 miesięcy, o wadze 3,5 – 6 kg (Valitutti i in. 2018).

WHO, UNICEF, Amerykańska Akademia Pediatrii (AAP), Amerykańskie Kolegium Położników i Ginekologów (ACOG), Akademia Lekarzy Rodzinnych (ALR) oraz Europejskie Towarzystwo Gastroenterologii Dziecięcej, Hepatologii i Żywienia (ESPGHAN), zalecają wyłącznie karmienie mlekiem niemowląt przynajmniej do 6 miesiąca życia i kontynuowanie jego karmienia wraz z odpowiednim rozszerzeniem diety do 2 lat. Ponadto po wprowadzaniu nowych pokarmów naturalne karmienie powinno być kontynuowane przez ok. 2 – 3 miesiące, jednakże nie ma jasno określonych zasad, jak długo należy karmić dziecko piersią – jest to indywidualna decyzja każdej matki i dziecka. Dodatkowo, prowadzone badania nie wykazały negatywnego wpływu na dzieci karmione piersią powyżej 3 roku życia (Leotsinidis i in. 2005; Stuebe 2009; Kim i Unger 2010; Mahdavi i in. 2010; Stuebe i Schwarz 2010; Laskowska i Książyk 2011; Anatolitou 2012; PATH 2013; Salone i in. 2013; Tudehope 2013; Chung 2014; Jeleń i in. 2014; Kowalska i in. 2015; Leung i Yau 2015; Warth i in. 2016; Grzesik-Gąsior i in. 2018; Wu i in. 2018, Sinkiewicz-Darol i in. 2021).

Mleko kobiece jest koloidalnym roztworem, który może mieć różny skład (Somogyi i Beck 1993; Prentice 1996; Anatolitou 2012; Tudehope 2013; Florea 2014; Kowalska i in. 2015; Rhine i Bode 2018). Zależy on od wielu czynników, takich jak: stan zdrowia matki (Kamińska-El-Hassan i in. 2017), miejsce jej zamieszkania (Wu i in. 2018), długość ciąży (Tudehope 2013), wiek matki (Prentice 1996; Leotsinidis i in. 2005), odstępy między karmieniami (Prentice 1996), pora dnia, okres laktacji (Prentice 1996; Anatolitou 2012; Kamińska-El-Hassan i in. 2017; Wu i in. 2018) i masa ciała noworodka (Leotsinidis i in. 2005). Na skład mleka kobiecego mają wpływ również środowisko zewnętrzne (Shi i in. 2011), a nawet predyspozycje genetyczne (Kamińska-El-Hassan i in. 2017).

Należy pamiętać, że okres laktacji dzieli się na mleko przedporodowe, które może wydelać się już od 16 tygodnia ciąży, siarę (colostrum, mleko początkowe) produkowaną przez

pierwsze 3 – 4 dni po porodzie, mleko przejściowe, które pojawia się między 7 a 14 dniem po porodzie i dojrzałe mleko produkowane od 3 tygodnia po porodzie. W każdym z tych czterech okresów skład mleka również ulega zmianie (Prentice 1996; Shi i in. 2011; Tudehope 2013; Florea 2014; Kowalska i in. 2015).

Siara oraz mleko przejściowe w porównaniu do mleka dojrzałego zawierają więcej:

- białka (Prentice 1996),
- witaminy B₁ (Prentice 1996), B₁₂ (Bravi i in. 2016),
- witaminy A (Prentice 1996; Bravi i in. 2016),
- witaminy D, E, K, kwasu foliowego (Tudehope 2013),
- sodu (Prentice 1996; Ballard i Morrow 2013; Florea 2014),
- magnezu (Ballard i Morrow 2013),
- chloru (Ballard i Morrow 2013; Tudehope 2013),
- potasu (Florea 2014),
- retinolu, (Wu i in. 2018),
- karotenu (Annemiek i in. 1994),
- immunoglobulin – w szczególności IgA (Prentice 1996; Ballard i Morrow 2013; Chung 2014; Florea 2014; Kowalska i in. 2015; Kamińska-El-Hassan i in. 2017; Grzesik-Gąsior i in. 2018),

a także mniej węglowodanów (Prentice 1996; Laskowska i Książyk 2011; Chung 2014; Florea 2014) i cynku (Prentice 1996).

Siara posiada mniejszą wartość energetyczną (56 kcal/100 ml) niż mleko dojrzałe (70 kcal/100 ml) (Kowalska i in. 2015). Białko, które zawarte jest w mleku matki, stanowi 0,9% jego składu (Florea 2014; Grzesik-Gąsior i in. 2018). Białka te to głównie:

- wspomniane już immunoglobuliny: IgA, IgM, IgD, IgE, IgG (Kowalska i in. 2015),
- glikoproteiny (Florea 2014),
- lizozym (Laskowska i Książyk 2011; Florea 2014; Kowalska i in. 2015; Peila i in. 2016),
- α-laktoalbuminy (Florea 2014),
- serwatka (Wu i in. 2018),
- kazeina (Florea 2014; Kowalska i in. 2015),
- laktoferyna, wiążąca żelazo (Prentice 1996; Laskowska i Książyk 2011; Ballard i Morrow 2013; Chung 2014; Florea 2014; Kowalska i in. 2015; Grzesik-Gąsior i in. 2018; Peila i in. 2016).

Mleko matki zawiera również substancje prebiotyczne – czynniki bifidogenne, które mogą stymulować wzrost pożytecznych bakterii (Martín i in. 2003; Kamińska-El-Hassan i in. 2017).

Dodatkowo, mleko kobiece w swoim składzie zawiera:

- enzymy (trawienne – lipaza, amylaza, peroksydaza) (Annemiek i in. 1994; Prentice 1996; Anatolitu 2012; Tudehope 2013; Florea 2014),
- hormony – tyroksynę, trójiodotyrozinę, kortyzol, progesteron, estrogeny (Florea 2014),
- czynniki wzrostu (Annemiek i in. 1994; Prentice 1996; Wight 2001; Anatolitu 2012; Tudehope 2013; Colen i in. 2014; Florea 2014),
- interferony (Prentice 1996; Anatolitu 2012),

- nukleotydy (Annemiek i in. 1994; Prentice 1996; Anatolitou 2012; Ballard i Morrow 2013; Bertino i in. 2013; Tudehope 2013; Kowalska i in. 2015; Grzesik-Gąsior i in. 2018),
- kwasy nukleinowe (Annemiek i in. 1994; Kowalska i in. 2015; Grzesik-Gąsior i in. 2018),
- kreatynę i kreatyninę (Annemiek i in. 1994; Ballard i Morrow 2013; Kowalska i in. 2015; Grzesik-Gąsior i in. 2018),
- mocznik (Annemiek i in. 1994; Prentice 1996; Ballard i Morrow 2013; Tudehope 2013; Kowalska i in. 2015; Grzesik-Gąsior i in. 2018),
- aminokwasy (Annemiek i in. 1994; Prentice 1996; Ballard i Morrow 2013; Tudehope 2013; Underwood 2013; Kowalska i in. 2015),
- aminocukry i aminoalkohole (Annemiek i in. 1994; Kowalska i in. 2015),
- cytokiny (Prentice 1996; Anatolitou 2012; Ballard i Morrow 2013; Tudehope 2013; Salone i in. 2013; Underwood 2013; Kamińska-El-Hassan i in. 2017),
- poliaminy (Prentice 1996; Kowalska i in. 2015),
- peptydy (Prentice 1996; Ballard i Morrow 2013; Tudehope 2013; Kowalska i in. 2015)
- miedź (Leotsinidis i in. 2005, Florea 2014, Wu i in. 2018),
- wapń, fosfor (Annemiek i in. 1994, Florea 2014, Wu i in. 2018),
- żelazo, selen (Annemiek i in. 1994; Leotsinidis i in. 2005; Florea 2014; Wu i in. 2018),
- mangan, cynk, chrom (Leotsinidis i in. 2005; Florea 2014),
- fluor (Florea 2014; Wu i in. 2018),
- molibden (Annemiek i in. 1994; Florea 2014),
- nikiel, jod, siarkę (Florea 2014),
- witaminę B₂, B₆, C (Ballard i Morrow 2013; Florea 2014; Kowalska i in. 2015),
- kwas pantotenowy, biotynę (Florea 2014; Kowalska i in. 2015),
- komórki macierzyste o właściwościach pluripotencjalnych (Ballard i Morrow 2013; Haiden i Ziegler 2016; Kamińska-El-Hassan i in. 2017),
- leukocyty (Ballard i Morrow 2013; Haiden i Ziegler 2016; Kamińska-El-Hassan i in. 2017),
- komórki nabłonka (Ballard i Morrow 2013; Kamińska-El-Hassan i in. 2017).

Na szczególną uwagę zasługują oligosacharydy (Prentice 1996). Są one bowiem opisywane mianem prebiotycznego „czynnika bifidus” – stymulują wzrost *Lactobacillus bifidus* (Martín i in. 2009; Laskowska i Książyk 2011; Tudehope 2013; Florea 2014) oraz *Lactobacillus acidophilus* (Kowalska i in. 2015; Kamińska-El-Hassan i in. 2017), które pełnią rolę substratu metabolicznego dla pożądaných bakterii i kształtują skład mikroflory jelitowej oraz chronią układ trawienny. Oligosacharydy bezpośrednio zapobiegają adhezji patogenów do powierzchni śluzówki, co skutkuje obniżeniem ryzyka infekcji, a także modulowaniem odpowiedzi komórek nabłonkowych i odpornościowych (Bertino i in. 2013). Oligosacharydy wraz z glikoproteinami zapobiegają infekcjom zakaźnym powodowanym przez popularne patogeny, takie jak: *Haemophilus influenzae* (pałeczka grypy), *Streptococcus pneumoniae* (dwoinka zapalenia płuc), *Vibrio cholerae* (przecinkowiec cholery), *Escherichia coli* (pałeczka okrężnicy), *Giardia lamblia* (ogoniastek jelitowy), paciorkowce grupy B, gronkowce, rotawirusy czy wirus opryszczki pospolitej (Stuebe 2009; Stuebe i Schwarz 2010).



Tłuszcz w mleku kobiecym wynosi 6% i jest łatwo przyswajalną energią dla dziecka (Florea 2014). Tłuszcze stanowią ok 40 – 55% dziennego zapotrzebowania energetycznego dzieci (Wu i in. 2018). Mleko kobiece zawiera w swoim składzie długołańcuchowe wielonienasycone kwasy tłuszczowe, które odgrywają ważną rolę w prawidłowym rozwoju siatkówki i nerwów (Prentice 1996; Anatolitu 2012; Colen i in. 2014; Kowalska i in. 2015; Grzesik-Gąsior i in. 2018), a także wolne kwasy tłuszczowe, triacyloglicerole, fosfolipidy i sterole – cholesterol (Annemiek i in. 1994; Laskowska i Książyk 2011; Florea 2014; Kowalska i in. 2015)

Do długołańcuchowych wielonienasyconych kwasów tłuszczowych należą kwas dokozaheksaenowy (DHA) (Annemiek i in. 1994; Prentice 1996; Ballard i Morrow 2013; Bzikowska i in. 2016) i kwas arachidonowy (AA), które tworzą struktury błon neuronowych i odgrywają kluczową rolę w prawidłowym funkcjonowaniu układu nerwowego (Annemiek i in. 1994; Prentice 1996). Najpopularniejszymi kwasami tłuszczowymi w trójglicerydach w mleku matki są kwas oleinowy, palmitynowy, linolenowy i linolowy (Annemiek i in. 1994; Prentice 1996; Ballard i Morrow 2013).

U dzieci karmionych piersią zaobserwowano mniejszą częstość występowania sepsy w porównaniu do dzieci karmionych w inny sposób (Wight 2001; Montjoux-Régis i in. 2011; Bertino i in. 2013; Underwood 2013; Haiden i Ziegler 2016) i dysplazji oskrzelowo-płucnej (Bertino i in. 2013) oraz zwiększenie tolerancji karmienia (Montjoux-Régis i in. 2011; Bertino i in. 2013). Wykazany został także korzystny efekt w postaci zmniejszenia częstości alergii (w szczególności z objawami z układu oddechowego i atopowym zapaleniem skóry) (Laskowska i Książyk 2011; Anatolitu 2012; Eidelman 2012; Iha i in. 2013; Tudehope 2013; Underwood 2013; Kowalska i in. 2015). Badania prowadzone na świecie udowadniają, że karmienie piersią chroni dzieci przed wadami zgryzu (w szczególności wady zębów mlecznych, które z kolei są czynnikami wad zgryzu zębów stałych) (Salone i in. 2013; Victora i in. 2016), wspomaga rozwój funkcji poznawczych (Wight 2001; Stuebe 2009; Laskowska i Książyk 2011; Eidelman 2012; Tudehope 2013; Colen i in. 2014; Kowalska i in. 2015; Hansen 2016; Victora i in. 2016; Brahm i Valdés 2017; Koh 2017) i prawdopodobnie zmniejsza prawdopodobieństwo zachorowania na otyłość, nadwagę i cukrzycę (szczególnie typu I) (Stuebe 2009; Anatolitu 2012; Eidelman 2012; Salone i in. 2013; Colen i in. 2014; Kowalska i in. 2015; Brahm i Valdés 2017).

Zmniejszenie otyłości i nadwagi wiąże się z tym, że dziecko karmione piersią szybciej i łatwiej rozpoznaje uczucie sytości, a mleko kobiece sprzyja szybszemu opróżnianiu żołądka i częstszemu wydalaniu (Tudehope 2013).

Dowodzono, że dzieci karmione piersią z mniejszym prawdopodobieństwem zachorują na białaczkę dziecięcą i innego typu nowotwory (Murphy 1999; Valaitis i in. 2000; Stuebe 2009; Stuebe i Schwarz 2010; Anatolitu 2012; Eidelman 2012; Salone i in. 2013; Colen i in. 2014; Florea 2014; Victora i in. 2016; Brahm i Valdés 2017).

Karmienie piersią łagodzi przebieg biegunek, zapalenia płuc i oskrzeli (Anatolitu 2012; Eidelman 2012; Salone i in. 2013), a nawet zmniejsza występowanie infekcji dróg oddechowych, pokarmowych (Eidelman 2012; Salone i in. 2013) i moczowych (Wight 2001; Tudehope 2013; Florea 2014) u dzieci.

Przeprowadzane badania wykazują też znaczny spadek zachorowalności na astmę przez dzieci, które karmione były mlekiem kobiecym (Murphy 1999; Stuebe 2009; Anatolitu 2012; Florea 2014; Brahm i Valdés 2017), oraz obniżenie ryzyka zachorowania na ostre zapalenie ucha środkowego (Valaitis i in. 2000; Stuebe 2009; Stuebe i Schwarz 2010; Laskowska i Książyk 2011; Eidelman 2012; Salone i in. 2013; Kowalska i in. 2015; Leung i Yau 2015).

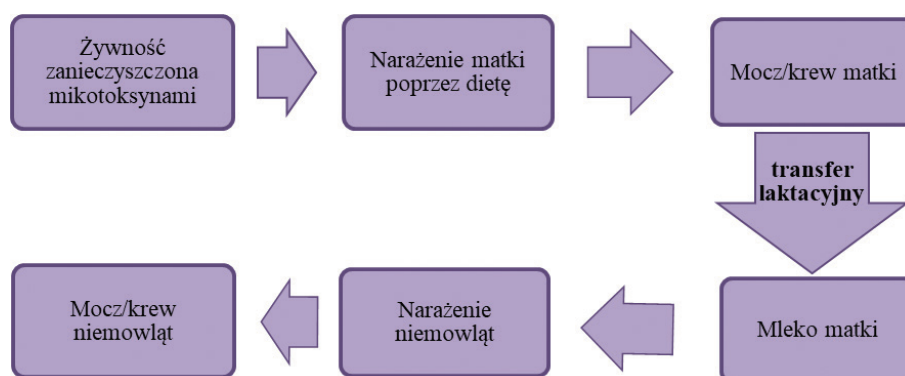
Szeroko rozwiniętym zagadnieniem jest zmniejszenie częstości występowania martwiczego zapalenia jelit (NEC) (Wight 2001; Stuebe 2009; Kim i Unger 2010; Stuebe i Schwarz 2010; Montjoux-Régis i in. 2011; Anatolitou 2012; Eidelman 2012; Bertino i in. 2013; Salone i in. 2013; Tudehope 2013; Underwood 2013; Leung i Yau 2015; Haiden i Ziegler 2016; Brahm i Valdés 2017; Wesołowska i in. 2018), a także śmiertelność (również w przypadku nagłej śmierci łóżeczkowej – SIDS) (Wight 2001; Stuebe 2009; Stuebe i Schwarz 2010; Anatolitou 2012; Eidelman 2012; Salone i in. 2013; Tudehope 2013; Kowalska i in. 2015; Leung i Yau 2015; Brahm i Valdés 2017). Dzięki karmieniu piersią poprawiają się długoterminowe wyniki neurokognitywne i sercowo – naczyniowe u wcześniaków (Tudehope 2013; Underwood 2013; Leung i Yau 2015; Brahm i Valdés 2017), zmniejsza się również ryzyko choroby Leśniowskiego-Crohna (Murphy 1999; Laskowska i Książyk 2011; Leung i Yau 2015) oraz celiakii (Laskowska i Książyk 2011; Eidelman 2012; Brahm i Valdés 2017). Stwierdzony został też pozytywny wpływ na ciśnienie tętnicze oraz poziom cholesterolu we krwi. Dzieci karmione naturalnym mlekiem mają obniżone ryzyko infekcji *Helicobacter pylori* (Laskowska i Książyk 2011).

Mleko kobiece może być także źródłem zakażenia patogenami (głównie, jeśli dziecko nie jest karmione bezpośrednio z piersi), z powodu niewłaściwej higieny i postępowania ze sprzętem laktacyjnym (Tudehope 2013; Jeleń i in. 2014).

Mleko matki może zawierać w swoim składzie nie tylko potrzebne i korzystnie wpływające na dziecko składniki, ale również niekorzystne zanieczyszczenia, do których należą: ksenobiotyki, alergeny, wirusy (Prentice 1996), alkohol, narkotyki, leki (Somogyi i Beck 1993), kofeina (Somogyi i Beck 1993; Prentice 1996), a nawet mikotoksyny – głównie ochratoksyna A (Muñoz i in. 2010; Warth i in. 2016) i aflatoksynę M_1 (Mahdavi i in. 2010; Atasever i in. 2014; Cherkani-Hassani i in. 2016; Warth i in. 2016).

Innym zanieczyszczeniem występującym w mleku kobiecym mogą być toksyczne metale (ciężkie) (Somogyi i Beck 1993; Leotsinidis i in. 2005, Stawarz i in. 2007). Metalem, który występuje w mleku matki w najwyższych stężeniach, jest cynk. Innymi szkodliwymi metalami mogącym występować w mleku kobiecym są kadm, ołów i miedź. W dużej mierze ich źródłem są spożywane pokarmy (Stawarz i in. 2007).

Poniższy schemat (rys. 7) przedstawia proces przedostawania się mikotoksyn z żywności spożywanej przez matkę do organizmu karmionego dziecka.



Rysunek 7. Schemat ilustrujący narażenie matek i noworodków na żywność skażoną mikotoksynami (Warth i in. 2016)

7.1. Historia banków mleka

W 1980 roku Światowa Organizacja Zdrowia i Fundusz Narodów Zjednoczonych dla dzieci wydały wspólnie oświadczenie popierające wykorzystanie mleka ludzkiego jako alternatywnego pokarmu dla noworodków w przypadku, braku dostępu lub ograniczonej ilości mleka biologicznej matki (WHO/UNICEF 1980).

Banki mleka powstały z inicjatywy ustanowienia instytucji mających zajmować się gromadzeniem mleka matek i umożliwianiem podawania go wcześniakom i noworodkom, które z różnych przyczyn nie mogą być karmione mlekiem swojej matki (np. brak koordynacji między ssaniem a odruchem połykania czy zły stan zdrowia). Kobiety w okresie laktacji dobrowolnie przekazują nadwyżki swojego mleka tego typu placówkom, często w zamian otrzymując bezpłatne badanie mleka, konsultacje laktacyjne, usługi i edukację zdrowotną. Procedura pobierania jest przeprowadzana z najwyższą starannością i z przestrzeganiem zasad bezpieczeństwa, a każda próbka poddawana jest ścisłym testom, umożliwiającym jej właściwe użycie (DeMarchis i in. 2016; Haiden i Ziegler 2016; Grzesik-Gąsior i in. 2018; Wesołowska i in. 2018).

Pierwsze banki mleka powstawały już na początku XX wieku, kiedy jednak WHO i UNICEF w 1980 roku zaczęły popularyzować koncepcje banków mleka, pojawiły się obawy dotyczące możliwości rozprzestrzeniania się wirusa HIV poprzez mleko matki, a to skłoniło liczne organizacje do zaprzestania swojej działalności (Haiden i Ziegler 2016). Rozwój technik pasteryzacji i standardów epidemiologicznych zminimalizował ryzyko przenoszenia i rozprzestrzeniania się chorób i infekcji. Obecnie w Europie działa 280 aktywnych banków mleka i 17 planowanych (EMBA – dostęp 27.10.2021 r.) m.in. 37 we Włoszech, 36 we Francji, 28 w Szwecji, 15 w Niemczech, 7 w Szwajcarii (Moro 2018), 16 w Polsce (Fundacja Bank Mleka Kobiecego – dostęp 31.01.2021 r.). Na całym świecie natomiast działa ponad 500 banków mleka (tab. 11).

Każdy bank mleka pełni 6 podstawowych funkcji: rekrutuje odpowiednie dawczynie, zbiera mleko, bada je pod kątem czystości mikrobiologicznej, pasteryzuje, analizuje, przechowuje i dystrybuje wśród potrzebujących dzieci (PATH 2013; DeMarchis i in. 2016; Haiden i Ziegler 2016; Grzesik-Gąsior i in. 2018). Dawczynie nie otrzymują wynagrodzenia za przekazanie swojego mleka do dyspozycji banków (Grzesik-Gąsior i in. 2018), natomiast muszą przejść szereg bezpłatnych badań, które potwierdzają ich dobry stan zdrowia. Istotna jest historia medyczna kobiet i ich styl życia. Potencjalne dawczynie przechodzą badania na obecność wirusa HIV, wirusowego zapalenia wątroby typu B i C oraz kiły (Wight 2001; Kim i Unger 2010; PATH 2013; Bharadva i in. 2014; DeMarchis i in. 2016; Haiden i Ziegler 2016; Grzesik-Gąsior i in. 2018). W Polsce dawczynie badane są także w kierunku CMV (Wesołowska i in. 2018).

Badania przeprowadzone we Francji wykazały, że typową dawczynią jest kobieta w średnim wieku rozrodczym. Prawie połowa dawczyń nie pracuje poza domem, a znaczna część

pochodzi ze środowisk związanych ze zdrowiem (Azema i Callahan 2003). Kobiety, które chcą zostać dawczyniami mleka najczęściej kierują się chęciami altruistycznymi (Kim i Unger 2010; Haiden i Ziegler 2016). Dawczynie podczas procesu rekrutacyjnego przechodzą badania krwi w kierunku chorób zakaźnych, a ich mleko poddawane jest badaniom na czystość mikrobiologiczną.

Istnieją jednak pewne obostrzenia, stosowane w różnych krajach, które wykluczają bycie dawczynią:

- regularne lub z różną częstością picie alkoholu, palenie papierosów, zażywanie narkotyków (nawet w przeszłości) (PATH 2013; Barbarska i in. 2017; Grzesik-Gąsior i in. 2018),
- picie zbyt dużej ilości napojów kofeinowych (Grzesik-Gąsior i in. 2018),
- prowadzenie diety wegańskiej (z powodu niewystarczającej ilości witaminy B12 i kwasu foliowego) (PATH 2013),
- posiadanie wielu kolczyków – pircing (PATH 2013),
- tatuaże lub makijaż permanentny wykonane w ciągu 6 miesięcy (Grzesik-Gąsior i in. 2018),
- niektóre przewlekłe choroby (Barbarska i in. 2017),
- białaczka (Kim i Unger 2010; Haiden i Ziegler 2016; Wesołowska i in. 2018),
- nosicielstwo lub aktywna postać HIV, HBV, HCV (Kim i Unger 2010; PATH 2013; Haiden i Ziegler 2016; Barbarska i in. 2017; Grzesik-Gąsior i in. 2018; Wesołowska i in. 2018),
- uprawianie seksu z wieloma partnerami (w szczególności z osobą uzależnioną od narkotyków lub zakażoną HIV) lub prostytutka (Grzesik-Gąsior i in. 2018),
- zapalenie żołądka, jelit, sutka (Grzesik-Gąsior i in. 2018),
- aktywne zakażenie wirusem opryszczki (Grzesik-Gąsior i in. 2018; Wesołowska i in. 2018),
- kiła (Haiden i Ziegler 2016; Barbarska i in. 2017; Wesołowska i in. 2018),
- choroby skóry (Grzesik-Gąsior i in. 2018),
- szczepienie w ciągu ostatnich 4 tygodni (Grzesik-Gąsior i in. 2018),
- stosowanie niektórych leków (PATH 2013) – cytotoksycznych, chemioterapeutyków, radioizotopów, immunosupresantów (Wesołowska i in. 2018), ziołowych (Grzesik-Gąsior i in. 2018),
- aktywna postać schorzeń i chorób, w których stosowane leki lub ich metabolity mogą przeniknąć do mleka (Wesołowska i in. 2018),
- przebyte przeszczepy, dializy nerek, sztuczne zapłodnienia czy transfuzja krwi (PATH 2013).

Po pozytywnym zakwalifikowaniu kobiety jako dawczynie bank mleka zapewnia profesjonalny sprzęt służący do zbierania mleka oraz kompleksowe informacje dotyczące zasad bezpieczeństwa i higieny, zbierania, gromadzenia, przechowywania, transportu i pobierania mleka do banku mleka. Po odciążeniu mleka próbkę przechowuje się w zamrażalniku, do momentu dostarczenia jej do banku mleka (Wight 2001; De Nisi i in. 2015; Haiden i Ziegler 2016; Grzesik-Gąsior i in. 2018).

Ze względu na ograniczone zasoby banków mleka w pierwszej kolejności zgromadzone mleko trafia do najbardziej potrzebującej grupy dzieci, czyli do wcześniaków lub chorych no-

worodków (Kim i Unger 2010; Leung i Yau 2015; Wesołowska i in. 2018). Gdy zapotrzebowanie na mleko w tej grupie zostanie zaspokojone, następnymi w kolejności odbiorcami mleka z banków mleka są:

- noworodki z chorobami przewodu pokarmowego, w szczególności z zaburzeniami żołądkowo-jelitowymi (Wight 2001; Haiden i Ziegler 2016),
- noworodki po przebytych operacjach gastroenterologicznych (Haiden i Ziegler 2016; Wesołowska i in. 2018),
- noworodki po zakończeniu karmienia pozajelitowego lub z zaburzeniami wzrostu, z rotawirusowym zapaleniem jelit oraz podczas chemioterapii (Haiden i Ziegler 2016),
- noworodki z zaburzeniami metabolicznymi, zwłaszcza aminokwasowymi (Geraghty i in. 2005; Haiden i Ziegler 2016),
- noworodki chorujące na hipoglikemię (Wesołowska i in. 2018),
- dzieci, których matki tymczasowo są niezdolne do karmienia piersią – np. w przypadku choroby, przyjmowania leków lub hospitalizowania (Wight 2001; Bharadva i in. 2014; Haiden i Ziegler 2016),
- noworodki lub starsze dzieci z ciężkimi alergiami lub nietolerancjami pokarmowymi (Wight 2001; Geraghty i in. 2005),
- dzieci adoptowane (Bharadva i in. 2014; Haiden i Ziegler 2016),
- noworodki, których matka zmarła natychmiast po porodzie lub w trakcie porodu (Bharadva i in. 2014).

Nie ma ustalonych standardowych zaleceń ani wytycznych dotyczących wymagań miejsca do tworzenia banku mleka, aczkolwiek minimalne wymagania, związane z wielkością pomieszczenia to ok. 23 m², aby wygodnie mogło pomieścić sprzęt wymagany do przechowywania mleka oraz zapewnić optymalne warunki pracy pracowników – odpowiednie miejsce do przechowywania dokumentacji, obszar służący do doradztwa laktacyjnego itp. Ponadto ważne jest zapewnienie prywatności kobiecie, która odciąża pokarm. Stres dawczyń pomaga obniżyć zapewnienie muzyki, telewizji czy miejsca do zabawy dla dzieci (Bharadva i in. 2014).

Do podstawowego wyposażenia banku mleka w Polsce należą:

- zamrażarka ze stałą kontrolą temperatury – służy do przechowywania mleka w temperaturze –20°C (Wesołowska i in. 2017b),
- lodówki – do przechowywania mleka, które należy rozmrozić przed podaniem odbiorcom (Bharadva i in. 2014),
- sprzęt laktacyjny – laktatory (Bharadva i in. 2014),
- pojemniki do gromadzenia i przechowywania mleka (Bharadva i in. 2014),
- podgrzewacz do butelek (Wesołowska i in. 2017b),
- komora laminarna (Wesołowska i in. 2017b),
- pasteryzator mleka kobiecego (Wesołowska i in. 2017b),
- analizator składu mleka kobiecego – jest pomocny w przypadku badania składu mleka, szacowania wartości kalorycznej i makroelementów w mleku (Wesołowska i in. 2017b).

7.2. Banki mleka na świecie

Pierwszy bank mleka powstał w Wiedniu (Austria) w 1909 roku, jako konsekwencja badań prowadzonych przez Theodora Escherich'a, które wykazały, że bakterie jelitowe noworodków karmionych mlekiem z piersi różnią się od bakterii noworodków karmionych w inny sposób. W 1919 roku otwarty został drugi bank mleka na świecie, w Bostonie (w Boston Floating Hospital), (Kim i Unger 2010; Haiden i Ziegler 2016; Moro 2018). W Azji jako pierwszy powstał bank mleka w Bombaju w roku 1989 (Bharadva i in. 2014).

W latach 60. XX wieku wysiłki w zakresie działalności banków mleka zmalały z powodu rozwoju wysokiej jakości preparatów żywieniowych dla niemowląt. Natomiast w latach 80. XX wieku z powodu odkrycia wirusa HIV i możliwości przenoszenia go przez mleko matki wiele banków mleka musiało zakończyć swoją działalność. Spowodowało to przeprowadzanie szczegółowych badań potencjalnych dawczyń mleka zgłaszających chęć podzielenia się swoim pokarmem. Badania te były jednak dość kosztochłonne, co było kolejną przyczyną zamykania banków mleka. Dzięki odpowiednim badaniom przesiewowym i zmianie standardów postępowania w latach dwutysięcznych banki mleka ponownie zaczęły pojawiać się na rynku światowym. Wpływ na działanie banków mleka mają różne czynniki, takie jak: ekonomia, finanse, religia, kultura (Kim i Unger 2010; Haiden i Ziegler 2016).

Na szczęście na całym świecie wzrasta zainteresowanie bankami mleka. Obecnie nowe otwierane są nawet w wielu krajach azjatyckich (Indie, Wietnam, Chiny czy Japonia) (Haiden i Ziegler 2016).

7.3. Banki mleka w Polsce

Pierwszy bank mleka kobiecego w Polsce został otworzony w Łodzi w 1989 roku, jednakże został zamknięty pod koniec lat 90 (Grzesik-Gąsior i in. 2018), jak większość banków mleka w tamtym okresie z powodu obawy o zakażenie wirusem HIV. W dniu 28 marca 2012 roku dzięki zaangażowaniu ze strony Fundacji Banku Mleka Kobiecego został otworzony bank mleka w Warszawie w Samodzielnym Publicznym Szpitalu Klinicznym im. prof. W. Orłowskiego. Pełnił rolę lokalną, tj. zbierał i przekazywał mleko wyłącznie do szpitala, w którym się znajdował (Wesołowska i in. 2017a). Obecnie w Polsce funkcjonuje 16 banków mleka w: Toruniu, Gdyni, Gdańsku, Szczecinie, Poznaniu, Zielonej Górze, Łodzi, Wrocławiu, Opolu, Krakowie, Rudzie Śląskiej i Lublinie. W Rzeszowie i Warszawie znajdują się po dwa banki (Fundacja Bank Mleka Kobiecego – dostęp 31.01.2021 r.).

Ich prace nadzorowane są przez Fundację Banku Mleka Kobiecego, która działa w oparciu o normy Europejskiego Stowarzyszenia Banku Mleka (EMBA) (Barbarska i in. 2017).

W tabeli 11 umieszczono kraje z liczbą banków mleka działających na rok 2020. Należy nadmienić, że liczba ta wciąż wzrasta.

Tabela 11. Banki Mleka na świecie (Haiden i Ziegler 2016; Grzesik-Gąsior i in. 2018; Moro 2018)

Kraj	Liczba działających banków mleka
Anglia (Europa)	14
Australia	4
Austria (Europa)	2
Belgia (Europa)	4
Belgia (Europa)	4
Bułgaria (Europa)	1
Chiny (Azja)	12
Czechy (Europa)	4
Dania (Europa)	2
Estonia (Europa)	1
Filipiny (Azja)	6
Finlandia (Europa)	17
Francja (Europa)	36
Grecja (Europa)	2
Hiszpania (Europa)	8
Holandia (Europa)	1
Indie (Azja)	22
Iran (Azja)	1
Irlandia (Europa)	1
Kamerun (Afryka)	6
Kuwejt (Azja)	1
Meksyk (Ameryka Północna)	17
Niemcy (Europa)	15
Norwegia (Europa)	12
Nowa Zelandia	1
Polska (Europa)	16
Południowa Afryka	ok. 60
Południowa Ameryka	258
Portugalia (Europa)	1
Rosja (Europa)	1
Serbia (Europa)	3
Słowacja (Europa)	6
Szkocja (Europa)	1
Szwajcaria (Europa)	7
Szwecja (Europa)	28
Tajlandia (Azja)	1
Tajwan (Azja)	1
Węgry (Europa)	8
Włochy (Europa)	37
Wyspy Zielonego Przylądka (Afryka)	1

7.4. Działanie banków mleka

Banki Mleka służą nie tylko do gromadzenia, przetwarzania i przechowywania nadwyżek mleka kobiecego, ale stanowią niezastąpione narzędzie do promocji karmienia piersią i szerzenia kultury karmienia piersią (Bertino i in. 2013; PATH 2013; Haiden i Ziegler 2016; Moro 2018).

