

VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V BRNĚ

BRNO UNIVERSITY OF TECHNOLOGY

FAKULTA CHEMICKÁ
ÚSTAV CHEMIE POTRAVIN A BIOTECHNOLOGIÍ

FACULTY OF CHEMISTRY
INSTITUTE OF FOOD SCIENCE AND BIOTECHNOLOGY

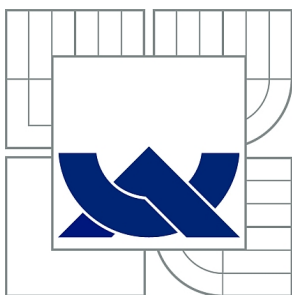
STANOVENÍ OBSAHU VYBRANÝCH MYKOTOXINŮ V KRMIVECH

DIPLOMOVÁ PRÁCE
MASTER'S THESIS

AUTOR PRÁCE
AUTHOR

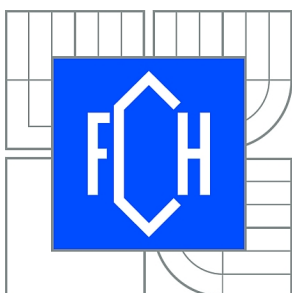
Bc. LENKA ZELNÍČKOVÁ

BRNO 2010



VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V BRNĚ

BRNO UNIVERSITY OF TECHNOLOGY



FAKULTA CHEMICKÁ

ÚSTAV CHEMIE POTRAVIN A BIOTECHNOLOGIÍ

FACULTY OF CHEMISTRY

INSTITUTE OF FOOD SCIENCE AND BIOTECHNOLOGY

STANOVENÍ OBSAHU VYBRANÝCH MYKOTOXINŮ V KRMIVECH

THE CONTENT OF CHOSEN MYCOTOXINS IN FEEDS

DIPLOMOVÁ PRÁCE

MASTER'S THESIS

AUTOR PRÁCE

AUTHOR

Bc. LENKA ZELNÍČKOVÁ

VEDOUCÍ PRÁCE

SUPERVISOR

MGR. DITA KELLNEROVÁ

BRNO 2010



Vysoké učení technické v Brně
Fakulta chemická
Purkyňova 464/118, 61200 Brno 12

Zadání diplomové práce

Číslo diplomové práce:	FCH-DIP0436/2009	Akademický rok: 2009/2010
Ústav:	Ústav chemie potravin a biotechnologií	
Student(ka):	Bc. Lenka Zelníčková	
Studijní program:	Chemie a technologie potravin (N2901)	
Studijní obor:	Potravinářská chemie a biotechnologie (2901T010)	
Vedoucí práce	Mgr. Dita Kellnerová	
Konzultanti:	Ing. Eva Vítová, Ph.D.	

Název diplomové práce:

Stanovení obsahu vybraných mykotoxinů v krmivech

Zadání diplomové práce:

- Zpracujte literární přehled dané problematiky:
 - stručný přehled nejdůležitějších mykotoxinů
 - zearalenon, deoxynivalenol - charakteristika, vlastnosti, biologické účinky
 - možnosti stanovení mykotoxinů v krmivech
 - metoda ELISA, princip, provedení, použití na různé typy vzorků
- Sledujte obsah zearalenonu a deoxynivalenolu ve vzorcích krmiv
- Zhodnoťte kvalitu krmiv z hlediska požadavků legislativy

Termín odevzdání diplomové práce: 14.5.2010

Diplomová práce se odevzdává ve třech exemplářích na sekretariát ústavu a v elektronické formě vedoucímu diplomové práce. Toto zadání je přílohou diplomové práce.

Bc. Lenka Zelníčková
Student(ka)

Mgr. Dita Kellnerová
Vedoucí práce

doc. Ing. Jiřina Omelková, CSc.
Ředitel ústavu

V Brně, dne 1.12.2009

prof. Ing. Jaromír Havlica, DrSc.
Děkan fakulty

ABSTRAKT

Tato diplomová práce je věnována aktuální problematice monitoringu vybraných mykotoxinů v krmivech v ČR.

Cílem teoretické práce bylo zpracovat literární rešerši z dostupných

knižních, elektronických i časopiseckých pramenů, popř. firemních materiálů. Rešerše je zaměřená na souhrnný přehled mykotoxinů; popsání jejich vlastností, biologické účinky, metody detekce mykotoxinů a také shrnutí platných legislativních požadavků týkající se výskytu těchto látek v krmivech pro hospodářská zvířata.

Cílem experimentální části bylo stanovení vybraných mykotoxinů (DON a ZEA) metodou ELISA v krmivech a jejich celkové zhodnocení dle maximálních limitů.

Diplomová práce byla vypracována v diagnostické laboratoři SEVARON, s.r.o. v Brně.

ABSTRACT

This diploma thesis is focused on current problematics of monitoring of selected mycotoxins DON and ZEA in feeds in Czech Republic.

The objective of my thesis was to elaborate a literature search from available books, electronic and periodical sources and service materials. Literature search is aimed at overall overview of mycotoxins, describes their characteristics, biological effects, methods of detection as well as summarize recent legislative requirements concerning occurrence of these substances in feeds for animals.

The aim of experimental part was a determination of selected mycotoxins in feed (DON and ZEA) by method ELISA and their evaluation according to maximum limits.

The diploma thesis was prepared in diagnostic laboratory SEVARON, s. r. o. in Brno.

KLÍČOVÁ SLOVA

zearalenon, deoxynivalenol, ELISA, krmiva

KEY WORDS

zearalenon, deoxynivalenol, ELISA, feeds

ZELNÍČKOVÁ, L. Stanovení obsahu vybraných mykotoxinů v krmivech. Brno 2010, 99 s. Diplomová práce na Fakultě chemické Vysokého učení technického v Brně, Ústavu chemie potravin a biotechnologií. Vedoucí diplomové práce Mgr. Dita Kellnerová.

PROHLÁŠENÍ

Prohlašuji, že jsem diplomovou práci vypracovala samostatně a že všechny použité literární zdroje jsem správně a úplně citovala. Diplomová práce je z hlediska obsahu majetkem Fakulty chemické VUT v Brně a může být využita ke komerčním účelům jen se souhlasem vedoucího diplomové práce a děkana FCH VUT.

.....
podpis studenta

Poděkování:

Na tomto místě bych ráda poděkovala paní Mgr. Dítě Kellnerové, a paní Mgr. Marcele Gambové, za odborné vedení, užitečné rady, pomoc a podporu při zpracování této diplomové práce.

Dále bych ráda poděkovala i paní Ing. Vítové, Ph.D. za vstřícnost a konzultace.

OBSAH

ÚVOD.....	11
1 TEORETICKÁ ČÁST	12
1.1 PŘEHLED A TŘÍDĚNÍ MYKOTOXINŮ	12
1.2 VÝSKYT MYKOTOXINŮ	12
1.3 VÝZNAMNÉ SKUPINY VYBRANÝCH MYKOTOXINŮ	17
1.3.1 Aflatoxiny	17
1.3.2 Kyselina penicilová	18
1.3.3 Patulin	19
1.3.4 Ochratoxin.....	19
1.3.5 Trichotheceny.....	20
1.3.5.1 Makrocyclické trichotheceny	20
1.3.5.2 Nemakrocyclické trichotheceny (T-2 toxin, deoxinyvalenol, ...)	20
1.3.6 Zearalenon	22
1.4 MAXIMÁLNÍ PŘÍPUSTNÉ OBSAHY MYKOTOXINŮ	25
1.5 BIOLOGICKÉ ÚČINKY MYKOTOXINŮ	26
1.5.1 Neurotoxická.....	26
1.5.2 Imunotoxická.....	26
1.5.3 Teratogenita	26
1.5.4 Mutagenita	26
1.5.5 Karcinogenita.....	27
1.6 ÚČINKY MYKOTOXINŮ NA ZDRAVOTNÍ STAV A REPRODUKCI ZVÍŘAT	27
1.6.1 Akutní a chronické mykotoxikózy	28
1.7 VYŠETŘENÍ NA PŘÍTOMNOST PLÍSNÍ V KRMÍVECH	29
1.8 KONTAMINACE ZRNIN A DALŠÍCH KRMIV	31
1.9 PREVENCE A KONTROLNÍ METODY	32
1.9.1 Předsklizňová opatření.....	32
1.9.2 Posklizňová opatření.....	32
1.10 VZORKOVÁNÍ KRMIV PRO ANALÝZY	33
1.11 DEKONTAMINACE MYKOTOXINŮ – PREVENCE A KONTROLNÍ METODY	33
1.11.1 Fyzikálně chemické dekontaminační postupy	33
1.11.2 Použití enzymů.....	34
1.12 METODY DETEKCE MYKOTOXINŮ	35
1.12.1 Enzymová imunoanalýza	35
1.12.1.1 Definice používaných termínů v ELISA	36
1.12.1.2 Základní systémy ELISA	37
2 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	40
2.1 LABORATORNÍ VYBAVENÍ	40
2.1.1 Chemikálie.....	40
2.1.2 Přístroje.....	40
2.1.3 Použitý software	40
2.1.4 Pracovní pomůcky.....	40
2.1.5 Složení soupravy.....	40

2.1.6	<i>Příprava vzorku a extrakce [68]</i>	41
2.2	KVANTITATIVNÍ STANOVENÍ DEOXYNIVALENOLU V KRMNÝCH SMĚSÍCH	41
2.2.1	<i>Princip testu [68]</i>	41
2.2.2	<i>Provedení testu [68]</i>	41
2.2.3	<i>Parametry metody [68]</i>	42
2.3	KVANTITATIVNÍ STANOVENÍ ZEARALENONU V KRMNÝCH SMĚSÍCH	42
2.3.1	<i>Princip testu [69]</i>	42
2.3.2	<i>Provedení testu [69]</i>	43
2.3.3	<i>Parametry metody [69]</i>	43
3	VÝSLEDKY A DISKUZE	44
3.1	VÝSKYT DON A ZEA V JEDNOTLIVÝCH CHOVECH	44
3.1.1	<i>Chov 7</i>	44
3.1.2	<i>Chov 12</i>	47
3.1.3	<i>Chov 28</i>	50
3.1.4	<i>Chov 16</i>	52
3.1.5	<i>Chov 2</i>	53
3.1.6	<i>Chov 32</i>	55
3.1.7	<i>Chov 15</i>	56
3.2	VYHODNOCENÍ VEŠKERÝCH VZORKŮ ŽLUČE NA DON	58
3.3	VYHODNOCENÍ VEŠKERÝCH VZORKŮ ŽLUČE NA ZEA	61
3.4	VYHODNOCENÍ VŠECH VZORKŮ JEČMENE NA DON A ZEA	64
3.5	VYHODNOCENÍ VŠECH VZORKŮ PŠENICE NA DON A ZEA	65
3.6	VYHODNOCENÍ VŠECH VZORKŮ KUKUŘICE NA DON A ZEA	67
	ZÁVĚR	69
	SEZNAM POUŽITÝCH ZDROJŮ	71
	SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK A SYMBOLŮ	75
	PŘÍLOHY	76
	SEZNAM OBRÁZKŮ	97
	SEZNAM TABULEK	98
	SEZNAM GRAFŮ	99

ÚVOD

Plísně (mikroskopické vláknité houby, mikromycety) jsou jednobuněčné nebo mnohobuněčné organismy, které vytvářejí vláknité povlaky na povrchu různých substrátů nebo jimi prorůstají. Rozmnožují se rozrůstáním hyf (vláken) nebo sporami. Mykotoxiny jsou metabolity některých plísní rostoucích na rostlinách, krmivech a potravinách se specifickými biologickými účinky na vyšší organismy. K jejich produkci dochází za určitých podmínek, daných druhem plísně, substrátem, vlhkostí a teplotou prostředí. Metabolity plísní pronikají do substrátu, tím kontaminují potravní řetězec a stávají se významným zdrojem alimentárních intoxikací zvířat a člověka, skupinově nazývaných mykotoxikózy [1, 4, 38, 40].

Případy hromadných mykotoxikóz jsou známy již od středověku, kdy opakovaně došlo v Evropě k zamoření obilovin paličkovici nachovou (*Claviceps purpurea*) a kontaminaci mouky jejími alkaloidy. Je známo, že v 17. století způsobovaly toxiny obsažené v žitném chlebě halucinace. K dalšímu výskytu hromadných mykotoxikóz, a to u hospodářských zvířat, došlo před II. světovou válkou na Ukrajině při zkrmování plesnivé slámy a sena kontaminovaného pravděpodobně mykotoxiny plísně *Stachybotrys atra*, které způsobily rozsáhlé úhyny koní a skotu. Masivní výskyt mykotoxikózy byl zaznamenán ve Velké Británii v roce 1960, kdy uhynulo více než 100 000 krů'at následkem zkrmování plesnivého podzemnicového šrotu, který obsahoval toxické produkty plísně *Aspergillus flavus*, zvané aflatoxiny.