W 2010 roku powołane zostało Europejskie Stowarzyszenie Banków Mleka (EMBA), które ma na celu promowanie karmienia piersią i instytucji banków mleka. EMBA opracowuje wytyczne europejskie w zakresie przetwarzania i wzbogacania mleka ludzkiego (Moro 2018). Po pobraniu próbka mleka w banku analizowana jest pod kątem ilości kalorii oraz zawartości makroskładników, tj. białka, tłuszczu i węglowodanów. W tym celu wykorzystywany jest analizator składu mleka kobiecego. Analizuje on próbki na podstawie transmisyjnej spektroskopii w podczerwieni (Kowalska i in. 2015; Barbarska i in. 2017). Polskie Banki Mleka wykorzystują do badań analizator składu mleka kobiecego firmy Miris, który umożliwia pomiar tłuszczu, białka, węglowodanów, energii i suchej masy. Do przeprowadzenia analizy wystarczy zaledwie 1 – 3 ml mleka, a wynik można uzyskać po 60 sekundach (informacja producenta).

Dodatkowo każda próbka mleka podczas procesu rekrutacyjnego badana jest na obecność bakterii (głównie gram – dodatnich), które mogły się do niej przedostać z przewodu piersiowego lub bezpośrednio z powierzchni piersi (Grzesik-Gąsior i in. 2018). Aktualne rekomendacje dopuszczają (przed pasteryzacją) ogólną liczbę bakterii mniejszą niż 10^5 jtk. Mleko pasteryzowane można przechowywać przez kilka miesięcy (maksymalnie 3) w temperaturze -20°C , natomiast mleko do bezpośredniego spożycia w 4°C przez 12 godzin. Mleko po pasteryzacji jest jałowe, natomiast rekomendowane jest wykonanie testów selekcyjnych w kierunku *Bacillus cereus*, ponieważ jest to gatunek termooporny i może tworzyć formy przetrwalnikowe (Wesołowska i in. 2018) Pasteryzacja mleka zostaje przeprowadzona w temperaturze $62,5^{\circ}\text{C}$ przez 30 min. w pasteryzatorze, po czym mleko następnie jest gwałtownie chłodzone do temperatury 4°C – jest to metoda pasteryzacji Holder (Wesołowska i in. 2020). Mimo, że jest to najczęściej stosowana metoda obróbki mleka to istnieje jeszcze kilka innych metod konserwowania mleka kobiecego:

1. Wysokotemperaturowa, szybka pasteryzacja w temperaturze 72°C przez 5 – 15 sekund (Underwood 2013; Haiden i Ziegler 2016).
2. Połączenie ciepła i ultradźwięków (Haiden i Ziegler 2016).
3. Wysokociśnieniowa obróbka (Haiden i Ziegler 2016).
4. Grzanie ohmowe (Haiden i Ziegler 2016).

Pasteryzacja jest niezbędna do inaktywacji większości wirusów i bakterii (do zapewnienia czystości biologicznej) (Kim i Unger 2010; Bertino i in. 2013; Peila i in. 2016), ale wpływa też na właściwości odżywcze i immunologiczne mleka matki (Wight 2001).

Proces pasteryzacji nie powinien mieć wpływu na skład mleka kobiecego, jednakże badania dowodzą, że oprócz wymienionych już składników zmniejsza się w nim ilość laktoferyny, lizozymu, insulinopodobnych czynników wzrostu, hepatocytów, czynników wzrostu, witamin rozpuszczalnych w wodzie i lipaz lipoproteinowych, immunoglobulin IgA (Underwood 2013), IgM (Peila i in. 2016), natomiast ilość białka, tłuszczu, oligosacharydów, długołańcuchowych wielonienasyconych kwasów tłuszczowych, gangliozydów i witamin rozpuszczalnych w tłuszczach zawartych w mleku się nie zmienia (Underwood 2013).

Po pasteryzacji mleko zostaje zamrożone i przechowywane przez kilka miesięcy (czas przechowywania pasteryzowanego mleka określają lokalne wytyczne). W Stanach Zjednoczonych Ameryki Północnej banki mleka pobierają opłatę za przetwarzanie mleka kobiecego, w celu pokrycia kosztów jego zbierania i przechowywania. Zdarza się, że próbki mleka pochodzące od kilku dawczyń, są ze sobą połączone, w celu optymalizacji składników odżywczych. (Haiden i Ziegler 2016).



MIKOTOKSYNY W MLEKU

8.1. Bezpieczeństwo mleka w XXI wieku

W kobiecym mleku oprócz wspomnianych już pozytywnych składników mogą znajdować się takie, które negatywnie wpływają na organizm. Są to między innymi mikotoksyny. Dwie najczęściej występującymi mikotoksynami w mleku kobiecym są opisana już ochratoksyna A oraz aflatoksyna M_1 .

Aflatoksyny mogą być produkowane przez trzy rodzaje grzybów z rodzaju *Aspergillus*. Należą do nich *A. flavus*, *A. parasiticus* i *A. nomius*. Przy czym *A. flavus* posiada zdolność do wytwarzania wyłącznie aflatoksyny B, podczas gdy dwa pozostałe gatunki aflatoksyny B i G (Creppy 2002). Cztery główne, naturalnie występujące aflatoksyny to AFB_1 , AFB_2 , AFG_1 , AFG_2 , jednakże najwyższe stężenia w żywności stwierdzono w przypadku B_1 (Sweeney i Dobson 1998). AFB charakteryzują się niebieską fluorescencją, podczas gdy AFG zieloną (Trucksess i Diaz-Amigo 2011). W mleku zwierząt i ludzi czasami występują aflatoksyny M_1 i M_2 , które są hydroksylowanymi metabolitami aflatoksyn odpowiednio B_1 i B_2 (Sweeney i Dobson 1998, Creppy 2002). Aflatoksyny mogą również występować w produktach pochodzenia mlecznego, takich jak sery czy jogurty (Iqbal i in. 2015).

Oprócz wspomnianego już mleka i przetworów mlecznych, produktami spożywczymi, które mogą zostać skażone aflatoksynami, są orzeszki ziemne, mąka kukurydziana, nasiona bawełny (Creppy 2002), sorgo, ziarna kakaowca, przyprawy i ryż (Trucksess i Diaz-Amigo 2011), kukurydza, pszenica, słonecznik, soja, przyprawy (np.: papryczki chili, pieprz czarny, kolendra, kurkuma, imbir), migdały, kokosy, orzechy brazylijskie, włoskie i pistacje (Tirmenstein i Mangipudy 2014). Aflatoksyna może być również obecna w mleku, jajach i mięsie zwierząt, które są karmione skażoną paszą (Tirmenstein i Mangipudy 2014). W pożywieniu występuje głównie w formie B_1 (AFB_1), która w wyniku transformacji przekształca się w organizmie w mniej toksyczną formę – M_1 (AFM_1), mogącą z kolei przedostawać się do mleka kobiecego (Iha i in. 2013). Aflatoksyna B_1 jest najbardziej toksyczną mikotoksyną dla ssaków, wywołuje krwotoki, toksyczne zapalenie wątroby i nowotwory wątroby (Iqbal i in. 2014b).

Aflatoksyny zostały przez IARC zaklasyfikowane do grupy I (kancerogenne dla ludzi) (IARC 2002), a AFB_1 uznana jest za jeden z najsilniejszych hepatokancerogenów mogących występować u ssaków (Creppy 2002). Dlatego tak wiele obaw budzi występowanie jej metabolitu AFM_1 nie tylko w produktach spożywczych, ale i w naturalnym pokarmie, jakim jest mleko kobiece. W tabeli stanowiącej załącznik nr 1 przedstawiono dopuszczalne normy aflatoksyn w wybranych produktach spożywczych, natomiast w tabeli 12 przykłady wyników badań opisujące występowanie aflatoksyn w mleku kobiecym.

Aflatoksyny działają również immunosupresyjnie, mutagennie, teratogennie oraz powodują uszkodzenia DNA i mutacje genów (Riahi-Zanjani i Balali-Mood 2013). Innymi objawami sugerującymi zatrucie aflatoksyną są anoreksja, utrata masy ciała, żółtaczka, marskość czy stłuszczenie wątroby (Tirmenstein i Mangipudy 2014).

**Tabela 12.** Przykłady wyników badań opisujące występowanie aflatoksyn w mleku kobylicym

Mikotoksyna	Kraj	Wyniki	Źródło
AFM ₁	Iran	85/85 (100%) Wartości pomiędzy 2 – 10 ng/L	Maleki i in. 2015
AFM ₁	Iran	8/132 (6%) Wartości pomiędzy 7,1 – 10,8 ng/L	Ghiasian i Maghsood 2012
AFM ₁	Serbia	6/10 (60%) Wartości pomiędzy 0,006 – 0,022 µg/kg	Kos i in. 2014
AFM ₁	Etiopia	232/360 (64,4%) Wartości pomiędzy 0 – 143,3 ppt	Eshete i in. 2020
AFM ₁	Maroko	43/82 (52,4%) Wartości pomiędzy 0 – 13,33 ng/L	Cherkani-Hassani i in. 2020a
AFM ₁	Turcja	53/100 (53%) Wartości pomiędzy 5,10 – 8,31 ng/L	Muslu i Özdemir 2020
AFM ₁	Iran	39/250 (15,6%) Wartości pomiędzy 11,07 – 39,25 ng/L	Jafari i in. 2017
AFM ₁	Bangladesz	32/62 (51,6%) Wartości pomiędzy 4,00 – 6,66 pg/mL	Islam i in. 2021

8.2. Pasteryzacja a toksyny

W tabeli 13 przedstawione zostały przykładowe wyniki badań, które opisują występowanie aflatoksyn w mleku pasteryzowanym. Wyniki te wykazują, że pasteryzacja nie wpływa na poziom występowania aflatoksyn w mleku pasteryzowanym.

Tabela 13. Przykłady wyników badań opisujące występowanie aflatoksyn w mleku pasteryzowanym

Produkt	Mikotoksyna	Kraj	Wyniki	Źródło
Mleko krowie pasteryzowane	AFM ₁	Iran	45/45 (100%) Wartości pomiędzy 8,8 – 64 ng/l	Riahi-Zanjani i Balali-Mood 2013
Mleko krowie pasteryzowane	AFM ₁	Iran	20/20 (100%) Wartości pomiędzy 0,0024 – 0,131 µg/kg	Sarvar Taherabadi i in. 2016
Organiczne mleko krowie pasteryzowane	AFM ₁	Brazylia	8/15 (53,33%) Wartości pomiędzy 0 – 0,061 µg/kg	Sifuentes dos Santos i in. 2016
Mleko krowie pasteryzowane	AFM ₁	Brazylia	8/15 (53,33%) Wartości pomiędzy 0 – 0,064 µg/kg	Sifuentes dos Santos i in. 2016



CEL BADAŃ

W ciągu kilku ostatnich lat zauważalny jest wzrost zainteresowania oddziaływania mikotoksyn na organizmy ludzi. Analiza istniejących badań wykazała, że wiele kwestii dotyczących mikotoksyn i ich wpływu na organizmy ludzi nie zostało opisanych. Stało się to motywem do przeprowadzenia badań opisanych w niniejszej pracy, która zakładała kilka celów.

Głównym z nich było określenie częstości i ilości występowania ochratoksyny A w płynach ustrojowych (mleko, mocz, surowica) kobiet zgłoszonych do badania, które są w okresie laktacji, oraz określenie częstości występowania i ilości zearalenonu w moczu tej samej grupy badawczej.

Ponadto przedmiotem badań było:

- określenie korelacji występowania ochratoksyny A w płynach ustrojowych (mleko, mocz, surowica) a dietą prowadzoną przez przebadane kobiety,
- zbadanie korelacji występowania ochratoksyny A w zależności od tandemowego karmienia dzieci (karmienie w tym samym czasie dzieci w różnym wieku) oraz w zależności od podstawowych informacji okołoporodowych, które dotyczą długości ciąży, wagi nowonarodzonego dziecka i wieku matki czy rodzaju karmienia dziecka (pokarmem z piersi lub pokarmem odciągniętym),
- określenie czystości mikrobiologicznej mleka (niepasteryzowanego) kobiecego dawczyń z banku mleka kobiecego w Toruniu,
- określenie składu mleka kobiecego, a także jego korelacji z występowaniem w nim ochratoksyny A,
- określenie wpływu pasteryzacji mleka kobiecego na występowanie w nim ochratoksyny A.

MATERIAŁ BADAWCZY I METODY

24 kwietnia 2018 roku Komisja Bioetyczna przy Uniwersytecie Mikołaja Kopernika w Toruniu, Collegium Medicum w Bydgoszczy wydała zgodę o numerze KB323/2018 na prowadzenie badania „Wykrycie i porównanie poziomu ochratoksyny A w płynach ustrojowych (mleko, mocz, krew) kobiet karmiących piersią”. 25 czerwca 2019 roku ta sama Komisja Bioetyczna wyraziła zgodę na rozszerzenie zakresu prowadzonych badań o zwiększenie grupy i tematu badawczego. Rozszerzenie tematu badawczego wiązało się z oznaczeniem poziomu skażenia zearalenonem moczu kobiet biorących udział w badaniu.

W okresie między grudniem 2018 roku a listopadem 2019 roku przy współpracy z regionalnym Bankiem Mleka Kobiecego działającym w Wojewódzkim Szpitalu Zespolonym im. L. Rydygiera w Toruniu zebrane zostały próbki płynów ustrojowych (mleko, mocz i krew) od wolontariuszek, które wykazały chęć udziału w badaniu.

Grupę badawczą stanowiło 60 kobiet w okresie laktacji – 19 z nich było dawczyniami toruńskiego Banku Mleka, natomiast 41 kobiet zostało zrekrutowanych tylko do tego badania.

Ponadto mleko (przed i po pasteryzacji) od 23 dawczyń zostało zbadane pod kątem występowania w nim ochratoksyny A.



Rysunek 8. Logo toruńskiego Banku Mleka Kobiecego

10.1. Materiał

Materiał badawczy składał się z 60 próbek mleka kobiecego, 60 próbek moczu oraz 60 próbek krwi. Każda z kobiet poddających się badaniom wypełniła ankietę dotyczącą ogólnego stanu jej zdrowia oraz stosowanej diety (Załącznik 2).

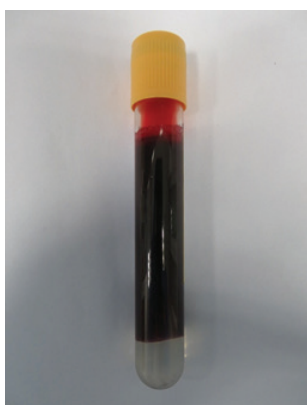
W ankiecie zostały uwzględnione pokarmy, które potencjalnie mogą zawierać OTA lub ZEN i przystosowane są do diety kobiet karmiących piersią.



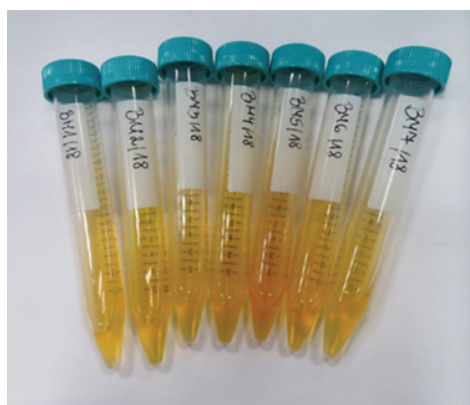
Zdjęcie 6. Próbkę moczu pobranego do badań



Zdjęcie 7. Próbkę mleka pobranego do badań



Zdjęcie 8. Próbkę krwi pobranej do badań



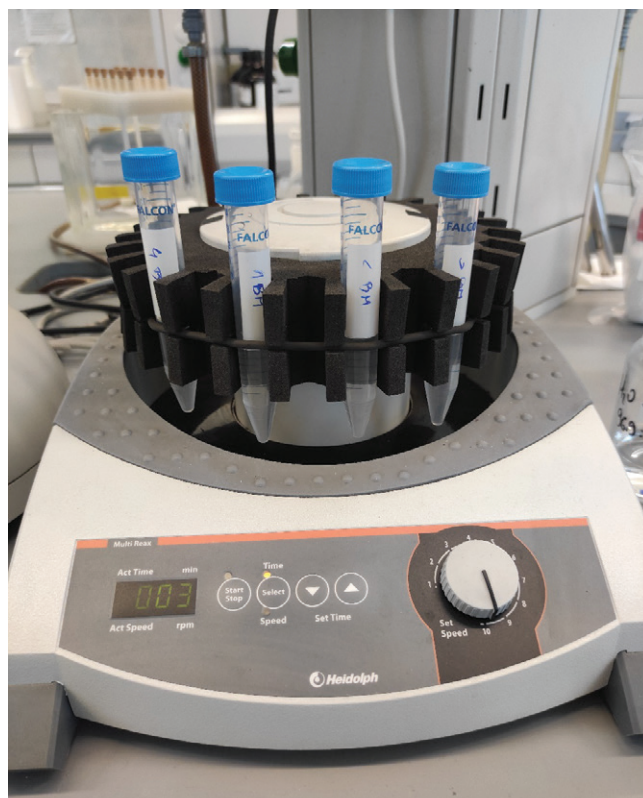
Zdjęcie 9. Próbkę surowicy otrzymanej do badań

10.2. Metody

10.2.1. Odczynniki i sprzęt

1. Probówki BD Vacutainer® SST™ II Advance
2. Kolumnienki powinowactwa immunologicznego OchraPrep – R-Biopharm Rhône LTD
3. Kolumnienki powinowactwa immunologicznego ZearalaTest – Vicam
4. Acetonitryl – ACN (CAS 75-05-08) – Merck
5. Metanol – MeOH (CAS 67-56-1) – Merck
6. OTA – Merck
7. ZEN – Merck
8. Wodorowęglan sodu – NaHCO₃ (CAS 144-55-8) – Merck
9. Standard wewnętrzny ¹³C-ZEN – Romer Labs
10. Standard wewnętrzny ¹³C-OTA – Romer Labs
11. Glukoronidaza (CAS 9001-45-0) – Merck
12. Kwas octowy – CH₃COOH (CAS 64-19-7)
13. PBS o pH 7,4
14. Bufor octanowy o pH 4,8
15. Woda dejonizowana – Merck Simplicity
16. Szkło laboratoryjne i materiały zużywalne
17. Pojemniki na mocz

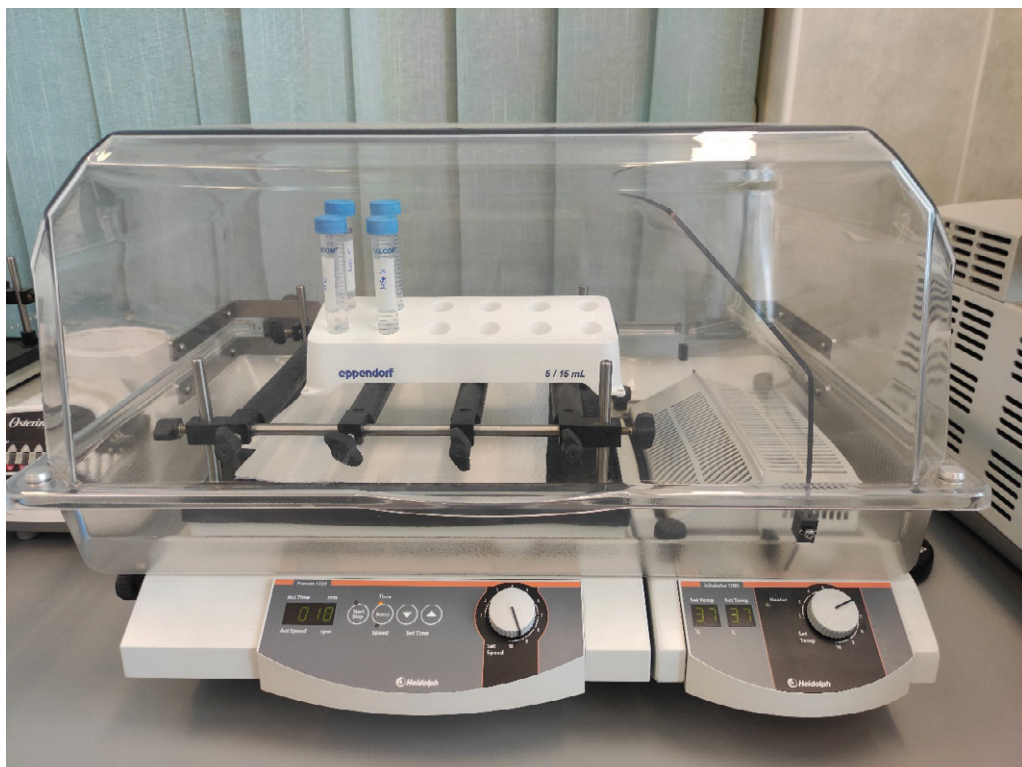
18. Probówki typu falkon o pojemności 15 ml i 50 ml
19. Podłoże MacConkey Agar z fioletem krystalicznym/podłoże Columbia Agar z 5% krwi baraniej (nr katalogowy 2040, GRASO Biotech)
20. System HPLC (Merck Hitachi):
 - pompa L-2130,
 - piec do kolumn L-2300,
 - autosampler L-2200,
 - detektor fluorescencji L-2480,
 - kolumna LiChrospher® 100 RP-18 (250 × 4 mm, 5 μm) z prekolumną (4 × 4 mm, 5 μm)
21. Chromatograf – Shimadzu Nexera:
 - pompa LC30AD,
 - autosampler SIL30AC,
 - piec CTO20AC,
 - detektor – spektrometr masowy 5500 Qtrap (Sciex),
 - kolumna chromatograficzna Kinetex C18 (100 × 2,1 mm 2,6 μm)
22. Wytrząsarka laboratoryjna – Heidolph Reax Control
23. Wytrząsarka laboratoryjna – Heidolph Multi Reax
24. Wirówka – Eppendorf Centrifuge 5430 R
25. Termoblok – Thermo Scientific Pierce Reacti Therm III #18823
26. Płuczka ultradźwiękowa – Ultron
27. Inkubator – Heidolph Promax 1020
28. Pasteryzator Sterifeed S90
29. Analizator składu mleka kobiecego MIRIS



Zdjęcie 10. Wytrząsarka laboratoryjna – Heidolph Multi Reax



Zdjęcie 11. Wirówka – Eppendorf Centrifuge 5430 R



Zdjęcie 12. Inkubator – Heidolph Promax 1020



Zdjęcie 13. Płuczka ultradźwiękowa – Ultron

10.2.2. Sposób uzyskania próbek do badań

Krew żylną od uczestniczek badania pobrano do Probówek BD Vacutainer® SST™ II Advance. Probówki te posiadają żel, który podczas wirowania oddziela surowicę od skrzepu krwi. Zapobiega to jej zanieczyszczeniu przez oddzielone elementy komórkowe. Po odwirowaniu surowica była gotowa do dalszych badań. Po pobraniu materiał zamrożono i przechowywano w zamrażarce w temp. -20°C do dalszych analiz.



Zdjęcie 14. Zdjęcie wykonane podczas pobierania krwi do badań

Od tych samych uczestniczek badania, podczas spontanicznej mikcji, pobrano do czystych pojemników mocz, który następnie zamrożono i przechowywano w temp. -20°C . Mleko do badań uzyskano od uczestniczek poprzez oddanie go do czystych probówek typu falkon. Materiał ten następnie zamrożono i przechowywano w temp. -20°C do dalszych analiz.

10.2.3. Metody oznaczania ochratoksyny A w mleku

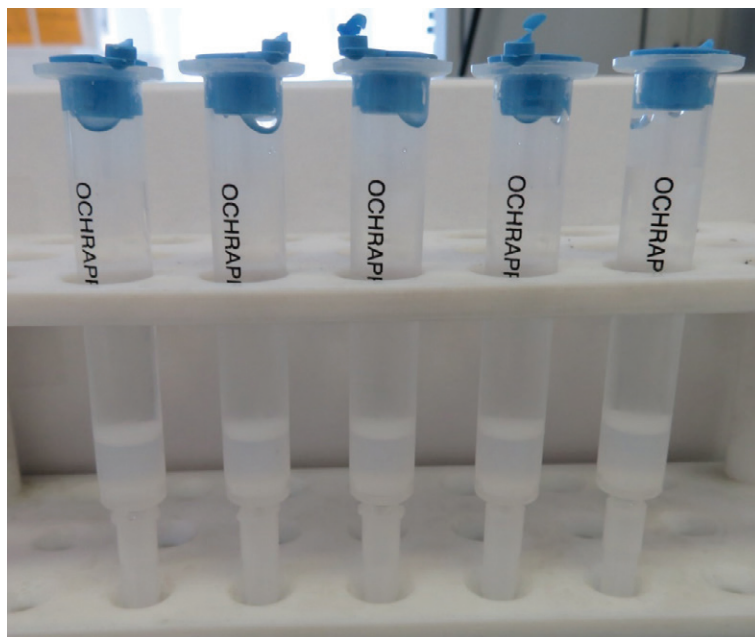
Próbki mleka odmrożono bezpośrednio przed ekstrakcją. W pierwszej kolejności odwirowano je w wirówce przez 15 minut przy prędkości wirowania 7500 rpm. Po odwirowaniu 20 ml mleka przepuszczono przez kolumnkę powinowactwa immunologicznego OchraPrep (R-Biopharm Rhône LTD). Po przejściu próbek przez kolumnki, przemyto je 20 ml wody dejonizowanej i osuszono powietrzem. Kolejnym krokiem było wymycie OTA przez 1,5 ml mieszaniny ACN:MeOH (3:2). W ostatnim etapie próbki odparowano do sucha w strumieniu azotu w 40°C . Bezpośrednio przed poddaniem próbek analizie przy zastosowaniu chromatografii cieczowej z detekcją fluorescencyjną (HPLC – FLD) rozpuszczono je w 1 ml fazy ruchomej.

10.2.4. Metody oznaczania ochratoksyny A w moczu

10 ml moczu rozcieńczono 10 ml 5% roztworu NaHCO_3 . Następnie próbki wymieszano na vortexie. Kolejnym krokiem było przefiltrowanie roztworu przez filtr gładki. 10 ml przefiltrowanego roztworu naniesiono na kolumnkę powinowactwa immunologicznego OchraPrep (R-Biopharm Rhône LTD). Po przejściu próbek przez kolumnki przemyto je 10 ml wody destylowanej i osuszono powietrzem. W następnym etapie OTA została eluowana przez 2 ml MeOH. Ostatnim krokiem było odparowanie mieszaniny w strumieniu azotu w temperaturze 40°C . Bezpośrednio przed poddaniem próbek analizie przy zastosowaniu chromatografii cieczowej z detekcją fluorescencyjną (HPLC – FLD) rozpuszczono je w 1 ml fazy ruchomej.

10.2.5. Metody oznaczania ochratoksyny A w surowicy

Do 1 ml surowicy dodano 20 μl standardu wewnętrznego (^{13}C -OTA) oraz 20 μl β -glukonidazy. Następnie próbki inkubowano przez 18 godzin w temperaturze 37°C . Po zakończeniu inkubacji do mieszaniny dodano 1 ml MeOH i 1,96 ml ACN. Kolejno roztwór wymieszano na vortexie przez 2 minuty oraz odwirowano w wirówce przez 10 minut przy prędkości 7000 rpm. 3 ml supernatantu przeniesiono do probówki o pojemności 50 ml i odparowano w strumieniu azotu. Po odparowaniu próbki rozpuszczano w 1 ml MeOH, najpierw przez 3 minuty w płuczce ultradźwiękowej, a następnie 5 minut na wytrząsarce. W kolejnym kroku do roztworu dodano 25 ml PBS. Roztwór przeniesiono ilościowo na kolumnkę powinowactwa immunologicznego OchraPrep (R-Biopharm Rhône LTD). Po przejściu próbki przez kolumnkę przemyto ją 20 ml wody destylowanej i osuszono powietrzem. OTA została wymyta przez 1,5 ml MeOH: CH_3COOH (98:2) do 2 ml probówki. Następnie odparowano w strumieniu azotu w 40°C . Bezpośrednio przed analizą LC – MS/MS próbki rozpuszczono w 150 μl mieszaniny H_2O :MeOH (7:3).



Zdjęcie 15. Kolumnienki powinowactwa immunologicznego OchraPrep

10.2.6. Metody oznaczania zearalenonu i jego metabolitów w moczu

Do 5 ml moczu dodano 10 ml buforu octanowego o pH 4,8 i 100 μ l β -glukonoronidazy. Następnie próbki inkubowano przez 18 godzin w temperaturze 37°C. Po zakończonej inkubacji do roztworu dodano 20 μ l wzorca wewnętrznego ^{13}C -ZEN o stężeniu 100 ng/ml. Kolejną całość odwirowano w wirówce przez 5 minut przy 5000 rpm. Odwirowany roztwór ilościowo przeniesiono na kolumnienkę powinowactwa immunologicznego ZearalaTest (Vicam). Kolumnienkę przemyto 10 ml wody i osuszono powietrzem. Następnie eluowano przy użyciu 1,5 ml MeOH. Eluat odparowano do sucha w strumieniu azotu w temperaturze 40°C. Bezpośrednio przed analizą LC – MS/MS próbka została rozpuszczona w 0,5 ml mieszaniny $\text{H}_2\text{O}:\text{MeOH}$ (8:2).



Zdjęcie 16. Oczyszczanie ekstraktu na kolumnkach powinowactwa immunologicznego



Zdjęcie 17. Odparowanie eluatu w strumieniu azotu

10.2.7. Ocena czystości mikrobiologicznej mleka kobiecego

Około 2 – 5 ml mleka pobierano bezpośrednio z brodawki piersi kobiety do jałowego pojemnika, po wcześniejszym higienicznym umyciu i dezynfekcji rąk. Pierwsze kilka mililitrów jest odrzucane, po czym pobierana jest właściwa próbka do posiewu mikrobiologicznego. Dopuszczalne jest również pobranie próbki kilku mililitrów mleka laktatorem z próbek o większej objętości. W ten sposób pobrany materiał powinien trafić do laboratorium mikrobiologicznego w czasie nieprzekraczającym 2h.

Posiewy mleka dawczyń wykonywane są w Zakładzie Diagnostyki Mikrobiologicznej Wojewódzkiego Szpitala Zespolonego w Toruniu. Posiew wykonywany jest w warunkach komory laminarnej kalibrowaną jednorazową eżą o pojemności 10 µl na zestaw podłoży MacConkey Agar z fioletem krystalicznym/Columbia Agar z 5% krwi baraniej (nr katalogowy 2040, GRASO Biotech). Na podłożu Columbia Agar wykonywano posiew ilościowy, natomiast na podłożu MacConkey metodą redukcyjną (izolacyjną). Po naniesieniu mleka na podłoża następuje inkubacja trwająca 18 – 24 godziny lub w sytuacji, gdy nie ma wzrostu lub wzrost jest niewielki inkubacja zostaje przedłużona do 48 godzin w 36°C w warunkach tlenowych.

10.2.8. Metody identyfikacji mikrobiologicznej mleka kobiecego

Po wysiewie na odpowiednich podłożach, próbki zostają zbadane pod kątem występowania w nich drobnoustrojów. Metodami identyfikacji bakterii w Banku Mleka Kobiecego w Toruniu są:

- identyfikacja serologiczna paciorkowców,
- test PYR (test paskowy do identyfikacji *Enterococcus* spp.),
- test z optochiną (identyfikacja *Streptococcus*),
- wykrywanie katalazy i koagulazy,
- hydroliza na podłożu z eskuliną (identyfikacja *Enterococcus*),
- wykorzystanie podłoży chromogennych,
- barwienie metodą Grama,
- automatyczne metody do identyfikowania drobnoustrojów – BD Phoenix
- system do identyfikacji drobnoustrojów – Microgen ID-A
(identyfikacja tlenowych i fakultatywnie beztlenowych pałeczek Gram-ujemnych)

10.2.9. Metoda pasteryzacji próbek mleka

Próbki mleka poddano procesowi pasteryzacji. Próbki zostały pasteryzowane w Banku Mleka Kobiecego w Toruniu przy użyciu metody holder w pasteryzatorze Sterifeed S90. Próbkę podgrzano do temperatury 62,5°C i inkubowano w tej temperaturze przez 30 minut, a następnie szybko chłodzono do temperatury 4°C. Następnie próbki zamrażano.

10.2.10. Metody chromatograficzne analizy badanych próbek

Ochratoksynę A w mleku i moczu oznaczono metodą HPLC z detekcją fluorescencyjną. System HPLC (Merck Hitachi) składał się z pompy L-2130, pieca do kolumn L-2300, autosamplera L-2200, detektora fluorescencji L-2480 i kolumny LiChrospher® 100 RP-18 (250 × 4 mm, 5 µm) z prekolumną (4 × 4 mm, 5 µm), faza ruchoma: ACN : 2% CH₃COOH (70:30), szybkość przepływu: 1 ml/min, objętość nastrzyku: 50µl.

Do oznaczenia ochratoksyny A w surowicy krwi i zearalenonu w moczu wykorzystano metodę chromatografii cieczowej ze spektrometrem masowym (LC – MS/MS). Chromatografem wykorzystywanym w badaniach był Shimadzu Nexera: pompa (LC30AD), autosampler (SIL30AC), piec (CTO20AC), a także detektor – spektrometr masowy 5500 Qtrap (Sciex). Kolumna chromatograficzna: Kinetex C18 100 × 2,1 mm 2,6 um, fazy ruchome: A: 5m MAcONH₄ + 0.1%AcOH w H₂O; B: 5m MAcONH₄ + 0,1% AcOH w MeOH; szybkość przepływu: 0,3 ml/min, objętość nastrzyku 10 µl, temperatura pieca 40°C.

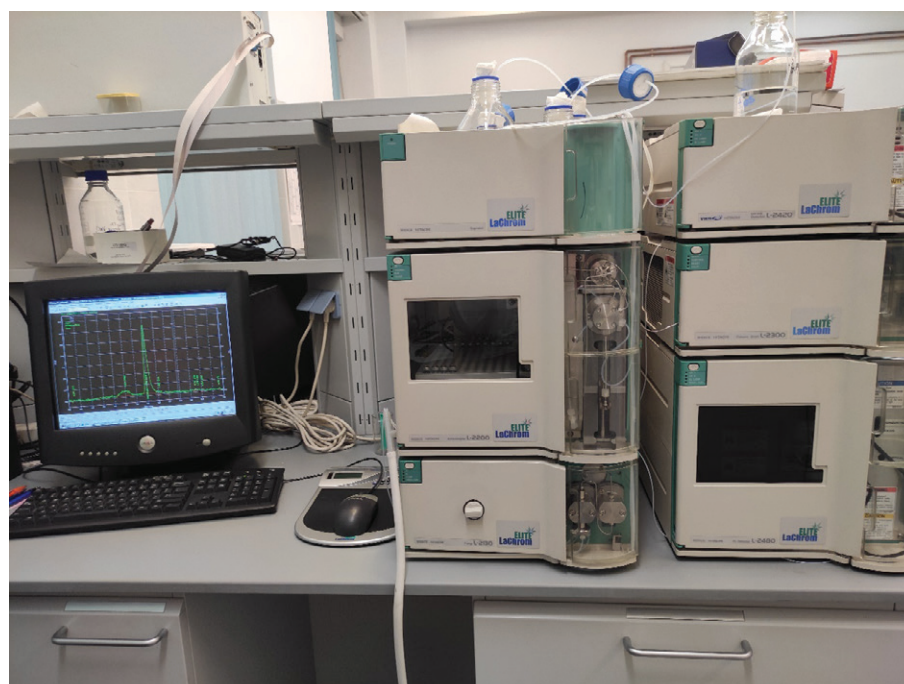
Tabele 14 i 15 przedstawiają wartości LOD (granica wykrywalności), LOQ (granica oznaczalności) i odzysk oznaczanych mikotoksyn.