Mykotoxiny jsou toxické látky nebiřkovinné povahy, produkované patogenními plísněmi, z nichž k nejvýznamnějším patří rody *Aspergillus*, *Penicillium* a *Fusarium* [1, 7]. Různé kmeny téhož druhu mohou produkovat více než jeden typ mykotoxinu a naopak řada rozličných plísní produkuje jeden typ mykotoxinu. Nejvýznamnější mykotoxiny, pokud jde o jejich toxicitu a výskyt, jsou aflatoxiny, ochratoxiny, T-2 toxin, deoxynivalenol (DON, vomitoxin), zearalenon a fumonisiny [1, 37, 63].

V současné době je známo asi 400 mykotoxinů, které jsou produkovány 200 až 300 druhy plísní. Přenos mykotoxinů z krmiv do masa, mléka a vajec představuje vážný problém i pro lidskou populaci [1, 21, 23, 63].

Prokazovaná četnost výskytu plísní a mykotoxinů v krmivech dokumentuje zdravotní a ekonomickou závažnost mykotoxikóz u hospodářských zvířat [21]. Pro svůj skrytý průběh bez klinicky zjevných příznaků onemocnění mohou být vážným problémem chronické mykotoxikózy, kdy příčiny snížené produkce a reprodukce zvířat jsou často hledány v řadě jiných oblastí (virové infekce, skladba krmných dávek, karence minerálních prvků a vitamínů, apod.) [1, 58]. Ekonomické ztráty v chovech hospodářských zvířat způsobené kontaminací krmiv mykotoxiny se odhadují na miliony dolarů [13].

Cílem této práce je poskytnout souhrnnou formou základní informace o mykotoxinech, o jejich výskytu a negativních účincích na zdravotní stav, reprodukci a užitkovost hospodářských zvířat. V neposlední řadě poskytnout informace o možnostech diagnostiky plísní a mykotoxinů v krmivech a o stávajících postupech prevence. Právě do těchto oblastí činnosti musí být se znalostmi všech okolností a rizik vzniku mykotoxikóz soustředěna maximální pozornost všech zainteresovaných pracovníků zemědělské výroby.

1 TEORETICKÁ ČÁST

1.1 Přehled a třídění mykotoxinů

Mykotoxiny představují nesmírně pestrou skupinu sloučenin, jejichž relativní molekulová hmotnost běžně nepřesahuje 500 Da. Stejně jako je tomu i v případě jiných sekundárních metabolitů, nelze mykotoxiny jednoduše klasifikovat pouze na základě chemické struktury bez současného zohlednění jejich výskytu, producentů, charakteru a intenzity vyvolávaných účinků do jednotlivých skupin [2, 12]. V tab. 1 je uveden přehled vybraných mykotoxinů dle rodu a druhu plísní.

Tab. 1: Třídění vybraných mykotoxinů podle rodu a druhu plísní [1]

Mykotoxiny produkované druhy rodu <i>Aspergillus</i>	
Mykotoxiny	Původně izolované z druhu
Aflatoxiny	<i>A. flavus</i>
Citreoviridin	<i>A. terreus</i>
Ochratoxiny	<i>A. ochraceus</i>
Patulin	<i>A. clavatus</i>
Mykotoxiny produkované druhy rodu <i>Penicillium</i>	
Mykotoxiny	Původně izolované z druhu
Citreoviridin	<i>P. citreo-viride</i>
Ochratoxin A	<i>P. viridicatum</i>
Kys. Penicilová	<i>P. verrucosum</i>
Patulin	<i>P. patulum</i>
Mykotoxiny produkované různými druhy hub	
Mykotoxiny	Původně izolované z druhu
Zearalenon	<i>Gibberella zea</i>
Plísně produkující trichothecey	
Trichothecey	Původně izolované z druhu
Deoxynivalenol	<i>F. culmorum</i>
T-2 toxin	<i>F. tricinctum</i>

1.2 Výskyt mykotoxinů

Ke kontaminaci zemědělských produktů může dojít v různých fázích předcházejících jejich konzumaci. Obr. 1 znázorňuje průnik mykotoxinů do potravního řetězce člověka i hospodářských zvířat a jejich další osud.

Vedle exogenní kontaminace však mohou být potraviny kontaminovány i v souvislosti s cíleným využíváním plísní v různých potravinářských a biotechnologických procesech. Komplexní výčet zdrojů kontaminace je následující:

- plesnivé potraviny - zemědělské plodiny (primární infekce), tj. cereálie a olejniny, hotové produkty (sekundární infekce), včetně krmných směsí pro hospodářská zvířata
- rezidua v živočišných tkáních a produktech – mléko a mléčné produkty, maso a masné výrobky [2].

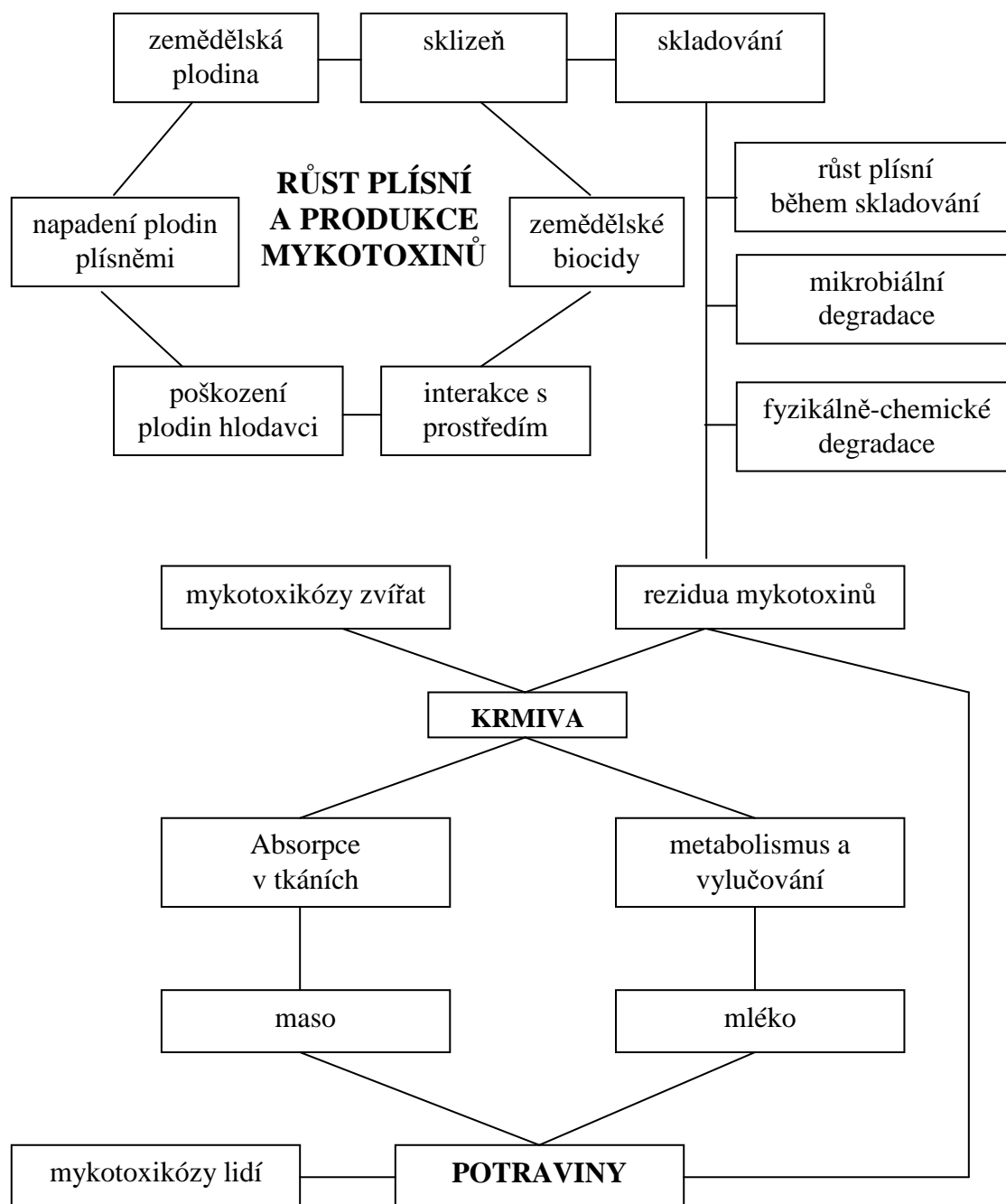
Faktory podmiňující rozsah případné kontaminace zemědělských plodin mykotoxiny za polních podmínek jsou shrnuty ve výčtu:

- míra fyziologického stresu, kterému jsou rostliny vystaveny (nedostatek minerálií, malé či nadměrné množství vlhkosti, slanost půdy, znečištění ovzduší, napadení hmyzem, atd.)
- virulence patogenní plísně
- typ produkovaného mykotoxinu
- schopnost rostliny degradovat mykotoxiny
- interval mezi sklizní a obdobím produkce mykotoxinů [2, 17].

Analýzy v řadě zemi uvádějí, že mykotoxiny jsou přítomny ve více než 25% zrnin, a to navzdory kvalitním technologickým systémům pěstování obilovin a dalších plodin [1, 8, 17, 40, 55].

Významnou roli sehrávají samozřejmě také klimatické poměry. Ve prospěch produkce mykotoxinů působí zejména srážky (vysoká relativní vlhkost vzduchu) v pozdějších fázích zrání plodin a v před sklizňovém období. Problémy s výskytem mykotoxinů ve sklizených plodinách nastávají zejména tehdy, uplatní-li se současně více faktorů příznivých pro růst plísní a tvorbu jejich toxických metabolitů. V období následujícím po sklizni, tj. během transportu, zpracování či skladování, může dojít ke kontaminaci zemědělských produktů mykotoxiny. Nejčastěji jde o metabolity plísní rodů *Aspergillus* a *Penicillium*. Rozhodující roli v této souvislosti hrají faktory:

- biologické (vlastnosti daného mikroorganismu, kompetitivní mikroflóra, velikost inokula)
- chemické (typ substrátu, přítomnost fungicidních látek)
- prostředí (teplota, aktivita vody, složení atmosféry, přístup světla) [2].



Obr. 1: Faktory ovlivňující výskyt mykotoxinů v potravinách a krmivech [2]

V určitých geografických pásmech se vyskytují některé druhy mykotoxinů častěji než ostatní. V chladnějších oblastech s vyšší vlhkostí vzduchu (Kanada, sever USA, Nový Zéland, většina evropských zemí) jsou krmiva a potraviny kontaminovány nejvíce deoxynivalenolem (vomitoxinem), zearalenonem a ochratoxiny. Aflatoxiny, které jsou nejvíce rozšířené, se vyskytují převážně v teplejších a vlhkých zeměpisných šířkách (Latinská Amerika, jižní Asie, Afrika, část Austrálie) (viz. tab. 2, 3, 4 a 5).

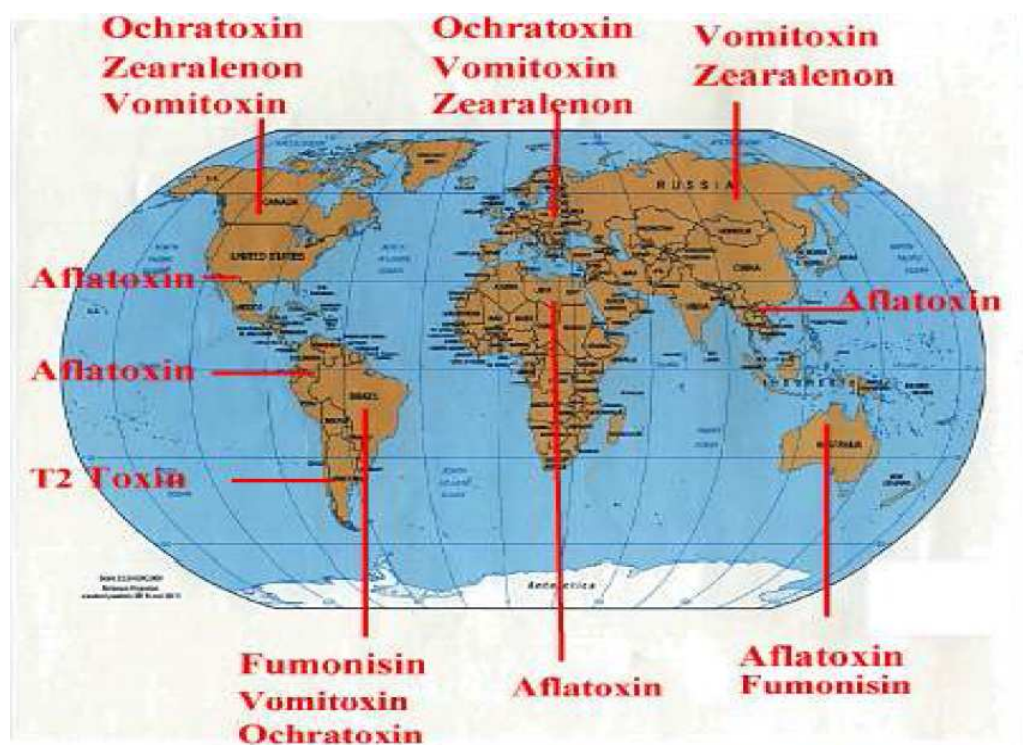
V našich podmínkách je nejvíce rozšířen zearalenon, dále pak deoxynivalenol, ochratoxiny a T-2 toxin (obr. 2).