Tabela 14. Wartości LOD, LOQ i odzysku dla analiz OTA w płynach ustrojowych

	LOD	LOQ	Odzysk
OTA w mleku	0,002 ng/ml	0,007 ng/ml	93%
OTA w moczu	0,004 ng/ml	0,013 ng/ml	87%
OTA w surowicy	0,006 ng/ml	0,02 ng/ml	83%

Tabela 15. Wartości LOD, LOQ i odzysku dla analiz ZEN i jego metabolitów w moczu

	LOD	LOQ	Odzysk
ZEN w moczu	0,006 ng/ml	0,020 ng/ml	95%
α-ZEL w moczu	0,012 ng/ml	0,040 ng/ml	98%
β-ZEL w moczu	0,015 ng/ml	0,050 ng/ml	96%
α-ZAL w moczu	0,012 ng/ml	0,040 ng/ml	100%
β-ZAL w moczu	0,018 ng/ml	0,060 ng/ml	96%
ZAN w moczu	0,009 ng/ml	0,030 ng/ml	98%



Zdjęcie 18. System HPLC



Zdjęcie 19. Zestaw LC – MS/MS

10.2.11. Metoda analizy składu mleka kobiecego

Skład mleka kobiecego został określony w Banku Mleka Kobiecego w Toruniu przy użyciu analizatora składu mleka kobiecego MIRIS. Na zdjęciu 12 przedstawiono analizator składu mleka kobiecego wykorzystywany w Banku Mleka. Przed zbadaniem na analizatorze składu mleka próbki zostają ogrzane i homogenizowane.



Zdjęcie 20. Analizator składu mleka kobiecego

METODY STATYSTYCZNE I WYNIKI

11.1. Ankieta do prowadzonych badań

Ankieta dotycząca informacji o badanych kobietach oraz prowadzonej diecie stanowi załącznik nr 2, natomiast w tabelach 16 i 17 przedstawiono odpowiedzi udzielane w ankiecie.

Tabela 16. Informacje dotyczące kobiet biorących udział w badaniu

Pytanie	Odpowiedzi
Wiek badanej [średnia]	31 lat
Miejsce zamieszkania	46 ankietowanych – miasto 14 ankietowanych – wieś
Czynna zawodowo	35 ankietowanych – tak 22 ankietowane – nie 3 ankietowane – urlop macierzyński
Płeć karmionego dziecka	25 ankietowanych – dziewczynka 35 ankietowanych – chłopiec
Liczba dzieci [średnia]	2
Tydzień porodu [średnia]	37
Masa urodzeniowa dziecka [średnia]	2965,6 g
Wiek dziecka w dniu badania	Między 6 dni a 14 miesięcy
Karmienie w tandemie	55 ankietowanych – nie 5 ankietowanych – tak
Wiek drugiego karmionego dziecka [średnia]	26,8 miesięcy
Czy inne dzieci były karmione pokarmem mamy (w przypadku drugiego lub kolejnego dziecka)	31 ankietowanych – tak 1 ankietowana – nie
Czy dziecko karmione jest pokarmem z piersi, odciągniętym, mieszanym?	39 ankietowanych – z piersi 10 ankietowanych – odciągnięty 11 ankietowanych – pokarm mieszany
Czy ankietowana choruje na choroby przewlekłe?	16 ankietowanych – tak 43 ankietowane – nie 1 ankietowana – brak odpowiedzi
Spożywane leki	Ankietowane wymieniały: Euthyrox, Euthyrox 25 mg, Euthyrox 50, Euthyrox N25, Euthyrox 75, Euthyrox 100, Rutinoscorbin, witamina D, Femaltiker, Isoptin, Letrox 75 mg, Jodid
Ilość spożywanego płynu w ciągu doby [średnia]	2,3 L

Tabela 17. Informacje dotyczące diety prowadzonej przez badane kobiety

Produkt	Częstotliwość spożycia [liczba ankietowanych]
Pieczyno białe	Codziennie – 36 Raz w tygodniu – 18 Raz w miesiącu – 3 Nigdy – 3
Pieczyno ciemne	Codziennie – 28 Raz w tygodniu – 23 Raz w miesiącu – 5 Nigdy – 4
Płatki zbożowe	Codziennie – 11 Raz w tygodniu – 22 Raz w miesiącu – 22 Nigdy – 5
Płatki kukurydziane	Codziennie – 2 Raz w tygodniu – 12 Raz w miesiącu – 23 Nigdy – 23
Podroby	Codziennie – 3 Raz w tygodniu – 15 Raz w miesiącu – 15 Nigdy – 27
Kawa mielona	Codziennie – 18 Raz w tygodniu – 7 Raz w miesiącu – 7 Nigdy – 28
Kawa rozpuszczalna	Codziennie – 8 Raz w tygodniu – 9 Raz w miesiącu – 8 Nigdy – 35
Kawa zielona	Codziennie – 0 Raz w tygodniu – 0 Raz w miesiącu – 3 Nigdy – 57
Wino	Codziennie – 0 Raz w tygodniu – 0 Raz w miesiącu – 4 Nigdy – 56
Piwo	Codziennie – 0 Raz w tygodniu – 0 Raz w miesiącu – 7 Nigdy – 53
Sok z winogron	Codziennie – 0 Raz w tygodniu – 3 Raz w miesiącu – 6 Nigdy – 51

cd. tabeli 17

Gluten pszenny	Codziennie – 43 Raz w tygodniu – 8 Raz w miesiącu – 3 Nigdy – 6
Czekolada	Codziennie – 15 Raz w tygodniu – 33 Raz w miesiącu – 8 Nigdy – 4
Kakao	Codziennie – 7 Raz w tygodniu – 23 Raz w miesiącu – 15 Nigdy – 15
Kasze	Codziennie – 8 Raz w tygodniu – 33 Raz w miesiącu – 15 Nigdy – 4
Ryż	Codziennie – 2 Raz w tygodniu – 42 Raz w miesiącu – 12 Nigdy – 4
Orzechy	Codziennie – 12 Raz w tygodniu – 23 Raz w miesiącu – 17 Nigdy – 8
Mleko krowie	Codziennie – 43 Raz w tygodniu – 12 Raz w miesiącu – 1 Nigdy – 4
Ser żółty	Codziennie – 36 Raz w tygodniu – 13 Raz w miesiącu – 6 Nigdy – 5
Ser pleśniowy	Codziennie – 1 Raz w tygodniu – 15 Raz w miesiącu – 17 Nigdy – 27
Jaja kurze	Codziennie – 20 Raz w tygodniu – 38 Raz w miesiącu – 0 Nigdy – 2
Lukrecja	Codziennie – 0 Raz w tygodniu – 0 Raz w miesiącu – 1 Nigdy – 59
Suszone owoce winorośli	Codziennie – 3 Raz w tygodniu – 15 Raz w miesiącu – 25 Nigdy – 17

cd. tabeli 17

Przyprawy [wymieniane]	<p>Codziennie – curry, czosnek, koperek, pieprz, pieprz ziołowy, pieprz cayenne, cynamon, sól, papryka słodka, papryka ostra, papryka czerwona, zioła prowansalskie, lubczyk, bazylia, oregano, kmin rzymski, kolendra, mięta, imbir, majeranek, tymianek, kurkuma, rozmaryn, chili, pietruszka, liść laurowy, ziele angielskie (odpowiedzi łącznie 49 ankietowanych)</p> <p>Raz w tygodniu – kurkuma, zioła prowansalskie, cynamon, imbir, oregano, bazylia, papryka ostra, papryka słodka, papryka czerwona, czosnek, tymianek, pieprz, pieprz cayenne, sól himalajska, sól, liść laurowy, gałka muszkatołowa, kozieradka, czarnuszka, kumin, majeranek, bazylia (odpowiedzi łącznie 13 ankietowanych)</p> <p>Raz w miesiącu – brak odpowiedzi</p> <p>Nigdy – brak odpowiedzi</p>
Suszone owoce [wymieniane]	<p>Codziennie – morele, śliwki (odpowiedzi 1 ankietowanej)</p> <p>Raz w tygodniu – śliwki, żurawina, jabłka, morele, daktyle, pestki dyni, słońcecznik, figi, rodzynki (odpowiedzi łącznie 16 ankietowanych)</p> <p>Raz w miesiącu – śliwki, morele, daktyle, żurawina, jabłka, rodzynki, banan, słońcecznik, wiśnie, ananas, papaja, mango (odpowiedzi łącznie 19 ankietowanych)</p> <p>Nigdy – 25</p>
Rośliny strączkowe [wymieniane]	<p>Codziennie – cieciora, soczewica, fasola, ciecierzycyca (odpowiedzi łącznie 2 ankietowanych)</p> <p>Raz w tygodniu – ciecierzycyca, soczewica, groch, groszek zielony, cieciora, fasola, fasola zielona strączkowa, soja, kukurydza (odpowiedzi łącznie 17 ankietowanych)</p> <p>Raz w miesiącu – groch, groszek, fasola szparagowa, fasola czerwona, fasola zielona, bób, ciecierzycyca, soczewica, kukurydza (odpowiedzi łącznie 23 ankietowanych)</p> <p>Nigdy – 19</p>

11.2. Określenie wpływu pasteryzacji mleka kobiecego na występowanie w nim OTA

Do badań pobrano próbki mleka od 23 dawczyń z Banku Mleka Kobiecego w Toruniu. Każda próbka mleka została podzielona na dwie mniejsze próbki – jedna z nich została poddana procesowi pasteryzacji. Dzięki temu uzyskano 23 próbki mleka pasteryzowanego i 23 próbki mleka niepasteryzowanego. Wyniki wykazały obecność OTA w 6 próbkach (26,1%) mleka pasteryzowanego oraz w 8 próbkach (34,8%) mleka niepasteryzowanego. Wszystkie wyniki były stosunkowo niewielkie i wynosiły $<0,007$ ng/ml. Dodatkowo w Banku Mleka został zbadany skład odżywczy mleka. W tabeli 18 przedstawiono średnie wartości składników odżywczych w badanych próbkach. Nie wykazano zależności pomiędzy występowaniem OTA w mleku a jego pasteryzacją.

Tabela 18. Średnie wartości składników odżywczych zawartych w mleku grupy badawczej

Parametr	Tłuszcz [g/100 mL]	Białko całkowite [g/100 mL]	Białko odżywcze [g/100 mL]	Węglowodany [g/100 mL]	Sucha masa [g/100 mL]	Wartość energetyczna [kcal/100 mL]
Średnia	2,92	1,24	0,98	7,61	12,12	63,48

11.3. Identyfikacja mikroorganizmów w mleku kobiecym

W Banku Mleka Kobiecego w Toruniu określony został poziom skażenia mikrobiologicznego próbek mleka pochodzących od wyznaczonych do badań dawczyń. Wśród grupy badanej, 19 kobiet było dawczyniami z banku mleka, dlatego ich mleko przed pasteryzacją i przed dalszą procedurą dawstwa, zostało zbadane pod kątem czystości mikrobiologicznej. Tabela 19 przedstawia wyniki poszczególnych kobiet. Wyniki obrazują, że u 12 kobiet w mleku obecny był więcej niż jeden patogen. 12 z badanych kobiet miało w mleku gatunki *Streptococcus* (który może powodować zapalenie płuc lub zapalenie ucha środkowego) u 15 wykryto koagulazo-ujemny *Staphylococcus* (powodujących zakażenia gronkowcami), u trzech, gatunki *Staphylococcus*, u jednej skażenie gatunkiem *Neisseria* (mogącej powodować zakażenie rzeżączką) oraz u kolejnej *Streptococcus parasanguinis* i *Rothia mucilaginosa* (mogącej powodować rozstrzenie oskrzeli).

Tabela 19. Wyniki badania mikrobiologicznego dawczyń z banku mleka kobiecego

Lp.	Identyfikacja mikroorganizmów w mleku kobiecym
1.	<i>Streptococcus spp.</i> Koagulazo – ujemne <i>Staphylococcus</i>
2.	<i>Streptococcus spp.</i> Koagulazo – ujemne <i>Staphylococcus</i>
3.	<i>Staphylococcus spp.</i>
4.	Koagulazo – ujemne <i>Staphylococcus</i>
5.	<i>Streptococcus spp.</i> Koagulazo – ujemne <i>Staphylococcus</i> <i>Neisseria spp.</i>
6.	<i>Streptococcus spp.</i> <i>Staphylococcus spp.</i>
7.	<i>Streptococcus spp.</i> <i>Staphylococcus spp.</i>
8.	Koagulazo – ujemne <i>Staphylococcus</i>
9.	<i>Streptococcus spp.</i> Koagulazo – ujemne <i>Staphylococcus</i>
10.	<i>Streptococcus spp.</i> Koagulazo – ujemne <i>Staphylococcus</i>
11.	Koagulazo – ujemne <i>Staphylococcus</i>
12.	<i>Streptococcus spp.</i> Koagulazo – ujemne <i>Staphylococcus</i>
13.	Koagulazo – ujemne <i>Staphylococcus</i>
14.	Koagulazo – ujemne <i>Staphylococcus</i>
15.	<i>Streptococcus spp.</i> Koagulazo – ujemne <i>Staphylococcus</i>
16.	Koagulazo – ujemne <i>Staphylococcus</i>
17.	<i>Streptococcus spp.</i> <i>Streptococcus parasanguinis, Rothia mucilaginosa</i>
18.	<i>Streptococcus spp.</i> Koagulazo – ujemne <i>Staphylococcus</i>
19.	<i>Streptococcus spp.</i> Koagulazo – ujemne <i>Staphylococcus</i>

11.4. Zależność występowania OTA w mleku kobiet będących w okresie laktacji a składem badanego mleka

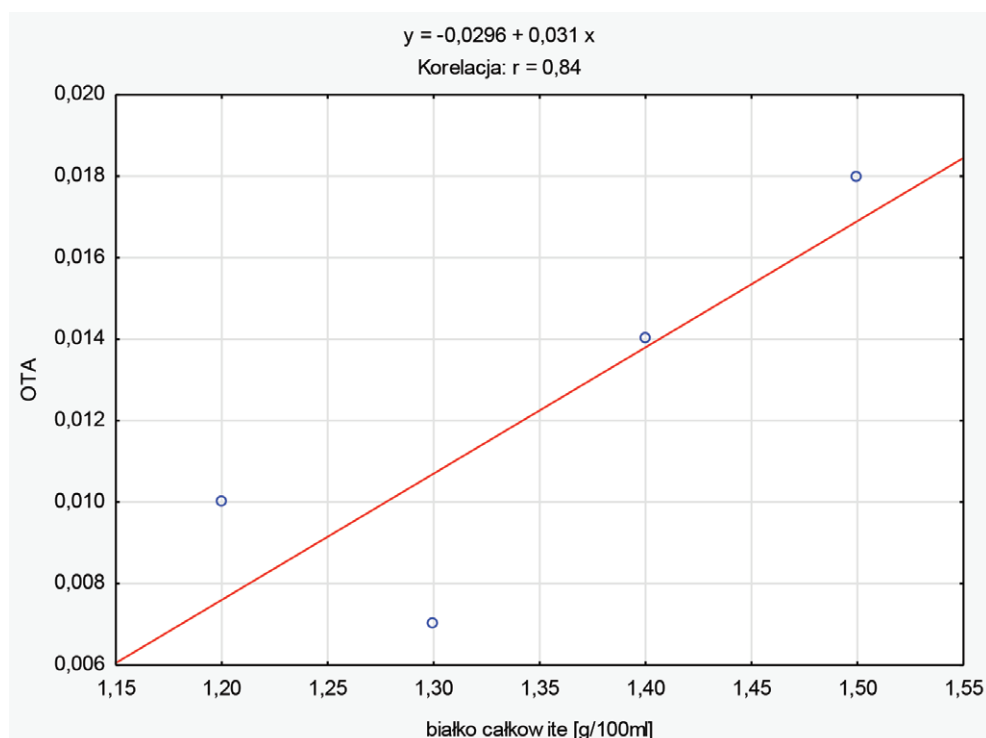
Jednym z celów badań było określenie zależności występowania OTA w mleku kobiet należących do grupy badawczej a składem ich mleka. Zależności stochastyczne pomiędzy zawartością OTA a zawartością tłuszczu, białka całkowitego, białka odżywczego, węglowodanów, suchej masy i wartością energetyczną opracowano w oparciu o współczynnik rang Spearmana. Istotne związki uznano na poziomie $p = 0,05$. Wykazano, że istotna i pozytywna

jest korelacja pomiędzy zawartością OTA i białka całkowitego ($r = 0,80$) oraz pomiędzy OTA i białkiem odżywczym ($r = 0,63$). Na wykresie 1 przedstawiono korelację występowania OTA w mleku kobiecym a ilością białka całkowitego w tym mleku, natomiast na wykresie 2 korelację występowania OTA w mleku kobiecym a ilością białka odżywczego w tym mleku.

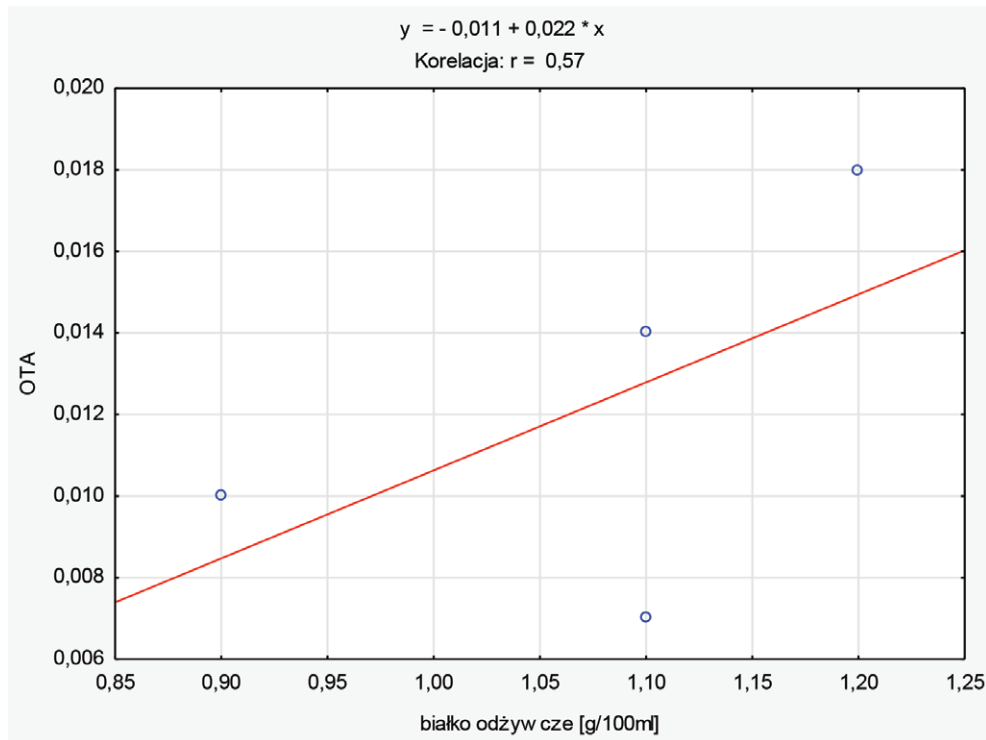
W tabeli 20 przedstawiono korelację porządku rang Spearmana wykorzystaną do statystycznych wyliczeń korelacji występowania OTA i składników odżywczych w mleku kobiecym.

Tabela 20. Korelacja porządku rang Spearmana

Zmienna	Korelacja porządku rang Spearmana (oznaczone współczynniki korelacji są istotne z $p < 0,05$)
	OTA
tłuszcz [g/100 mL]	-0,20
białko całkowite [g/100 mL]	0,80
białko odżywcze [g/100 mL]	0,63
węglowodany [g/100 mL]	0,32
sucha masa [g/100 mL]	-0,20
wartość energetyczna [kcal/100 mL]	-0,20
OTA	1,00



Wykres 1. Korelacja występowania OTA a ilością białka całkowitego w mleku kobiecym



Wykres 2. Korelacja występowania OTA a ilością białka odżywczego w mleku kobiecym

W tabeli 21 przedstawiono średnie wartości składników odżywczych w mleku grupy badawczej.

Tabela 21. Średnie wartości składników odżywczych zawartych w mleku grupy badawczej

Parametr	Tłuszcz [g/100 mL]	Białko całkowite [g/100m L]	Białko odżywcze [g/100 mL]	Węglowodany [g/100 mL]	Sucha masa [g/100 mL]	Wartość energetyczna [kcal/100 mL]
Średnia	3,73	1,28	1,03	7,79	13,02	71,85

11.5. Występowanie OTA w mleku, moczu i surowicy kobiet będących w okresie laktacji

W tabelach 22 – 27 przedstawione zostały ogólne wyniki opisujące występowanie OTA w płynach ustrojowych badanych kobiet.

Tabela 22. Występowanie OTA w mleku kobiecym

Liczba próbek pozytywnych	Średnia \bar{X} [ng/ml]	Wartość minimalna	Wartość maksymalna	Mediana [Me]	Odchylenie standardowe σ
4	0,0008 (wszystkie próbki) 0,0123 (pozytywne próbki)	0	0,0180 ng/ml	0	0,0033 ng/ml

Kobiety, których mleku wykryto OTA, miały 29, 35, 35 i 37 lat. Trzy z nich były mieszkankami miasta, natomiast jedna była mieszkanką wsi. W tej grupie urodziło się troje chłopców i jedna dziewczynka. Średnia masa urodzeniowa dzieci wynosiła ok. 2567,5 g. Poród nastąpił średnio w 35 tygodniu ciąży. Trzy z badanych kobiet karmiły piersią, natomiast jedna pokarmem odciągniętym. Jedna kobieta karmiła tandemowo. Dla dwóch badanych było to czwarte dziecko, dla jednej drugie, natomiast jedna kobieta była pierworódką. Trzy z kobiet codziennie jadały białe pieczywo, natomiast jedna pieczywo ciemne. Dwie z kobiet nie jadały suszonych owoców, natomiast codziennie jadały kasze i płatki zbożowe. Dwie kolejne kobiety codziennie piły kawę mieloną i jadały czekoladę. Jedna z kobiet, w której mleku wykryto OTA codziennie spożywała orzechy, mleko krowie i ser żółty.

Tabela 23. Wartości OTA w poszczególnych próbkach mleka

Nr prób	OTA [ng/ml]	Nr prób	OTA [ng/ml]
1	nw	31	nw
2	0,01	32	nw
3	nw	33	nw
4	nw	34	nw
5	nw	35	nw
6	nw	36	nw
7	nw	37	nw
8	nw	38	nw
9	nw	39	nw
10	nw	40	nw
11	nw	41	nw
12	0,014	42	nw
13	nw	43	nw
14	nw	44	nw
15	nw	45	nw
16	nw	46	nw
17	nw	47	nw
18	nw	48	<0,007
19	nw	49	nw
20	nw	50	nw
21	nw	51	nw
22	nw	52	nw
23	nw	53	nw
24	nw	54	nw
25	nw	55	nw
26	nw	56	nw
27	nw	57	nw
28	nw	58	nw
29	0,018	59	nw
30	nw	60	nw

nw – nie wykryto



Tabela 24. Występowanie OTA w moczu

Liczba próbek pozytywnych	Średnia $\bar{[x]}$ [ng/ml]	Wartość minimalna	Wartość maksymalna	Mediana [Me]	Odchylenie standardowe $[\sigma]$
40	0,0133 (wszystkie próbki) 0,0201 (pozytywne próbki)	0	0,1170 ng/ml	0,0130	0,0169

Kobiety, w których moczu, wykryto OTA, miały średnio 31 lat. 28 z nich było mieszkankami miast, natomiast 12 mieszkankami wsi. W tej grupie urodziło się 23 chłopców i 17 dziewczynek. Średnia masa urodzeniowa dzieci wynosiła ok. 2937,38 g, a poród nastąpił w 36 tygodniu ciąży. 28 kobiet karmiło piersią, 6 pokarmem odciągniętym, a 6 pokarmem mieszanym (piersią i odciągniętym). 4 kobiety karmiły tandemowo. Dla dwóch kobiet było to czwarte dziecko, dla czterech trzecie, dla szesnastu drugie, podczas gdy osiemnaście było pierworódkami. Kobieta z najwyższą zawartością OTA w moczu miała 35 lat, była mieszkanką wsi, urodziła pierwsze dziecko w 31 tygodniu ciąży – dziewczynkę o masie 1570 g. Dziecko karmione było pokarmem odciągniętym. Kobieta codziennie spożywała białe pieczywo, gluten pszeniny i czekoladę, piła także kawę mieloną. Raz w tygodniu kobieta zjadała ciemne pieczywo, podroby, orzechy, mleko krowie, jaja, i suszone owoce winorośli.

Tabela 25. Wartości OTA w poszczególnych próbkach moczu

Nr prób	OTA [ng/ml]	Nr prób	OTA [ng/ml]
1	0,030	31	0,024
2	0,042	32	0,019
3	0,026	33	<0,013
4	0,017	34	<0,013
5	<0,013	35	<0,013
6	0,016	36	0,014
7	0,028	37	<0,013
8	0,018	38	0,014
9	nw	39	nw
10	nw	40	nw
11	nw	41	nw
12	<0,013	42	<0,013
13	<0,013	43	<0,013

cd. tabeli 25

14	<0,013	44	nw
15	0,016	45	nw
16	0,014	46	nw
17	0,034	47	<0,013
18	<0,013	48	<0,013
19	<0,013	49	nw
20	0,027	50	<0,013
21	0,024	51	nw
22	0,014	52	<0,013
23	0,024	53	<0,013
24	<0,013	54	nw
25	nw	55	nw
26	nw	56	nw
27	0,017	57	nw
28	0,016	58	nw
29	0,117	59	nw
30	nw	60	<0,013

nw – nie wykryto

Tabela 26. Występowanie OTA w surowicy

Liczba próbek pozytywnych	Średnia $\bar{[X]}$ [ng/ml]	Wartość minimalna	Wartość maksymalna	Mediana [Me]	Odchylenie standardowe $[\sigma]$
60	0,3796	0,0820 ng/ml	0,8050 ng/ml	0,3520	0,1590

We krwi wszystkich kobiet poddanych badaniom wykryto OTA. Kobiety miały średnio 31 lat. 46 kobiet było mieszkankami miasta, a 14 mieszkankami wsi. W grupie badawczej urodziło się 25 dziewczynek i 35 chłopców. Średnia masa urodzeniowa dzieci wynosiła 2965,6 g, a poród nastąpił średnio w 37 tygodniu ciąży. 39 kobiet karmiło piersią, 10 pokarmem odciągniętym, a 11 w sposób mieszany. 5 kobiet karmiło tandemowo. Dla dwóch kobiet było to czwarte dziecko, dla sześciu trzecie, dla dwudziestu czterech drugie, a dwadzieścia osiem było pierworódkami. Kobieta, w której surowicy poziom OTA był najwyższy, codziennie spożywała białe pieczywo, płatki zbożowe, mleko krowie i ser żółty oraz raz w tygodniu pieczywo ciemne, płatki kukurydziane i jaja kurze.

Tabela 27. Wartości OTA w poszczególnych próbkach surowicy

Nr prób	OTA [ng/ml]	Nr prób	OTA [ng/ml]
1	0,409	31	0,415
2	0,424	32	0,456
3	0,437	33	0,490
4	0,296	34	0,518
5	0,291	35	0,747
6	0,348	36	0,451
7	0,437	37	0,323
8	0,777	38	0,805
9	0,312	39	0,229
10	0,427	40	0,181
11	0,478	41	0,240
12	0,688	42	0,233
13	0,538	43	0,315
14	0,191	44	0,243
15	0,693	45	0,327
16	0,225	46	0,554
17	0,555	47	0,238
18	0,327	48	0,246
19	0,246	49	0,232
20	0,425	50	0,271
21	0,417	51	0,496
22	0,438	52	0,245
23	0,279	53	0,321
24	0,236	54	0,082
25	0,099	55	0,252
26	0,586	56	0,270
27	0,285	57	0,498
28	0,377	58	0,222
29	0,455	59	0,443
30	0,356	60	0,378

11.6. Występowanie OTA w mleku, moczu i surowicy kobiet będących w okresie laktacji w zależności od rodzaju i częstotliwości spożywanego pokarmu

Aby zweryfikować hipotezę zakładającą związek pomiędzy częstotliwością spożywania określonych produktów spożywczych a poziomem OTA w mleku, moczu i surowicy matki przeprowadzono serię analiz korelacji rang Spearmana. Charakterystykę rozkładów zmiennych niezależnych biorących udział w owej analizie zawarto na wykresach 3 – 8.

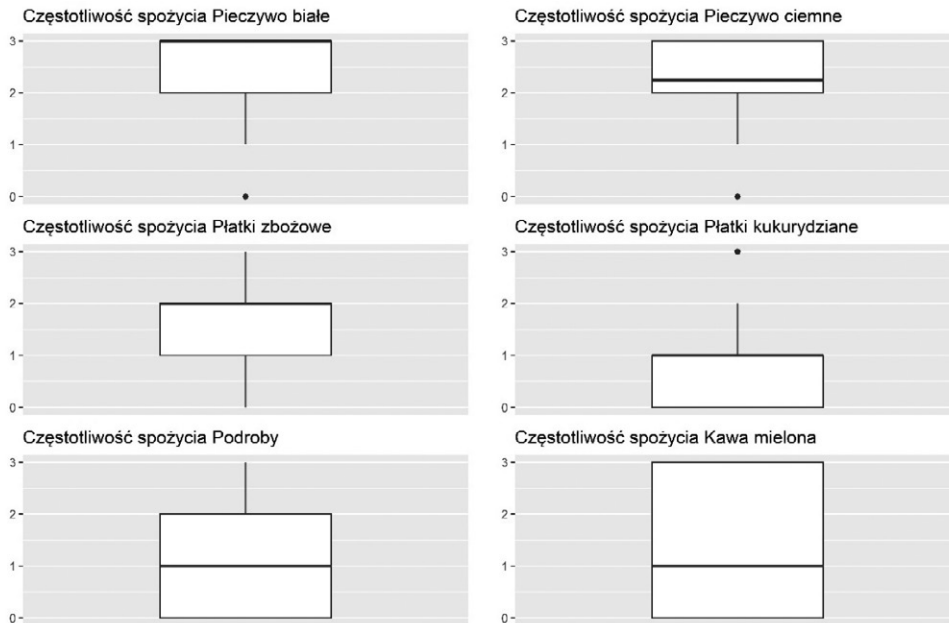
W wyniku analizy ustalono, że wraz ze wzrostem częstotliwości spożycia suszonych owoców winorośli dochodzi do istotnego wzrostu poziomu OTA w mleku matki ($\rho = 0,28$; $p < 0,05$). Siła tej korelacji jest słaba. Następnie wykazano, że wraz ze wzrostem częstotliwości spożycia

piwa dochodzi do istotnego wzrostu poziomu OTA w moczu matki ($\rho = 0,36; p < 0,01$). Siła tej korelacji jest umiarkowana. Ustalono również, że do istotnego obniżenia poziomu OTA w surowicy matki dochodzi wraz ze wzrostem częstotliwości spożycia mleka krowiego ($\rho = -0,26; p < 0,05$) oraz przypraw ($\rho = -0,40; p < 0,01$), przy czym siła pierwszej korelacji jest słaba, natomiast drugiej – umiarkowana. Ostatecznie wykazano, że do istotnego wzrostu poziomu OTA w surowicy matki dochodzi wraz ze wzrostem częstotliwości spożycia suszonych owoców ($\rho = 0,26; p < 0,05$) oraz roślin strączkowych ($\rho = 0,31; p < 0,05$), przy czym siła pierwszej korelacji jest słaba, natomiast drugiej – umiarkowana. Zestawienie otrzymanych wyników przedstawia tabela 28. Graficzną prezentację wyników zawarto na wykresie 9.

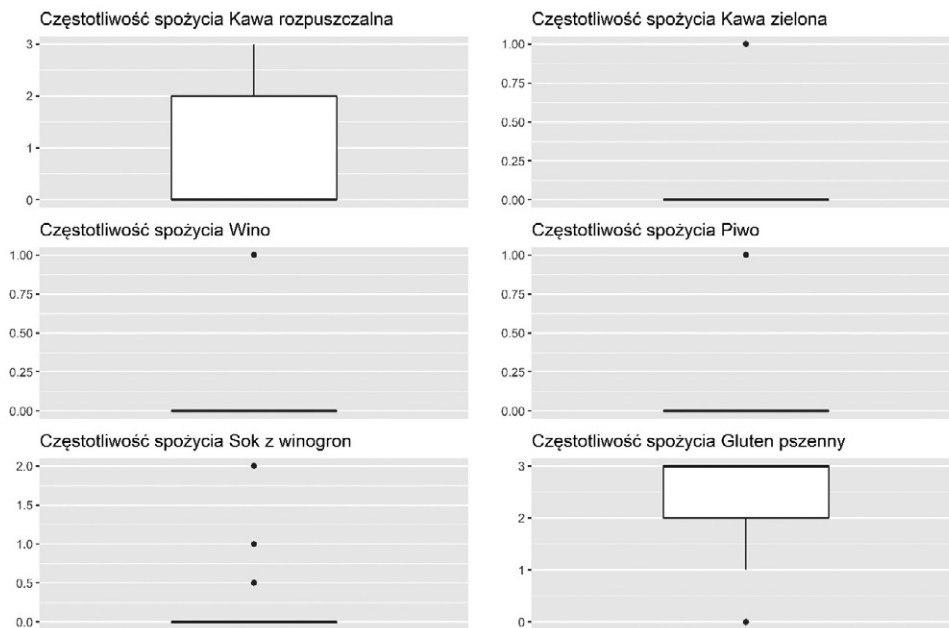
Tabela 28. Analiza korelacji rho Spearmana pomiędzy częstotliwością spożycia poszczególnych produktów spożywczych a zawartością OTA w mleku, moczu i surowicy matki

Zmienna	OTA w mleku matki [ng/ml]	OTA w moczu matki [ng/ml]	OTA w surowicy matki [ng/ml]
Pieczywo białe	0,05	-0,12	-0,18
Pieczywo ciemne	-0,07	0,02	0,24
Płatki zbożowe	0,07	-0,03	0,12
Płatki kukurydziane	-0,20	0,04	-0,05
Podroby	-0,12	-0,09	-0,11
Kawa mielona	0,05	-0,01	0,10
Kawa rozpuszczalna	-0,22	-0,08	-0,12
Kawa zielona	-0,06	0,08	0,09
Wino	-0,07	0,13	0,01
Piwo	-0,09	0,36**	0,15
Sok z winogron	-0,11	-0,05	-0,16
Gluten pszenny	0,00	0,13	0,10
Czekolada	0,09	0,18	0,17
Kakao	-0,10	0,04	-0,18
Kasze	0,15	-0,05	-0,05
Ryż	0,06	0,05	-0,20
Orzechy	0,05	-0,02	0,12
Mleko krowie	-0,15	-0,10	-0,26*
Ser żółty	-0,22	-0,14	-0,02
Ser pleśniowy	-0,08	0,00	-0,06
Jaja kurze	-0,05	-0,07	-0,07
Lukrecja	-0,03	0,00	0,16
Przyprawy	-0,17	-0,04	-0,40**
Suszone owoce winorośli	0,28*	0,03	0,23
Suszone owoce	-0,06	-0,11	0,26*
Rośliny strączkowe	0,07	0,09	0,31*

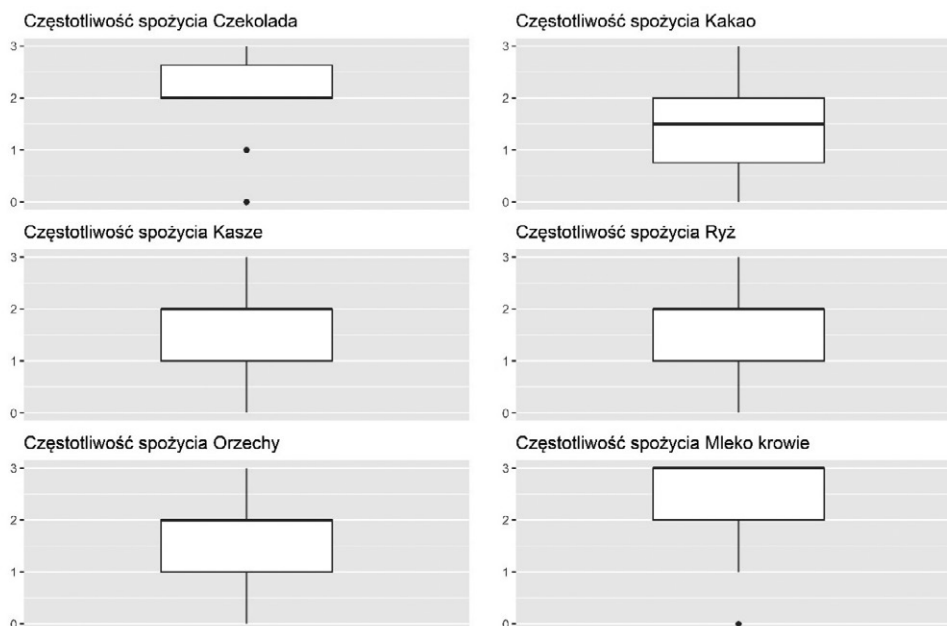
* $p < 0,05$ ** $p < 0,01$ *** $p < 0,001$



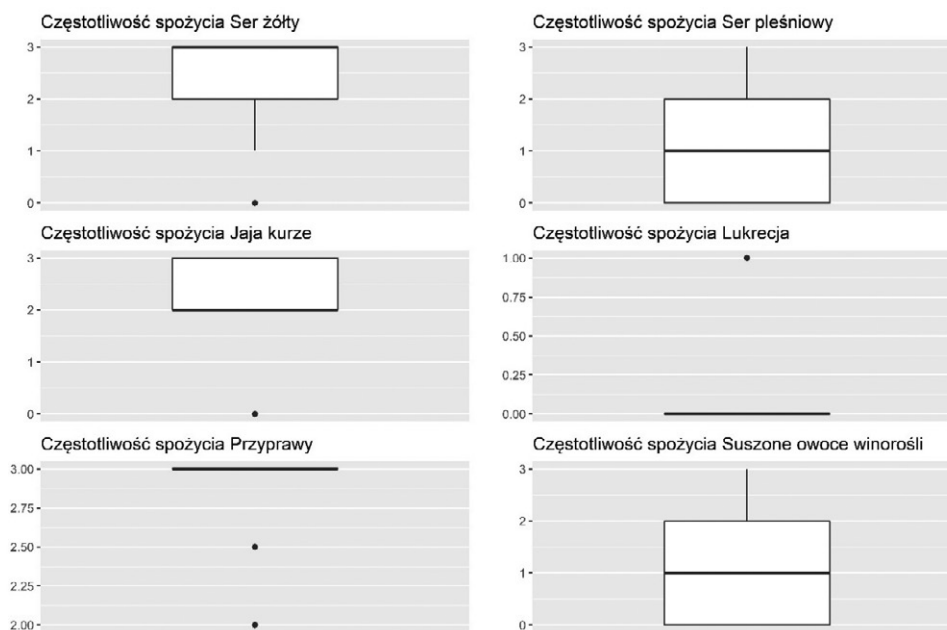
Wykres 3. Rozkład wartości zmiennej „częstotliwość spożycia”: pieczywo białe, pieczywo ciemne, płatki zbożowe, płatki kukurydziane, podroby, kawa mielona



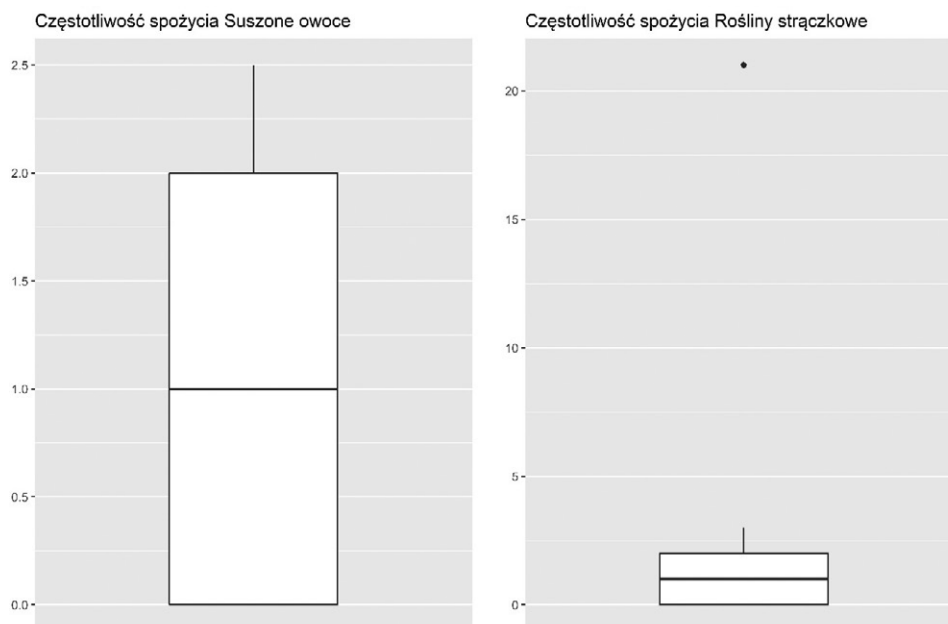
Wykres 4. Rozkład wartości zmiennej „częstotliwość spożycia”: kawa rozpuszczalna, kawa zielona, wino, piwo, sok z winogron, gluten pszenny



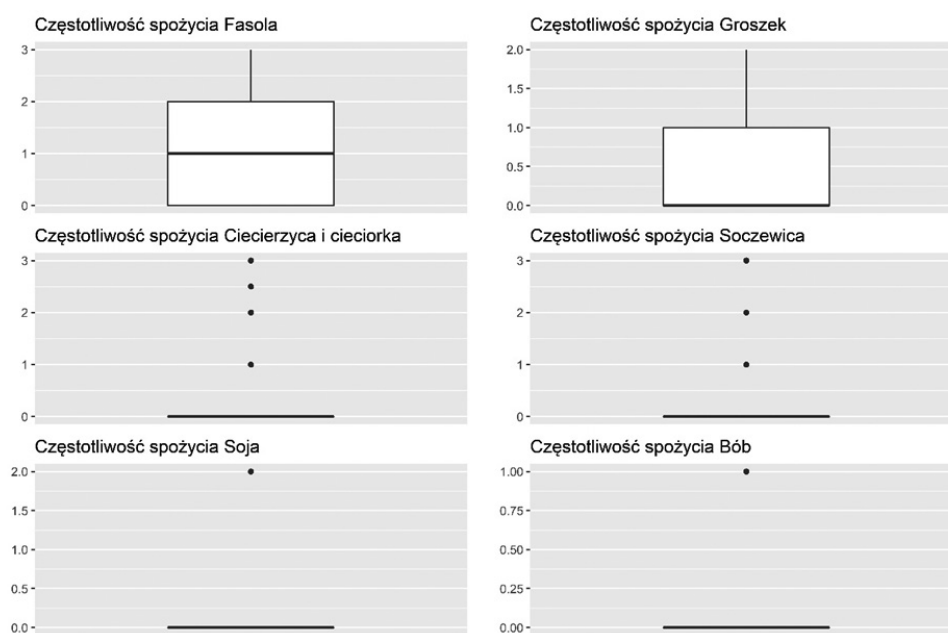
Wykres 5. Rozkład wartości zmiennej „częstotliwość spożycia”: czekolada, kakao, kasze, ryż, orzechy, mleko krowie



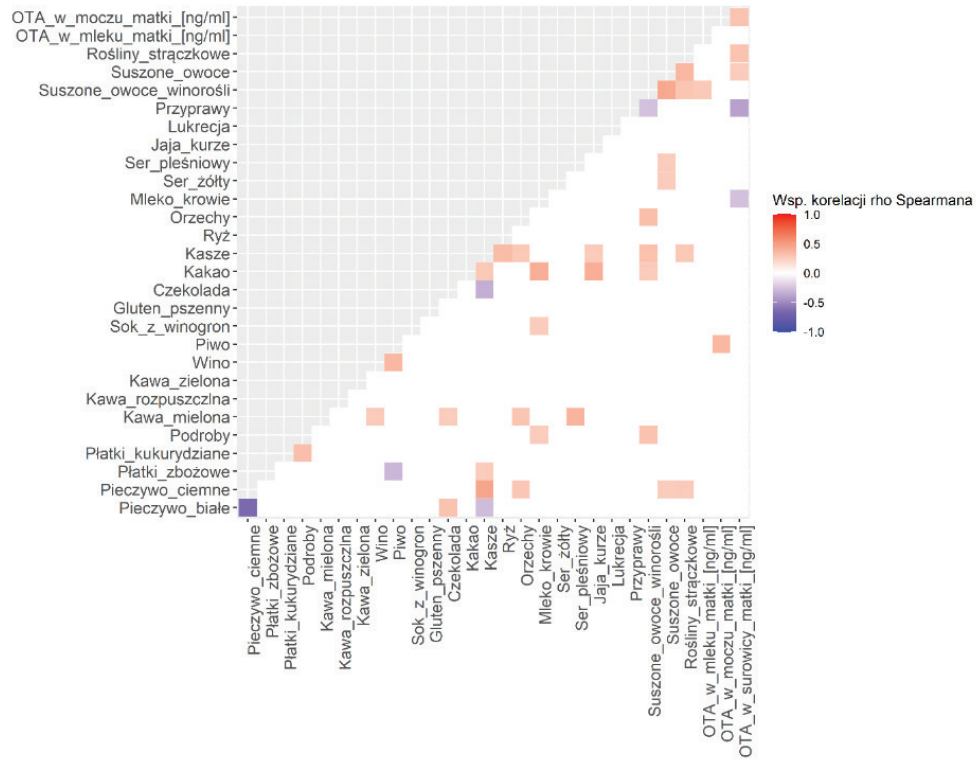
Wykres 6. Rozkład wartości zmiennej „częstotliwość spożycia”: ser żółty, ser pleśniowy, jaja kurze, lukrecja, przyprawy, suszone owoce winorośli



Wykres 7. Rozkład wartości zmiennej „częstotliwość spożycia”: suszone owoce, rośliny strączkowe



Wykres 8. Rozkład wartości zmiennej „częstotliwość spożycia” roślin strączkowych: fasola, groszek, ciecierzycy i ciecioraka, soczewica, soja, bób



Wykres 9. Korelogram zmiennych częstotliwość spożycia (poszczególne produkty) i zawartość OTA w mleku, moczu i surowicy matki

Tabele 29 – 32 przedstawiają statystyki opisowe oraz testy normalności rozkładu dla częstości spożycia poszczególnych produktów dla $p < 0,05$ $**p < 0,01$ $***p < 0,001$

Tabela 29. Statystyki opisowe oraz testy normalności rozkładu dla częstości spożycia poszczególnych produktów spożywczych

Zmienna	N	Braki	M	Me	SD	IOR	Min	Max	Skośność	Kurtoza	S-W
Pieczycwo białe	60	0	2,46	3,00	0,81	1,00	0,00	3,00	-1,65	2,39	0,68***
Pieczycwo ciemne	60	0	2,27	2,25	0,87	1,00	0,00	3,00	-1,23	1,05	0,77***
Płatki zbożowe	60	0	1,66	2,00	0,89	1,00	0,00	3,00	-0,03	-0,77	0,88***
Płatki kukurydziane	60	0	0,88	1,00	0,85	1,00	0,00	3,00	0,58	-0,49	0,83***
Podroby	60	0	0,90	1,00	0,95	2,00	0,00	3,00	0,57	-0,91	0,81***
Kawa mielona	60	0	1,25	1,00	1,32	3,00	0,00	3,00	0,34	-1,69	0,75***
Kawa rozpuszczalna	60	0	0,83	0,00	1,12	2,00	0,00	3,00	0,94	-0,68	0,72***
Kawa zielona	60	0	0,05	0,00	0,22	0,00	0,00	1,00	4,24	16,49	0,23***
Wino	60	0	0,07	0,00	0,25	0,00	0,00	1,00	3,56	11,07	0,27***
Piwo	60	0	0,10	0,00	0,30	0,00	0,00	1,00	2,74	5,67	0,34***
Sok z winogron	60	0	0,17	0,00	0,46	0,00	0,00	2,00	2,78	7,45	0,43***
Gluten pszeniczny	60	0	2,47	3,00	0,98	1,00	0,00	3,00	-1,74	1,67	0,59***
Czekolada	60	0	2,00	2,00	0,82	0,63	0,00	3,00	-0,79	0,49	0,83***

cd. tabeli 29

Zmienna	N	Braki	M	Me	SD	IQR	Min	Max	Skośność	Kurtoza	S-W
Kakao	60	0	1,38	1,50	1,00	1,25	0,00	3,00	-0,05	-1,13	0,87***
Kasze	60	0	1,77	2,00	0,78	1,00	0,00	3,00	-0,46	-0,01	0,85***
Ryż	60	0	1,70	2,00	0,65	1,00	0,00	3,00	-1,19	1,41	0,69***
Orzechy	60	0	1,65	2,00	0,95	1,00	0,00	3,00	-0,20	-0,83	0,88***
Mleko krowie	60	0	2,57	3,00	0,83	1,00	0,00	3,00	-2,14	4,02	0,57***
Ser zółty	60	0	2,33	3,00	0,97	1,00	0,00	3,00	-1,30	0,56	0,70***
Ser pleśniowy	60	0	0,83	1,00	0,87	2,00	0,00	3,00	0,50	-1,07	0,80***
Jaja kurze	60	0	2,27	2,00	0,63	1,00	0,00	3,00	-1,15	3,73	0,68***
Lukrecja	60	0	0,02	0,00	0,13	0,00	0,00	1,00	7,75	60,00	0,11***
Przyprawy	60	0	2,82	3,00	0,37	0,00	2,00	3,00	-1,67	1,04	0,52***
Suszone owoce winorośli	60	0	1,07	1,00	0,86	2,00	0,00	3,00	0,36	-0,59	0,86***
Suszone owoce	60	0	0,88	1,00	0,85	2,00	0,00	2,50	0,34	-1,33	0,81***
Rośliny strączkowe	60	0	1,03	1,00	0,87	2,00	0,00	3,00	0,30	-0,86	0,86***

Tabela 30. Statystyki opisowe oraz testy normalności rozkładu dla częstości spożycia poszczególnych suszonych owoców

Zmienna	N	Braki	M	Me	SD	IQR	Min	Max	Skośność	Kurtozą	S-W
Ananas	60	0	0,03	0,00	0,18	0,00	0,00	1,00	5,33	27,36	0,18***
Mango	60	0	0,02	0,00	0,13	0,00	0,00	1,00	7,75	60,00	0,11***
Jabłko	60	0	0,18	0,00	0,50	0,00	0,00	2,00	2,79	7,01	0,41***
Banan	60	0	0,05	0,00	0,22	0,00	0,00	1,00	4,24	16,49	0,23***
Śliwki	60	0	0,40	0,00	0,79	0,00	0,00	3,00	1,75	1,77	0,56***
Żurawina	60	0	0,25	0,00	0,63	0,00	0,00	2,00	2,31	3,78	0,43***
Morele	60	0	0,34	0,00	0,75	0,00	0,00	3,00	2,12	3,40	0,52***
Daktyle	60	0	0,17	0,00	0,49	0,00	0,00	2,50	3,16	10,41	0,40***
Papaja	60	0	0,02	0,00	0,13	0,00	0,00	1,00	7,75	60,00	0,11***
Winogrono	60	0	0,05	0,00	0,29	0,00	0,00	2,00	6,15	39,25	0,17***
Figi	60	0	0,03	0,00	0,26	0,00	0,00	2,00	7,75	60,00	0,11***
Wiśnie	60	0	0,03	0,00	0,26	0,00	0,00	2,00	7,75	60,00	0,11***

Tabela 31. Statystyki opisowe oraz testy normalności rozkładu dla częstości spożycia poszczególnych przypraw

Zmienna	N	Braki	M	Me	SD	IQR	Min	Max	Skośność	Kurtzoza	S-W
Curry	60	0	0,45	0,00	1,08	0,00	0,00	3,00	2,01	2,11	0,43***
Czosnek	60	0	0,38	0,00	0,99	0,00	0,00	3,00	2,27	3,33	0,41***
Koperek	60	0	0,1	0,00	0,54	0,00	0,00	3,00	5,33	27,36	0,18***
Pieprz	60	0	2,19	3,00	1,26	1,00	0,00	3,00	-1,12	-0,6	0,62***
Cynamon	60	0	0,29	0,00	0,88	0,00	0,00	3,00	2,76	5,83	0,35***
Sól	60	0	1,68	2,75	1,45	3,00	0,00	3,00	-0,27	-1,93	0,67***
Kolendra	60	0	0,1	0,00	0,54	0,00	0,00	3,00	5,33	27,36	0,18***
Papryka	60	0	1,33	0,00	1,46	3,00	0,00	3,00	0,21	-1,96	0,67***
Bazylija	60	0	1,24	0,00	1,41	3,00	0,00	3,00	0,31	-1,87	0,68***
Oregano	60	0	1,44	2,00	1,44	3,00	0,00	3,00	0,04	-1,97	0,69***
Zioła prowansalskie	60	0	0,6	0,00	1,16	0,00	0,00	3,00	1,48	0,3	0,53***
Lubczyk	60	0	0,1	0,00	0,54	0,00	0,00	3,00	5,33	27,36	0,18***
Majeranek	60	0	0,52	0,00	1,11	0,00	0,00	3,00	1,75	1,2	0,48***
Tymianek	60	0	0,45	0,00	1,03	0,00	0,00	3,00	1,96	2,06	0,46***
Kurkuma	60	0	0,54	0,00	1,11	0,00	0,00	3,00	1,64	0,86	0,51***



cd. tabeli 31

Zmienna	N	Braki	M	Me	SD	IQR	Min	Max	Skośność	Kurtoza	S-W
Kumin	60	0	0,18	0,00	0,70	0,00	0,00	3,00	3,70	12,38	0,27***
Mięta	60	0	0,05	0,00	0,39	0,00	0,00	3,00	7,75	60,00	0,11***
Imbir	60	0	0,19	0,00	0,73	0,00	0,00	3,00	3,60	11,42	0,27***
Rozmaryn	60	0	0,10	0,00	0,54	0,00	0,00	3,00	5,33	27,36	0,18***
Pietruszka	60	0	0,10	0,00	0,54	0,00	0,00	3,00	5,33	27,36	0,18***
Kminek	60	0	0,05	0,00	0,39	0,00	0,00	3,00	7,75	60,00	0,11***
Liść laurowy	60	0	0,13	0,00	0,60	0,00	0,00	3,00	4,44	18,79	0,23***
Ziele angielskie	60	0	0,10	0,00	0,54	0,00	0,00	3,00	5,33	27,36	0,18***
Vegeta	60	0	0,05	0,00	0,39	0,00	0,00	3,00	7,75	60,00	0,11***
Suszone pomidory	60	0	0,05	0,00	0,39	0,00	0,00	3,00	7,75	60,00	0,11***
Gałka muszkatołowa	60	0	0,03	0,00	0,26	0,00	0,00	2,00	7,75	60,00	0,11***
Kozieradka	60	0	0,03	0,00	0,26	0,00	0,00	2,00	7,75	60,00	0,11***
Czarnuszka	60	0	0,03	0,00	0,26	0,00	0,00	2,00	7,75	60,00	0,11***
Ziosta	60	0	0,15	0,00	0,66	0,00	0,00	3,00	4,24	16,49	0,23***

Tabela 32. Statystyki opisowe oraz testy normalności rozkładu dla częstości spożycia poszczególnych roślin strączkowych

Zmienna	N	Braki	M	Me	SD	IQR	Min	Max	Skośność	Kurtosis	S-W
Fasola	60	0	0,93	1,00	0,86	2,00	0,00	3,00	0,36	-1,07	0,83
Groszek	60	0	0,35	0,00	0,61	1,00	0,00	2,00	1,55	1,39	0,61
Ciecierzycia i cieciorka	60	0	0,36	0,00	0,82	0,00	0,00	3,00	2,15	3,36	0,49
Soczewica	60	0	0,37	0,00	0,80	0,00	0,00	3,00	2,09	3,21	0,51
Soja	60	0	0,03	0,00	0,26	0,00	0,00	2,00	7,75	60,00	0,11
Bób	60	0	0,05	0,00	0,22	0,00	0,00	1,00	4,24	16,49	0,23

11.7. Występowanie OTA w płynach ustrojowych a podstawowe parametry opisujące badane kobiety i ich dzieci karmione mlekiem

Inną zależnością badaną w pracy była zależność występowania OTA w płynach ustrojowych a podstawowymi parametrami opisującymi badane kobiety i ich dzieci karmione pierśią – wiek badanej kobiety, tydzień ciąży, kiedy nastąpił poród, masa urodzeniowa dziecka.

Tabela 33 przedstawia parametry opisujące kobiety i ich dzieci, przy założeniu, że do wyliczeń wykorzystano dane podane przed 60 kobiet (wiek oraz masa urodzeniowa dziecka) oraz 59 danych dotyczących tygodnia ciąży, w którym nastąpił poród.

Tabela 33. Parametry opisujące kobiety i ich dzieci

	Parametr				
	Min	Max	$\bar{[X]}$	$[\sigma]$	Me
Wiek badanej	22	41	31 lat	4,71	32
Tydzień ciąży, w którym nastąpił poród	27 tc	42 tc	37 tc	4,43	39
Masa urodzeniowa dziecka	750 g	4480 g	2965,6 g	964,62	3195

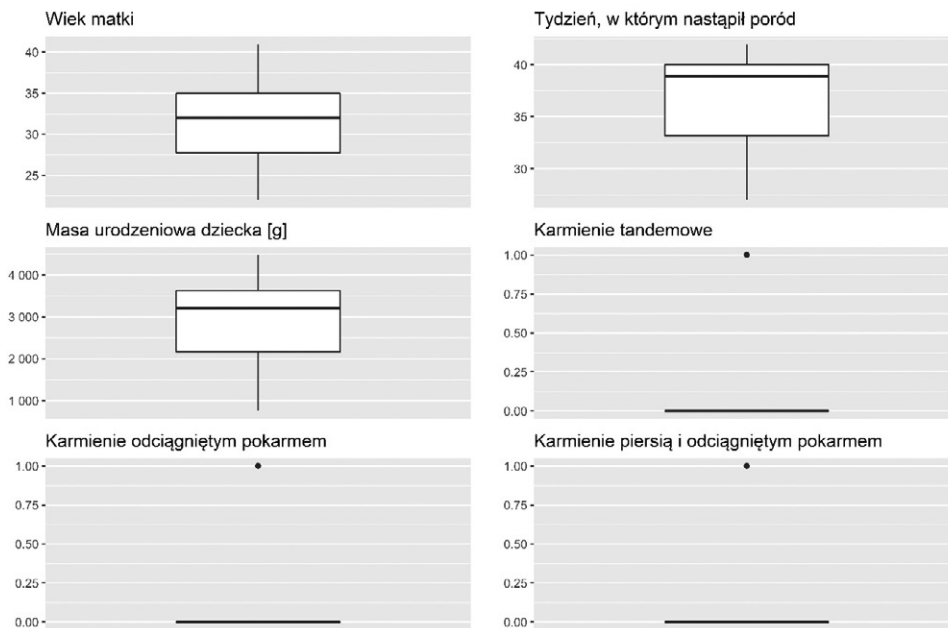
W celu eksploracji danych służących utworzeniu formuły modelu regresji liniowej pozwalającego przewidywać poziom OTA w mleku, moczu lub osoczu matki przeprowadzono serię analiz korelacji liniowej Pearsona. Charakterystykę rozkładów zmiennych biorących udział w owej analizie zawarto na wykresach 10 – 11.

W wyniku analizy ustalono istotne korelacje jedynie w przypadku zmiennej „zawartość OTA w surowicy matki (tab. 34). Okazało się, że wraz ze wzrostem poziomu zmiennej „tydzień, w którym nastąpił poród” dochodzi do istotnego wzrostu poziomu zawartości OTA w surowicy matki ($r = 0,30$; $p < 0,05$). Ustalono również, że karmienie odciągniętym pokarmem (*versus* karmienie pierśią) związane jest z istotnym obniżeniem poziomu OTA w surowicy matki ($r = -0,26$; $p < 0,05$). Siła owych korelacji jest słaba. Graficzną prezentację wyników zawarto na wykresie 12.

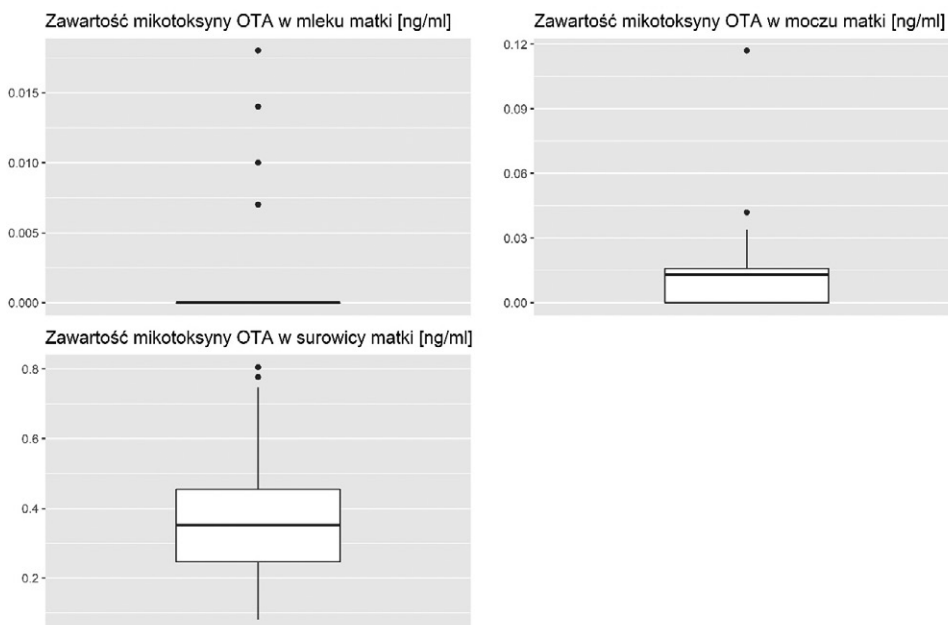
Tabela 34. Analiza korelacji r Pearsona pomiędzy wiekiem matki, tygodniem, w którym nastąpił poród, masą urodzeniową dziecka, tandemowym karmieniem, karmieniem odciągniętym pokarmem, karmieniem pierśią i odciągniętym pokarmem, a zawartością OTA w mleku, moczu i surowicy

Zmienna	OTA w mleku matki [ng/ml]	OTA w moczu matki [ng/ml]	OTA w surowicy matki [ng/ml]
Wiek matki	0,13	0,01	0,03
Tydzień porodu	-0,11	-0,12	0,30*
Masa urodzeniowa dziecka [g]	-0,11	-0,10	0,25
Tandemowe karmienie	0,11	0,08	0,13
Karmienie odciągniętym pokarmem	0,14	0,17	-0,26*
Karmienie pierśią i odciągniętym pokarmem	-0,12	-0,11	-0,03

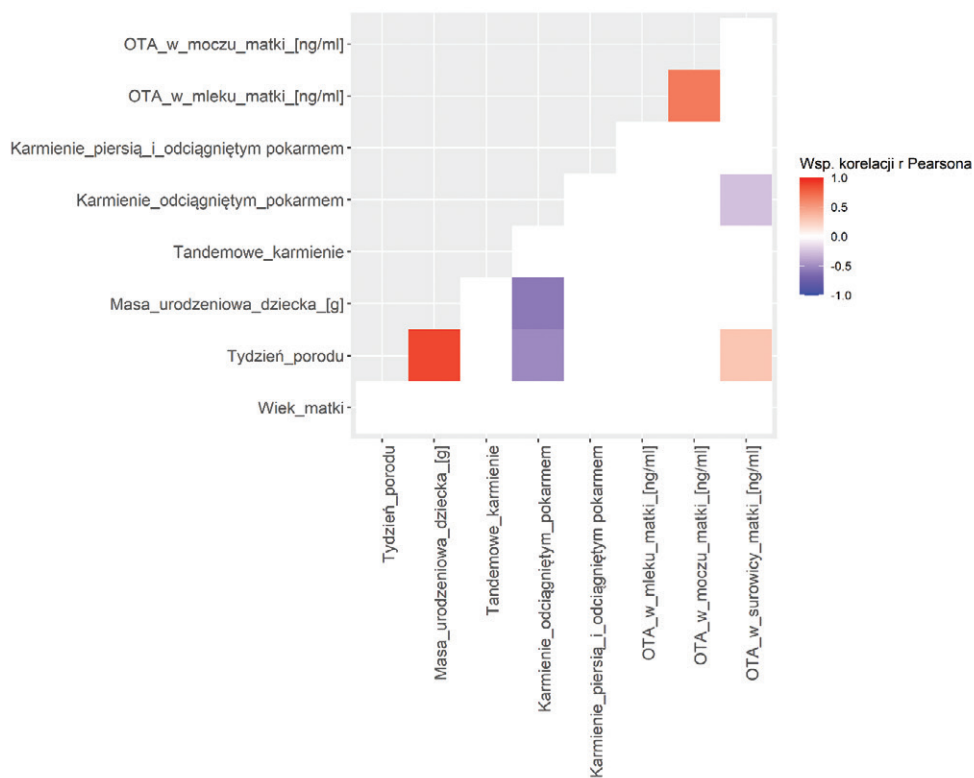
Grupą referencyjną dla karmienia odciągniętym pokarmem i karmienia pierśią i odciągniętym pokarmem jest karmienie pierśią; * $p < 0,05$ ** $p < 0,01$ *** $p < 0,001$



Wykres 10. Rozkład wartości zmiennych: wiek matki, tydzień, w którym nastąpił poród, masa urodzeniowa dziecka, tandemowe karmienie, karmienie odciągniętym pokarmem, karmienie piersią i odciągniętym pokarmem



Wykres 11. Rozkład wartości zmiennych: zawartość mikotoksyny OTA w mleku, moczu i surowicy matki



Wykres 12. Korelogram zmiennych wiek matki, tydzień, w którym nastąpił poród, masa urodzeniowa dziecka, tandemowe karmienie, karmienie odciągniętym pokarmem, karmienie piersią i odciągniętym pokarmem, zawartość OTA w mleku, moczu i surowicy matki

Tabela 35. Statystyki opisowe oraz testy normalności rozkładu dla zmiennych: wiek matki, tydzień, w którym nastąpił poród, masa urodzeniowa dziecka, tandemowe karmienie, karmienie odciągniętym pokarmem, karmienie z piersi i odciągniętym pokarmem, zawartość OTA w mleku, moczu i surowicy matki

Zmienna	N	Braki	M	Me	SD	IQR	Min	Max	Skośność	Kurtoza	S-W
Wiek matki	60	0	31,30	32,00	4,71	7,25	22,00	41,00	-0,04	-0,90	0,97
Tydzień porodu	60	0	36,81	38,93	4,40	6,86	27,00	42,00	-0,87	-0,57	0,86***
Masa urodzeniowa dziecka [g]	60	0	2965,58	3195,00	964,62	1457,50	750,00	4480,00	-0,57	-0,65	0,94**
Tandemowe karmienie	60	0	0,08	0,00	0,28	0,00	0,00	1,00	3,09	7,83	0,31***
Karmienie odciągniętym pokarmem	60	0	0,17	0,00	0,38	0,00	0,00	1,00	1,84	1,41	0,45***
Karmienie piersią i odciągniętym pokarmem	60	0	0,18	0,00	0,39	0,00	0,00	1,00	1,68	0,85	0,47***
OTA w mleku matki [ng/ml]	60	0	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,02	4,20	17,64	0,27***
OTA w moczu matki [ng/ml]	60	0	0,01	0,01	0,02	0,02	0,00	0,12	4,06	23,88	0,61***
OTA w surowicy matki [ng/ml]	60	0	0,38	0,35	0,16	0,21	0,08	0,81	0,77	0,46	0,94**

Grupę referencyjną dla karmienia odciągniętym pokarmem i karmienia piersią i odciągniętym pokarmem jest karmienie piersią; *p < 0,05. **p < 0,01 ***p < 0,001

Tabela 35 przedstawia Statystyki opisowe oraz testy normalności rozkładu dla zmiennych: wiek matki, tydzień, w którym nastąpił poród, masa urodzeniowa dziecka, tandemowe karmienie, karmienie odciągniętym pokarmem, karmienie z piersi i odciągniętym pokarmem, zawartość OTA w mleku, moczu i surowicy matki.