Tab. 2: Nálezmy mykotoxinů v krmivech vyšetřených v České republice [1]

Mykotoxin	Počet vyšetřených vzorků	Počet pozitivních vzorků	Procento pozitivních vzorků
Aflatoxin B	1030	27	2,6
Ochratoxin A	398	19	4,8
Zearalenon	645	138	21,4
Deoxynivalenol	331	53	16,0
T-2 toxin	332	29	8,7

Tab. 3: Nejčastější výskyt mykotoxinů u vybraných krmiv [1]

Plodina	Mykotoxiny
Bavlníková semena	Aflatoxiny
Ječmen	Aflatoxiny, DON, T-2 toxin, zearalenon, ochratoxin A, citrinin
Kukuřice	Aflatoxiny, DON, T-2 toxin, zearalenon, fumonisiny, citreoviridin
Maniok	Aflatoxiny, zearalenon
Oves	Aflatoxiny, DON, T-2 toxin, zearalenon, ochratoxin A, citrinin
Podzemnice	Aflatoxiny, zearalenon, ochratoxin A, citrinin
Pšenice	Aflatoxiny, DON, zearalenon, ochratoxin A, citrinin, námellové alkaloidy
Rýže	Aflatoxiny, zearalenon, ochratoxin A, cystinin
Sojové boby	Aflatoxiny
Vojtěška	Aflatoxiny, zearalenon
Žito	Aflatoxiny, DON, zearalenon, ochratoxin A, citrinin, námellové alkaloidy



Obr. 2: Výskyt mykotoxinů ve světě [1]

Tab. 4: Výskyt mykotoxinů v Evropě [1]

Země výskytu	Druh obiloviny	Nález u vyšetřených vzorků (%)	Koncentrace mykotoxinu [$\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$]	Rok výskytu
Aflatoxiny				
Polsko	Kukuřice	4	neuveďeno	1975-1979
Velká Británie	Rýžové otruby	72,5	do 28	neuveďeno
Citrinin				
Bulharsko	Obiloviny	3,3-14	6,1-180	1998
Velká Británie	Pšenice, ječmen	20	do 8	neuveďeno
Deoxynivalenol				
Maďarsko	Kukuřice	70	$7\cdot 10^{-5}$ - $21,2\cdot 10^{-3}$	neuveďeno
Ochratoxiny				
Bulharsko	Pšenice, ječmen, oves, kukuřice, pšeničné otruby	29-47	1,5-18	1998
Polsko	Obiloviny	9	2-200	1975-1979
Velká Británie	Pšenice, ječmen	20	do 102	1992

Zearalenon				
Maďarsko	Kukuřice	87,5	0,11–11,8	neuveďeno
Velká Británie	Kukuřice	Téměř 100	> 100	neuveďeno

Tab. 5: Výskyt mykotoxinů v ostatních světadělech [1]

Země výskytu	Druh obiloviny	Nález u vyšetřených vzorků (%)	Koncentrace Mykotoxinu [$\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$]	Rok výskytu
Aflatoxiny				
Sev. Karolína	Kukuřice	34	20	1984-1994
Brazílie	Kukuřice	34,8	12-906	1988
Egypt	Kukuřice	44,2	< než 100	neuveďeno
Jižní Afrika	Kukuřice	6	neuveďeno	1994
Indie	Kukuřice	26	30-666	neuveďeno
Deoxynivalenol				
Sev. Karolína	Krmiva	60	neuveďeno	1984-1994
Ochratoxiny				
USA	Pšenice, ječmen	14,6	> 0,03	1997
		10,7	> 0,03	1997
T-2 toxin				
Sev. Karolína	Krmiva	5	neuveďeno	neuveďeno
Zearalenon				
Sev. Karolína	Krmiva	15-20	neuveďeno	1984-1994
Jižní Afrika	Kukuřice	3	40	1994

1.3 Významné skupiny vybraných mykotoxinů

Daný mykotoxin či skupinu vzájemně příbuzných toxických sloučenin může produkovat celá řada plísní, proto jsou členěny na jednotlivé skupiny podle struktury [2].

1.3.1 Aflatoxiny

Aflatoxiny jsou toxické produkty plísní *Aspergillus flavus* a *Aspergillus parasiticus* [14]. Tyto plísně rostou a jsou nejčastěji izolovány z obilovin, olejnin a z nich připravených pokrutin a dále z krmiv a potravin, které obsahují tyto suroviny. Růst plísní a syntéza aflatoxinů závisí na substrátu, obsahu stopových prvků, vlhkosti, teplotě, pH, přítomnosti kyslíku a kompetitivní mikroflóře. Aflatoxiny se tvoří při vysoké relativní vlhkosti (80 až

100%), poměrně vysoké teplotě prostředí (optimální teplota 28° C) a vysokém obsahu vlhkosti v zrně (16 až 20%). Při vlhkosti substrátu nižší než 12 % se plíseň netvoří.

Jsou známy čtyři základní aflatoxiny – B₁ (obr. 3), B₂, G₁ a G₂. Od nich jsou odvozeny aflatoxiny M₁ a M₂, které jsou hydroxyderiváty B₁ a B₂. Ty vznikají v játrech a přecházejí do masa, ledvin a mléka [1, 14]. Aflatoxiny se v těle hromadí v tělesných tekutinách a tkáních a jejich vylučování je pomalé a rozsahem omezené.

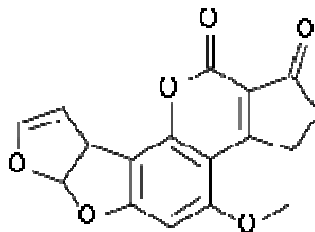
Při perorálním příjmu vykazují aflatoxiny různý toxický účinek, který závisí na výši přijaté dávky, na délce příjmu mykotoxinu, na druhu a věkové kategorii postiženého organismu.

Akutní hepatotoxický účinek je důsledkem příjmu vyšších dávek vnímavými kategoriemi zvířat. Akutní intoxikace probíhá za příznaků anorexie, gastroenteritidy, podkožního krvácení a krvácení z tělních otvorů. Při pitvě jsou shledávány zánětlivé změny sliznic gastrointestinálního ústrojí, krváceniny v podkoží, kloubech, svalovině, tělních tekutinách. Játra jsou zvětšená, výrazně zbarvená.

Chronický hepatotoxický účinek je důsledkem déletrvajícího příjmu nižších dávek aflatoxinů, u méně citlivých kategorií zvířat. Dochází k cirhotickým změnám jater, které jsou klinicky vyjádřeny anorexií, sníženou užitkovostí a tělesnou hmotností. Dlouhodobý příjem aflatoxinů vyvolává dystrofické změny spermiogenního epitelu u samců a u březích samic působí teratogenně.

Všechny druhy zvířat jsou citlivé na působení aflatoxinu, především mladá drůbež a mláďata hospodářských zvířat, více samci než samice. Velmi citlivá na aflatoxiny jsou selata a březí prasnice. Dospělý skot s výjimkou mladých zvířat vysoko reprodukčních dojníc je vůči aflatoxinům relativně odolnější, ale zaplísněné krmivo přijímá nerad [1]. Při podání krmiva kontaminovaného aflatoxiny B₁ a B₂ dojnícím lze zhruba po 12 hodinách prokázat v mléce hlavně přítomnost aflatoxinů M₁ vznikajících z mateřských látek hydroxylací. Při jednorázovém příjmu kontaminovaného krmiva je nutné také předpokládat výskyt stopových množství aflatoxinu M₁ v mléce ještě po dvou až třech dnech [2].

Mezi odolnější druhy patří kozy, ovce, potkani a myši. Kuřata, přijímají-li krmivo kontaminované aflatoxiny, jsou vnímavější k infekčním onemocněním. Mezi projevy aflatoxikózy patří degenerativní změny v nervových tkáních. Mutagenní a teratogenní vlivy byly zjištěny u laboratorních zvířat a na základě epidemiologických studií lze toto působení aflatoxinů předpokládat i u lidí. Přijímá-li zvíře současně s aflatoxiny také ochratoxiny, nastává zesílení jejich účinnosti (synergismus).



Obr. 3: Aflatoxin B₁

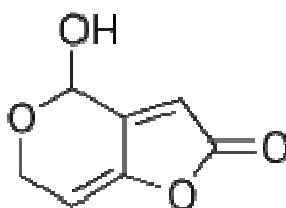
1.3.2 Kyselina penicilová

Je produkována plísněmi *Penicillium nartensii*, *P. palitans*, *P. cyclopium* a *P. puberulum* na navlhčích skladovaných obilovinách při nízkých teplotách (1 až 10°C). Kyselina

penicilová působí tukovou degeneraci a nekrotické změny jater [1]. Při opakovaném podávání zvířatům byl tento mykotoxin prokázán jako karcinogenní [2].

1.3.3 Patulin

Je produkován plísněmi *Penicillium urticae*, *P. expansum*, *P. vlaviforme* a některými plísněmi rodu *Aspergillus* [1,2, 12]. Optimální teplota pro jeho tvorbu je 25°C. Nachází se v rýži, nahnilém ovoci, ovocných šťávách a silážích. Poškozuje CNS, slezinu, játra, žaludek, ledviny a respirační aparát. Nejčastěji vyvolává intoxikace u drůbeže. Při dlouhodobém podávání je karcinogenní [1]. U patulinu (obr. 4) byla také prokázána mutagenita s inhibicí transkripce RNA a selektivním poškozováním DNA [2].



Obr. 4: Patulin

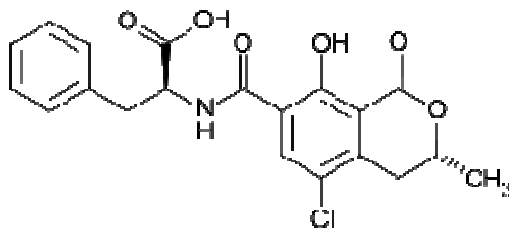
1.3.4 Ochratoxin

Ochratoxiny A, B a C jsou produkovány plísněmi rodu *Aspergillus* (*A. ochraceus*, *A. mellus*) a *Penicillium* (*P. viridicatum*, *P. verrucosum*, *P. palitans*, *P. commune*). Vyskytují se v cereáliích (ječmeni, žitě, ovsu, pšenici, rýži a kukuřici) [1, 2, 47]. Ochratoxiny byly zjištěny v obilovinách už dva týdny před sklizní i po ní při skladování zrna při vlhkosti kolem 20% a teplotě 3 až 5 °C [1].

Nejtoxičtější ochratoxin A (obr. 5) je častým kontaminantem krmiv a potravin. Nejcitlivější na ochratoxiny jsou prasata, u kterých snižuje užitkovost a vyvolává poškození ledvin. Koncentrace zde často dosahují až stovek $\mu\text{g.kg}^{-1}$ [1, 2]. Ochratoxin zasahuje do tří hlavních oblastí buněčných funkcí - glukoneogeneze, transportních systémů mitochondrií a proteosyntézy. Známé jsou nefrotoxické, imunotoxické, genotoxické, teratogenní a karcinogenní účinky [1, 2]. Při ochratoxikóze dochází k výraznému podráždění sliznic trávicího ústrojí a k rozvoji akutní gastroenteritidy. Resorbované mykotoxiny vedou k nechutenství, depresím, průjmům, horečkám a žíznivosti. Organismus je postupně dehydratován, postižená zvířata jsou ochablá a apatická. K úhynu dochází během několika dní.

Poškození ledvin prasat ochratoxinem, „nefropatie prasat“, je charakteristické a bývá zjišťováno při prohlídce na jatkách. Ledviny mohou být zvětšené a bledé s nerovným povrchem. Ochratoxin A snižuje imunitu, vyvolává zhoršení kvality semene u kanců a předpokládá se, že způsobuje odumírání plodů. Ochratoxin A přechází do masa zvířat a kontaminované živočišné produkty mohou být rizikové pro zdraví lidí. Přípustné množství v masu činí $0,005 \text{ mg.kg}^{-1}$ (vyhláška 298/97 Sb.). Po převedení prasat na nezávaznou dietu neobsahující ochratoxin probíhá přirozená dekontaminace po dobu 1 měsíce.

Ochratoxiny A a B jsou velmi toxické pro kuřata a krůty, jsou-li obsaženy v dietě v koncentraci vyšší než $0,3 \text{ mg.kg}^{-1}$. Už nízké hladiny ochratoxinů v krmivu u nosnic způsobují sníženou produkci vajec a charakteristické žlutohnědé zbarvení vaječných skořápek, které je připisováno vylučování urátů močí.



Obr. 5: Ochratoxin A

1.3.5 Trichotheceny

Trichotheceny jsou největší skupinou mykotoxinů produkovaných houbami rodu *Fusarium*, která zahrnuje více jak 140 známých metabolitů. Produkce trichothecenů byla prokázána i u některých kmenů rodu *Myrothecium*, *Trichoderma*, *Trichothecium*, *Cylinrocarpon*, *Phomopsis*, *Verticimonosporium* a *Stachybotrys* [11, 64]. Vzhledem k vysoké toxicitě a značnému rozšíření patří ke zdravotně nejzávažnějším mykotoxinům. Podle molekulární struktury se dělí na makrocyclické a nemakrocyclické.

1.3.5.1 Makrocyclické trichotheceny

Jsou to toxiny produkované plísní *Stachybotrys atra*, která roste zejména na slámě, seně, dřevě apod., tedy na substrátech obsahujících celulózu [1, 2]. V našem klimatickém pásmu je tato plíseň velmi rozšířena a skladování slámy přes zimní období v nevhodně budovaných stozích je jednou z příčin jejího růstu, propagace a produkce mykotoxinů. V přírodě plíseň roste za nízkých teplot (2 až 4 °C) při vysoké vlhkosti prostředí. Krmivo obsahující spory plísně *S. atra* je třeba považovat za závadné a nelze je zkrmovat.

Toxické produkty plísně působí toxicky na koně, skot, ovce, prasata a drůbež. Nejčastějšími příznaky otravy jsou horečka, průjem, hemoragie na sliznicích dutiny nosní a ústní. Při pitvě jsou zjišťovány krváceniny téměř ve všech orgánech. Příkladem makrocyclických trichothecenů je verrukarin A [2].

1.3.5.2 Nemakrocyclické trichotheceny (T-2 toxin, deoxynivalenol, ...)

Je to skupina mykotoxinů produkovaných plísněmi rodu *Fusarium* (*F. tricinctum*, *F. sporotrichioides*, *F. roseum*, *F. nivale*), *Trichothecium spp.*, *Trichoderma spp.* aj. [1, 15]. Zrna napadená fusarií se vyznačují typickým načervenalým zbarvením [2]. Toxiny produkované těmito plísněmi vyvolávají standardní syndrom projevující se zvracením, nechutenstvím, odmítáním krmiva, akutními průjmy a poruchami koordinace pohybů [1, 75].

Deoxynivalenol (3,7,15-trihydroxy-12,13-epoxytrichothec-9-en-8-one, DON, syn. vomitoxin, Rd toxin) je produkován plísněmi rodu *Fusarium* (*F. Gramineraum*, *F. Roseum*, *F. Culmorum* aj.) a patří k nejčastěji se vyskytujícím mykotoxinům [35, 37]. Tyto mikroskopické houby způsobují fuzariózu klasu „Fusarium Head Blight“ (FHB) u pšenice a fuzariózu „ear rot“ u kukuřice – viz. obr. 6. Obr. 7 vystihuje zdravá zrna pšenice a zrna napadená fusariemi.

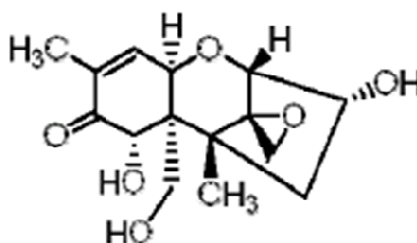


Obr. 6: Kukuřice napadená plísní rodu *Fusarium* (vlevo) a *Gibberella* (vpravo) [16]



Obr. 7: Porovnání zdravých (vpravo) a napadnutých zrn pšenice [41]

Všechny druhy experimentálních zvířat (např. myš, potkan) a hospodářských zvířat (např. prase, drůbež a přežvýkavci) jsou citlivé na přítomnost DON v krmivu v pořadí prase → myš → potkan → drůbež → přežvýkavci [16]. Vomitoxin vyvolává zvracení (vomitus), akutní průjmy, poruchy koordinace pohybů, náhlý úhyn. U přežvýkavců může být pozorováno snížení mléčné reprodukce. U drůbeže snižuje hmotnost vajec a kvalitu skořápky. U více druhů zvířat byla prokázána inhibice imunitních funkcí a snížení reprodukce. Přítomnost vomitoxinu (obr. 8) v krmivu nepřímo ukazuje na problémy s mykotoxiny a může sloužit jako marker pro přítomnost dalších mykotoxinů [42]. Podle doporučení EU činí nejvyšší tolerovaný obsah v denní dávce při dlouhodobém krmení selat 0,2 mg.kg⁻¹ krmiva, výkrmu prasat 0,6 mg.kg⁻¹, chovných prasat 1,0 mg.kg⁻¹. Pro kukuřice je to 2,0 mg.kg⁻¹, nosnice 5,0 mg.kg⁻¹ a u přežvýkavců rovněž 5,0 mg.kg⁻¹ krmiva [1, 13, 35].

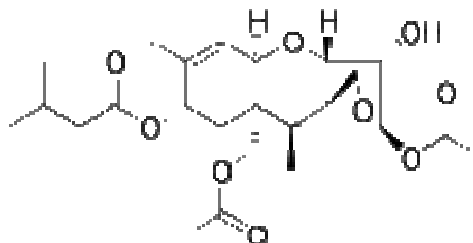


Obr. 8: Deoxynivalenol

T-2 toxin (obr. 9) je produkován *F. tricinctum*, *F. nivale*, *F. sporotrichioides*, které rostou na znu. U prasat vyvolává T-2 toxin nektrotické léze na rypáku. Aplikace T-2 toxinu na kůži prasat způsobuje její zduření a změnu barvy s následným odlupováním. V důsledku toxického

vlivu na krevní destičky dochází ke snížení srážlivosti krve. U prasat může T-2 toxin vyvolávat poruchy reprodukce – zhoršené zabřezávání, potraty nebo malé vrhy. T-2 toxin a jeho metabolity jsou asi z 0,2% vylučovány mlékem. U nosnic způsobuje snížení produkce vajec při příjmu krmiva obsahujícím koncentraci toxinu vyšší než $3 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$. U kuřat se může vyskytnout nekoordinovaný pohyb.

Na základě experimentů se zvířaty se T-2 toxin považuje za potenciálně karcinogenní a mutagenní sloučeninu [2].

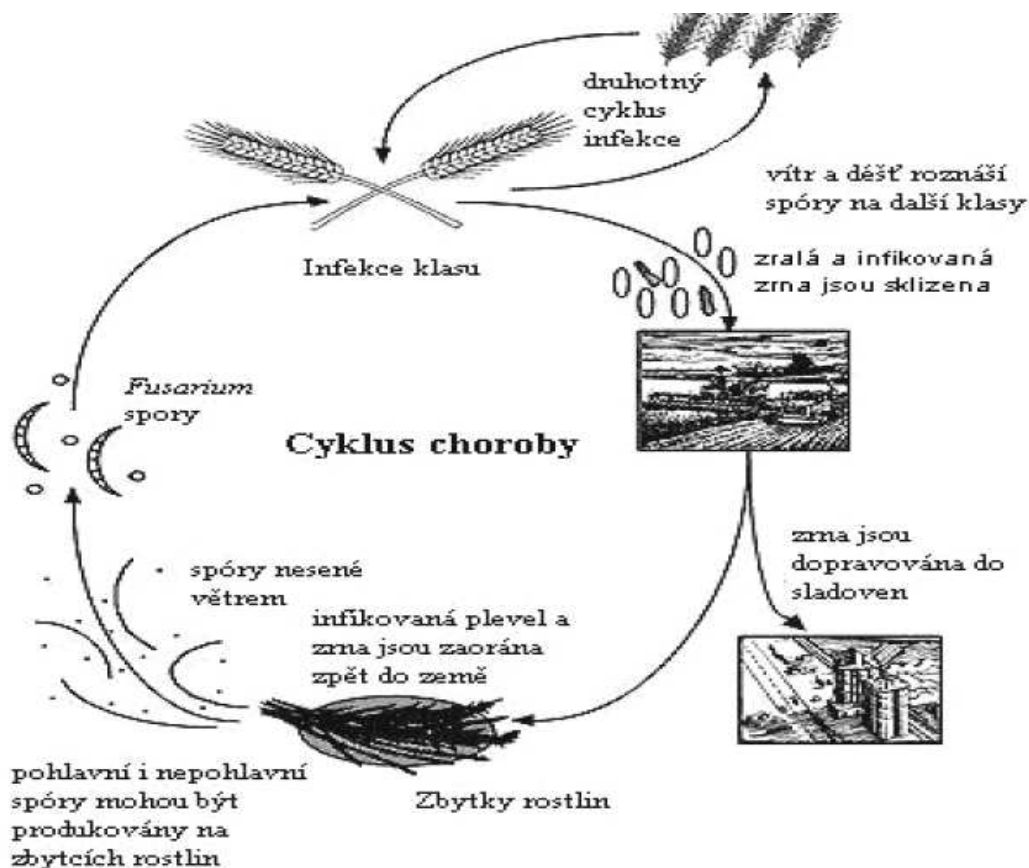


Obr. 9: T-2 toxin

1.3.6 Zearalenon

Zearalenon (F-2 toxin, ZEA, ZEN) je z hlediska chemické struktury lakton kyseliny β -ressorcylové [36, 38]. Mykotoxin je produkován více druhy plísní rodu *Fusarium* a *Gibberella* (*F. roseum*, *F. tricinctum*, *G. zae* a další). Plísně rostou hlavně na vlhkém obilí (22 až 25 %), skladovaném při nízkých teplotách [1, 3, 4, 38, 41]. S ohledem na své estrogení účinky se zearalenon označuje jako mykoestrogen [2, 8, 14, 20].

Zearalenon spolu s deoxynivalenolem se vyskytuje zejména v kukuřici, pšenici, žitu, ječmeni a ovsu. Na obr. č. 10 je naznačen cyklus napadení mikromycetami r. *Fusarium* [64].



Obr. 10: Cyklus choroby napadení mikromycetami rodu *Fusarium* [64]

V krmivech živočišného původu, zvláště v masokostních a rybích moučkách, bývá nejčastějším mykotoxinem [1]. Vzhledem ke své chronické toxicitě představuje zdravotní riziko pro člověka i hospodářská zvířata. Je ve skladovaných komoditách velice stabilní a jeho koncentrace se výrazně nemění ani po tepelném zpracování či fermentaci [36, 38, 42]. Estrogenní účinky zearalenonu se nejvíce projevují u prasat. Největší účinky má na prasničky ve stáří 6 až 7 měsíců.

Příznačným projevem intoxikace zearalenonem bývá vymizení říje nebo naopak déletrvající říje, pseudogavidita v důsledku perzistence žlutých tělísek na ovariích, snížená plodnost, menší vrhy a nižší hmotnost selat [1, 75]. Mortalita zvířat může být vysoká. Při vysokých koncentracích zearalenonu přechází tento mykotoxin do mléka prasnic v množství, dostatečném pro vyvolání klinických příznaků u sajících selat [1, 36].

K estrogenizaci prasniček a prasnic dochází především v zimě a časně zjara, protože plíseň, kterou je napadeno zrno, potřebuje období relativně nízkých teplot, aby mohla produkovat biologicky významná množství zearalenonu. Příznaky intoxikace se objevují za 3 až 6 dnů od začátku příjmu mykotoxinu, po přerušení zkrmování závadného krmiva brzo vymizí. U mladých kanců má zearalenon negativní vliv na spermiogenezi a při dlouhodobém působení může vyvolat atrofii varlat [1, 13].

Také u skotu se projevuje nepravidelná říje a snížená fertilita vyvolaná působením zearalenonu, ale celkově jsou estrogenní účinky slabší než u prasat. U prepubertálních jalovic mléčných plemen bylo při zkrmování zaplísněného obilí zaznamenáno zvětšení mléčné žlázy.

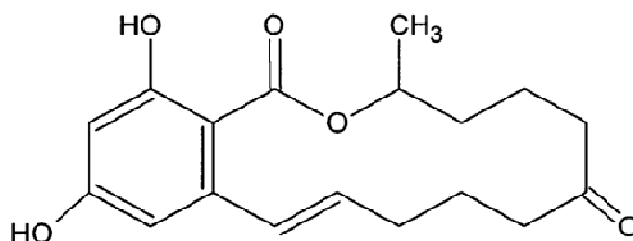
U ovcí dochází k přenosu zearalenonu do mléka.