Model regresji przewidujący poziom zawartości OTA w surowicy matki

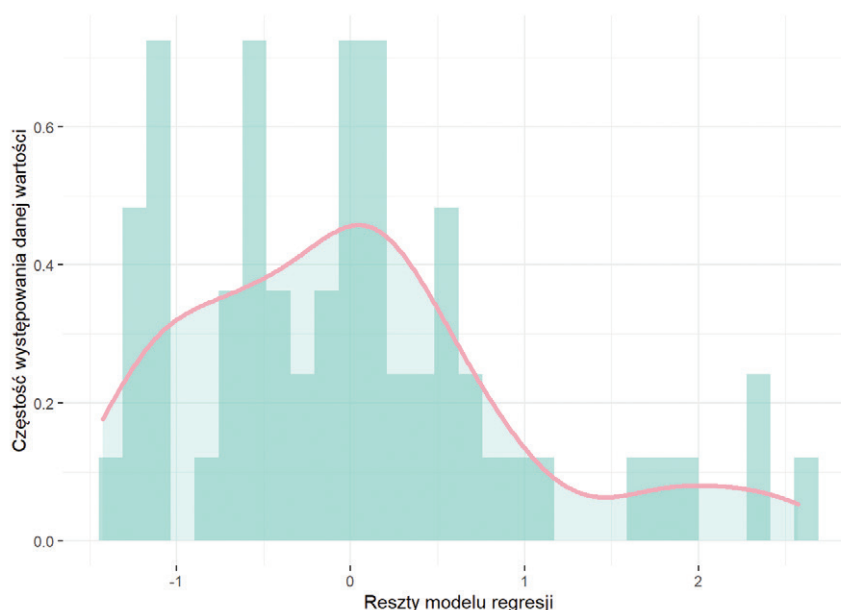
W celu weryfikacji hipotezy zakładającej, że tydzień, w którym nastąpił poród, oraz karmienie odciągniętym pokarmem (*versus* karmienie piersią) są istotnymi predyktorami poziomu zawartości OTA w surowicy matki, przeprowadzono wielozmienną analizę regresji liniowej. Analiza regresji wykazała istotne przewidywanie, $F(2,57) = 3,38$; $p < 0,05$. Analiza wartości współczynnika R^2 wykazała, że model regresyjny uwzględnionych zmiennych niezależnych (tydzień, w którym nastąpił poród, karmienie odciągniętym pokarmem) wyjaśniał około 11% (7% po skorygowaniu) zmienności wyników zmiennej „zawartość OTA w surowicy matki [ng/ml]”. Współczynnik nieskorygowany i skorygowany wyjaśnionej wariancji wynosił odpowiednio: $R^2 = 0,11$, $adj. R^2 = 0,07$. Ilość istotnych predyktorów w modelu wynosiła: 0. Analiza statystyk poszczególnych predyktorów w modelu wykazała następujące rezultaty: Wzrost wyników zmiennej „tydzień, w którym nastąpił poród” wiązał się ze wzrostem poziomu zawartości OTA w surowicy matki [ng/ml], aczkolwiek uzyskany wynik był nieistotny statystycznie, $B = 0,23$; $t = 1,58$; $p > 0,05$. Wzrost wyników zmiennej „karmienie odciągniętym pokarmem” wiązał się ze spadkiem poziomu OTA w surowicy matki [ng/ml], aczkolwiek uzyskany wynik był nieistotny statystycznie, $B = -0,14$; $t = -0,97$; $p > 0,05$. Analiza regresji nie wykazała żadnych innych statystycznie istotnych wyników. Rezultaty oszacowań testowanego modelu przedstawia tabela 36.

Tabela 36. Wpływ zmiennych „tydzień, w którym nastąpił poród” i „karmienie odciągniętym pokarmem” na poziom OTA w surowicy matki [ng/ml]

Predyktory	<i>B</i>	<i>SE</i>	<i>t</i>	<i>DPU</i>	<i>GPU</i>	<i>VIF</i>
Stała	0	0,12	0	-0,25	0,25	
Tydzień porodu	0,23	0,15	1,58	-0,06	0,52	1,35
Karmienie odciągniętym pokarmem	-0,14	0,15	-0,97	-0,43	0,15	1,35

Grupą referencyjną dla karmienia odciągniętym pokarmem jest karmienie piersią; * $p < 0,05$ ** $p < 0,01$ *** $p < 0,001$

W celu weryfikacji założenia dotyczącego homoskedastyczności wariancji przeprowadzono analizę testem Breusha-Pagana. Analiza jego wyników wykazała, że założenie o homoskedastyczności zostało spełnione (wariancja reszt była równa), $\chi^2 = 0,35$; $p > 0,05$. Do wyników analizy należy podchodzić z ostrożnością ze względu na brak spełnienia założenia o normalności rozkładów zmiennych biorących udział w analizie, a także niespełnione (formalnie) założenie odnośnie normalności reszt modelu – rozkład wyników reszt testowanego modelu regresji był istotnie różny od teoretycznego rozkładu normalnego, $S-W = 0,93$; $p < 0,01$. Oceny wzrokowej normalności rozkładu reszt można dokonać analizując wzorzec wyników na wykresie 13.



Wykres 13. Rozkład składnika losowego (reszt) modelu regresji

11.8. Zależność pomiędzy występowaniem ZEN i jego metabolitów w moczu kobiet będących w okresie laktacji

Ponadto wyliczone zostały zależności pomiędzy występowaniem w moczu badanych kobiet ZEN i jego metabolitów α -ZEL, β -ZEL, α -ZAL oraz ZAN. Zależności stochastyczne pomiędzy zawartością ZEN a jego metabolitami obliczono z wykorzystaniem współczynnika korelacji prostej r – Pearsona. Istotne i pozytywne zależności stwierdzono pomiędzy zawartością zearalenonu i: β -ZEL ($r = 0,89$), α -ZEL ($r = 0,91$), α -ZAL ($r = 0,84$) oraz ZAN ($r = 0,79$). W tabeli 37 przedstawiono korelację między zmiennymi, którymi były badane związki α -ZEL, β -ZEL, α -ZAL, ZAN oraz ZEN, natomiast w tabeli 38 ogólne wartości ZEN i jego metabolitów w badanych próbkach. Wykresy 14 –17 przedstawiają korelacje pomiędzy występowaniem ZEN i jego metabolitów.

ZEN i jego metabolity były obecne we wszystkich badanych próbkach moczu. Wartość ZEN wahała się od $<0,006$ ng/ml ($<LOD$) do 0,48 ng/ml, α -ZEL od $<0,012$ ng/ml ($<LOD$) do 0,668 ng/ml, β -ZEL od $<0,015$ ng/ml ($<LOD$) do 0,0441 ng/ml, α -ZAL od $<0,012$ ng/ml ($<LOD$) do 0,08 ng/ml, a ZAN od 0,07 ng/ml ($<LOD$) do 0,055 ng/ml.

Tabela 37. Wartości ZEN i jego metabolitów w poszczególnych próbkach moczu

Nr prób	α -ZEL [ng/ml]	β -ZEL [ng/ml]	α -ZAL [ng/ml]	ZAN [ng/ml]	ZEN [ng/ml]
1	0,220	0,172	0,050	0,027	0,294
2	0,012	0,015	0,012	0,009	0,035
3	0,668	0,293	0,080	0,055	0,482
4	0,040	0,050	0,012	0,009	0,052
5	0,040	0,050	0,012	0,009	0,069
6	0,066	0,069	0,040	0,030	0,132

cd. tabeli 37

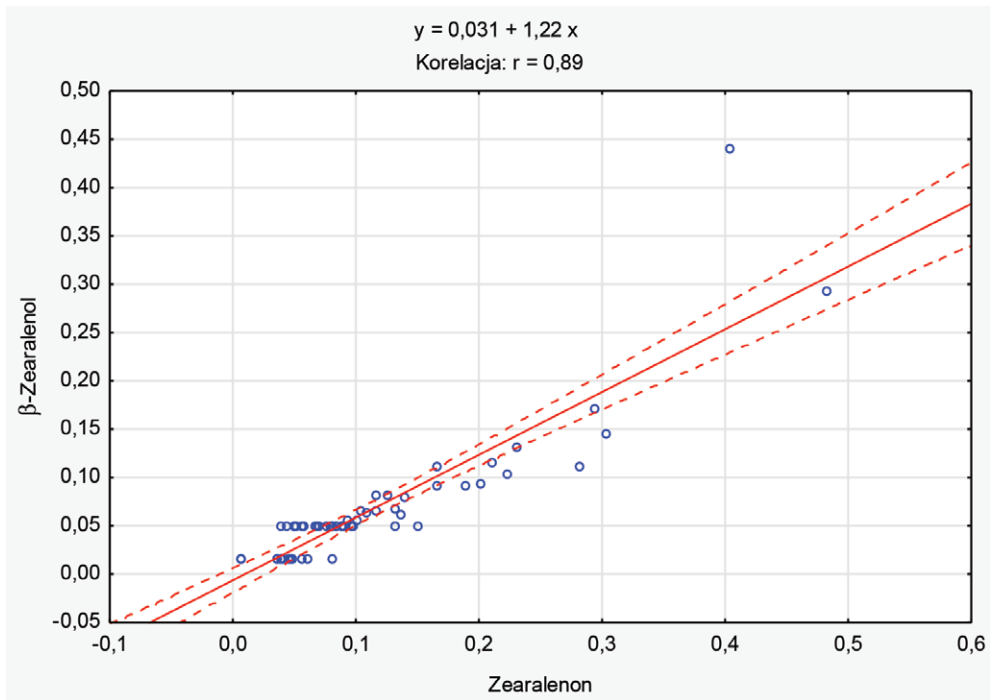
7	0,045	0,055	0,012	0,007	0,093
8	0,206	0,145	0,040	0,030	0,304
9	0,040	0,050	0,012	0,009	0,043
10	0,045	0,050	0,012	0,009	0,096
11	0,074	0,055	0,040	0,030	0,101
12	0,228	0,112	0,047	0,030	0,282
13	0,012	0,015	0,012	0,009	0,039
14	0,040	0,050	0,012	0,009	0,057
15	0,040	0,015	0,012	0,009	0,047
16	0,040	0,050	0,012	0,009	0,080
17	0,150	0,132	0,043	0,030	0,230
18	0,012	0,015	0,012	0,009	0,040
19	0,040	0,050	0,012	0,009	0,051
20	0,040	0,050	0,012	0,009	0,049
21	0,078	0,083	0,040	0,030	0,116
22	0,040	0,050	0,012	0,009	0,056
23	0,068	0,067	0,040	0,030	0,117
24	0,040	0,015	0,012	0,009	0,040
25	0,044	0,050	0,012	0,009	0,082
26	0,140	0,104	0,040	0,030	0,223
27	0,040	0,050	0,012	0,009	0,040
28	0,040	0,050	0,012	0,009	0,070
29	0,042	0,050	0,012	0,009	0,088
30	0,040	0,050	0,012	0,009	0,076
31	0,080	0,050	0,040	0,030	0,151
32	0,040	0,015	0,012	0,009	0,056
33	0,057	0,015	0,012	0,009	0,081
34	0,045	0,050	0,012	0,009	0,132
35	0,094	0,093	0,040	0,030	0,189
36	0,048	0,050	0,012	0,009	0,090
37	0,068	0,079	0,040	0,030	0,140
38	0,044	0,064	0,040	0,009	0,109
39	0,012	0,015	0,012	0,009	0,060
40	0,040	0,065	0,012	0,030	0,104
41	0,040	0,050	0,012	0,009	0,088

cd. tabeli 37

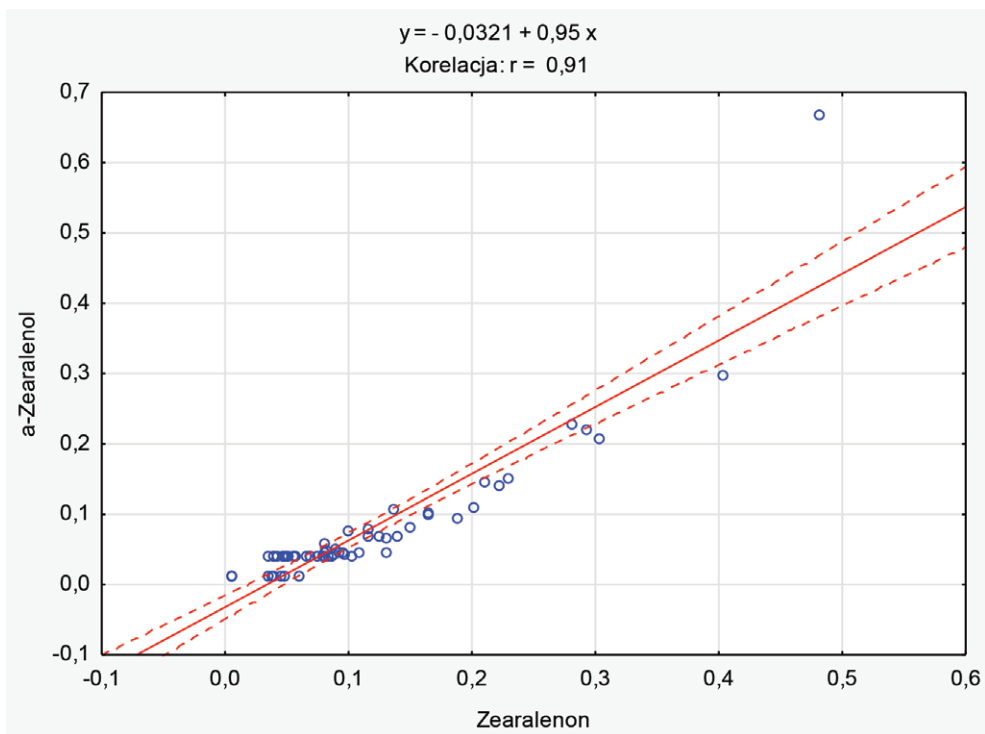
42	0,047	0,050	0,012	0,030	0,083
43	0,100	0,111	0,040	0,030	0,166
44	0,041	0,050	0,012	0,009	0,098
45	0,296	0,441	0,040	0,030	0,404
46	0,040	0,015	0,012	0,009	0,035
47	0,040	0,050	0,012	0,009	0,067
48	0,040	0,050	0,012	0,009	0,084
49	0,097	0,091	0,040	0,030	0,166
50	0,012	0,015	0,012	0,009	0,006
51	0,040	0,050	0,012	0,009	0,081
52	0,069	0,082	0,040	0,030	0,126
53	0,144	0,115	0,054	0,033	0,211
54	0,012	0,015	0,012	0,009	0,006
55	0,012	0,015	0,012	0,009	0,046
56	0,105	0,062	0,040	0,030	0,137
57	0,012	0,015	0,012	0,009	0,049
58	0,040	0,050	0,012	0,009	0,081
59	0,012	0,015	0,012	0,009	0,006
60	0,108	0,093	0,040	0,030	0,202

Tabela 38. Korelacja pomiędzy ZEN i jego metabolitami

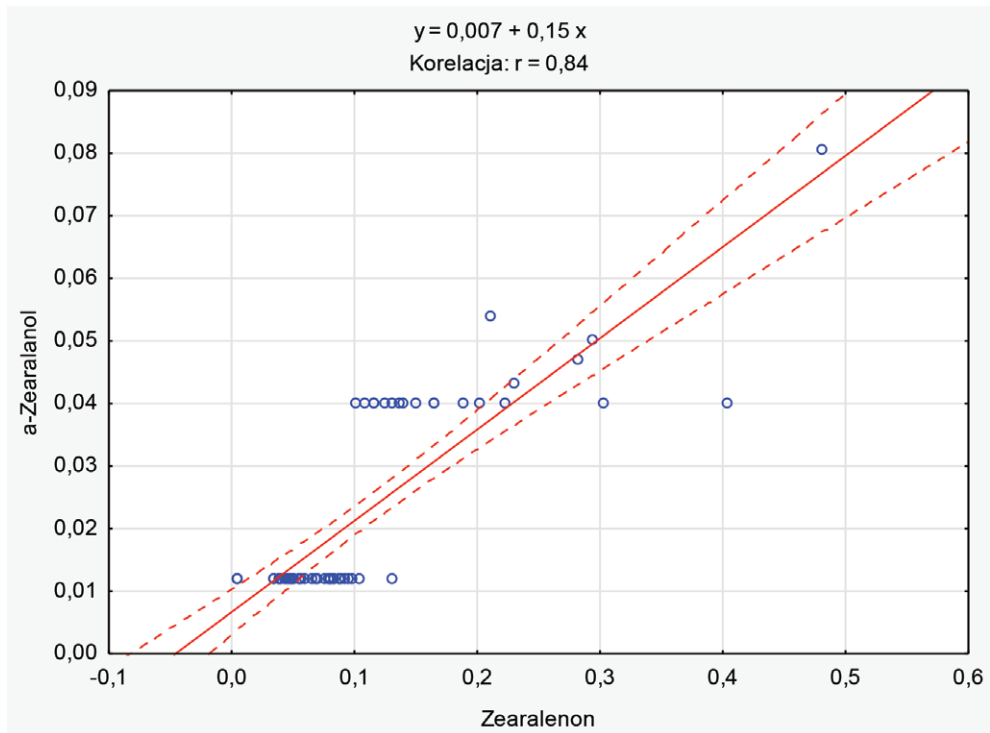
Zmienna	Oznaczone współczynniki korelacji są istotne z $p < 0,05$ N = 60			
	β -Zearalenol	α -Zearalenol	α -Zearalanol	Zearalanon
Zearalenon	0,8909	0,9074	0,8374	0,7940



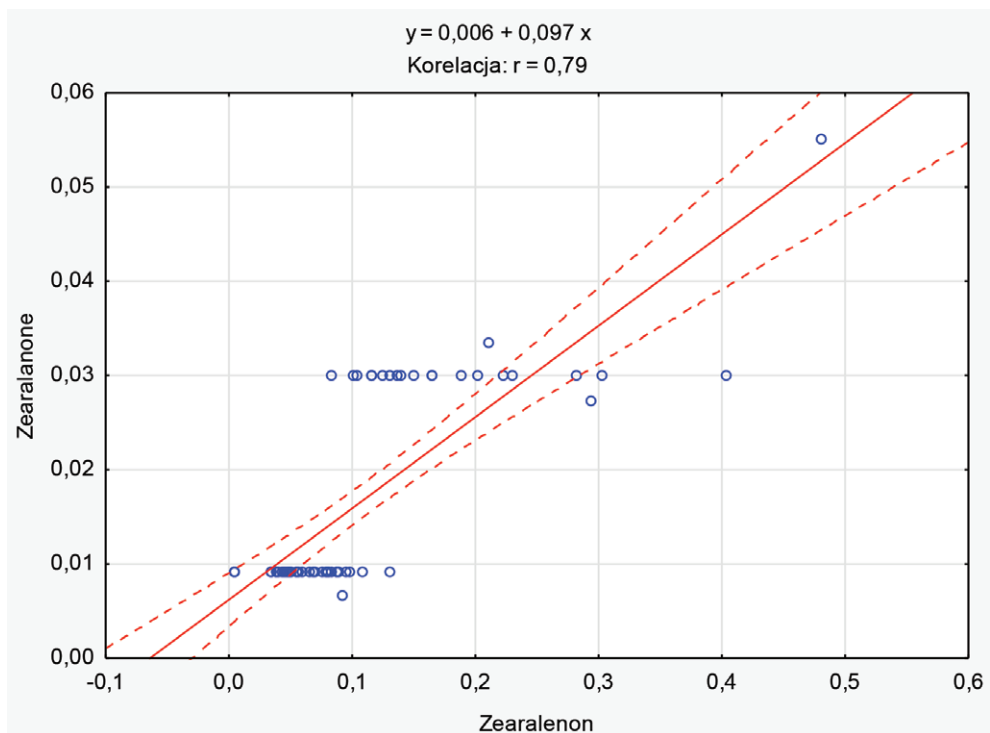
Wykres 14. Korelacja pomiędzy występowaniem ZEN i β -ZEL w moczu kobiet poddanych badaniom



Wykres 15. Korelacja pomiędzy występowaniem ZEN i α -ZEL w moczu kobiet poddanych badaniom



Wykres 16. Korelacja pomiędzy występowaniem ZEN i α -ZAL w moczu kobiet poddanych badaniom



Wykres 17. Korelacja pomiędzy występowaniem ZEN i ZAN w moczu kobiet poddanych badaniom

Dostępne piśmiennictwo w większości skupia się na zagadnieniach związanych z występowaniem ochratoksyny A i zearalenonu oraz ich metabolitów w poszczególnych tkankach zarówno ludzi, jak i zwierząt oraz w płynach ustrojowych człowieka. Nie brakuje również badań dotyczących występowania opisywanych mikotoksyn w żywności i paszach. Niestety badania dotyczące zależności występowania ochratoksyny A a danymi antropometrycznymi czy społecznymi są prowadzone stosunkowo rzadko. Brakuje również literatury dotyczącej korelacji występowania ochratoksyny A w płynach ustrojowych i tandemowym karmieniem dzieci, a także korelacji występowania ochratoksyny A a czystością mikrobiologiczną mleka, co w znacznym stopniu utrudnia dyskusję. Brak jest również badań określających związek pomiędzy występowaniem ochratoksyny A w mleku a składem mleka kobiecego.

W niniejszej pracy wyniki badania występowania ochratoksyny A w surowicy krwi wykazały jej obecność na średnim poziomie wynoszącym 0,3796 ng/ml, zakres pomiędzy 0,082 ng/ml – 0,805 ng/ml. Uzyskany wynik jest niższy niż średnie występowanie ochratoksyny A w surowicy krwi na świecie, które wynosi 700 pg/ml (0,7 ng/ml) (Märtlbauer i in. 2009). Zaledwie 3 próbki zawierały OTA na poziomie powyżej 0,7 ng/ml.

Fan i in. (2019) otrzymali średni wynik OTA w próbach osocza krwi wynoszący 1,21 µg/l (1,21 ng/ml). OTA występowała w 27,7% próbek w grupie 260 (149 mężczyzn i 111 kobiet) osób zamieszkujących tereny wiejskie, w tym, w przypadku kobiet 26,1% próbek było zanieczyszczonych OTA na średnim poziomie 1,22 µg/l (1,22 ng/ml) oraz 28,9% próbek w przypadku mężczyzn, z średnią 1,2 µg/l (1,2 ng/ml).

Palli i in. (1999) w swoim badaniu wykazali OTA w surowicy krwi na średnich poziomach 0,64 ng/ml u mężczyzn i 0,5 ng/ml u kobiet. Grupa mężczyzn składała się z 51 próbek, w tym 49 (96%) zanieczyszczonych OTA, z kolei grupa badawcza kobiet składała się z 86 próbek, w tym 83 zanieczyszczonych OTA (96,5%). W obu badaniach wyniki są wyższe niż wyniki otrzymane w niniejszej pracy.

W swoich badaniach Postupolski i in. (2006) wykazali obecność OTA w 30 próbkach (100%) surowicy krwi na średnim poziomie 1,14 ng/ml, co jest wynikiem wyższym niż uzyskany w badaniach do niniejszej pracy.

Malir i in. (2013) otrzymali średni poziom OTA w surowicy ciężarnych kobiet 0,15 µg/l (0,15 ng/ml) – w zakresie od 0,1 do 0,35 ng/ml, co jest wynikiem niższym niż uzyskane w niniejszej pracy. W badaniu Malir i in. (2013) wzięło udział 100 kobiet w wieku pomiędzy 19 a 40 lat. 96% próbek zanieczyszczonych było przez OTA.

Arce-López i in. (2020) w swoich badaniach wykryli OTA w osoczu krwi na średnim poziomie $2,87 \pm 2,16$ ng/ml, przy analizie 438 próbek (97,3% próbek pozytywnych).

Występowanie ochratoksyny A w moczu jest często badane przez naukowców z całego świata. Wyniki badań prowadzonych przez autorkę wykazały, że średnia ilość ochratoksyny A w pozytywnych próbkach moczu wynosiła 0,0199 ng/ml, co jest niskim wynikiem w porównaniu do wyników uzyskanych przez innych autorów. Pena i in. (2006) w prowadzonych badaniach wykazali ochratoksynę A w próbkach moczu na średnim poziomie 0,039 ng/ml (mężczyźni), 0,037 ng/ml (kobiety). W 42 z 60 badanych próbek wykryto OTA, przy czym badanie wykazało znaczne różnice pomiędzy ilością OTA u osób zamieszkujących obszary endemiczne chorych na nefropatie (wartości między 0,005 – 0,604 ng/ml), a osobami zdrowymi (0,005 do 0,043 ng/ml) oraz osobami niezamieszkującymi obszarów endemicznych (u takich osób nie wykryto OTA w moczu). Kłapeć i in. (2012) w swoich badaniach wykazali, że średni poziom OTA wynosił $0,09 \pm 0,21$ ng/ml. W badaniu wzięło udział 20 ciężarnych kobiet zamieszkujących tereny wiejskie oraz 20 kobiet mieszkających w miastach. Wyniki wykazały, że wyższe poziomy OTA występowały w moczu kobiet mieszkających w miastach (maksymalny poziom 1,11 ng/ml), podczas gdy w moczu kobiet zamieszkujących tereny wiejskie maksymalny poziom wynosił 0,81 ng/ml.

Fan i in. (2019) w swoich badaniach wykazali średni poziom OTA w próbach moczu 0,362 µg/l (0,362 ng/ml) u 1,2% z 260 osób: 149 mężczyzn i 111 kobiet, w tym w 0,9% prób moczu kobiet (średnia 0,557 ng/ml) i 1,3% prób moczu mężczyzn (średnia 0,265 ng/ml).

Średni poziom ochratoksyny A w pozytywnych próbkach mleka kobiecego w niniejszym badaniu wynosił 0,0123 ng/ml, co jest wyższym wynikiem niż ten uzyskany przez Postupolskiego i in. (2006) – średnia 0,0056 ng/ml (w 5 z 13 próbek) i niższy niż uzyskany przez Kamali i in. (2017) $1,99 \pm 1,34$ ng/ml (wszystkie z 84 badanych próbek mleka były zanieczyszczone OTA, a badane były mieszkankami miasta Jiroft, w którym panuje ciepła i wilgotna pogoda, sprzyjająca rozwojowi grzybów pleśniowych).

Wyniki badań podobnych do prowadzonych w niniejszej pracy opublikowane zostały przez Cherkani-Hassani i in. 2020b. W okresach pomiędzy lutym i marcem oraz listopadem i grudniem 2017 roku zespół badawczy Cherkani-Hassani i in. zebrał 82 próbki siary (po 41 z dwóch okresów) od matek karmiących piersią ze szpitala położniczego w Rabacie (Maroko) w ramach badań przekrojowych CONTAMILK. Badania miały na celu ocenę poziomu zanieczyszczenia w mleku kobiecym. Kobiety biorące udział w badaniu wypełniły ankiety, które zawierały informacje o czynnikach społeczno-demograficznych: miejsce zamieszkania, wiek, wykształcenie, danych antropometrycznych: waga przed i podczas ciąży, wzrost matki, płeć, masa urodzeniowa noworodka, a także o danych klinicznych: stan zdrowia, poród, wiek ciążowy, poród, historia laktacji. Ponadto wolontariuszki wypełniały kwestionariusze dotyczące ich nawyków żywieniowych. Kwestionariusz ten zawierał produkty, które potencjalnie mogą zostać zanieczyszczone ochratoksyną A, tzn. ryż, kukurydza, jęczmień, pszenica i ich pochodne, mięso, ryby, owoce morza, mleko i produkty mleczne, żywność w puszkach, rośliny strączkowe, suszone owoce, przyprawy, olej, kawa, herbata, napoje bezalkoholowe. W ankiecie uwzględniono także częstotliwości spożywania określonych pokarmów: codziennie, często (dwa razy w tygodniu lub częściej), sporadycznie (raz w tygodniu lub krócej) i nigdy.

W badaniach prowadzonych przez Cherkani-Hassani i in. (2020b) i w badaniach własnych można zaobserwować kilka porównywalnych czynników, które zostały przedstawione w tabeli 39.

Tabela 39. Porównanie cech w badaniach Cherkani-Hassani i in. 2020b i w niniejszej pracy

Cecha porównywalna	Badania prowadzone przez Cherkani-Hassani i in. 2020b	Badania prowadzone w niniejszej pracy (własne)
Liczba zbadanych próbek	82	60
Wiek matek	18 – 44 lata	22 – 41 lat
Miejsce zamieszkania	Tereny miejskie: 57 matek Tereny wiejskie: 22 matki Tereny przemysłowe: 3 matki	Tereny miejskie: 46 Tereny wiejskie: 14
Status zawodowy matki	Pracująca: 11 Niepracująca: 71	Pracująca: 35 Niepracująca (lub przebywająca na urlopie macierzyńskim): 25
Przebyte porody	Pierworódki: 36 Wieloródki: 46	Pierworódki: 28 Wieloródki: 32
Płeć karmionego dziecka	Dziewczynka: 31 Chłopiec: 48 Bliźnięta: 3	Dziewczynka: 25 Chłopiec: 35
Masa urodzeniowa dziecka	<2500 g: 7 2500 – 3000 g: 17 3000 – 4000 g: 55 >4000 g: 6	<2500 g: 17 2500 – 3000 g: 9 3000 – 4000 g: 26 >4000 g: 8

W badaniach przeprowadzonych w Maroku 45 z 82 (wartość maksymalna 10,04 ng/ml) przebadanych próbek okazało się zanieczyszczonych OTA, a w badaniach własnych 4 z 60 próbek (wartość maksymalna 0,018 ng/ml). Cherkani-Hassani i in. (2020b) wykazali, że poziom ochratoksyny A w mleku kobiecym był zależny od częstotliwości spożywania roślin strączkowych, suszonych owoców i produktów mlecznych. W wynikach badań własnych częstotliwość spożywania suszonych owoców winorośli wpływała znacząco na poziom ochratoksyny A w mleku kobiecym.

Kilka lat wcześniej we Włoszech przeprowadzone zostały podobne badania obejmujące wpływ diety kobiet karmiących piersią na poziom ochratoksyny A w ich mleku. Grupę badawczą stanowiły 82 kobiety. W 61 próbkach wykryto ochratoksynę A o maksymalnym poziomie 405 ng/L. Wyniki wykazały, że kobiety, które spożywały częściej pieczywo, wyroby cukiernicze oraz wędliny miały wyższe poziomy ochratoksyny A w mleku (Galvano i in. 2008). Zbliżone wyniki badań opublikowane zostały w 2004 roku przez Turconi i in., którzy badali wpływ diety na poziom ochratoksyny w mleku kobiecym mieszkanek Włoch. Ten zespół badawczy wykazał, że ochratoksyna A występowała w 198 z 231 próbek mleka o maksymalnej wartości 57 ng/L, przy czym znaczący statystycznie wpływ na poziom ochratoksyny A miało spożywanie pieczywa.

Afshar i in. (2013) opublikowali wyniki badań przeprowadzonych w Iranie. Badaniu poddano 136 kobiet, 5 próbek zawierało ochratoksynę o maksymalnym poziomie 16,42 ng/L (przy analizie ELISA) oraz 2 próbki z poziomem maksymalnym 140 ng/L (przy analizie HPLC). Badane kobiety były w wieku od 16 do 39 lat, 124 kobiety nie pracowały, 12 było aktywnych zawodowo. 90 kobiet było pierworódkami, natomiast 46 urodziły drugie lub trzecie dziecko. 70 noworodków było płci męskiej, a 66 żeńskiej.

Badania dotyczące wpływu prowadzonej diety na występowanie ochratoksyny A były prowadzone już w 2001 roku w Norwegii przez Skaug i in. 17 z 80 przebadanych próbek zawierało ochratoksynę A o maksymalnym poziomie 182 ng/L. Kobiety z najbardziej skażonym przez ochratoksynę A mlekiem spożywały więcej ciast, przetworów mięsnych, płatków zbożowych (płatków kukurydzianych, owsianych, musli) i serów.

Navas i in. (2005) roku przeprowadzili badania występowania ochratoksyny A w mleku kobiecym w stosunku do nawyków żywieniowych kobiet, jednakże zbyt mała ilość pozytywnych próbek – 2 z 50 uniemożliwiła zbadanie korelacji związanej z występowaniem ochratoksyny A a prowadzoną dietą.

W roku 2010 Biasucci i in. (Włochy) opublikowali wyniki badania, które dotyczyło korelacji występowania ochratoksyny A a nawykami żywieniowymi kobiet w okresie laktacji. W 45 z 57 badanych próbek mleka wykryto ochratoksynę A, z maksymalnym poziomem powyżej 75,1 ng/L. Na podstawie danych zebranych w ankiecie dotyczącej żywienia kobiet autorzy wykazali znaczącą korelację pomiędzy występowaniem ochratoksyny A w mleku a dietą prowadzoną przez matki. Dieta ta obejmowała słodczyce, oleje z nasion i napoje bezalkoholowe (bez uwzględniania soków owocowych), a autorzy wykazali, że spożywanie ryb było odwrotnie skorelowane z poziomem ochratoksyny A w mleku.

Oprócz badania wpływu diety na występowanie ochratoksyny A w mleku badacze z całego świata zajmują się badaniem wpływu tej diety na występowanie ochratoksyny A w moczu. Tego typu badanie zostało przeprowadzone w Bangladeszu w 2016 roku przez Ali i in., co więcej, w badaniu wzięły udział kobiety ciężarne pomiędzy 18 a 36 rokiem życia. Wyniki badań wykazały obecność ochratoksyny A w 50 z 54 próbek moczu, przy czym zauważono, że występowanie wyższego stężenia ochratoksyny A było skorelowane z częstszym spożywaniem ryżu (na podstawie przeprowadzonej ankiety dotyczącej diety). Dodatkowo w badaniu wykazano, że wyższe poziomy ochratoksyny A były obecne w próbkach moczu kobiet zamieszkujących przedmieścia.

Z kolei Gilbert i in. w 2001 roku w Wielkiej Brytanii zaobserwowali znaczące powiązania między prowadzoną dietą a występowaniem ochratoksyny A w moczu 50 zbadanych wolontariuszy, jednakże korelacja ta nie nadawała się do zastosowania w praktyce. Wśród tej grupy badawczej 46 próbek zostało zanieczyszczonych ochratoksyną A o maksymalnej wartości 0,058 ng/ml. Wyniki te pomimo niższej wartości maksymalnej ochratoksyny A w moczu są podobne do badań własnych, w których nie zostały wykazane powiązania między dietą a obecnością ochratoksyny A w moczu badanych kobiet.

Innego typu badanie przeprowadził Ali i in. (2017). Pobrano kilka próbek od dwóch wolontariuszy. Przeprowadzono również ankietę dotyczącą ich nawyków żywieniowych – badany, który jadał większe ilości produktów, potencjalnie zanieczyszczonych ochratoksyną A – pieczywo, płatki śniadaniowe, kawa – miał niższe poziomy ochratoksyny A zarówno w osoczu jak i we krwi. Co więcej, u wolontariuszy zbadano poziom tej mikotoksyny w osoczu. Okazało się, że anality określone w osoczu były wyższe niż w moczu. Może mieć to związek z powinowactwem ochratoksyny A do albuminy, która stanowi jeden ze składników krwi.