Krmivo obsahující zearalenon vyvolalo poruchy reprodukce také v některých chovech králíků. V krmných směsích pro králíky bylo zjištěno pozitivních 63 % vyšetřovaných vzorků.

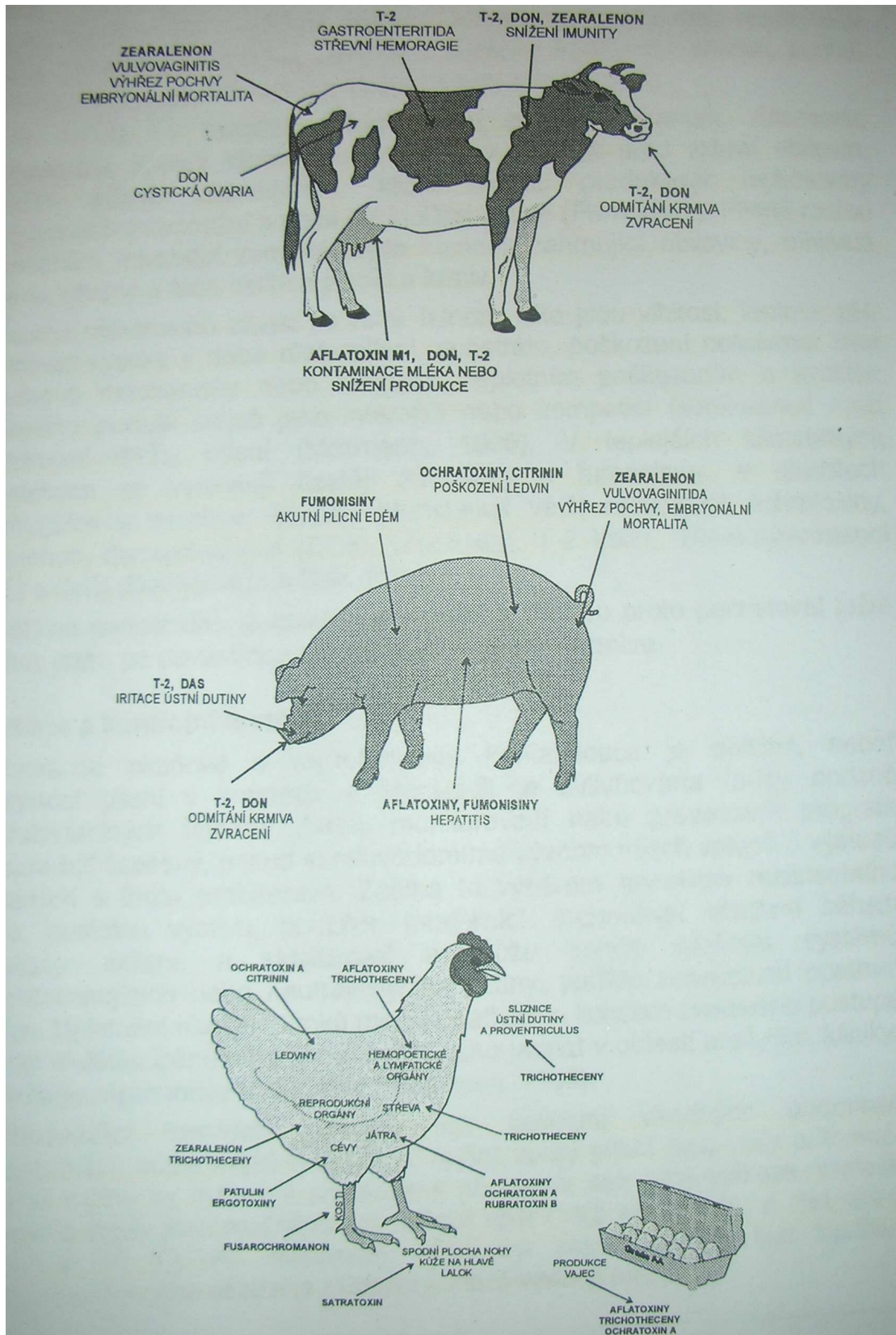
U nosnic může zearalenon způsobit viditelné změny na vejcovodech a snížení produkce vajec. U plemenné drůbeže, zejména u krocanů, dochází k morfologickým změnám spermií. Velmi citlivé jsou husy a kachny.

Indikací pro vyšetření krmiva na fusariové mykotoxiny v chovech prasat a drůbeže je špatný příjem nebo odmítání krmiva, poruchy reprodukce, snížené přírůstky a konverze krmiva v případě, že současně provedený rozbor krmiva byl v pořádku z hlediska obsahu živin, fyzikálních a chemických parametrů.

Mezinárodní agentura pro výzkum rakoviny (IARC) zařadila zearalenon do kategorie „omezeně karcinogenních látek“, registrován je také ve skupině látek s teratogenními účinky.



Obr. 11: Zearalenon



Obr. 12: Systémové účinky mykotoxinů na organismus hospodářských zvířat [1]

1.4 Maximální přípustné obsahy mykotoxinů

Tab. 6: Maximální přípustné koncentrace některých mykotoxinů v krmivech [1]

Kategorie zvířat	Krmivo	Maximální koncentrace [mg.kg ⁻¹]
Maximální koncentrace celkových aflatoxinů v krmivech		
Mláďata a drůbež	Kukuřice a podzemnice	0,02
Dojnice	Kukuřice a podzemnice	0,02
Chovný skot a prasnice	Kukuřice a podzemnice	0,1
Dospělá drůbež	Kukuřice a podzemnice	0,1
Prasata ve výkrmu	Kukuřice a podzemnice	0,2
Výkrm skotu	Kukuřice a podzemnice	0,3
Maximální koncentrace deoxynivalenolu v krmivech		
Přežvýkavci a výkrm skotu starší 4 měsíců	Zrniny a produkty pod 50% KD	10
Kuřata	Zrniny a produkty pod 50% KD	10
Prasnice	Zrniny a produkty pod 20% KD	5
Ostatní zvířata	Zrniny a produkty pod 40% KD	5

Tab. 7: Tolerované koncentrace [mg.kg⁻¹] některých mykotoxinů v kompletním krmivu [1]

Kategorie zvířat	Aflatoxin B ₁	Zearalenon	DON
Nosnice a drůbež	0,05	-	-
Prasata 34-57 kg	0,05	0,05	< 0,3
Prasnice	0,05	0,05	< 0,3
Dojnice	0,025	0,25	< 0,3
Skot	0,05	0,25	0,5

Kombinace dvou nebo více mykotoxinů, stres, špatná zoohygiena, nedostatky v řízení chovu, snížená kvalita výživy a poruchy zdravotního stavu (metabolické poruchy, parazitární a infekční onemocnění) snižují práh toxicity a koncentrace mykotoxinů ovlivňujících zvířata mohou být nižší, než je uvedeno v tabulce.

Imunosupresivní účinky mykotoxinů se mohou projevovat již při hodnotách nižších než uvedených, a to neúspěšnou vakcinací zvířat s nutností aplikaci antibiotik a chemoterapeutik.

Tab. 8: Orientační hodnoty pro kritické koncentrace mykotoxinů v krmivu [mg.kg⁻¹] [1]

Kategorie zvířat	Zearalenon	Deoxynivalenol
Prasničky	0,05	1
Prasnice a výkrm	0,25	1
Dojnice	0,5	5
Výkrm skotu	Bez doporučení	5
Nosnice a brojleři	Bez doporučení	5

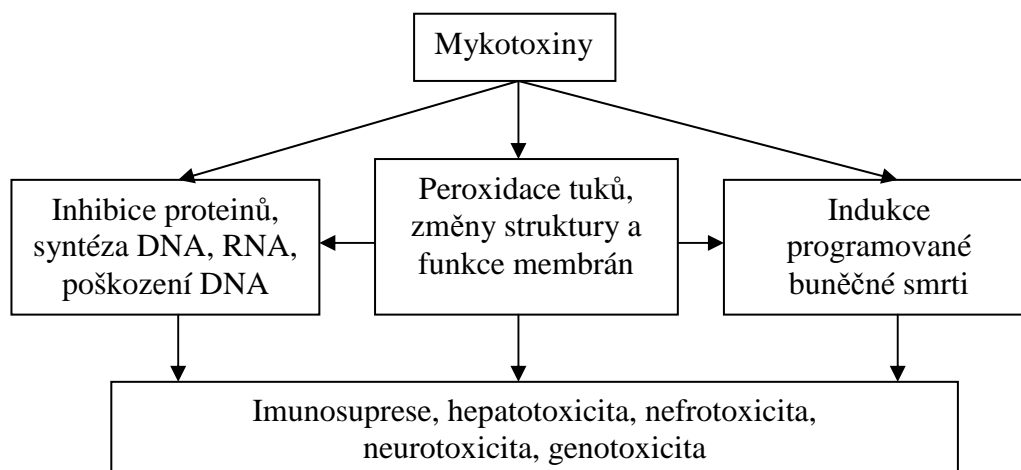
Evropská unie plánuje přijmout pevné limity pro aflatoxiny – např. u podzemnice olejné do 10 µg.kg⁻¹, pro přímou spotřebu lidí do 4 µg.kg⁻¹.

V ČR jsou mykotoxiny v potravinách, jmenovitě aflatoxiny, deoxynivalenol, patulin a ochratoxin A limitovány ve vyhlášce MZ 298/97 Sb. V zemích EU jsou aflatoxiny v potravinách limitovány ve směrnici EU č. 1525-98.

Limity na přípustné množství spor plísní v krmivech nejsou u nás zavedeny s výjimkou krmiv uvedených ve vyhlášce 287/1999 Sb., o mikrobiologických požadavcích na potraviny.

1.5 Biologické účinky mykotoxinů

Jednotlivé mykotoxiny mají různé biologické účinky, které závisejí na jejich chemické struktuře a na živočišném druhu, viz. obr. 13. Mohou být karcinogenní, teratogenní, genotoxické, hepatotoxické, neurotoxické, hematotoxické, imunosupresivní, estrogenní, tremorgenní nebo mutagenní [8]. Vedle všeobecné toxicity mohou specificky působit na některé orgány a tkáně [1, 22].



Obr. 13: Hlavní mechanismy mykotoxinové toxicity [6]

Toxicita mykotoxinů se testuje na různých modelech. Z obratlovců se nejčastěji používají myši, potkani a slepice. Kromě nich se k testování toxicity využívá vysoká citlivost některých bezobratlých živočichů a v poslední době také buněčných kultur.

1.5.1 Neurotoxicita

Neurotoxické účinky byly prokázány u různých mykotoxinů s klinickými projevy třesu a chvění.

1.5.2 Imunotoxicita

Imunosupresivní účinky mají některé trichotheceny, produkované především fusarií a ochratoxiny. Na základě dosavadních údajů jsou mezi mykotoxiny s imunotoxickými účinky zahrnovány např. ochratoxin A, citrinin, fumonisiny, zearalenon, deoxynivalenol, T-2 toxin a aflatoxiny. Následkem poruch imunitního systému dochází ke snížení odolnosti proti infekcím. Mykotoxiny způsobují snížení počtu bílých krvinek, snížení hladin imunoglobulinů (protilátek) a obsahu celkových proteinů v krevním séru.

1.5.3 Teratogenita

Teratogenní účinky v důsledku inhibice biosyntézy proteinů byly pozorovány v případě chronických toxikóz aflatoxinem B₁ a ochratoxiny.

1.5.4 Mutagenita

Mykotoxiny, které interferují s DNA, mohou mít mutagenní nebo karcinogenní vlastnosti. Byly potvrzeny mutagenní účinky aflatoxinu B₁ a dalších mykotoxinů.

1.5.5 Karcinogenita

Karcinogenní účinky některých mykotoxinů byly potvrzeny v pokusech na zvířatech a přibývá důkazů, že alespoň aflatoxiny způsobují nádory jater u lidí.

Mezi nejúčinnější karcinogeny patří aflatoxin B₁ a sterigmatocystin.

Mezinárodní agentura pro výzkum rakoviny kategorizuje vybrané mykotoxiny z hlediska karcinogenních účinků. Zatím byl z mykotoxinů prokázán jako karcinogen pro člověka pouze aflatoxin B₁. Komise pro potravinářské přísady a škodlivé látky, sestavená z odborníků FAO a WHO stanovila expoziční standardy vybraných mykotoxinů.

Tab. 8: Karcinogenita a expoziční standardy některých mykotoxinů [1]

Mykotoxin	Karcinogen	Expoziční standardy
Aflatoxiny	1	ALARA – nejnižší možný přívod
Deoxynivalenol	3	1250 ng.kg ⁻¹ tělesné hmotnosti / den
Ochratoxin A	2B	100 ng.kg ⁻¹ tělesné hmotnosti/týden
Patulin	3	0,4 ng.kg ⁻¹ tělesné hmotnosti / den
Zearalenon	3	500 ng.kg ⁻¹ tělesné hmotnosti / den

1 – prokázáný karcinogen pro člověka

2B – možný karcinogen pro člověka

3 – zatím není klasifikován jako karcinogen pro člověka

1.6 Účinky mykotoxinů na zdravotní stav a reprodukci zvířat

Vzhledem k tomu, že mykotoxiny jsou mimořádně stabilní organické látky a jejich toxicita nebývá běžnou úpravou krmiv podstatně snížena, mohou se už při relativně slabém zaplísnění substrátu (méně než 1 tisíc spor v 1 gramu) tvořit dostatečná množství mykotoxinů pro vyvolání poruch zdravotního stavu zvířat [1]. Mykotoxiny mohou u zvířat a člověka vyvolat řadu změn:

- vyvolávají patologické změny na orgánech (játra, ledviny, CNS)
- vyvolávají sníženou plodnost (estrogenní syndrom – mykotické zmetání),
- vedou k alergickým reakcím,
- způsobují oslabení imunitního systému, klesá odolnost organismu vůči infekčním onemocněním, prokázána byla snížená aktivita T nebo B lymfocytů a potlačení produkce protilátek (koncentrace i účinnost) jako jsou imunoglobuliny (snížená účinnost vakcinace i terapeutický účinek léčiv). Imunosupresivní účinky se u jednotlivých mykotoxinů (aflatoxin, vomitoxin, T-2 toxin, ochratoxin, fumonisiny) značně liší a i mechanismus jejich působení na imunitní systém je rozdílný podle druhu mykotoxinu,
- způsobují změnu v membránových strukturách buněk a peroxidaci polynenasycených kyselin uvnitř těchto membrán,
- mají mutagenní, kancerogenní, teratogenní účinky,
- hromadí se a vylučují v produktech, často v metabolicky a toxikologicky aktivnějších formách a tím ohrožují zdraví člověka [13].

Celkový toxický účinek mykotoxinů na zvířata je dán:

- druhem mykotoxinu,
- přijatou dávkou mykotoxinu (chronická nebo akutní mykotoxikóza),
- přítomností více druhů mykotoxinů (výrazné zvýšení toxicity, např. kyselina penicilová a citrinin, směs trichothecenových mykotoxinů,

- délkou zkrmování,
- druhem zvířete, rozdílná je citlivost jednotlivých druhů, ale i kategorií zvířat,
- pohlavím, různá citlivost samců a samic, estrogenní aktivita,
- výživným stavem, podvyživená zvířata jsou citlivější,
- fyziologickým stavem - vyčerpání, gravidita,
- patologickým stavem (nemoc) [10, 13, 20].

1.6.1 Akutní a chronické mykotoxikózy

U hospodářských zvířat se mykotoxikózy mohou vyskytovat jako:

- akutní mykotoxikózy, které vznikají po požití vyšších dávek mykotoxinů, což způsobuje specifický a klinicky zjevný akutní syndrom onemocnění nebo smrt (např. akutní hepatitida při aflatoxikóze);
- chronické mykotoxikózy, které se vyskytují při opakovaném příjmu středních a nízkých množství toxinů, mají subklinický průběh a tím vesměs unikají pozornosti. Projevují se sníženou užitkovostí – zpomalený růst, snížená laktace a snáška, poruchami imunitního systému a rozmnožování a zhoršenou tržní jakostí živočišných produktů. Snížená bývá využitelnost krmiv.

Tab 9: Hodnoty LD₅₀ některých mykotoxinů (mg.kg⁻¹ živé hmotnosti) [1]

Druh mykotoxinu	skot	sele	slepice	kuře
Aflatoxin B		0,62		
Ochratoxin A			Až 0,16	Až 3,9
Patulin			170	
T-2 toxin	0,6			

Mezi silně toxické mykotoxiny jsou řazeny např. alfatoxiny, patulin, ochratoxin A, zearalenon, T-2 toxin, mezi středně toxické citrinin a kyselina penicilová – viz. tab. 10.

Tab. 10: Citlivost některých druhů zvířat na mykotoxiny [1]

Mykotoxin	Dojnice	Prasata	Drůbež
Aflatoxiny	+	+	++
Fumonisin	+	+	+
Ochratoxiny		+	+
T-2 toxin	+	-	+
Deoxynivalenol	+	++	+
Zearalenon	+	++	+

Tab. 11: Toxické koncentrace některých mykotoxinů v krmivech [1]

Aflatoxiny	200 - 500 µg.kg ⁻¹
Fumonisin	5 mg.kg ⁻¹ pro nepřežvýkavce 100 mg.kg ⁻¹ pro přežvýkavce

Deoxynivalenol	2 – 10 mg.kg ⁻¹
T-2 toxin	100 µg.kg ⁻¹
Zearalenon	200 – 300 µg.kg ⁻¹

Tab. 12: Třídění a obecná charakteristika mykotoxikóz u hospodářských zvířat [1]

Mykotoxin	Plíseň	Onemocnění	Klinické příznaky	Druh zvířete	Substrát
Aflatoxiny	<i>Aspergillus flavus</i> a další	aflatoxikóza	Slepota, chůze dokola, křeče, pěna u tlamy, úhyn během 48 hod.	Prasata, ovce, skot	Skladované obilí, mleté ořechy, arašídý, plesnivý chleba, plodiny na poli
Fumonisy	<i>Fusarium moniliforme</i>	leukoencefalomalácie koní	Třes, nejistý pohyb, neschopnost polykat, deprese, polehávání, úhyn	Koně, osli	Plesnivé obilí, uskladněné nebo stojící na poli
Ochratoxiny	<i>Aspergillus ochraceus</i>	nefropatie	Průjem, žíznivost, polyurie	Všechny druhy, zejm. prasata	Skladované obilí
Nemakrocyclické trichotheceny (T-2 toxin, deoxynivalenol)	<i>Fusarium sporotrichoides</i> , <i>F. roseum</i> , <i>F. culmorum</i>	fuzariotoxikóza	Zvracení, odmítání krmiva, průjem, vředy, poruchy reprodukce	Všechny druhy	Skladované obilí
Zearalenon	<i>Fusarium roseum</i> , <i>F. culmorum</i> , <i>Giberella zeae</i> a další	estrogenní syndrom	Poruchy plodnosti samců a samic, zduření vulvy, vagíny a mléčné žlázy, výhřez rekta	Prasata, skot	Plesnivá kukuřice nebo ječmen

1.7 Vyšetření na přítomnost plísní v krmivech

Vyšetření plísněvé kontaminace spolu s vyloučením přítomnosti mykotoxinů tvoří nezbytné podklady pro hodnocení zdravotní nezávadnosti krmiv. Obsah plísní (spor) v krmivu není vždy v korelaci s mykotoxinovou kontaminací. U zdravých zvířat spory plísní procházejí

zaživacím traktem, který nijak nepoškozují, a tak se spory dostávají s výkaly zvířat zpět do prostředí, především do půdy.

Při vyšetření na přítomnost plísní kultivačním vyšetřením, při kterém se zjišťuje intenzita kontaminace krmiva spory plísní po jejich vyklíčení v laboratorních podmínkách, se nálezy hodnotí křížkovou metodou. Intenzita kontaminace se značí jako ojedinělá (+), slabá (++) , střední (+++) a silná (++++).

Objektivnější je metoda stanovení obsahu životaschopných spor plísní – kolonie tvořících jednotek (KTJ) v daném množství krmiva (1g). Limity na přípustná množství spor nejsou u nás zavedeny. Počty spor plísní v krmivech v řádech 10^5 až 10^6 jsou považovány za nežádoucí.

Orientační metodou pro předběžnou identifikaci plísňové kontaminace je vizuální posouzení pigmentace plísní pomnožených na krmivu. Například *Aspergillus parasiticus* produkuje aflatoxiny vytváří na krmivech tmavě zelené zbarvení, druhy rodu *Fusarium* produkuje trichotheceny, zearalenon a jiné jsou narůžovělé a *Aspergillus ochraceus* produkuje ochratoxiny má zbarvení pískově žlutohnědé. Se stářím plísňových kultur se intenzita pigmentace mění.

K exaktnímu posouzení intenzity plísňové kontaminace je bezpodmínečně nutné provést kultivační vyšetření plísní. Kvalitativním vyšetřením se určuje druhové zastoupení s typizací potenciálních patogenních a toxigenních plísní. Kvantitativním stanovením plísní se určuje obsah plísní v 1 gramu krmiva. Při celkovém hodnocení zaplísňenosti krmiva se bere v úvahu významnost izolovaných druhů plísní z hlediska patogenity a toxicity a dále intenzita jejich výskytu v krmivu pro určitou kategorii zvířat. Veškeré podklady pro hodnocení jsou vztahovány k citlivosti a vnímavosti jednotlivých kategorií zvířat, pro které je krmivo určeno. Z hlediska požadavků na zdravotní nezávadnost krmiva jsou za prioritní považována mláďata, zvířata chovná, březí a v období aktivní fáze reprodukce.

Kde se provádí vyšetřování krmiv

Vyšetření krmiv na přítomnost plísní a mykotoxinů se provádí ve Státních veterinárních ústavech (Brno, České Budějovice, Hradec Králové, Jihlava, Olomouc, Praha). Stanovení mykotoxinů zahrnuje většinou aflatoxin B1, G1, M1, ochratoxin A, patulin, deoxynivalenol (DON, vomitoxin), T-2 toxin, zearalenon (F-2 toxin, ZEA).

Stanovení plísní a mykotoxinů převážně v potravinách, včetně cereálií, provádějí:

- Centrum hygieny potravinových řetězců v Brně (pracoviště Státního zdravotního ústavu Praha), jehož součástí je Národní referenční centrum pro mikroskopické houby a jejich toxiny v potravinových řetězcích;
- Krajské hygienické stanice (Brno, Hradec Králové, Ostrava, Plzeň, Středočeský kraj, Ústí nad Labem);
- Krajský inspektorát České zemědělské a potravinářské inspekce v Olomouci.

Prevence mykotoxikóz (veterinární kontrola v chovech, technologie výroby krmiv)

Z pohledu ochrany zdraví spotřebitele se v současnosti stává prioritou zajištění zdravotní nezávadnosti potravin. Bezpečnost potravinového řetězce je ovlivňována řadou faktorů. Významně se zde uplatňuje biotechnologie výroby zemědělských produktů, zvláště pak oblast výroby krmiv a jejich zdravotní nezávadnost.

Závažné riziko pro kvalitu krmiv, užitkovost zvířat a jejich zdraví, ale i pro bezpečnost potravin a zdraví lidí představují plísně a mykotoxiny. FAO odhaduje, že 25% světových zásob zrnin je ročně kontaminováno mykotoxiny. Ekonomické ztráty v chovech

hospodářských zvířat způsobené kontaminací zásob krmiv mykotoxiny se odhadují na miliony dolarů.

Pro monitorování výskytu plísní a mykotoxinů a pro jejich kontrolu je nezbytné pochopit význam řady faktorů ovlivňujících jejich produkci.

1.8 Kontaminace zrnin a dalších krmiv

Plísně jsou pravidelně nacházeny v půdě. Nepříznivé počasí a nevhodné podmínky ošetřování mohou umožnit životaschopným sporám plísní klíčení, růst a pomnožení v krmných surovinách přímo na poli. Rozmnožují se sporama, které se v prostředí šíří větrem a hmyzem a mohou napadat rostliny během jejich růstu [1, 13]. Např. *Fusarium* napadá zárodečné tkáně semen rostlin. Poškození povrchové vrstvy obalu semen, např. kukuřice a dalších zrnin, způsobené hmyzem, stresem, příp. dalšími faktory (teplota, vlhkost, vegetační stádium a další) mohou usnadnit pomnožení plísní a tvorbu mykotoxinů.

Mezi širokou škálu faktorů ovlivňujících šíření plísní a tvorbu mykotoxinů řadíme vysokou teplotu, vydatné deště, hustotu rostlinného porostu, mechanickou sklizeň, vegetační stadium, kontinuální sklizeň, sucho, rostlinnou varietu, strukturu půdy, deště během sklizně, mráz.