Ochratoksyna A w surowicy i osoczu jest analizowana przez wielu autorów. Jedno z badań dotyczyło zależności występowania ochratoksyny A a dietą wolontariuszy, którzy poddają się badaniom. Częstą grupą badawczą okazują się kobiety będące w ciąży. Tego typu badania były prowadzone przez Biasucci i in. we Włoszech w 2010 roku. Według uzyskanych wyników 129 ze 130 próbek surowicy było zanieczyszczonych ochratoksyną A w granicach pomiędzy

84 – 4,835 ng/L. Na podstawie przeprowadzonej ankiety dotyczącej spożywanej żywności autorzy określili istotną korelację między występowaniem ochratoksyny A w surowicy a spożywaniem słodyczy (zwłaszcza zawierających czekoladę i kakao) i czerwonego wina.

W badaniach prowadzonych przez Thuvander i in. (2001) wykazano silną korelację występowania ochratoksyny A we krwi kobiet, ciemnego pieczywa i piwa oraz słabszą dla szynki, przekąsek kukurydzianych i chrupkiego pieczywa ciemnego. W badaniu wzięło udział 166 kobiet będących dawczyniami z banku krwi, we wszystkich próbkach wykazano obecność ochratoksyny A.

Wspomniane już wcześniej badania Gilberta i in. (2001) obejmowały również określenie korelacji pomiędzy ochratoksyną A w osoczu i dietą. Zespół badawczy Gilberta nie był w stanie określić znaczącej korelacji. Ochratoksyna A została oznaczona we wszystkich 50 badanych próbkach (w pracy własnej w 60 próbkach).

Występowanie zearalenonu i jego metabolitów w moczu jest przykładem szeroko opisanym w piśmiennictwie. Podobnie jest w przypadku związku współwystępowania zearalenonu i jego metabolitów. Jednymi z takich badań zajmowali się badacze ze Szwecji. Wallin i in. (2015) opublikowali wyniki badania, w którym na 252 próbki moczu 92 zawierało zearalenon, średnia wynosiła $0,09 \pm 0,07$ ng/ml. Dodatkowo, w tym samym badaniu określono poziom α -zearalenolu; w grupie badawczej 53 próbki były nim skażone, przy czym średnia wynosiła $0,13 \pm 0,26$ ng/ml. Średni poziom β -zearalenolu w 45 pozytywnych próbkach wyniósł $0,10 \pm 0,19$ ng/ml. W badaniach własnych, występowanie zearalenonu i jego metabolitów w 60 próbkach moczu wahało się w podobnych granicach, tj. średnie stężenie zearalenonu w badanych próbkach moczu wynosiło $0,112 \pm 0,09$ ng/ml (57 próbek pozytywnych, 3 poniżej LOD), α -zearalenolu $0,074$ ng/ml $\pm 0,09$ ng/ml (30 próbek pozytywnych, 9 poniżej LOD i 21 poniżej LOQ), a β -zearalenolu $0,067 \pm 0,06$ ng/ml (22 próbki pozytywne, 14 poniżej LOD i 24 poniżej LOQ).

Z kolei badania prowadzone w Nigerii przez Ezekiel i in. (2014) wykazały obecność zearalenonu w zaledwie jednej ze 120 próbek moczu. Jego wartość wynosiła $0,3 \mu\text{g/L}$. W innym kraju afrykańskim – Kamerunie (2013) w grupie 145 badanych chorujących na HIV zaledwie 4 próbki zawierały zearalenon o średniej wartości $0,22 \mu\text{g/L}$. Przebadano również 30 osób niechorujących na HIV. Te próbki nie były skażone zearalenonem. W grupie chorujących na HIV w 2 próbkach wykryto α -zearalenol, w grupie osób zdrowych metabolit ten nie był obecny (Abia i in. 2013).

W innych badaniach prowadzonych w 2018 roku w Nigerii, z 120 przebadanych próbek moczu wykazano obecność zearalenonu w 98 z nich, na poziomie od $0,03$ do $19,99$ ng/ml. Poziom oznaczonego w 5 próbkach α -zearalenolu wahał się między $0,52$ a $2,52$ ng/ml, a 7 próbek zawierało β -zearalenol w granicach od $0,06$ do $2,74$ ng/ml (Šarkanj i in. 2018). Były to wyniki znacznie wyższe niż uzyskane przez autorkę.

W Nigerii zostały przeprowadzone także badania, które dotyczyły występowania mikotoksyn (w tym zearalenonu i jego metabolitów) w moczu niemowląt karmionych wyłącznie piersią i niemowląt karmionych nie tylko pokarmem z piersi. W grupie niemowląt karmionych wyłącznie piersią znajdowało się 23 dzieci. 13 z nich miało obecny w swoim moczu zearalenon w granicach między 17 a 784 ng/L, 7 badanych β -zearalenol, którego wartość wahała się od 8 do 648 ng/L, natomiast żadna badana próbka nie zawierała α -zearalenolu. W grupie niemowląt niekarmionych wyłącznie pokarmem z piersi poziom zearalenonu był wyższy i wynosił $13 - 678$ ng/L w 35 z 42 próbek poddanych badaniom. β -zearalenol obecny był w 6 próbkach,

na poziomie niższym niż w poprzedniej grupie, tj.: 14 – 68 ng/L. Dzieci niekarmione wyłącznie piersią charakteryzowały się występowaniem α -zearalenonu w 7 próbkach, na poziomie wahającym się między 5 a 55 ng/L (Ezekiel i in. 2020).

Inne wyniki badań przeprowadzonych w Afryce Południowej otrzymali w 2013 roku Shephard i in., którzy przebadali mocz od 54 kobiet. W moczu wszystkich badanych wykryto zearalenon o wartościach pomiędzy 0,012 a 11,2 ng/ml, 50 próbek zawierało z α -zearalenol w granicach od 0,006 do 13,2 ng/ml oraz 41 próbek zawierało β -zearalenol, którego wartości wahały się pomiędzy 0,010 a 21,1 ng/ml.

Tak jak w poprzednim badaniu wyniki te były wyższe niż otrzymane w badaniach własnych.

Występowanie zearalenonu i jego metabolitów w organizmach ludzi jest zależne od wielu czynników. Grupa badawcza z Niemiec próbowała określić poziom zanieczyszczenia zearalenonem i jego metabolitami moczu w zależności od miejsca pracy badanych osób. Do badań wybrano pracowników młynów, na co dzień mającymi do czynienia ze składnikami, które potencjalnie mogą być skażone przez mikotoksyny, tj. żyto, pszenica i orkisz. Jako grupę kontrolną wybrano mężczyzn, pracujących w biurach lub w laboratoriach. Grupę pracowników młyna stanowiło 12 mężczyzn i 5 kobiet, podczas gdy grupę kontrolną 13 wolontariuszy. Zearalenon wykryto we wszystkich przebadanych próbkach moczu. Wśród mężczyzn pracujących w młynie jego poziom wahał się pomiędzy 4 a 100 ng/L, w grupie kobiet w tym samym miejscu pracy poziom ten był nieco niższy i wynosił od 6 do 78 ng/L. W grupie kontrolnej natomiast poziom zearalenonu wynosił 7 – 90 ng/L. α -zearalenol u mężczyzn pracujących w młynie został wykryty w 4 próbkach, z maksymalnym poziomem 40 ng/L, podczas gdy β -zearalenol w 2 próbkach, z maksymalnym poziomem 37 ng/L. U kobiet α -zearalenol nie został wykryty w żadnej próbce, natomiast β -zearalenol w jednej, na poziomie 21 ng/L. W grupie kontrolnej natomiast α -zearalenol występował w 6 próbkach, z maksymalnym poziomem 75 ng/L, a β -zearalenol w 3 próbkach, z maksymalnym poziomem 21 ng/L. Autorzy doszli do wniosku, że narażenie zawodowe na występowanie zearalenonu i jego metabolitów w organizmach ludzi jest stosunkowo niskie w tym konkretnym, badanym miejscu pracy (Föllmann i in. 2016).

Mocz 52 ochotników (26 mężczyzn i 26 kobiet) został zbadany podczas badań prowadzonych na Południu Włoch. Zarówno zearalenon, jak i α -zearalenol zostały wykryte we wszystkich zbadanych próbkach, z kolei β -zearalenol w 51. Maksymalny poziom zearalenonu wynosił 0,120 ng/ml, α -zearalenolu 0,176 ng/ml, a β -zearalenolu 0,135 ng/ml. Autorzy przeprowadzili analizę współwystępowania różnych mikotoksyn wykazując, że zearalenon występował wraz z deoksyniwalenolem, fumonizynami, aflatoksynami i ochratoksyną A (Solfrizzo i in. 2014).

Średnia ilość zearalenonu w moczu badanym przez autorkę wynosiła 0,112 ng/ml, α -zearalenolu 0,074 ng/ml, a β -zearalenolu 0,067 ng/ml. Ali i Degen (2018) przeprowadzili badanie, które wykazały, że średni poziom zearalenonu w moczu wynosił $0,10 \pm 0,05$ ng/ml, α -zearalenolu $0,16 \pm 0,07$ ng/ml, a β -zearalenolu $0,05 \pm 0,04$ ng/ml.

Porównując dane pochodzące od różnych autorów wraz z danymi przedstawionymi w niniejszej pracy można sformułować następujące wnioski:

- Stężenie ochratoksyny A w mleku, moczu i surowicy oraz zearalenonu i jego metabolitów w moczu kobiet poddanych badaniom nie jest wysokie. Mleko jest bezpieczne w stosowaniu terapii żywieniowej.
- W porównaniu do wyników badań publikowanych przez innych naukowców wyniki badań autorki nie odbiegają od nich w stopniu znaczącym.
- Trudno oszacować korelację występowania ochratoksyny A w organizmach ludzi a danymi antropometrycznymi, społecznymi, tandemowym karmieniem, zanieczyszczeniami mikrobiologicznymi i składem mleka, ponieważ brakuje danych porównawczych w tym temacie.
- W niniejszych badaniach istnieje zależność pomiędzy występowaniem OTA w mleku a ilością białka całkowitego oraz białka odżywczego w tym mleku.
- Proces pasteryzacji nie wpływa na występowanie OTA w mleku kobiecym.

Pomimo tego, badania dotyczące występowania ochratoksyny A oraz zearalenonu i jego metabolitów w organizmach ludzi są niezwykle ważne, nie tylko ze względu na ich niekorzystne działanie, ale również z uwagi na fakt, że w przypadku mleka, mogą być wraz z nim transferowane do organizmów dzieci. Te z kolei ze względu na niższą masę trudniej usuwają toksyny ze swoich organizmów. W rezultacie już od najmłodszych lat mogą zostać narażone na ekspozycję i odczuwać negatywne skutki działania mikotoksyn. W niniejszej pracy badano kobiety, które mogą być (lub też są) dawczyniami mleka kobiecego. Mleko to może trafić do najbardziej potrzebujących dzieci, często chorych, dlatego nie powinno się ich dodatkowo narażać na spożywanie zanieczyszczonego pokarmu. Badania prowadzone w tej pracy jasno pokazują, że odpowiednio dobrana dieta może wpłynąć na obecność lub brak ochratoksyny A w mleku kobiecym, nie wykazują natomiast wpływu prowadzonej diety na obecność ochratoksyny A w moczu i surowicy krwi. W badaniach wykazano również, że ochratoksyna A była obecna w próbkach mleka, które w swoim składzie zawierało wyższe poziomy białka (całkowitego i odżywczego). Jest to związane z faktem, iż ochratoksyna A charakteryzuje się wysokim powinowactwem do albumin.

W prowadzonych badaniach zearalenon i jego metabolity obecne były właściwie we wszystkich próbkach moczu, ich poziom był niski, jednakże to sygnalizuje, że pokarmy, które spożywamy, na co dzień są w większym lub mniejszym stopniu skażone mikotoksynami.

Dalsze badania dotyczące występowania mikotoksyn w organizmach ludzi mogą przyczynić się do określenia zbilansowanej diety, eliminującej potencjalne źródło dodatkowych zanieczyszczeń mikotoksynami lub metod eliminowania ich z pożywienia na etapie obróbki.

Przedstawiona praca zawiera dokładne zestawienie danych dotyczących dwóch często spotykanych mikotoksyn – nefrotoksycznej ochratoksyny A i mikoestrogenu zearalenonu. Rozdziały poświęcone każdej z tych mikotoksyn opisują ich budowę, cechy charakterystyczne, występowanie, metabolizm, toksokinetykę i toksyczny wpływ na organizmy zarówno ludzi jak i zwierząt. Opisu i dalszych badań wymagają zagadnienia dotyczące wpływu poszczególnych cech takich jak: prowadzona dieta, tandemowe karmienie piersią, dane antropometryczne i społeczne, profil mikrobiologiczny czy skład mleka kobiecego oraz ich wpływ na obecność mikotoksyn w badanych organizmach, czego częściowo podjęła się autorka pracy.

SPIS RYSUNKÓW

Rysunek 1. Schemat drogi zakażenia mikotoksynami	12
Rysunek 2. Wzór strukturalny OTA	14
Rysunek 3. Ogólna struktura OT	23
Rysunek 4. Wzór strukturalny OTB	23
Rysunek 5. Wzór strukturalny OT- α	24
Rysunek 6. Wzór strukturalny ZEN	31
Rysunek 7. Schemat ilustrujący narażenie matek i noworodków na żywność skażoną mikotoksynami (Warth i in. 2016)	43
Rysunek 8. Logo toruńskiego Banku Mleka Kobiecego	54

SPIS ZDJĘĆ

Zdjęcie 1. Konidofor z konidiami <i>Aspergillus ochraceus</i> (kolekcja Katedry Fizjologii i Toksykologii UKW)	16
Zdjęcie 2. Kolonie <i>Aspergillus ochraceus</i> na podłożu CYA (kolekcja Katedry Fizjologii i Toksykologii UKW)	16
Zdjęcie 3. Konidofor z konidiami <i>Penicillium verrucosum</i> (kolekcja Katedry Fizjologii i Toksykologii UKW)	16
Zdjęcie 4. Kolonie <i>Penicillium verrucosum</i> na podłożu CYA (kolekcja Katedry Fizjologii i Toksykologii UKW)	16
Zdjęcie 5. Konidia <i>Fusarium graminearum</i> (kolekcja Katedry Fizjologii i Toksykologii (UKW)	31
Zdjęcie 6. Próbkę moczu pobranego do badań	55
Zdjęcie 7. Próbkę mleka pobranego do badań	55
Zdjęcie 8. Próbkę krwi pobranej do badań	55
Zdjęcie 9. Próbkę surowicy otrzymanej do badań	55
Zdjęcie 10. Wytrząsarka laboratoryjna – Heidolph Multi Reax	56
Zdjęcie 11. Wirówka – Eppendorf Centrifuge 5430 R	57
Zdjęcie 12. Inkubator – Heidolph Promax 1020	57
Zdjęcie 13. Płuczka ultradźwiękowa – Ultrason	58
Zdjęcie 14. Zdjęcie wykonane podczas pobierania krwi do badań	58
Zdjęcie 15. Kolumny powinowactwa immunologicznego OchraPrep	60
Zdjęcie 16. Oczyszczanie ekstraktu na kolumnach powinowactwa immunologicznego	61
Zdjęcie 17. Odparowanie eluatu w strumieniu azotu	61
Zdjęcie 18. System HPLC	63
Zdjęcie 19. Zestaw LC – MS/MS	64
Zdjęcie 20. Analizator składu mleka kobiecego	64

SPIS TABEL

Tabela 1. Gatunki grzybów pleśniowych zdolnych do produkcji OTA	15
Tabela 2. Chronologiczne opisanie grzybów pleśniowych produkujących OTA (Malir i in. 2016)	17
Tabela 3. Przykładowe wyniki badań opisujące występowanie OTA w różnych materiałach	18
Tabela 4. Dopuszczalne normy ochratoksyny A w wybranych produktach spożywczych (Rozporządzenie Komisji (WE) nr 1881/2006 z późn. zm. i Zalecenie Komisji nr 2006/576/WE z późn. zm.)	21
Tabela 5. Wartości NOEL OTA dla różnych gatunków (FAO/WHO 2001)	22
Tabela 6. Wybrane formy OT (Khoury i Atoui 2010; Heussner i Bingle 2015)	24
Tabela 7. Gatunki grzybów pleśniowych produkujących ZEN	30
Tabela 8. Przykładowe wyniki badań opisujące występowanie ZEN w żywności	32
Tabela 9. Dopuszczalne poziomy zearalenonu w wybranych produktach spożywczych oraz produktach przeznaczonych do żywienia zwierząt (mieszanki paszowe) (Rozporządzenie Komisji (WE) nr 1881/2006 i Zalecenie Komisji nr 2006/576/WE z późn. zm.)	34
Tabela 10. Wartości NOEL dla ZEN-u dla różnych gatunków zwierząt (IPCS 2000)	35
Tabela 11. Banki Mleka na świecie (Haiden i Ziegler 2016; Grzesik-Gąsior i in. 2018; Moro 2018)	48
Tabela 12. Przykłady wyników badań opisujące występowanie aflatoksyn w mleku kobiecym	52
Tabela 13. Przykłady wyników badań opisujące występowanie aflatoksyn w mleku pasteryzowanym	52
Tabela 14. Wartości LOD, LOQ i odzysku dla analiz OTA w płynach ustrojowych	63
Tabela 15. Wartości LOD, LOQ i odzysku dla analiz ZEN i jego metabolitów w moczu	63
Tabela 16. Informacje dotyczące kobiet biorących udział w badaniu	65
Tabela 17. Informacje dotyczące diety prowadzonej przez badane kobiety	66
Tabela 18. Średnie wartości składników odżywczych zawartych w mleku grupy badawczej	69
Tabela 19. Wyniki badania mikrobiologicznego dawczyń z banku mleka kobiecego	70
Tabela 20. Korelacja porządku rang Spearmana	71
Tabela 21. Średnie wartości składników odżywczych zawartych w mleku grupy badawczej	72
Tabela 22. Występowanie OTA w mleku kobiecym	72
Tabela 23. Wartości OTA w poszczególnych próbkach mleka	73
Tabela 24. Występowanie OTA w moczu	74
Tabela 25. Wartości OTA w poszczególnych próbkach moczu	74
Tabela 26. Występowanie OTA w surowicy	75
Tabela 27. Wartości OTA w poszczególnych próbkach surowicy	76
Tabela 28. Analiza korelacji rho Spearmana pomiędzy częstotliwością spożycia poszczególnych produktów spożywczych a zawartością OTA w mleku, moczach i surowicy matki	77

Tabela 29. Statystyki opisowe oraz testy normalności rozkładu dla częstości spożycia poszczególnych produktów spożywczych	82
Tabela 30. Statystyki opisowe oraz testy normalności rozkładu dla częstości spożycia poszczególnych suszonych owoców	84
Tabela 31. Statystyki opisowe oraz testy normalności rozkładu dla częstości spożycia poszczególnych przypraw	85
Tabela 32. Statystyki opisowe oraz testy normalności rozkładu dla częstości spożycia poszczególnych roślin strączkowych	87
Tabela 33. Parametry opisujące kobiety i ich dzieci	88
Tabela 34. Analiza korelacji r Pearsona pomiędzy wiekiem matki, tygodniem, w którym nastąpił poród, masą urodzeniową dziecka, tandemowym karmieniem, karmieniem odciągniętym pokarmem, karmieniem piersią i odciągniętym pokarmem, a zawartością OTA w mleku, moczu i surowicy	88
Tabela 35. Statystyki opisowe oraz testy normalności rozkładu dla zmiennych: wiek matki, tydzień, w którym nastąpił poród, masa urodzeniowa dziecka, tandemowe karmienie, karmienie odciągniętym pokarmem, karmienie z piersi i odciągniętym pokarmem, zawartość OTA w mleku, moczu i surowicy matki	91
Tabela 36. Wpływ zmiennych „tydzień, w którym nastąpił poród” i „karmienie odciągniętym pokarmem na poziom OTA w surowicy matki [ng/ml]	92
Tabela 37. Wartości ZEN i jego metabolitów w poszczególnych próbkach moczu	93
Tabela 38. Korelacja pomiędzy ZEN i jego metabolitami	95
Tabela 39. Porównanie cech w badaniach Cherkani-Hassani i in. 2020b i w niniejszej pracy	100

SPIS WYKRESÓW

Wykres 1. Korelacja występowania OTA a ilością białka całkowitego w mleku kobiecym	71
Wykres 2. Korelacja występowania OTA a ilością białka odżywczego w mleku kobiecym	72
Wykres 3. Rozkład wartości zmiennej „częstotliwość spożycia”: pieczywo białe, pieczywo ciemne, płatki zbożowe, płatki kukurydziane, podroby, kawa mielona	78
Wykres 4. Rozkład wartości zmiennej „częstotliwość spożycia: kawa rozpuszczalna, kawa zielona, wino, piwo, sok z winogron, gluten pszeniczny	78
Wykres 5. Rozkład wartości zmiennej „częstotliwość spożycia”: czekolada, kakao, kasze, ryż, orzechy, mleko krowie	79
Wykres 6. Rozkład wartości zmiennej „częstotliwość spożycia”: ser żółty, ser pleśniowy, jaja kurze, lukrecja, przyprawy, suszone owoce winorośli	79
Wykres 7. Rozkład wartości zmiennej „częstotliwość spożycia”: suszone owoce, rośliny strączkowe	80
Wykres 8. Rozkład wartości zmiennej „częstotliwość spożycia” roślin strączkowych: fasola, groszek, ciecierzycy i cieciora, soczewica, soja, bób	80
Wykres 9. Korelogram zmiennych częstotliwość spożycia (poszczególne produkty) i zawartość OTA w mleku, moczu i surowicy matki	81
Wykres 10. Rozkład wartości zmiennych: wiek matki, tydzień, w którym nastąpił poród, masa urodzeniowa dziecka, tandemowe karmienie, karmienie odciągniętym pokarmem, karmienie piersią i odciągniętym pokarmem	89
Wykres 11. Rozkład wartości zmiennych: zawartość mikotoksyny OTA w mleku, moczu i surowicy matki	89
Wykres 12. Korelogram zmiennych wiek matki, tydzień, w którym nastąpił poród, masa urodzeniowa dziecka, tandemowe karmienie, karmienie odciągniętym pokarmem, karmienie piersią i odciągniętym pokarmem, zawartość OTA w mleku, moczu i surowicy matki	90
Wykres 13. Rozkład składnika losowego (reszt) modelu regresji	93
Wykres 14. Korelacja pomiędzy występowaniem ZEN i β -ZEL w moczu kobiet poddanych badaniom	96
Wykres 15. Korelacja pomiędzy występowaniem ZEN i α -ZEL w moczu kobiet poddanych badaniom	96
Wykres 16. Korelacja pomiędzy występowaniem ZEN i α -ZAL w moczu kobiet poddanych badaniom	97
Wykres 17. Korelacja pomiędzy występowaniem ZEN i ZAN w moczu kobiet poddanych badaniom	97

BIBLIOGRAFIA

- Abia W.A., Warth B., Sulyok M., Krska R., Tchana A., Njobeh P.B., Turner P.C., Kouanfack C., Eyongetah M., Dutton M., Moundipa P.F. 2013. Bio-monitoring of mycotoxin exposure in Cameroon using a urinary multi-biomarker approach. *Food Chem Toxicol.*, Dec; 62:927-34.
- Abid-Essefi S., Baudrimont I., Hassen W., Ouanes Z., Mobio T.A., Anane R., Creppy E.A., Bacha, H. 2003. DNA fragmentation, apoptosis and cell cycle arrest induced by zearalenone in cultured DOK, Vero and Caco-2 cells: prevention by Vitamin E. *Toxicology*, 192(2-3), 237-248.
- Afshar P., Shokrzadeh M., Kalhori S., Babae Z., Saeedi Saravi S.S. 2013. Occurrence of Ochratoxin A and Aflatoxin M1 in human breast milk in Sari, Iran. *Food Control* 31:525-529.
- Agriopoulou S., Stamatelopoulou E., Varzakas T. 2020. Advances in Analysis and Detection of Major Mycotoxins in Foods. *Foods* 9, 518.
- Al-Anati L., Petzinger E. 2006. Immunotoxic activity of ochratoxin A. *Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics*, 29(2), 79-90.
- Ali N., Blaszkewicz M., Manirujjaman M., Degen G.H. 2016. Biomonitoring of concurrent exposure to ochratoxin A and citrinin in pregnant women in Bangladesh. *Mycotoxin Res.* Aug; 32(3):163-72.
- Ali N., Degen G. H. 2018. Urinary biomarkers of exposure to the mycoestrogen zearalenone and its modified forms in German adults. *Archives of Toxicology*, 92(8), 2691-2700.
- Ali N., Hossain K., Degen G.H. 2018. Blood plasma biomarkers of citrinin and ochratoxin A exposure in young adults in Bangladesh. *Mycotoxin Res.* Mar; 34(1):59-67.
- Ali N., Muñoz K., Degen G.H. 2017. Ochratoxin A and its metabolites in urines of German adults – An assessment of variables in biomarker analysis. *Toxicology Letters* 275, 19-26.
- Alm H., Brüssow K.-P., Torner H., Vanselow J., Tomek W., Dänicke S., Tiemann U. 2006. Influence of Fusarium-toxin contaminated feed on initial quality and meiotic competence of gilt oocytes. *Reproductive Toxicology*, 22(1), 44-50.
- Alvito P.C., Sizoo E.A., Almeida C.M.M., Van Egmond H.P. 2010. Occurrence of aflatoxins and ochratoxin A in baby foods in Portugal. *Food Analytical Methods* 3, 22-30.
- Anatolitou F. 2012. Human milk benefits and breastfeeding. *Journal of Pediatric and Neonatal Individualized Medicine* 1(1):11-18.
- Annemiek C., Goedhart, Bindels J.G. 1994. The composition of human milk as a model for the design of infant formulas: recent findings and possible applications. *Nutrition Research Reviews* 7, 1-23.
- Arce-López B., Lizarraga E., Irigoyen Á., González-Peñas E. 2020. Presence of 19 Mycotoxins in Human Plasma in a Region of Northern Spain. *Toxins*, 12, 750.
- Assaf H., Betbeder A.M., Creppy E.E., Pallardy M., Azouri H. 2004. Ochratoxin A levels in human plasma and foods in Lebanon. *Hum Exp Toxicol.* Oct; 23(10):495-501.
- Atasever M., Yildirim Y., Atasever M., Tastekin A. 2014. Assessment of aflatoxin M1 in maternal breast milk in Eastern Turkey. *Food and Chemical Toxicology* 66; 147-149.
- Awad W.A., Ghareeb K., Böhm J. 2012. Occurrence, Health Risks and Methods of Analysis for Aflatoxins and Ochratoxin A. *J. Vet. Anim. Sci.*, Vol. 2: 1-10.
- Azema E., Callahan S. 2003. Breast Milk Donors in France: A Portrait of the Typical Donor and the Utility of Milk Banking in the French Breastfeeding Context. *Journal of Human Lactation*; 19(2):199-202.

- Ballard O., Morrow A.L. 2013. Human milk composition: nutrients and bioactive factors. *Pediatr Clin North Am.* Feb; 60(1):49-74.
- Barabasz W., Pikulicka A. 2017. Mykotoksyny – zagrożenie dla zdrowia ludzi i zwierząt Część 1. Mykotoksyny – charakterystyka, występowanie, toksyczność dla organizmów. *Journal of Health Study and Medicine*, nr 3.
- Barbarska O., Zielińska M., Pawlus B., Wesołowska A. 2017. Characteristics of the regional human milk bank in Poland - donors, recipients and nutritional value of human milk. *Rocz. Panstw. Zakl. Hig.* 68(4):395-400.
- Baydar T., Erkekoglu P., Sipahi H., Sahin G. 2006. Aflatoxin B1, M1 and Ochratoxin A Levels in Infant Formulae and Baby Foods Marketed in Ankara, Turkey. *Journal of Food and Drug Analysis*, Vol. 15, No. 1. 89-92.
- Ben Salah-Abbès J., Abbès S., Abdel-Wahhab M., Oueslati R. 2010. Immunotoxicity of zearalenone in Balb/c mice in a high subchronic dosing study counteracted by *Raphanus sativus* extract. *Immunopharmacology and Immunotoxicology*, 32(4), 628-636.
- Ben Salah-Abbès J., Belgacem H., Ezzdini K., Abdel-Wahhab M.A., Abbès S. 2020. Zearalenone nephrotoxicity: DNA fragmentation, apoptotic gene expression and oxidative stress protected by *Lactobacillus plantarum* MON03. *Toxicon* 175: 28-35.
- Bendele A.M., Carlton W.W., Krogh P., Lillehoj E.B. 1985. Ochratoxin A Carcinogenesis in the (C57BL/6J X C3H)F1 Mouse. *JNCI: Journal of the National Cancer Institute*. VOL. 75. NO.4.
- Benford D., Bolger P. M., Carthew P., Coulet M., DiNovi M., Leblanc J.-C., Renwick A.G., Setzer W., Schlatter J., Smith B., Slob W., Williams G., Wildemann T. 2010. Application of the Margin of Exposure (MOE) approach to substances in food that are genotoxic and carcinogenic. *Food and Chemical Toxicology*, 48, S2–S24. doi:10.1016/j.fct.2009.11.003
- Bennett J. W., Klich M. 2003. Mycotoxins. *Clinical Microbiology Reviews*, 16(3), 497-516.
- Bernáldez V., Córdoba J.J., Rodríguez M., Cordero M., Polo L., Rodríguez A. 2013. Effect of *Penicillium nalgiovense* as protective culture in processing of dry-fermented sausage "salchichón". *Food Control* 32: 69-76.
- Bertino E., Giuliani F., Baricco M., Di Nicola P., Peila C., Vassia C., Chiale F., Pirra A., Cresi F., Martano C., Coscia A. 2013. Benefits of donor milk in the feeding of preterm infants. *Early Hum Dev.* Oct; 89 Suppl 2:S3-6.
- Bharadva K., Tiwari S., Mishra S., Mukhopadhyay K., Yadav B., Agarwal R., Kumar V. 2014. Human Milk Banking Guidelines. *Indian pediatrics*. 51. 469-74.
- Biancardi A., Piro R., Galaverna G., Dall'Asta C., 2013. A simple and reliable liquid chromatography-tandem mass spectrometry method for determination of ochratoxin A in hard cheese. *International Journal of Food Sciences and Nutrition* 64, 632-640.
- Biasucci G., Calabrese G., Di Giuseppe R., Carrara G., Colombo F., Mandelli B., Maj M., Bertuzzi T., Pietri A., Rossi F. 2010. The presence of ochratoxin A in cord serum and in human milk and its correspondence with maternal dietary habits. *Eur. J. Nutr.* Apr: 50(3):211-218.
- Binder S.B., Schwartz-Zimmermann H.E., Varga E., Bichl G., Michlmayr H., Adam G., Berthiller F. 2017. Metabolism of Zearalenone and Its Major Modified Forms in Pigs. *Toxins* 9, 56.
- Böhm J., Grajewski J., Asperger H., Cecon B., Rabus B., Razzazi E. 2000. Study on biodegradation of some A- and B-trichothecenes and ochratoxin A by use of probiotic microorganisms. *Mycotoxin Research*, 16(S1), 70-74.
- Boorman G. A., Hong H. L., Dieter M. P., Hayes H. T., Pohland A. E., Stack M., Luster M. I. 1984. Myelotoxicity and macrophage alteration in mice exposed to ochratoxin A. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 72(2), 304-312.
- Bottalico A., Perrone G. 2002. Toxigenic Fusarium species and Mycotoxins Associated with Head Blight in Small-Grain Cereals in Europe. *European Journal of Plant Pathology* 108, 611-624.
- Boudra H., Barnouin J., Dragacci S., Morgavi D.P. 2007. Aflatoxin M1 and Ochratoxin A in Raw Bulk Milk from French Dairy Herds. *Journal of Dairy Science* Vol. 90 No. 7.

- Boudra H., Le Bars P., Le Bars J. 1995. Thermostability of Ochratoxin A in wheat under two moisture conditions. *Appl. Environ. Microbiol.* 1995, 61, 1156-1158.
- Boudra H., Saivin S., Buffiere C., Morgavi D.P. 2013. Short communication: Toxicokinetics of ochratoxin A in dairy ewes and carryover to milk following a single or long-term ingestion of contaminated feed. *J. Dairy Sci.* 96:6690-6696.
- Brahm P., Valdés V. 2017. Benefits of breastfeeding and risks associated with not breastfeeding. *Rev Chil Pediatr.* 88(1):15-21.
- Bravi F., Wiens F., Decarli A., Dal Pont A., Agostoni C., Ferraroni M. 2016. Impact of maternal nutrition on breast-milk composition: a systematic review. *Am J Clin Nutr.* 104:646-62.
- Bulgaru C.V., Marin D.E., Pistol G.C., Taranu I. 2021. Zearalenone and the Immune Response. *Toxins*, 13, 248.
- Bunge I., Dirheimer G., Röschenthaler R. 1978. In vivo in vitro inhibition of protein synthesis in *Bacillus stearothermophilus* by ochratoxin A. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 83(2), 398-405.
- Bzikowska A., Więch M., Weker H. 2016. Żywnienie Kobiet w Okresie Laktacji – Aktualne Spojrzenie. *Biuletyn Komitetu Upowszechniania Karmienia Piersią i Szpitali Przyjaznych Dziecku*, Nr 2/2016 – Grudzień, 2-4.
- Cameron E. A., French E. B. 1960. "St. Anthony's fire rekindled: gangrene due to therapeutic dose of ergotamine". *British medical journal* vol. 2, 5191: 28-30.
- Casal S., Vieira T., Cruz R., Cunha S.C. 2014. Ochratoxin A in commercial soluble coffee and coffee substitutes. *Food Research International* 61; 56-60.
- CAST 2003. Mycotoxins: risks in plant, animal and human systems. Task force report. No 139. Ames, Iowa, USA. ISSN 0194-4088, ss. 216.
- Chang C. F., Chu F. S. 1977. The fate of ochratoxin A in rats. *Food and Cosmetics Toxicology*, 15(3), 199-204.
- Chang C.F., Huff W.E., Hamilton P.B., 1979. A leucocytopenia induced in chickens by dietary ochratoxin. *Poult. Sci.*, 58: 555-558.
- Cherkani-Hassani A., Ghanname I., Zinedine A., Sefrioui H., Qmichou Z., Mouane N. 2020a. Aflatoxin M1 prevalence in breast milk in Morocco: Associated factors and health risk assessment of newborns "CONTAMILK study". *Toxicon*, 187, 203-208.
- Cherkani-Hassani A., Ghanname I., Zinedine A., Sefrioui H., Qmichou Z., Mouane N. 2020b. Ochratoxin a in breast milk in Morocco: the affecting dietary habits of the lactating mothers and the degree of exposure of newborns "CONTAMILK study". *Drug and Chemical Toxicology*, 1-7.
- Cherkani-Hassani A., Mojemmi B., Mouane N. 2016. Occurrence and levels of mycotoxins and their metabolites in human breast milk associated to dietary habits and other factors: A systematic literature review, 1984-2015. *Trends in Food Science & Technology* 50: 56-69.
- Chung M.Y. 2014. Factors Affecting Human Milk Composition. *Pediatrics and Neonatology* 55, 421-422.
- Clark H.A., Snedeker S.M. 2006. Ochratoxin A: Its Cancer Risk and Potential for Exposure. *Journal of Toxicology and Environmental Health, Part B*, 9(3), 265-296.
- Colen C.G., Ramey D.M. 2014. Is breast truly best? Estimating the effects of breastfeeding on long-term child health and wellbeing in the United States using sibling comparisons. *Social Science & Medicine* Volume 109, May, Pages 55-65.
- Commission of the European Communities (EC). January 2002. Reports on tasks for scientific cooperation. Report of experts participating in task 3.2.7: assessment of dietary intake of ochratoxin A by the population of EU member states.
- Coronel M.B., Sanchis V., Ramos A.J., Marin S. 2009. Assessment of the exposure to ochratoxin A in the province of Lleida, Spain. *Food Chem Toxicol.* Nov; 47(11):2847-52.
- Creppy E.E. 2002. Update of survey, regulation and toxic effects of mycotoxin in Europe. *Toxicology letters* 127; 19-28.