Produkce mykotoxinů je ovlivněna faktory biotickými, mezi které zařazujeme přítomnost jednoho resp. více druhů toxikogenních plísní, což může vést k synergickým a antagonistickým vztahům. Mezi faktory abiotické patří vlhkost substrátu (min. 14%), relativní vlhkost vzduchu (min. 65%), teplota substrátu a vnějšího prostředí. Nejdůležitější je tzv. vodní aktivita (a_w). Je to poměr tlaku vodní páry nad potravinou nebo krmivem a tlaku nad vodou za dané teploty. Jde o vodu, která není vázaná na molekuly rozpuštěných látek a je využitelná mikroorganismy. Plísně rostou při a_w 0,75 a jejich rozvoj ustává při a_w pod 0,65. Pro produkci mykotoxinu u většiny plísní je vhodné rozmezí 15 až 30 °C s optimem 25 °C. Plísně a zejména jejich spory přežívají i při extrémně nízkých i vysokých teplotách. Důležitý je obsah kyslíku (O_2) v prostředí. Pokles koncentrace O_2 pod 1 % vede k útlumu produkce mykotoxinů (aflatoxin). Výjimkou je plíseň *Fusarium verticillioides*, která je schopna růst v prostředí s obsahem až 60 % CO_2 . Obecně lze konstatovat, že plísním vyhovuje spíše kyselé, než zásadité prostředí [13].

Plísně kontaminují zrniny a krmné plodiny v průběhu celého výrobního procesu, tzn. pěstování, sklizně, transportu a zejména pak při skladování a konzervaci [13]. Lze rozlišit tři skupiny plísní: polní plísně (*Fusarium*, *Alternaria*, *Cladosporium*, apod.), které jsou přítomny v znu již před sklizní obilovin, skladištní plísně (*Aspergillus*), které mohou produkovat mykotoxiny v podmínkách skladování a polní i skladištní plísně (*Penicillium*) [1, 13]. Plísně rostou na značném množství zemědělských komodit zahrnující obiloviny, olejnatá semena, ořechy a řadu dalších plodin a krmiv.

Jakmile plísně kolonizují krmiva, začnou využívat jejich živiny pro svůj metabolismus a rozmnožování a snižují jejich obsah. Výrazně kontaminovaná kukuřice může po zaplísnění ztratit až 10% metabolizované energie a 5% bílkovin. Metabolická činnost hub je v krmivech spojena s anaerobním dýcháním, při kterém se spotřebovávají významné živiny, především tuky a sacharidy. U kontaminované kukuřice se po 50 dnech skladování sníží obsah tuku o 52 až 57 %. Tím dochází k výraznému snížení energetického složky krmiva [13].

Kontaminace krmiv plísněmi je v některých geografických oblastech velmi vysoká – u objemných krmiv i přes 90%, u jaderných krmiv určených pro výživu telat a prasat do 90% a u jaderných krmiv pro drůbež až 100% [13].

Tvorba mykotoxinů závisí na řadě faktorů jako jsou vlhkost, teplota, pH, přítomnost kyslíku v době růstu plísní, substrátu, poškození celistvosti zrna způsobené mechanicky nebo hmyzem, teplotním poškozením a kvalitou plísňového inokula stejně jako interakcí nebo konkurencí mezi jednotlivými druhy plísní. V teplejších klimatických podmínkách se vyskytují aflatoxiny a fumonisiny, v oblastech s vysokou vlhkostí jsou to ochratoxiny, ZEA, DON, T-2 toxin [1, 42].

1.9 Prevence a kontrolní metody

Prevence vzniků mykotoxinů je jedním z nejvýznamnějších opatření. V průběhu výroby, transportu a uskladnění krmiv je obtížné zajistit takové podmínky a ošetření krmiv, aby bylo zabráněno jejich kontaminaci sporami, růstu plísní a produkci mykotoxinů [13].

Preventivní opatření by měla zabránit:

- infekci již při pěstování a sklizni krmiv
- střídání plodin v osevních postupech, omezit vliv předplodin
- zpracování půdy,
- výběr vhodné odrůdy, hybridu,
- protiplísňové ošetření osiv (fungicidy – mořidla),
- vyrovnaná výživa porostů,
- boj proti plevelům (rezervoární organismy),
- boj proti škůdcům a chorobám,
- šlechtění odrůd odolných proti houbovým chorobám a škůdcům (GM – odrůdy),
- dodržování všech agrotechnických zásad při pěstování kulturních plodin
- zabránit mechanickému poškození zrna (při sklizni a uskladnění nebo jakékoliv manipulaci),
- kvalitní ošetření a uskladnění krmiv po sklizni,
- po sklizni cereálií do 48 hodin snížit vlhkost pod 14%,
- kontaminaci a růstu plísní při skladování a konzervaci krmiv [8, 17].

1.9.1 Před sklizňová opatření

Opatření vedoucí k minimalizaci kontaminace zemědělských plodin v před sklizňovém období.

1.9.2 Posklizňová opatření

Úspěšná ochrana plodiny před napadením toxinogenními plísněmi začíná již okamžikem sklizně. Plodiny je třeba sklízet v plné zralosti, kdy je obsah vlhkosti nejnížší a případně ještě před vlastním skladováním dosušit. Nutné je též důsledně vyloučit možnost kondenzace vody [2].

Skladování krmných komodit bez zajištění vhodných podmínek a ošetřování může zvýšit růst plísní, neboť spory plísní jsou vždy přítomné. Kvalitní zrniny by měly být skladovány při menší než 14% vlhkosti, protože vlhkost a kyslík jsou nezbytné pro klíčení spor (14,5 až 15,5 %) a růst plísní (13,5 až 14 %). Při skladování musí být krmiva suchá, bez kyslíku, fermentována nebo ošetřena přípravky, které inhibují plísně [1, 13].

Při zjištění určitých klinických příznaků u zvířat můžeme mít podezření, že krmivo je mykotoxiny kontaminováno. Např. u skotu je možné pozorovat omezený příjem krmiva, nízké přírůstky a sníženou produkci mléka, zvýšený výskyt potratů a mortality embryí, tiché říje, nepravidelný pohlavní cyklus, nižší procento zabřezávání, záněty dělohy, sníženou imunitu, ztučnění jater a rezidua v mléce.

U drůbeže shledáváme zhoršený růst, snížený příjem krmiva, sníženou líhivost a deformovaná vejce, ztučnění jater, snížený počet bílých krvinek (T-lymfocytů, fagocytů).

Prasata projevují nechutenství, poruchy plodnosti, průjmy, zvracení, změněné biochemické ukazatele krve.

1.10 Vzorkování krmiv pro analýzy

Stanovení mykotoxinů v krmivu je poměrně nákladná záležitost, proto je nutné zajistit taková vyšetření, která by měla co nejvyšší vypovídací schopnost. Je zjištěno, že chybné vzorkování a odběr poměrného vzorku z odebraného celkového vzorku tvoří většinou přes 90% celkové chyby. Největší problémy jsou s vyšetřováním obilnin, které jsou skladovány v tisícitunových silech. Odebrání jednoho náhodného vzorku ze sila nemá žádný význam, nález mykotoxinu je ovlivněn vysokou mírou náhody [1, 13].

V momentě vyšetření nemusí již být toxigenní houba zachycena, přestože příslušný toxin je v krmivu přítomen. Vystavení zvířat vlivu více než jednoho mykotoxinu může vyvolat příznaky odlišné od působení stejných mykotoxinů samostatně. Při vzájemném spolupůsobení více mykotoxinů dochází k synergismu, tj. k zesílení jejich účinků na organismus zvířat. Relativně nebezpečnější než akutní intoxikace je dlouhodobé působení nízkých hladin mykotoxinů, vedoucí k oslabení imunitního systému, zvýšenému výskytu sekundárních infekcí, snížení užitkovosti a plodnosti [1].

Vzhledem k heterogennímu rozložení mykotoxinů v krmivu a z toho vyplývající možnosti značné chyby vzniklé odběrem vzorků, časté přítomnosti více druhů mykotoxinů a neexistenci referenčních metod analytických stanovení pro většinu mykotoxinů, nelze jakoukoliv hladinu mykotoxinů v krmivu považovat za zcela bezpečnou [1].

Z těchto důvodů, pokud je požadováno provedení testu na stanovení mykotoxinů, je technika vzorkování rozhodující. Vzorkování vyžaduje odebrat několik menších vzorků (optimálně 20 dílčích vzorků), jejich sloučení a důkladné promíchání před získáním konečného k analýzám použitelného vzorku [1, 13].

1.11 Dekontaminace mykotoxinů – prevence a kontrolní metody

Na dekontaminaci lze pohlížet jako na proces řešící již vzniklou situaci, kdy jsou v krmivu mykotoxiny přítomny [13].

K dekontaminaci krmiv jsou využívány metody fyzikálně chemické (např. vodný roztok chloridu vápenatého, čpavkování, kombinace tepla a tlaku), i degradace mykotoxinů za využití enzymů esterázy a epoxidázy, nebo kombinace minerálních jíílů s enzymy s cílem nejen ochránit zdraví hospodářských zvířat, ale také s cílem zabránit ekonomickým ztrátám [1, 2, 13].

1.11.1 Fyzikálně chemické dekontaminační postupy

Většina mykotoxinů má velmi pevnou chemickou strukturu, která zajišťuje jejich velkou stabilitu jak při působení vysokých teplot, tak při nízkých hodnotách pH [1, 9, 13]. Koncentrace mykotoxinů v napadených zrnech či semenech může dosáhnout i desítek mg.kg⁻¹. Z tohoto důvodu je jedním z účinných opatření pro snížení rizika kontaminace potravin mechanické odstraňování napadených částic, ať již realizované ručně nebo jiným způsobem. Ke změnám v obsahu mykotoxinů dochází také při mletí, případně mytí [2].

Řadu mykotoxinů lze rozložit zahřátím nebo kombinací tepla a tlaku, obvykle za přítomnosti vody. Citlivost na teplo závisí na typu mykotoxinu, teplotě a době jejího působení

a obsahu vody v krmivu. Pro zearalenon, patulin, ochratoxin A je tento způsob ale neúčinný. Zvláště odolné jsou trichotheceny. Aflatoxiny se za normálního tlaku rozkládají až při 360°C.

Čpavkováním a louhováním krmiv lze podstatně snížit množství aflatoxinů, ochratoxinů, patulinu a zearalenonu [1, 13]. Nejvýznamnějším způsobem dekontaminace je reakce s amoniakem. Dalšími testovanými činidly byly chlornan sodný a peroxid vodíku [2].

1.11.2 Použití enzymů

Mezi novější postupy dekontaminace mykotoxinů patří použití enzymů. Jsou dostupné enzymy na inaktivaci mykotoxinů, např. zearalenonu, trichothecenů zahrnující T-2 toxin, deoxynivalenol, nivalenol. Enzymy degradují toxin rozštěpením molekuly na neškodné metabolity [1].

1.12 Metody detekce mykotoxinů

Metody používané k detekci mykotoxinů ve vzorcích podezřelého krmiva nebo potravin lze rozdělit na chemické a biologické.

Z chemických metod patří na první místo chromatografické metody, které jsou používané v experimentální i běžné laboratorní praxi. Pro stanovení mykotoxinů je z hlediska náročnosti a přístrojového vybavení nejdostupnější tenkovrstvá chromatografie, uplatňuje se nově i vysokoúčinná kapalinová chromatografie a v neposlední řadě plynová chromatografie.

Biologické metody analýzy mykotoxinů se zakládají zejména na jejich toxicitě, chemické struktuře nebo na specifických účincích. Toxicita mykotoxinů se určuje pomocí mikroorganismů, buněčných nebo tkáňových kultur, bezobratlých nebo obratlovců. Na zjišťování akutní nebo chronické toxicity se často používají např. kuřecí embrya.

V posledních letech se začaly k detekci a kvantifikaci mykotoxinů využívat imunologické testy RIA (radioimmunoassay) nebo ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay). [37] RIA je technika, kterou se zjišťuje koncentrace rozpustného antigenu na základě určení jejich množství v imunokomplexech vzniklých po reakci se specifickou protilátkou. Používá se přitom antigen označený radioaktivním radioizotopem a série jeho standardních roztoků se známou koncentrací. ELISA je enzymová imunoanalýza, při které antigen nebo protilátka je imobilizovaná navázáním na tuhý nosič – obvykle stěna zkuševky nebo jamky v mikrotitrační desce [1]. Metoda ELISA je vhodná pro detekci aflatoxinů, zearalenonu, ochratoxinů, DON a T-2 toxinu [9]. Provádí se extrakce metanolem a po přidání konjugátu protilátky s enzymem a chromogenu vznikne barevný produkt, který je kvantitativním ukazatelem prokazovaného mykotoxinu. Čím víc mykotoxinu vzorek obsahuje, tím více vazebných míst je obsazeno. Naváže se méně konjugovaného antigenu a výsledná barevná reakce je slabší [42].

1.12.1 Enzymová imunoanalýza

ELISA (Enzyme-linked Immuno Sorbet Assay; enzymová imunoanalýza s vázaným enzymem na imunosorbent) je jedním z nejcitlivějších testů na bázi imunoenzymatické reakce, který je používán jak k detekci protilátek, tak také pro zjišťování přítomnosti antigenu [66]. ELISA zvláštním typem EIA (Enzyme Immuno Assay; enzymová imunoanalýza). Obě metody patří k imunoanalýze se značenými reaktanty, založené na fotometrických principech [19].