- D'Mello J.P.F., MacDonald A.M.C. 1997. Mycotoxins. *Anim. Feed Sci. Technol.* 69, 155-166.
- D'Mello J.P.F., Placinta C.M., Macdonald A.M.C. 1999. Fusarium mycotoxins: a review of global implications for animal health, welfare and productivity. *Animal Feed Science and Technology* 80: 183-205.
- De Groene E., Jahn A., Horbach G.J., Fink-Gremmels J. 1996. Mutagenicity and genotoxicity of the mycotoxin ochratoxin A. *Environmental Toxicology and Pharmacology I*: 21-26.
- De Nisi G., Moro G.E., Arslanoglu S., Ambruzzi A.M., Biasini A., Profeti C., Tonetto P., Bertino E. 2015. Survey of Italian human milk banks. *Journal of Human Lactation* 31(2):294-300.
- Degen G.H., Mayer S., Blaszkewicz M. 2007. Biomonitoring of ochratoxin A in grain workers. *Mycotoxin Res. Jun*; 23(2):88-93.
- DeMarchis A., Israel-Ballard K., Mansen K.A., Engmann C. 2016. Establishing an integrated human milk banking approach to strengthen newborn care. *J Perinatol.* 37(5):469-474.
- Doerr J. A., Huff W. E., Tung H. T., Wyatt R. D., Hamilton P. B. 1974. A Survey of T-2 Toxin, Ochratoxin, and Aflatoxin for Their Effects on the Coagulation of Blood in Young Broiler Chickens. *Poultry Science*, 53(5), 1728-1734.
- Dohnal V., Dvořák V., Malíř F., Ostrý V., Roubal T. 2013. A comparison of ELISA and HPLC methods for determination of ochratoxin A in human blood serum in the Czech Republic. *Food and Chemical Toxicology* 62; 427-431.
- Doi K., Uetsuka K. 2011. Mechanisms of Mycotoxin-Induced Neurotoxicity through Oxidative Stress-Associated Pathways. *Int. J. Mol. Sci.*:12, 5213-5237.
- Duarte S.C., Pena A., Lino C.M. 2011. Human ochratoxin A biomarkers—From exposure to effect. *Critical Reviews in Toxicology*, 41(3): 187-212.
- Dupont J., Dequin S., Gitaud T., Le Tacon F., Marsit S., Ropars J., Richard F., Selosse M.A. 2017. Fungi as a Source of Food. In Heitman J., Howlett B., Crous P., Stukenbrock E., James T., Gow N. (ed). p. 1063-1085. *The Fungal Kingdom*. ASM Press, Washington, DC.
- Dwivedi P., Burns R.B., 1985. Immunosuppressive effects of ochratoxin A in young turkeys. *Avian Pathol.*, 14: 213-225.
- Edite Bezerra da Rocha M., Freire F. da C. O., Erlan Feitosa Maia F., Izabel Florindo Guedes M., Rondina D. 2014. Mycotoxins and their effects on human and animal health. *Food control*, 36, 159-165.
- EFSA Panel on Contaminants in the Food Chain (CONTAM). 2019. Scientific Opinion on the risks to public health related to the presence of ochratoxin A in food.
- EFSA Panel on Contaminants in the Food Chain (CONTAM). 2020. Risk assessment of ochratoxin A in food. *EFSA Journal*; 18(5):6113.
- 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* (2004); 101: 1-36.
- EFSA. 2006. Opinion of the scientific panel on contaminants in the food chain on a request from the commission related to ochratoxin a in food. *The EFSA Journal* (2006) 365, 1-56.
- EFSA. 2011. Scientific Opinion on the risks for public health related to the presence of zearalenone in food. *The EFSA Journal*: 9(6):2197.
- Eidelman A. I. 2012. Breastfeeding and the Use of Human Milk. *PEDIATRICS* Volume 129, Number 3. e827-e841.
- Elaridi J., Yamani O., Al Matari A., Dakroub S., Attieh Z. 2019. Determination of Ochratoxin A (OTA), Ochratoxin B (OTB), T-2, and HT-2 Toxins in Wheat Grains, Wheat Flour, and Bread in Lebanon by LC-MS/MS. *Toxins*: 11, 471.
- El-Hoshy S.M. 1999. Occurrence of zearalenone in milk, meat and their products with emphasis on influence of heat treatments on its level. *Archiv für Lebensmittelhygiene* 50, 140-143.
- Elzupir A.O., Makawi S.Z.A., Elhussein A.M. 2009. Determination of aflatoxins and ochratoxin A in dairy cattle feed and milk in Wad Medani, Sudan. *Journal of Animal and Veterinary Advances* 8, 2508-2511.

- Engelhardt G., Kibler R., Verwied-Jorky S., Koletzko B. 2003. The daily dietary intake of ochratoxin A – Results of a duplicate portion study with Bavarian schoolchildren. *Mycotoxin Research March*, Volume 19, Issue 1, pp. 8-12.
- Eshete M., Gebremedhin S., Alemayehu F.R., Taye M., Boshe B., Stoecker B.J. 2020. Aflatoxin contamination of human breast milk and complementary foods in southern Ethiopia. *Matern Child Nutr.*e13081.
- EU. SCOOP. 2002. Task 3.2.7. Reports on Tasks for Scientific Cooperation: Assessment of Dietary Intake of Ochratoxin A by the Population of EU Member States.
- European Food Safety Authority (EFSA). 2013. Deoxynivalenol in food and feed: occurrence and exposure. *EFSA Journal*; 11(10):3379, 56 pp.
- Ezekiel C.N., Abia W.A., Braun D., Šarkanj B., Ayeni K.I., Oyedele O.A., Michael-Chikezie E.C., Ezekiel V.C., Mark B., Ahuchaogu C.P., Krska R., Sulyok M., Turner P.C., Warth B. 2020. Comprehensive mycotoxin exposure biomonitoring in breastfed and non-exclusively breastfed Nigerian children. *MedRxiv*
- Ezekiel C.N., Warth B., Ogara I.M., Abia W.A., Ezekiel V.C., Atehnkeng J., Sulyok M., Turner P.C., Tayo G.O., Krska R., Bandyopadhyay R. 2014. Mycotoxin exposure in rural residents in northern Nigeria: A pilot study using multi-urinary biomarkers. *Environ. Int.* 66, 138-145.
- Fan K., Xu J., Jiang K., Liu X., Meng J., Di Mavungu J.D. Wenbo G., Zhang Z., Jing J., Li H., Yao B., Li H., Zhao Z., Han Z. 2019. Determination of multiple mycotoxins in paired plasma and urine samples to assess human exposure in Nanjing, China. *Environmental Pollution*. 248.
- FAO/WHO. 2001. Safety evaluation of certain mycotoxins in food. Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives, 56th Meeting, Geneva, 6-15 February.
- FAO/WHO. 2012. Safety evaluation of certain food additives and contaminants. Fumonisin. WHO Food Additives Series 65:325-794
- Fazekas B., Tar A., Kovács M. 2005. Ochratoxin a content of urine samples of healthy humans in Hungary. *Acta Vet Hung.* 53(1):35-44.
- Fink-Gremmels J., Malekinejad, H. 2007. Clinical effects and biochemical mechanisms associated with exposure to the mycoestrogen zearalenone. *Animal Feed Science and Technology*, 137(3-4), 326-341.
- Fink-Gremmels J. 1999. Mycotoxins: their implications for human and animal health. *Vet. Q.* 21, 115–120.
- Fink-Gremmels J. 2005. Conclusions from the workshops on Ochratoxin A in Food: Recent developments and significance, organized by ILSI Europe in Baden (Austria). *Food Additives & Contaminants*, 22(1), 1-5.
- Flieger M., Wurst M., Shelby R. 1997. Ergot alkaloids - sources, structures and analytical methods. *Folia microbiologica.* 42: 3-30.
- Florea M., Laktacja i karmienie piersią. *Przegląd piśmiennictwa.* 2014. *Perinatologia, Neonatologia i Ginekologia*, tom 7, zeszyt 3, 165-170.
- Flores-Flores M.E., Lizarraga E., López de Cerain A. González-Peñas E. 2015. Presence of mycotoxins in animal milk: A review. *Food Control* 53:163-176.
- Föllmann W., Ali N., Blaszkewicz M., Degen G.H. 2016. Biomonitoring of Mycotoxins in Urine: Pilot Study in Mill Workers. *J. Toxicol. Environ. Heal. Part A*, 79, 1015-1025.
- Föllmann W., Hillebrand I. E., Creppy E. E., Bolt H. M. 1995. Sister chromatid exchange frequency in cultured isolated porcine urinary bladder epithelial cells (PUBEC) treated with ochratoxin A and alpha. *Archives of Toxicology*, 69(4), 280-286.
- Food Standards Agency (FSA). 2002. Survey of nuts, nut products and dried tree fruits for mycotoxins. *Food-Survey-Information-Sheet No.* 21/02.
- Fuchs R., Hult K., Peraica M., Radić B., Pleština R. 1984. Conversion of Ochratoxin C into Ochratoxin A In Vivo. *Applied And Environmental Microbiology*, p. 41-42; Vol. 48, No. 1.

- Fuchs R., Peraica M. 2005. Ochratoxin A In human kidney diseases. Food Additives and Contaminants, Supplement 1: 53-57.
- Galtier P. 1978. Contribution of pharmacokinetic studies to mycotoxicology-Ochratoxin A, "Veterinary Science Communications", vol. 1, no. 1, pp. 349-358, 1978.
- Galvano F., Pietri A., Bertuzzi T., Gagliardi L., Ciotti S., Luisi S., Bognanno M., La Fauci L., Iacopino A.M., Nigro F, Li Volti G., Vanella L., Giammanco G., Tina G.L., Gazzolo D. 2008. Maternal dietary habits and mycotoxin occurrence in human mature milk. Mol. Nutr. Food Res., 52, 496-501.
- Geraghty S.R., Davidson B.S., Warner B.B., Sapsford A.L., Ballard J.L., List B.A., Akers R., Morrow A.L. 2005. The development of a research human milk bank. J Hum Lact. Feb; 21(1):59-66.
- Gerding J., Cramer B., Humpf H.U. 2014. Determination of mycotoxin exposure in Germany using an LC-MS/MS multibiomarker approach. Mol. Nutr. Food Res. 58, 2358e2368.
- Ghiasian S.A., Maghsood A. H. 2012. Infants' Exposure to Aflatoxin M1 from Mother's Breast Milk in Iran. Iranian J Publ Health, Vol. 41, No.3, 119-126.
- Gifford F.J., Gifford R.M., Eddleston M., Dhaun N. 2017. Endemic Nephropathy Around the World. Kidney Int Rep. 2: 282-292.
- Gilbert J., Brereton P., MacDonald S. 2001. Assessment of dietary exposure to ochratoxin A in the UK using a duplicate diet approach and analysis of urine and plasma samples. Food Additives and Contaminants, Vol. 18, No. 12, 1088-1093.
- Gil-Serna J., Vázquez C., González-Jaén M. T., Patiño B. 2014. Mycotoxins. Toxicology. Encyclopedia of Food Microbiology, 887-892.
- Gliński Z., Kostro K., Gajęcki M. (red.). 2011. Mikozy i mikotoksykozy zwierząt. Wyd. UP Lublin, ss. 296.
- Gniadek A., Krzyściak P., Twarużek M., Macura A.B. 2017. Occurrence Of Fungi And Cytotoxicity Of The Species: *Aspergillus Ochraceus*, *Aspergillus Niger* And *Aspergillus Flavus* Isolated From The Air Of Hospital Wards. International Journal of Occupational Medicine and Environmental Health; 30(2):231-239.
- Grajewski J. 2003. Możliwości inaktywacji ochratoksyny „A” w badaniach in vitro oraz in vivo u kurcząt. Wydawnictwo Akademii Bydgoskiej im. Kazimierza Wielkiego, Bydgoszcz, s. 148.
- Grosso F., Saïd S., Mabrouk I., Fremy J.M., Castegnaro M., Jemmali M., Dragacci S. 2003. New data on the occurrence of ochratoxin A in human sera from patients affected or not by renal diseases in Tunisia. Food and Chemical Toxicology 41; 1133-1140.
- 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.
- Grzesik-Gąsior J., Bień A., Rzońca E. 2018. Breast milk banks – a special kind of banks. European Journal of Medical Technologies 1 (18).
- Haiden N., Ziegler E.E. 2016. Human milk exerts strong trophic effects on the infant gut and thereby enables full enteral feedings to be reached earlier than without human milk. Ann. Nutr. Metab. 69 (suppl 2):8-15.
- Hajok I., Kowalska A., Piekut A., Ćwieląg-Drabek M. 2019. A risk assessment of dietary exposure to ochratoxin A for the Polish population. Food Chemistry 284, 264-269.
- Hall P.W., Piscator M., Vasiljević M., Popović N. 1972. Renal Function Studies in Individuals with the Tubular Proteinuria of Endemic Balkan Nephropathy. QJM: An International Journal of Medicine. New Series, XLI, No. 164, pp. 385-93.
- Hansen K. 2016. Breastfeeding: a smart investment in people and in economies. The Lancet, Volume 387, Issue 10017, P. 416.
- Haschek W. M., Haliburton J. C. 1986. *Fusarium moniliforme* and zearalenone toxicoses in domestic animals: a review. Diagnosis of Mycotoxicoses, 213-235.
- Heshmati A., Zohrevand T., Khaneghah A.M., Mozaffari Nejad A.S., Sant'Ana A.S. 2017. Co-occurrence of aflatoxins and ochratoxin A in dried fruits in Iran: Dietary exposure risk assessment. Food and Chemical Toxicology 106; 202-208.

- Heussner A.H., Bingle L.E.H. 2015. Comparative Ochratoxin Toxicity: A Review of the Available Data. *Toxins* 7, 4253-4282.
- Heussner A.H., Moeller I., Day B.W., Dietrich D.R., O'Brien E. 2007. Production and characterization of monoclonal antibodies against ochratoxin B. *Food and Chemical Toxicology* 45: 827-833.
- Heyndrickx E., Sioen I., Huybrechts B., Callebaut A., De Henauw S., De Saeger S. 2015. Human bio-monitoring of multiple mycotoxins in the Belgian population: Results of the BIOMYCO study. *Environment International* 84; 82-89.
- Hidy P.H., Baldwin R.S., Greasham R.L., Keith C.L., McMullen J.R. 1977. Zearalenone and Some Derivatives: Production and Biological Activities. *Advances in Applied Microbiology Volume 22*, 59-82.
- <http://bankmleka.pl/29-banki-mleka-w-polsce.html> – Dostęp 31.01.2021 r.
- <https://europeanmilkbanking.com/> – Dostęp 27.10.2021 r.
- Huang L.C., Zheng N., Zheng B.Q., Wen F., Cheng J.B., Han R.W., Xu X.M., Li S.L., Wang J.Q. 2014. Simultaneous determination of aflatoxin M₁, ochratoxin A, zearalenone and α -zearalenol by UHPLC-MS/MS. *Food Chemistry* 146, 242-249.
- Hueza I.M., Raspantini P.C.F., Raspantini L.E.R., Latorre A.O., Górniak S.L. 2014. Zearalenone, an Estrogenic Mycotoxin, Is an Immunotoxic Compound. *Toxins* 6, 1080-1095.
- Hwang C., Draughon F.A. 1994. Degradation of Ochratoxin A by *Acinetobacter calcoaceticus*. *Journal of Food Protection*, Vol. 57, No. 5, Pages 410-414.
- IARC. 1987. Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans: Overall Evaluations of Carcinogenicity: An Updating of IARC Monographs; IARC. Volume 1-42, (Suppl. 7), pp. 1-403.
- IARC. 1993. Monographs on the identification of carcinogenic hazards to humans. Sup 7, vol. 56.
- IARC. 2002. IARC monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans. Some traditional herbal medicines, some mycotoxins, naphthalene and styrene Vol. 82. Lyon: IARC Press.
- Iha M.H., Barbosa C.B., Ribeiro Heck A., Trucksess M.W. 2013. Aflatoxin M₁ and ochratoxin A in human milk in Ribeirão Preto-SP, Brazil. *Food Control* 40, 310-313.
- International Programme On Chemical Safety (IPCS). 2000. Safety evaluation of certain food additives and contaminants. World Health Organization, Geneva.
- Iqbal S.Z., Jinap S., Pirouz A.A., Ahmad Faizal A.R. 2015. Aflatoxin M₁ in milk and dairy products, occurrence and recent challenges: A review *Trends in Food Science & Technology* 46; 110-119.
- Iqbal S.Z., Nisar S., Asi M.R., Jinap S., 2014a. Natural incidence of aflatoxins, ochratoxin A and zearalenone in chicken meat and eggs. *Food Control* 43, 98-103.
- Iqbal S.Z., Rabbani T., Asi M.R., Jinap S. 2014b. Assessment of aflatoxins, ochratoxin A and zearalenone in breakfast cereals. *Food Chemistry* 157: 257-262.
- Irakli M. N., Skendi A., Papageorgiou M. D. 2017. HPLC-DAD-FLD Method for Simultaneous Determination of Mycotoxins in Wheat Bran. *Journal of Chromatographic Science*, 55(7), 690-696.
- Islam F., Das Trisha A., Hafsa J.M., Hasan A., Degen G.H., Ali N. 2021. Occurrence of aflatoxin M₁ in human breast milk in Bangladesh. *Mycotoxin Res* 37, 241-248.
- Jafari T., Fallah A. A., Kheiri S., Fadaei A., Amini S. A. 2017. Aflatoxin M₁ in human breast milk in Shahrekord, Iran and association with dietary factors. *Food Additives & Contaminants: Part B*, 10(2), 128-136.
- Jeleń K., Musiał-Morsztyn D., Bogdał G., Królak-Olejnik G. 2014. Karmienie piersią na przestrzeni dziejów. Część II – aktualne inicjatywy i rekomendacje. *Piel. Zdr. Publ.* 4, 1, 65-68.
- Jiang C., Lan L., Yao Y., Zhao F., Ping J. 2018. Recent progress in application of nanomaterial-enabled biosensors for ochratoxin A detection. *Trends in Analytical Chemistry* 102: 236-249.
- Jodlbauer J., Zöllner P., Lindner W. 2000. Determination of zearalenone and its metabolites in urine and tissue samples of cow and pig by LC-MS/MS. *Mycotoxin Research* June, Volume 16, Supplement 2, pp. 174-178.
- Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives. JECFA 2008. Safety evaluation of certain food additives and contaminants. WHO food additives series, 59.

- Jonsyn F. E., Maxwell S. M., Hendrickse R. G. 1995. Ochratoxin A and aflatoxins in breast milk samples from Sierra Leone. *Mycopathologia*, 131(2), 121-126.
- Jørgensen K. 1998. Survey of pork, poultry, coffee, beer and pulses for ochratoxin A. *Food Additives & Contaminants*, vol. 15, 550-554.
- Kamali A., Mehni S., Kamali M., Sarvtin M.T. 2017. Detection of ochratoxin A in human breast milk in Jiroft city, south of Iran. *Curr Med Mycol* 2017, 3(3): 1-4.
- Kamińska-El-Hassan E., Mikulska A., Wójtowicz J., Witkowska-Zimny M. 2017. Komponenty komórkowe mleka kobiecego. *Postępy Nauk Medycznych* 9/2017, s. 493-499.
- Kanisawa M., Suzuki S. 1978. Induction of renal and hepatic tumors in mice by ochratoxin A, a mycotoxin. *Gan.*; 69(4):599-600.
- Khan S.A., Venancio E.J., Hirooka E.Y., Rigobello F., Ishikawa A., Nagashima L.A., Oba A. Itano E.N. 2014. Avian ochratoxicosis: A review. *African Journal of Microbiology Research*. 8. 3216-3219.
- Khoury A., Atoui A. 2010. Ochratoxin A: General Overview and Actual Molecular Status *Toxins* 2: 461-493.
- Kiang D.T., Kennedy B.J., Pathre S.V., Mirocha C.J. 1978. Binding Characteristics of Zearalenone Analogs to Estrogen Receptors. *Cancer Research* 38: 3611-3615.
- Kim J., Unger S. 2010. Human milk banking. *Paediatr Child Health* 15(9):595-602.
- Klapec T., Šarkanj B., Banjari I., Strelec I. 2012. Urinary ochratoxin A and ochratoxin alpha in pregnant women. *Food Chem Toxicol*. Dec;50(12):4487-92.
- Koh K. 2017. Maternal breastfeeding and children's cognitive development. *Soc Sci Med*. Aug; 187:101-108.
- Kong, W.-J., Shen H.-H., Zhang X.-F., Yang X.-L., Qiu F., Ou-yang Z., Yang M.-H. 2012. Analysis of zearalenone and α -zearalenol in 100 foods and medicinal plants determined by HPLC-FLD and positive confirmation by LC-MS-MS. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 93(7), 1584-1590.
- Kos J., Lević J., Đuragić O., Kokić B., Miladinović I. 2014. Occurrence and estimation of aflatoxin M₁ exposure in milk in Serbia. *Food Control*, 38, 41-46.
- Kosicki R., Błajet-Kosicka A., Grajewski J., Twarużek M. 2016. Multiannual mycotoxin survey in feed materials and feedingstuffs. *Animal Feed Science and Technology*, 215, 165-180.
- Kőszegi T., Poór M. 2016. Ochratoxin A: Molecular Interactions, Mechanisms of Toxicity and Prevention at the Molecular Level. *Toxins*, 8, 111.
- Kotowski K., Kostecki M., Grabarkiewicz-Szczęśna J., Golinski P., 1993. Ochratoxin A residue in kidney and blood of pigs. *Medycyna Weterynaryjna* 49, 554-556.
- Kowalska D., Gruczyńska E., Bryś J. 2015. Mleko matki – pierwsza żywność w życiu człowieka. *Probl. Hig. Epidemiol*. 96 (2):387-398.
- Kuiper-Goodman T., Scott P. M., Watanabe H. 1987. Risk assessment of the mycotoxin zearalenone. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, 7(3), 253-306.
- Kumagai S. 1988. Effects of plasma ochratoxin A and luminal pH on the jejunal absorption of ochratoxin A in rats. *Food and Chemical Toxicology*, 26(9), 753-758.
- Kumagai S., Aibara K. 1982. Intestinal absorption and secretion of ochratoxin A in the rat. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 64(1), 94-102.
- Kwaśniewska K., Gadzała-Kopciuch R., Cendrowski K. 2015. Analytical Procedure for the Determination of Zearalenone in Environmental and Biological Samples. *Critical Reviews in Analytical Chemistry* 45, 119-130.
- Laskowska J., Książek J. 2011. Aktualne wytyczne dotyczące karmienia piersią. *Pediatr. Med. Rodz.*, 7 (2), p. 110-114.
- Lea T., Steien K., Størmer F. C. 1989. Mechanism of ochratoxin A-induced immunosuppression. *Mycopathologia*, 107(2-3), 153-159.

- Leotsinidis M., Alexopoulos A., Kostopoulou-Farri E. 2005. Toxic and essential trace elements in human milk from Greek lactating women: Association with dietary habits and other factors. *Chemosphere* Volume 61, Issue 2, October, Pages 238-247.
- Leung J., Yau S. 2015. Perceptions of Breastfeeding Mothers on Breast Milk Donation and Establishment of Human Breast Milk Bank in Hong Kong: A Qualitative Study. *International Journal of Nursing*. 2.
- Lindsay D. G. 1985. Zeranone – A “nature-identical” oestrogen? *Food and Chemical Toxicology*, 23(8), 767-774.
- Lombard M.J. 2014. Mycotoxin Exposure and Infant and Young Child Growth in Africa: What Do We Know? *Ann Nutr Metab*; 64 (suppl 2):42-52.
- Maaroufi K., Achour A., Betbeder A.M., Hammami M., Ellouz F., Creppy E.E., Bacha H. 1995. Foodstuffs and human blood contamination by the mycotoxin ochratoxin A: correlation with chronic interstitial nephropathy in Tunisia. *Archives of Toxicology*, 69, 552-558.
- Mahdavi R., Nikniaz L., Arefhosseini S.R., Vahed Jabbari M. 2010. Determination of aflatoxin M(1) in breast milk samples in Tabriz-Iran. *Matern Child Health J. Jan*; 14(1):141-5.
- Maleki F., Abdi A., Davodian E., Haghani K., Bakhtiyari S. 2015. Exposure of Infants to Aflatoxin M1 from Mother's Breast Milk in Ilam, Western Iran. *Osong Public Health Res Perspect*, 6(5), 283-287.
- Malekinejad H., Tol H. V., Colenbrander B., Fink-Gremmels J. 2006. Expression of 3 α - and 3 β -hydroxy steroid dehydrogenase mRNA in COCs and granulosa cells determines Zearalenone biotransformation. *Toxicology in Vitro*, 20(4), 458-463.
- Malir F., Ostry V., Pfohl-Leszkowicz A., Malir J., Toman J. 2016. Ochratoxin A: 50 Years of Research. *Toxins* 2016, 8, 191.
- Malir F., Ostry V., Dofkova M., Roubal T., Dvorak V., Dohnal V. 2013. Ochratoxin A levels in blood serum of Czech women in the first trimester of pregnancy and its correspondence with dietary intake of the mycotoxin contaminant. *Biomarkers*, 18(8): 673–678.
- Manolova Y., Manolov G., Parvanova L., Petkova-Bocharova T., Castegnaro M., Chernozemsky I.N. 1990. Induction of characteristic chromosomal aberrations, particularly X-trisomy, in cultured human lymphocytes treated by ochratoxin A, A mycotoxin implicated in Balkan endemic nephropathy. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, 231(2), 143-149.
- Marin D.E., Pistol G.C., Bulgaru C.V., Taranu I. 2019. Cytotoxic and inflammatory effects of individual and combined exposure of HepG2 cells to zearalenone and its metabolites. *Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology*: 392:937-947.
- Martín R., Jiménez E., Heilig H., Fernández L., Marín M.L., Zoetendal E.G., Rodríguez J.M. 2009. Isolation of bifidobacteria from breast milk and assessment of the bifidobacterial population by PCR-denaturing gradient gel electrophoresis and quantitative real-time PCR. *Appl Environ Microbiol. Feb*; 75(4):965-9.
- Martín R., Langa S., Reviriego C., Jiménez E., Marín M.L., Xaus J., Fernández L., Rodríguez J.M. 2003. Human milk is a source of lactic acid bacteria for the infant gut. *J Pediatr. Dec*; 143(6):754-8.
- Märtlbauer E., Usleber E., Dietrich R., Schneider E. 2009. Ochratoxin A in human blood serum – retrospective long-term data. *Mycotoxin Research*, 25(4), 175-186.
- Massart F., Micillo F., Rivezzi G., Perrone L., Baggiani A., Miccoli M., Meucci V. 2016. Zearalenone screening of human breast milk from the Naples area. *Toxicological and Environmental Chemistry* 98, 128-136.
- Mata A.T., Ferreira J.P., Oliveira B.R., Batoréu M.C., Barreto Crespo M.T., Pereira V.J., Bronze M.R. 2015. Bottled water: Analysis of mycotoxins by LC–MS/MS. *Food Chemistry*, 176, 455-464.
- Meucci V., Soldani G., Razzuoli E., Saggese G., Massart F. 2011. Mycoestrogen pollution of Italian infant food. *Journal of Pediatrics*. 159, 278-283.

- Micek A., Gniadek A., Kawalec P., Brzostek T. 2019. Coffee consumption and colorectal cancer risk: a dose-response meta-analysis on prospective cohort studies. *International Journal of Food Sciences and Nutrition*, 1-21.
- Milićević D., Jurić V., Stefanović S., Jovanović M., Janković S. 2008. Survey of Slaughtered Pigs for Occurrence of Ochratoxin A and Porcine Nephropathy in Serbia. *International Journal of Molecular Sciences* 9, 2169-2183.
- Milićević D., Stefanović S., Janković S., Radičević T., 2012. Risk analysis and exposure assessment of ochratoxin A in Serbia. *Veterinary World* 5, 412-416.
- Minervini F., Giannoccaro A., Fornelli F., Dell'Aquila M.E., Minoia P., Visconti A. 2006. Influence of mycotoxin zearalenone and its derivatives (alpha and beta zearalenol) on apoptosis and proliferation of cultured granulosa cells from equine ovaries. *Reproductive Biology and Endocrinology* 4:62.
- Mirocha C.J., Pathre S.V., Behrens J., Schauerhamer B. 1978. Uterotropic activity of cis and trans isomers of zearalenone and zearalenol. *Applied and environmental microbiology*, 35(5), 986-987.
- Montjoux-Régis N., Cristini C., Arnaud C., Glorieux I., Vanpee M., Casper C. 2011. Improved growth of preterm infants receiving mother's own raw milk compared with pasteurized donor milk. *Acta Pædiatrica* Volume100, Issue12, Pages 1548-1554.
- Moro G.E. 2018. History of Milk Banking: From Origin to Present Time. *Breastfeeding Medicine* Volume 13, Number S1.
- Mostrom M. 2011. Trichothecenes and zearalenone. *Reproductive and Developmental Toxicology*, 739-751.
- Mostrom M. 2016. Mycotoxins: Toxicology. *Encyclopedia of Food and Health*, 43-48.
- Mounjouenpou P., Mbang J.A.A., Guyot B., Guiraud J.-P., 2012. Traditional procedures of cocoa processing and occurrence of ochratoxin - A in the derived products. *Journal of Chemical and Pharmaceutical Research* 4, 1332-1339.
- Muñoz K., Campos V., Blaszkewicz M., Vega M., Alvarez A., Neira J., Degen G.H. 2010. Exposure of neonates to ochratoxin A: first biomonitoring results in human milk (colostrum) from Chile. *Mycotoxin Res. May*; 26(2):59-67.
- Muñoz K., Cramer B., Humpf H.U. Degen G.H. 2017. Evidence of Ochratoxin A conjugates in urine samples from infants and adults. *Mycotoxin research*, 33 (1), 39-47.
- Murphy E. 1999. 'Breast is best': Infant feeding decisions and maternal deviance. *Sociology of Health & Illness* Vol. 21 No. 2, 187-208.
- Muslu G.K., Özdemir M. 2020. Occurrence of and Factors Associated With the Presence of Aflatoxin M1 in Breast Milk of Mothers in Fethiye, Turkey. *Biological Research for Nursing* 1-7.
- Navas S. A., Sabino M., Rodriguez-Amaya D. B. 2005. Aflatoxin M1 and ochratoxin A in a human milk bank in the city of São Paulo, Brazil. *Food Additives and Contaminants*, 22(5), 457-462.
- O'Brien E., Dietrich D. R. 2005. Ochratoxin A: The Continuing Enigma. *Critical Reviews in Toxicology*, 35(1), 33-60.
- Ostry V., Malir F., Dofkova M., Skarkova J., Pfohl-Leszkowicz A., Ruprich J. 2015. Ochratoxin A Dietary Exposure of Ten Population Groups in the Czech Republic: Comparison with Data over the World. *Toxins*, 7, 3608-3635.
- Ouanes Z., Abid S., Ayed I., Anane R., Mobio T., Creppy E. E., Bacha H. 2003. Induction of micronuclei by Zearalenone in Vero monkey kidney cells and in bone marrow cells of mice: protective effect of Vitamin E. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, 538(1-2), 63-70.
- Palli D., Miraglia M., Saieva C., Masala G., Cava E., Colatosti M., Corsi A.M., Russo A., Brera C. 1999. Serum levels of ochratoxin A in healthy adults in Tuscany: correlation with individual characteristics and between repeat measurements. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev. Mar*; 8(3):265-9.
- Pascale M., Visconti A. 2000. Rapid method for the determination of ochratoxin A in urine by immunoaffinity column clean-up and high-performance liquid chromatography. *Mycopathologia* 152: 91-95.

- PATH. Strengthening Human Milk Banking: A Global Implementation Framework. Version 1.1. Seattle, Washington, USA: Bill & Melinda Gates Foundation Grand Challenges initiative, PATH; 2013.
- Peila C., Moro G.E., Bertino E., Cavallarini L., Giribaldi M., Giuliani F., Cresi F., Coscia A. 2016. The Effect of Holder Pasteurization on Nutrients and Biologically-Active Components in Donor Human Milk: A Review. *Nutrients*. Aug 2;8(8). pii: E477.
- Pena A., Seifrtova M., Lino L., Silveira I., Solich P. 2006. Estimation of ochratoxin A in portuguese population: New data on the occurrence in human urine by high performance liquid chromatography with fluorescence detection. *Food and Chemical Toxicology* 44: 1449-1454.
- Peraica M., Domijan A.-M., Fuchs R., Lucić A., Radić B. 1999a. The occurrence of ochratoxin A in blood in general population of Croatia. *Toxicology Letters* 110: 105-112.
- Peraica M., Radić B., Lucić A., Pavlović M. 1999b. Toxic effects of mycotoxins in humans. *Bull World Health Organ.* 77(9): 754-766.
- Pietri A., Bertuzzi T., Gualla A., Piva G. 2006. Occurrence of ochratoxin A in raw ham muscles and in pork products from northern Italy. *Ital. J. Food Sci.* n. 1, vol. 18.
- Pitout M.J. 1969. The hydrolysis of ochratoxin a by some proteolytic enzymes. *Biochemical Pharmacology*, 18(2), 485-491.
- Pitt J.I. 2002. Biology and ecology of toxigenic *Penicillium* species. In *Mycotoxins and Food Safety*; DeVries, J.W., Truckseess, M.W., Jackson, L.S., Eds.; Kluwer Academic, Plenum Publisher: New York, NY, USA, str. 29-41.
- Pitt J.I., Miller J.D. 2016. A Concise History of Mycotoxin Research. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 65(33), 7021-7033.
- Pleadin J., Mihaljević Ž., Barbir T., Vulić A., Kmetič I., Zadravec M., Brumen V., Mitak M. 2015. Natural incidence of zearalenone in Croatian pig feed, urine and meat in 2014. *Food Additives and Contaminants: Part B* 8, 277-283.
- Pleadin J., Peršič N., Kovačević D., Vulić A., Frece J., Markov K. 2014. Ochratoxin A reduction in meat sausages using processing methods practiced in households. *Food Additives & Contaminants: Part B*, 7(4), 239-246.
- Pokrzywa P., Cieślak E., Topolska K. 2007. Ocena zawartości mikotoksyn w wybranych produktach spożywczych. *Żywność. Nauka. Technologia. Jakość*: 3 (52), 139-146.
- Postupolski J., Karłowski K., Kubik P. 2006. Ochratoxin A in maternal and foetal blood and in maternal milk. *Roczniki państwowego zakładu higieny*, 57 (1), 23-30.
- Prentice A. 1996. Constituents of human milk. *Food and Nutrition Bulletin*, vol. 17, no. 4.
- Qileng A., Wei J., Lu N., Liu W., Cai Y., Chen M., Lei H. 2018. Broad-specificity photoelectrochemical immunoassay for the simultaneous detection of ochratoxin A, ochratoxin B and ochratoxin C. *Biosensors and Bioelectronics* 106: 219-226.
- Reddy L., Bhoola K. 2010. Ochratoxins – Food Contaminants: Impact on Human Health. *Toxins*: 2, 771-779.
- Rhine W.D., Bode L. 2018. Welcome and Opening Remarks. *Breastfeeding Medicine*, Volume 13, Number S1.
- Riahi-Zanjani B., Balali-Mood M. 2013. Aflatoxin M1 contamination in commercial pasteurized milk from local markets in Fariman, Iran. *Mycotoxin Res*; 29:271-274.
- Ringot D., Chango A., Schneider Y.-J., & Larondelle Y. 2006. Toxicokinetics and toxicodynamics of ochratoxin A, an update. *Chemico-Biological Interactions*, 159(1), 18-46.
- Rivera-Núñez Z., Barrett E.S., Szamreta E.A., Shapses S.A., Qin B., Lin Y., Zarbl H., Buckley B., Bandera E.V. 2019. Urinary mycoestrogens and age and height at menarche in New Jersey girls. *Environ Health* 18, 24.
- Rogowska A., Pomastowski P., Rafińska K., Railean-Plugaru V., Złoch M., Walczak J., Buszewski B. 2019a. A study of zearalenone biosorption and metabolisation by prokaryotic and eukaryotic cells. *Toxicon* 169: 81-90.

- Rogowska A., Pomastowski P., Sagandykova G., Buszewski B. 2019b. Zearalenone and its metabolites: Effect on human health, metabolism and neutralisation methods. *Toxicology* 162, 46-56.
- Roth A., Chakor K., Creppy E. E., Kane A., Roschenthaler R., Dirheimer G. 1988. Evidence for an enterohepatic circulation of ochratoxin A in mice. *Toxicology*, 48(3), 293-308.
- Rozporządzenie Komisji (UE) nr 1058/2012 z dnia 12 listopada 2012 r., zmieniające rozporządzenie (WE) nr 1881/2006 w odniesieniu do najwyższych dopuszczalnych poziomów aflatoksyn w suzonych figach (Dz. U. L. 313 z 13.11.2012, s. 14-15).
- Rozporządzenie Komisji (UE) nr 165/2010 z dnia 26 lutego 2010 r. zmieniające rozporządzenie (WE) nr 1881/2006 ustalające najwyższe dopuszczalne poziomy niektórych zanieczyszczeń w środkach spożywczych w odniesieniu do aflatoksyn (Dz.U. L 50 z 26.02.2010, s. 8-12).
- Rozporządzenie Komisji (WE) nr 1881/2006 z dnia 19 grudnia 2006 r. ustalające najwyższe dopuszczalne poziomy niektórych zanieczyszczeń w środkach spożywczych (Dz.U. L 364 z 20.12.2006, s. 5-24 z późn. zm.).
- Sáenz de Rodriguez C. A., Bongiovanni A. M., Borrego, L. C. de. 1985. An epidemic of precocious development in Puerto Rican children. *The Journal of Pediatrics*, 107(3), 393-396.
- Salone L.R., Vann Jr. W.F., Dee D.L. 2013. Breastfeeding: an overview of oral and general health benefits. *J. Am. Dent. Assoc. Feb*; 144(2):143-51.
- Sarigiannis Y., Kapolos J., Koliadima A., Tsegenidis T., Karaiskakis G. 2014. Ochratoxin A levels in Greek retail wines. *Food Control* 42: 139-143.
- Šarkanj B., Ezekiel C. N., Turner P. C., Abia W. A., Rychlik M., Krska R., Sulyok M, Warth, B. 2018. Ultra-sensitive, stable isotope assisted quantification of multiple urinary mycotoxin exposure biomarkers. *Analytica Chimica Acta*, 1019, 84-92.
- Sarvar Taherabadi M., Gharavi M.J., Javadi I., Alimohammadi M., Moghadamnia S.H., Mosleh N., Farajollahi M.M., Sharif M. 2016. The Level of Aflatoxin M1 in Raw and Pasteurized Milk Produced in Alborz Province, Iran, *Jundishapur J. Nat. Pharm Prod.* 11(4):e31708.
- Sauvant C., Holzinger H., Mildenerger S., Gekle M. 2005. Exposure to nephrotoxic Ochratoxin A enhances collagen secretion in human renal proximal tubular cells. *Molecular Nutrition & Food Research*, 49(1), 31-37.
- Sava V., Reunova O., Velasquez A., Harbison R., Sánchez-Ramos J. 2006. Acute neurotoxic effects of the fungal metabolite ochratoxin-A. *NeuroToxicology* 27; 82-92.
- Sava V., Velasquez A., Song S., Sánchez-Ramos J. 2007. Adult Hippocampal Neural Stem/Progenitor Cells In Vitro Are Vulnerable to the Mycotoxin Ochratoxin-A. *Toxicological Sciences* 98(1), 187-197.
- Schaeffer J. L., Hamilton P. B. 1986. Occurrence and clinical manifestations of ochratoxicosis. *Diagnosis of Mycotoxicoses*, 43-50.
- Schilter B., Marin-Kuan M., Delatour T., Nestler S., Mantle P., Cavin C. 2005. Ochratoxin A: Potential epigenetic mechanisms of toxicity and Carcinogenicity. *Food Additives and Contaminants, Supplement 1*: 88-93.
- Schwerdt G., Freudinger R., Mildenerger S., Silbernagl S., Gekle M. 1999. The nephrotoxin ochratoxin A induces apoptosis in cultured human proximal tubule cells. *Cell Biology and Toxicology*, 15(6), 405-415.
- SCOOP (European Commission, Directorate-General Health and Consumer Protection- Scientific Cooperation on Questions relating to Food). 2003. SCOOP, task 3.2.10. Collection of occurrence data of Fusarium toxins in food and assessment of dietary intake by the population of EU Member States. European Commission, Directorate-General Health and Consumer Protection, Reports on tasks for scientific co-operation.
- Scott P.M. 2005. Biomarkers of human exposure to ochratoxin A. *Food Additives and Contaminants, Supplement 1*: 99-107.
- Scudamore K. A., Banks J., MacDonald S. J. 2003. Fate of ochratoxin A in the processing of whole wheat grains during milling and bread production. *Food Additives & Contaminants*, 20(12), 1153-1163.

- Scudamore K.A. 2008. Mycotoxins w: Bioactive Compounds in Foods, ed.: Gilbert J., Şenyuva H.Z. Blackwell Publishing, United Kingdom, s. 421.
- Shephard G.S., Burger H.M., Gambacorta L., Gong Y.Y., Krska R., Rheeder J.P., Solfrizzo M., Srey C., Sulyok M., Visconti A., Warth B., van der Westhuizen L. 2013. Multiple mycotoxin exposure determined by urinary biomarkers in rural subsistence farmers in the former Transkei, South Africa. *Food Chem Toxicol. Dec*; 62:217-25.
- Shi Y.D., Sun S.G., Zhang Z.G., Deng X., Kang X.H., Liu Z.D., Ma Y., Sheng Q.H. 2011. The chemical composition of human milk from Inner Mongolia of China. *Food Chemistry Volume 127, Issue 3, 1 August, Pages 1193-1198.*
- Shier W.T., Shier A.C., Xie W., Mirocha C.J. 2001. Structure-activity relationships for human estrogenic activity in zearalenone mycotoxins. *Toxicon* 39: 1435-1438.
- Shim W.-B., Ha K.-S., Kim M.-G., Kim J.-S., Chung D.-H. 2014. Evaluation of the transfer rate of ochratoxin a to decoctions of herbal medicines. *Food Science and Biotechnology*, 23(6), 2103-2108.
- Sifuentes dos Santos J., Granella V., Pigatto G. M., Reiniger L. R. S., Costabeber I. H. 2016. Aflatoxin M1 in pasteurized and raw milk from organic and conventional systems. *Journal Für Verbraucherschutz Und Lebensmittelsicherheit*, 11(4), 299-304.
- Sinkiewicz-Darol E., Bernatowicz-Łojko U., Łubiech K., Adamczyk I., Twarużek M., Baranowska B., Skowron K., Spatz D.L. 2021. Tandem Breastfeeding: A Descriptive Analysis of the Nutritional Value of Milk When Feeding a Younger and Older Child. *Nutrients*. Jan 19; 13(1):277.
- Skaug M.A., 1999. Analysis of Norwegian milk and infant formulas for ochratoxin A. *Food Additives and Contaminants* 16, 75-78.
- Skaug M.A., Helland I., Solvoll K., Saugstad O.D. 2001. Presence of ochratoxin A in human milk in relation to dietary intake. *Food Additives and Contaminants*, Vol. 18, No. 4, 321-327.
- Škrinjar M., Rašić J. L., Stojičić V. 1996. Lowering of ochratoxin A level in milk by yoghurt bacteria and bifidobacteria. *Folia Microbiologica*, 41(1), 26-28.
- Solfrizzo M., Gambacorta L., Visconti A. 2014. Assessment of Multi-Mycotoxin Exposure in Southern Italy by Urinary Multi-Biomarker Determination. *Toxins*, 6, 523-538.
- Solfrizzo M., Piemontese L., Gambacorta L., Zivoli R., Longobardi F. 2015. Food Coloring Agents and Plant Food Supplements Derived from *Vitis vinifera*: A New Source of Human Exposure to Ochratoxin A. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 63(13), 3609-3614.
- Somogyi A., Beck H. 1993. Nurturing and breast-feeding: exposure to chemicals in breast milk. *Environ Health Perspect.* Jul; 101 Suppl 2:45-52.
- Sprynskyy M., Gadzała-Kopciuch R., Nowak K., Buszewski M. 2012. Removal zearalenone toxin from synthetics gastric and body fluids using talc and diatomite: A batch kinetic study. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* 94: 7-14.
- Stawarz R., Formicki G., Massányi P. 2007. Daily fluctuations and distribution of xenobiotics, nutritional and biogenic elements in human milk in Southern Poland. *Journal of Environmental Science and Health, Part A: Toxic/Hazardous Substances and Environmental Engineering.*
- Stefanovic V., Polenakovic M., Toncheva D. 2011. Urothelial carcinoma associated with Balkan endemic nephropathy. A worldwide disease. *Pathologie Biologie* 59: 286–291.
- Stob M., Baldwin R.S., Tuite J., Andrews F.N., Gillette K.G. 1962. Isolation of an anabolic, uterotrophic compound from corn infected with *Gibberella zeae*. *Nature* 196: 1318.
- Støren O., Holm H., Størmer F.C. 1982. Metabolism of ochratoxin A by rats. *Appl Environ Microbiol.*; 44(4):785-789.
- Stuebe A. 2009. The Risks of Not Breastfeeding for Mothers and Infants. *Rev Obstet Gynecol.* Fall; 2(4): 222-231.
- Stuebe A.M., Schwarz E.B. 2010. The risk and benefits of infant feeding practices for women and their children. *Journal of Perinatology* (2010) 30: 155-162.
- Sueck F., Poór M., Faisal Z., Gertzen C. G. W., Cramer B., Lemli B., Kunsági-Máté S., Gohlke H., Humpf H.-U. 2018. Interaction of Ochratoxin A and Its Thermal Degradation Product 2'R-Ochratoxin A with Human Serum Albumin. *Toxins* 10, 256.

- Sun W., Han Z., Aerts J., Nie D., Jin M., Shi W., Zhao Z., De Saeger S., Zhao Y., Wu A., 2015. A reliable liquid chromatography-tandem mass spectrometry method for simultaneous determination of multiple mycotoxins in fresh fish and dried seafood. *Journal of Chromatography A* 1387, 42-48.
- Suzuki S., Satoh T., Yamazaki M. 1975. Effect of ochratoxin A on carbohydrate metabolism in rat liver. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 32:116-122.
- Sweeney M.J., Dobson A.D.W. 1998. Mycotoxin production by *Aspergillus*, *Fusarium* and *Penicillium* species. *International Journal of Food Microbiology* 43; 141-158.
- Szczzech G.M., Carlton W.W., Tuite J., 1973. Ochratoxicosis in beagle dogs. II. Pathology. *Vet. Pathol.*, 10: 219-231.
- Taghizadeh M., Afshar P., Madani G., Hasani F.M., Khoshhali M., Zamanfar D., Rouhanizadeh H., Larijani L.V. 2017. Infants breastfed: a require or a potential risk. *Progress in Nutrition* 2017; Vol. 19, N. 4: 423-429.
- Takagi M., Uno S., Kokushi E., Shiga S., Mukai S., Kuriyagawa T., Takagaki K., Hasunuma H., Matsumoto D., Okamoto K., Shahada F., Chenga T., Deguchi E., Fink-Gremmels J. 2014. Measurement of urinary zearalenone concentrations for monitoring natural feed contamination in cattle herds: On-farm trials. *J. Anim. Sci.* 89:287-296.
- Takahashi-Ando N., Kimura M., Kakeya H., Osada H., Yamaguchi I. 2002. A novel lactonohydrolase responsible for the detoxification of zearalenone: enzyme purification and gene cloning. *The Biochemical journal.* 365. 1-6.
- Tam J., Pantazopoulos P., Scott P.M., Moisey J., Dabeka R.W., Richard I.D.K. 2011. Application of isotope dilution mass spectrometry: determination of ochratoxin A in the Canadian Total Diet Study. *Food Additives and Contaminants* Vol. 28, No. 6, 754-761.
- Tang Z., Liu X., Wang Y., Chen Q., Hammock B.D., Xu Y. 2019. Nanobody-based fluorescence resonance energy transfer immunoassay for noncompetitive and simultaneous detection of ochratoxin a and ochratoxin B. *Environmental Pollution* 251: 238-245.
- Tao Y., Xie S., Xu F., Liu A., Wang Y., Chen D., Pan Y., Huang L., Peng D., Wang X., Yuan Z. 2018. Ochratoxin A: Toxicity, oxidative stress and metabolism. *Food Chem Toxicol.* Feb; 112:320-331.
- Tapia M. O., Seawright A. A. 1984. Experimental ochratoxicosis A in pigs. *Australian Veterinary Journal*, 61(7), 219-222.
- Thuvander A., Paulsen J.E., Axberg K., Johansson N., Vidnes A., Enghardt-Barbieri H., Trygg K., Lund-Larsen K., Jahrl S., Widenfalk A., Bosnes V., Alexander J., Hult K., Olsen M. 2001. Levels of ochratoxin A in blood from Norwegian and Swedish blood donors and their possible correlation with food consumption. *Food and Chemical Toxicology* 39: 1145-1151.
- Tirmenstein M. A., Mangipudy R. 2014. Aflatoxin. *Encyclopedia of Toxicology*, 104-106.
- Trucksess M.W., Diaz-Amigo C. 2011. Mycotoxins in Foods w: *Encyclopedia of Environmental Health (Second Edition)*, ed. Jerome Nriagu, Elsevier, str. 505-514.
- Tsakmakidis I.A., Lymberopoulos A.G., Alexopoulos C., Boscoc C.M., Kyriakis S.C. 2006. In vitro Effect of Zearalenone and a-Zearalenol on Boar Sperm Characteristics and Acrosome Reaction. *Reprod Dom Anim* 41, 394-401.
- Tudehope D. I. 2013. Human Milk and the Nutritional Needs of Preterm Infants. *The Journal of Pediatrics*, Volume 162, Issue 3, S17-S25.
- Turbic A., Ahokas J. T., Haskard C. A. 2002. Selective in vitro binding of dietary mutagens, individually or in combination, by lactic acid bacteria. *Food Additives and Contaminants*, 19(2), 144-152.
- Turconi G., Guarcello M., Liveri C., Comizzoli S., Maccarini L., Castellazzi A.M., Pietri A., Piva G., Roggi C., 2004. Evaluation of xenobiotics in human milk and ingestion by the newborn. An epidemiological survey in Lombardy (northern Italy). *European Journal of Nutrition* 43, 191-197.
- Ueberschär K.-H., Brezina U., Dänicke S. 2016. Zearalenone (ZEN) and ZEN metabolites in feed, urine and bile of sows: Analysis, determination of the metabolic profile and evaluation of the binding forms. *Appl Agric Forestry Res* 1; (66)21-28.
- Underwood M.A. 2013. Human milk for the premature infant. *Pediatr Clin North Am.* Feb; 60(1):189-207.

- Urry W.H., Wehrmeister H.H., Hodge E.B., Hidy P.H. 1966. The structure of zearalenone. *Tetrahedron Letters* Volume 7, Issue 27: 3109-3114.
- Valaitis R., Hesch R., Passarelli C., Sheehan D., Sinton J. 2000. A systematic review of the relationship between breastfeeding and early childhood caries. *Can. J. Public Health* November/December, Vol. 91, No. 6.
- Valenta H. 1998. Chromatographic methods for the determination of ochratoxin A in animal and human tissues and fluids. *Journal of Chromatography A*, 815(1), 75-92.
- Valitutti F., De Santis B., Trovato C.M., Montuori M., Gatti S., Oliva S., Brera C., Catassi C. 2018. Assessment of Mycotoxin Exposure in Breastfeeding Mothers with Celiac Disease. *Nutrients*. Mar 10; 10(3). pii: E336.
- Van der Merwe K.J., Steyn P.S., Fourie L. 1965a. Mycotoxins. Part II. The constitution of ochratoxins A, B, and C, metabolites of *Aspergillus ochraceus* wilh. *Journal of the Chemical Society (Resumed)*, 7083.
- Van Der Merwe K.J., Steyn P.S., Fourie L., Scott D.B., Theron J.J. 1965b. Ochratoxin A, a Toxic Metabolite produced by *Aspergillus ochraceus* Wilh. *Nature*, 205(4976), 1112-1113.
- Vecchio A., Mineo V., Planeta D. 2012. Ochratoxin A in instant coffee in Italy. *Food Control* 28: 220-223.
- Vekiru E., Hametner C., Mitterbauer R., Rechthaler J., Adam G., Schatzmayr G., Krska R., Schuhmacher R. 2010. Cleavage of zearalenone by *Trichosporon* mycotoxinivorans to a novel nonestrogenic metabolite. *Appl Environ Microbiol*. Apr; 76(7):2353-9.
- Victoria C.G., Bahl R., Barros A.J.D., França G.V.A, Horton S., Krasevec J., Murch S., Sankar M.J., Walker N, Rollins N.C. 2016. Breastfeeding in the 21st century: epidemiology, mechanisms, and life-long effect. *Breastfeeding*, Volume 387, Issue 10017, P475-490, January 30.
- Vidal A., Sanchis V., Ramos A. J., Marín S. 2015. Thermal stability and kinetics of degradation of deoxynivalenol, deoxynivalenol conjugates and ochratoxin A during baking of wheat bakery products. *Food Chemistry*, 178, 276-286.
- Vieira T., Cunha S., Casal S. 2015. Analysis of the Mycotoxin Ochratoxin A in Coffee. *Coffee in Health and Disease Prevention* 1023-1031.
- Vulić A., Persi, A.N., Vahčić, N., Hengl, B., Gross-Bošković, A., Jurković, M., Kovacevic, D., Pleadin, J. 2014. Estimation of possible exposure to Ochratoxin A via consumption of contaminated meat products. *Meso : prvi hrvatski časopis o mesu*, Vol. XVI No. 2.
- Wai-Cheung Chung S., Kwong K.P., Tang A.S.P., Yeung S.T.K. 2009. Ochratoxin A levels in foodstuffs marketed in Hong Kong. *Journal of Food Composition and Analysis* 22: 756-761.
- Walker R., Larsen J.C. 2005. Ochratoxin A: Previous risk assessments and issues arising. *Food Additives & Contaminants*, 22(sup1), 6-9.
- Wallin S., Gambacorta L., Kotova N., Warensjö Lemming E., Nälsén C., Solfrizzo M., Olsen M. 2015. Biomonitoring of concurrent mycotoxin exposure among adults in Sweden through urinary multi-biomarker analysis. *Food and Chemical Toxicology*, Volume 83, 133-139.
- Wang L., Zhang Q., Yan Z., Tan Y., Zhu R., Yu D., Yang H., Wu A. 2018. Occurrence and quantitative risk assessment of twelve mycotoxins in eggs and chicken tissues in China. *Toxins (Basel)* 10, 477.
- Wang Y., Wang L., Liu F., Wang Q., Selvaraj J. N., Xing F., Zhao Y., Liu Y. 2016. Ochratoxin A Producing Fungi, Biosynthetic Pathway and Regulatory Mechanisms. *Toxins*, 8(3), 83.
- Warth B., Braun D., Ezekiel C. N., Turner P. C., Degen G., Marko D. 2016. Biomonitoring of Mycotoxins in Human Breast Milk: Current State and Future Perspectives. *Chemical Research in Toxicology*. 29. 1087-1097.
- Wegst W., Lingens F. 1983. Bacterial degradation of ochratoxin A. *FEMS Microbiology Letters* 17. 341-344.
- Wei Y., Lu C., Lin T., Wei R. 1985. Effect of ochratoxin A on rat liver mitochondrial respiration and oxidative phosphorylation. *Toxicology*, 36(2-3), 119-130.

- Weidenbörner M. 2001. Encyclopedia of Food Mycotoxins, s. 293.
- Wesołowska A., Dobrowolska I., Sinkiewicz-Darol E., Barbarska O., Niewada M., Golicki M. 2020. Donor Human Milk for Preterm Infants: A Cost-Consequence Analysis of Alternative Preservation Methods. *Value In Health Regional Issues*. 22(C):54-60.
- Wesołowska A., Pawlus B., Bernatowicz-Łojko U., Borszewska-Kornacka M.K. 2018. Funkcjonowanie banków mleka w Polsce – praktyczne rekomendacje. *Postępy neonatologii* 24(1).
- Wesołowska A., Sawczuk D., Paczesna I., Bernatowicz-Łojko U. 2017a. Rola organizacji pozarządowych w upowszechnianiu karmienia piersią i mlekiem kobiecym w Polsce. W: *Banki Mleka w Polsce. Funkcjonowanie w podmiotach leczniczych – idea i praktyka*, pod red. nauk. Aleksandra Wesołowska. Fundacja Bank Mleka Kobiecego. Str. 31-45.
- Wesołowska A., Sinkiewicz-Darol E., Rosiak E. 2017b. Wymogi sprzętowe oraz plan zagospodarowania przestrzenno – organizacyjnego pomieszczeń banku mleka. W: *Banki Mleka w Polsce. Funkcjonowanie w podmiotach leczniczych – idea i praktyka*, pod red. nauk. Aleksandra Wesołowska. Fundacja Bank Mleka Kobiecego. Str. 171-176.
- Westlake K., Mackie R.I., Dutton M.F. 1987. Effects of several mycotoxins on specific growth rate of *Butyrivibrio fibrisolvens* and toxin degradation in vitro. *Appl. Environ. Microbiol.*, 53, pp. 613-614.
- WHO/UNICEF meeting on infant and young child feeding. 1980. *Journal of Nurse-Midwifery*, 25(3), 31-38.
- Wierzejska R. 2017. Dieta matki karmiącej. W: *Banki Mleka w Polsce. Funkcjonowanie w podmiotach leczniczych – idea i praktyka*, pod red. nauk. Aleksandra Wesołowska. Fundacja Bank Mleka Kobiecego. Str. 109-113.
- Wight N.E. 2001. Donor Human Milk for Preterm Infants. *Journal of Perinatology*, 21, 249-254.
- Wróbel B. 2014. Zagrożenia zwierząt i ludzi toksynami grzybów pleśniowych zawartych w paszach i żywności. *Woda-Środowisko-Obszary wiejskie* T. 14. Z. 3 (47).
- Wu Q., Dohnal V., Huang L., Kuča K., Wang X., Chen G., Yuan Z. 2011. Metabolic pathways of ochratoxin A. *Curr Drug Metab. Jan*; 12(1):1-10.
- Wu X., Jackson R.T., Khan S.A., Ahuja J., Pehrsson P.R. 2018. Human Milk Nutrient Composition in the United States: Current Knowledge, Challenges, and Research Needs. *Curr Dev Nutr.* 2(7): nzy025.
- Zain M. E. 2011. Impact of mycotoxins on humans and animals. *Journal of Saudi Chemical Society* Volume 15, Issue 2, 129-144.
- Zalecenie Komisji z dnia 17 sierpnia 2006 r. w sprawie obecności deoksyniwalenolu, zearalenonu, ochratoksyny A, T-2 i HT-2 oraz fumonizyn w produktach przeznaczonych do żywienia zwierząt (2006/576/WE z późn. zm.) (Dz. U. L/229/7).
- Zhang L., Dou X.-W., Zhang C., Logrieco A., Yang M.-H. 2018. A Review of Current Methods for Analysis of Mycotoxins in Herbal Medicines. *Toxins*, 10(2), 65.
- Zhang X., Boesch-Saadatmandi C., Lou Y., Wolffram S., Huebbe P., Rimbach G. 2009. Ochratoxin A induces apoptosis in neuronal cells. *Genes & Nutrition*, 4(1), 41-48.
- Zinedine A., Soriano J.M., Moltó J.C., Mañes J. 2007. Review on the toxicity, occurrence, metabolism, detoxification, regulations and intake of zearalenone: An oestrogenic mycotoxin. *Food and Chemical Toxicology* 45; 1-18.

ZAŁĄCZNIKI

ZAŁĄCZNIK 1. Dopuszczalne normy aflatoksyn w wybranych produktach spożywczych (Rozporządzenie Komisji (WE) nr 1881/2006, 165/2010 oraz 1058/2012)

Produkt	Najwyższa dopuszczalna wartość [$\mu\text{g}/\text{kg}$]		
	B ₁	Suma B ₁ , B ₂ , G ₁ i G ₂	M ₁
Orzechy arachidowe (orzeszki ziemne) i inne nasiona oleiste, które mają być sortowane lub poddane innej fizycznej obróbce przed spożyciem przez ludzi lub użyciem, jako składnik w środkach spożywczych z wyjątkiem orzechów arachidowych (orzeszków ziemnych) i innych nasion oleistych przeznaczonych do tłoczenia oleju w celu produkcji rafinowanego oleju roślinnego	8	15	—
Migdały, pistacje i pestki moreli, które mają być sortowane lub poddane innej fizycznej obróbce przed spożyciem przez ludzi lub użyciem, jako składnik w środkach spożywczych	12	15	—
Orzechy arachidowe (orzeszki ziemne) i inne nasiona oleiste oraz produkty z nich przetworzone, przeznaczone do bezpośredniego spożycia przez ludzi lub użycia, jako składniki w środkach spożywczych, z wyjątkiem surowego oleju roślinnego przeznaczonego do rafinacji – rafinowanego oleju roślinnego	2	4	—
Suszone owoce, inne niż suszone figi, przeznaczone do sortowania lub poddawania innej fizycznej obróbce przed spożyciem przez ludzi lub użyciem, jako składniki w środkach spożywczych	5	10	—
Suszone owoce, inne niż suszone figi, oraz produkty z nich przetworzone przeznaczone do bezpośredniego spożycia przez ludzi lub użycia, jako składniki w środkach spożywczych	2	4	—

Suszone figi	6	10	—
Następujące gatunki przypraw:			
– <i>Capsicum spp.</i> (pochodzące z tego gatunku suszone owoce, całe lub mielone, w tym papryka chili, mielone chili, pieprz kajeński i papryka)			
– <i>Piper spp.</i> (pochodzące z niego owoce, w tym biały i czarny pieprz)	5	10	—
– <i>Myristica fragrans</i> (gałka muszkatołowa)			
– <i>Zingiber officinale</i> (imbir)			
– <i>Curcuma longa</i> (kurkuma)			
Mieszanki przypraw zawierające jedną lub więcej wyżej wspomnianych przypraw			
Przetworzona żywność na bazie zbóż oraz żywność dla niemowląt i małych dzieci	0,1	—	—
Surowe mleko, mleko poddane obróbce cieplnej i mleko służące do wytwarzania produktów na bazie mleka	—	—	0,050
Preparaty do początkowego żywienia niemowląt i preparaty do dalszego żywienia niemowląt, w tym mleko początkowe i mleko następne	—	—	0,025
Dietetyczna żywność specjalnego przeznaczenia medycznego przeznaczona specjalnie dla niemowląt	0,1	—	0,025

ZAŁĄCZNIK 2. Ankieta dotycząca informacji o badanych kobietach i prowadzonej przez nie diecie, zgoda na udział w badaniu, informacja o badaniu**ANKIETA**

Odpowiedzi proszę zaznaczać w kółku.

Data urodzenia:

Miejsce zamieszkania MIASTO WIEŚ

Czy pracuje Pani zawodowo? TAK NIE

Jakiej płci jest karmione dziecko? Dziewczynka Chłopiec

Czy jest to Pani pierwsze dziecko? TAK NIE

Jeśli nie, to które?

Wiek ciążowy dziecka w dniu porodu (Hbd)

Aktualny wiek dziecka (miesiące)

Czy karmi Pani w tandemie? TAK NIE

Wiek starszego dziecka karmionego piersią (msc)

Czy poprzednie dzieci również były karmione piersią? TAK NIE

Czy karmi Pani piersią czy pokarmem odciągniętym?

Czy choruje Pani na jakąś chorobę przewlekłą? TAK NIE

Czy przyjmuje Pani systematycznie leki? TAK NIE

Jeśli tak, to jakie?

Ile ml/litrów płynów dziennie Pani przyjmuje?

Proszę określić jak często spożywa Pani poniżej podane pokarmy/napoje.

	Codziennie	Raz w tygodniu	Raz w miesiącu	Nigdy
Pieczywo białe				
Pieczywo ciemne				
Płatki śniadaniowe				
Podroby				
Kawa/Kawa rozpuszczalna				
Kawa zielona				
Wino				
Piwo				
Sok z winogron				
Gluten pszenny				
Czekolada				
Kakao				
Kasze				
Ryż				
Orzechy				
Mleko krowie				
Ser żółty				
Ser pleśniowy				
Jaja kurze				
Lukrecja				
Przyprawy (Proszę wymienić jakie)				
Suszone owoce (Proszę wymienić jakie)				
Rośliny strączkowe (Proszę wymienić jakie)				

ZGODA NA UDZIAŁ W BADANIU

pt. „Wykrycie i porównanie poziomu ochratoksyny A w płynach ustrojowych (mleko, moczu, krew) kobiet karmiących piersią”

Nazwisko i imię osoby badanej:

Wiek:

Adres:

Numer telefonu

Wyrażam zgodę na udział w badaniu mającym na celu wykrycie i określenie zawartości ochratoksyny A w płynach ustrojowych- mleku, moczu i krwi oraz oznaczenie jej wartości. Wyrażam zgodę na pobranie materiału (mleka, moczu i krwi) oraz na jego badanie. Oświadczam, że zostałam poinformowana o celu zamierzonych badań i sposobie ich przeprowadzenia oraz że mogę odmówić zgody na udział w badaniach lub cofnąć ją w każdej chwili bez jakichkolwiek konsekwencji lub zmiany sposobu leczenia.

Zostałam również poinformowana o możliwości zadawania pytań prowadzącym badania.

Wyrażam pełną i świadomą zgodę na udział w badaniu oraz wykorzystanie materiału badanego do innych badań naukowych oraz na udostępnienie i przetwarzanie danych osobowych, za wyjątkiem publikacji danych personalnych.

W związku z tym, zgodnie z art. 13 Rozporządzenia Parlamentu Europejskiego i Rady (UE) 2016/679 z dnia 27 kwietnia 2016 r. w sprawie ochrony osób fizycznych w związku z przetwarzaniem danych osobowych i w sprawie swobodnego przepływu takich danych oraz uchylenia dyrektywy 95/46/WE, informujemy, że:

- 1) administratorem Pani danych osobowych jest Uniwersytet Kazimierza Wielkiego z siedzibą przy ul. Chodkiewicza 30, 85-064 Bydgoszcz,
- 2) administrator danych osobowych powołał Inspektora Ochrony Danych nadzorującego prawidłowość przetwarzania danych osobowych, z którym można skontaktować się za pośrednictwem adresu e-mail: iod@ukw.edu.pl,
- 3) Pani dane przetwarzane są w celu umożliwienia administratorowi przeprowadzenia badań płynów ustrojowych
- 4) Podstawą przetwarzania danych jest udzielona wcześniej przez Panią zgoda, którą może Pani odwołać w dowolnym momencie,
- 5) nie zamierzamy przekazywać Pani danych osobowych innym podmiotom, jak również nie zamierzamy przekazywać Pani danych do państw trzecich (tj. niebędących członkami UE) lub organizacji międzynarodowych,
- 6) Pani dane będą przechowywane do czasu odwołania przez Panią zgody na ich przetwarzanie,
- 7) ma Pani prawo żądania od administratora danych dostępu do swoich danych osobowych, ich sprostowania oraz prawo żądania zaprzestania przetwarzania danych,

- 8) ma Pani prawo wniesienia skargi do organu nadzorczego; organem nadzorczym jest Prezes Urzędu Ochrony Danych Osobowych,
- 9) podanie przez Panią danych jest dobrowolne,
- 10) nie zamierzamy na podstawie Pani danych realizować zautomatyzowanego podejmowania decyzji ani profilowania.

.....
Miejscowość i data

.....
Podpis

INFORMACJA O BADANIU

Celem badania jest wykrycie i porównanie zawartości ochratoksyny A w mleku, krwi i moczu pobranych od kobiet karmiących piersią. Badania opierają się na analizie materiału biologicznego- próbek mleka kobiecego, próbek moczu i próbek krwi. Wyniki analizy pozwolą na określenie korelacji występowania ochratoksyny A w płynach ustrojowych oraz na opracowanie zaleceń dietetycznych dla kobiet w ciąży i karmiących piersią. Badanie nie wiąże się z dodatkowym ryzykiem dla osoby badanej. Badana osoba w każdej chwili może zrezygnować z dalszych badań.

.....
Miejscowość i data

.....
Podpis