Široké rozšíření ELISA testu vedlo k vývoji komerčních diagnostických souprav a výrobě přístrojů, které techniku ELISA usnadňují. Standardní uspořádání testů v mikroplotnách používají především diagnostické laboratoře a zkušebny, které podle počtu vyšetřovaných vzorků používají v různé míře přístrojovou techniku od ručního provedení, přes poloautomatické uspořádání (s použitím dávkovačů vzorků a protilátek, promývaček a vyhodnocení výsledků ELISA-readrem spojeným s počítačem) až po použití plných automatů, které samostatně provádějí rutinní typy ELISA ve velkých sériích vzorků [66].

ELISA představuje dobrý kompromis, pokud jde o citlivost, rychlost a nákladnost [1]. Mezi další výhody patří dostupnost hotových komerčních kitů, snadná extrakce a minimální nutnost čištění extraktu, vysoká specifita či srovnatelnost výsledků s chromatografií [8].

1.12.1.1 Definice používaných termínů v ELISA

ELISA používá v imunologickém testu enzymy, připojené k jednomu z reaktantů. Po přidání vhodného substrátu dochází k vývoji barvy, jejímž vyhodnocením (kvantifikací) se získají kvantitativní výsledky. ELISA tedy zahrnuje postupné přidávání a reakci látek se substancí vázanou na pevné fázi, včetně inkubace a separace vázaných a volných reagentů promytím. Enzymatická reakce slouží k poskytnutí barvy a ke kvantitativnímu určení reakce, použitím enzymaticky značeného reaktantu [19, 70]. Síla barevné reakce je závislá od počtu přítomných molekul enzymu a představuje tak míru obsahu antigenu ve vyšetřovaném vzorku. Při odečítání volným okem získáme alespoň semikvantitativní výsledek [65]. Tzn., že se srovnává pouze zabarvení negativních kontrol s vyšetřovanými vzorky. Za pozitivní se považují ty vzorky, které vykazují tmavší zabarvení než negativní kontrola [66].

Jako pevná fáze obvykle slouží mikrotitrační deska s jamkami. Komerčně dostupné jsou speciálně připravené ELISA desky, které mají 8 x 12 jamek. Používají se i tzv. stripy, což je část ELISA desky obsahující 8 jamek, uchycené v ELISA rámečku. (Viz. obr. 9)



Obr. 14: ELISA rámeček se stripy (vlevo). Speciálně připravené ELISA desky (vpravo)

Adsorpcí je myšleno přidávání antigenu nebo protilátky a jejich pasivní navázání na pevnou fázi při inkubaci. Toto je jednoduchá cesta pro imobilizaci jednoho z reaktantů v ELISA a jeden z hlavních předpokladů její úspěšnosti.

Promytí je jednoduché naplnění a vyprázdnění jamek, důležité pro separaci vázaných a nenavázaných reagentů v ELISA.

Substrát používaný v ELISA je chemické sloučenina, se kterou enzym specificky reaguje. Tato reakce je využívána k vytvoření signálu, který je charakterizován mírou intenzity zbarvení. Chromofor je chemická látka, která následkem enzymatické interakce se substrátem mění barvu.

Zastavením se při stanovení myslí proces ukončení reakce enzymu se substrátem. Tento krok má vliv na zastavení jakékoliv další změny barvy v ELISA.

Nakonec tzv. čtení, což znamená měření barvy vyvolané v ELISA. Výsledek je možno hodnotit buď pouhým okem (vizuálně), nebo pomocí čtecího zařízení (ELISA-reader), které na principu fotometrie měří intenzitu barevné reakce (absorbanci) v jednotlivých jamkách mikrotitrační destičky. Pro intenzitu zbarvení se také často používá označení optická denzita (OD). Při fotometrickém hodnocení se měří absorbance standardních (nebo kontrolních) a vyšetřovaných vzorků. Při vyhodnocování je nutné sestavit kalibrační křivku ze

standardních vzorků (viz. příloha 5) a z ní odečítat množství antigenu či protilátky ve vzorku vyšetřovaném [66].

1.12.1.2 Základní systémy ELISA

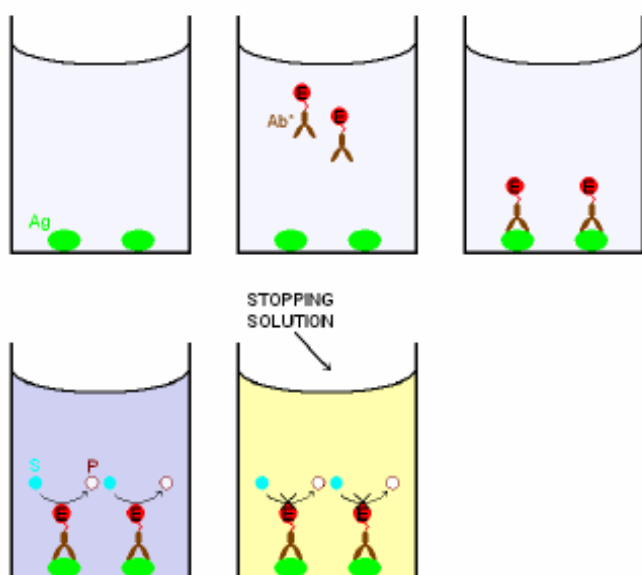
Existuje několik způsobů provedení, které se liší ve způsobu provedení detekce, imobilizované jsou buď protilátky nebo antigeny: přímá ELISA, nepřímá ELISA, „sendvičová“ ELISA [19, 71].

Imunoanalýzu lze rozdělit na kompetitivní a nekompetitivní. Kompetitivní imunoanalýza využívá protilátku, která je v reakci přítomna v omezeném množství. O její vazebná místa „soutěží“ značený antigen, který je v mírném přebytku, s antigenem neznačeným, který je stanovovaným vzorkem. Kvantifikaci umožňuje značený antigen. Množství komplexu se značeným antigenem je nepřímo úměrné množství stanovovaného neznačeného antigenu. Tedy čím vyšší je koncentrace vzorku, tím nižší bude intenzita měřeného signálu v komplexu a tím vyšší bude koncentrace nenavázaného značeného antigenu [19, 37, 66].

Nekompetitivní imunoanalýza používá protilátku v nadbytku. Reakce se účastní pouze jeden antigen a tím je analyzovaná látka. Kvantifikace závisí na značené protilátce, která reaguje s antigenem.

Přímá ELISA

Přímá ELISA (obr. 15) může být považována za nejjednodušší formu ELISA. Slouží k detekci antigenu. Protilátka pro detekci je značena (HRP, AP, FITC). Při inkubaci se konjugáty váží k antigenu a odstranění nenavázaných konjugátů je provedeno promytím. Po vymytí nadbytku konjugátu (komerční či připravený v laboratoři) se přidá chromogenní substrát pro tvorbu zbarvení. Reakce se nechá vyvíjet po určitou dobu, po které je zastavena přidáním inhibičního reaktantu. Nakonec je barva detekována spektrofotometricky při odpovídající vlnové délce pro vzniklou barvu.

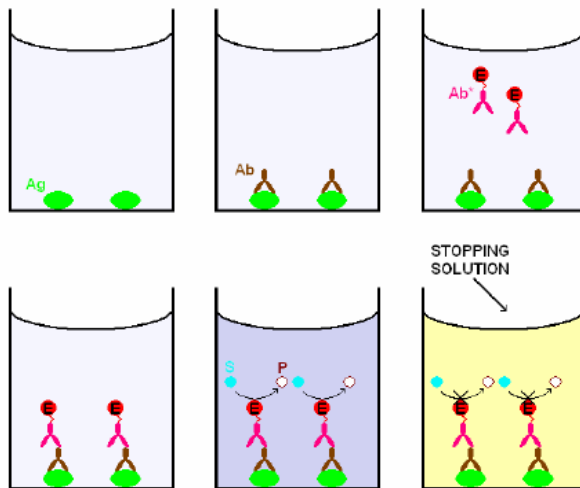


Obr. 15: Přímá ELISA. Na první jamku je přidán antigen (Ag) pasivně adsorbován na pevnou fázi. Po promytí jsou přidány enzymem značené protilátky (Ab^*), které se váží na antigen. Po inkubaci a promytí je přidán substrát/chromofor (S) a dochází k barevné změně. Nakonec je přidán „stop solution“, čímž dojde k další barevné změně a především k zastavení reakce [19].

Nepřímá ELISA

Nepřímá ELISA (obr. 16) opět zahrnuje přidání antigenu a odstranění nenavázaných komponent stejně jako u přímé, tzn. že antigen se inkubuje s primární protilátkou a její nadbytek se vymyje. Sekundární protilátka – konjugát se váže na primární konjugát a nadbytek se opět vymyje. Nakonec je přidán substrát (chromofor) k vázanému konjugátu, čímž se začne vyvíjet zbarvení. Reakce je zastavena pomocí inhibičního reaktantu (STOP činidlo) a vyhodnocena spektrofotometricky [19].

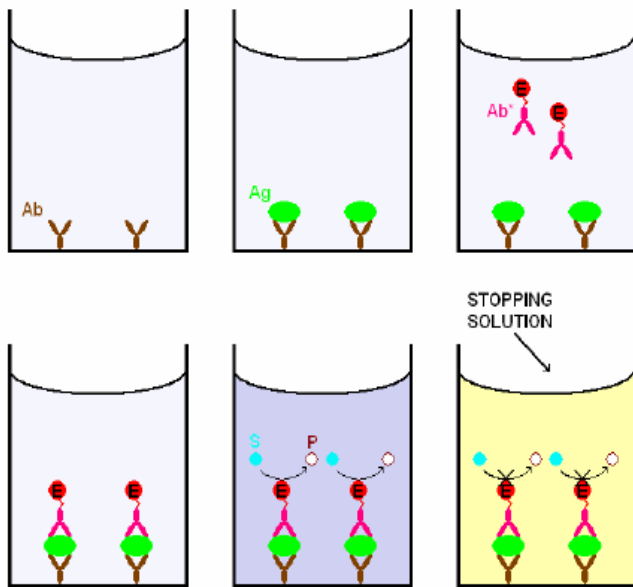
Podmínkou spolehlivosti je, že sekundární konjugát neváže imobilizovaný antigen ani nepřilne na stěny mikrotitrační destičky.



Obr. 16: Nepřímá ELISA. Na navázaný antigen se váže neznačená detekční protilátka. Poté je přidán konjugát, který se váže na neznačené protilátky [19].

„Sendvičová“ ELISA („capture“, „sandwich“ ELISA)

Sendvičová ELISA (obr. 17) začíná navázáním známé protilátky specifické pro hledaný antigen na plastickou mikrotitrační plotnu. V dalších krocích se postupně přidává tekutina testovaná na přítomnost antigenu, další (detekční) protilátka specifická pro daný antigen konjugovaná s enzymem a nakonec detekční systém – substrát reagující s enzymem, který pod vlivem enzymatické reakce buď změní barvu, nebo odštěpuje produkty, které s další látkou (chromogen) vytváří barevnou reakci. Mezi přidáním každé ingredience se plotny promývají, aby se zbavily nenavázaných přebytků reagujících látek. V pozitivním případě, tedy když v přítomnosti specifických protilátek v testovaném séru dojde k postupnému navázání všech složek, se jamka zbarví podle charakteru použitého substrátu. V jamce, kde nebyla protilátka přítomna, nedojde k navázání konjugované protilátky s enzymem a barva substrátu v jamce se nemění. Vyhodnocení se nejčastěji opět provádí spektrofotometricky [66].



Obr. 17: „Sendvičová“ ELISA. Na povrch první jamky navázaný protilátky (Ab), na které se specificky váže antigen (Ag). Následně je přidán konjugát (Ab*), který se váže na zachycený antigen. Další kroky jsou opět shodné jako u předchozího stanovení [19].

2 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

2.1 Laboratorní vybavení

2.1.1 Chemikálie

- destilovaná nebo deionizovaná voda
- 70% CH₃OH
- 1M NaOH
- 1% C₆H₈O₇

2.1.2 Přístroje

- pH metr - Schoeller instruments
- promývačka Tecan - Scholler instrumens
- laboratorní třepačka OS 2 basic yellow, Labicom s.r.o.
- minitřepačka Minishaker 1
- přístroj na vyhodnocení Sunrise – Schoeller Instruments

2.1.3 Použitý software

- Neogen Veratox
- Adamint v. 4.2.51.0. Sevaron poradenství s.r.o.
- KIM 32

2.1.4 Pracovní pomůcky

- mlýnek
- váhy na 5 – 10 g
- filtrační papír Whatman ≠1 nebo ekvivalentní filtrační papír
- zkumavky, láhve, odměrné válce
- jedno a vícekanálové mikropipety
- špičky pro jednorázové použití
- promývací zařízení nebo stříčka
- fotometr pro mikrotitrační destičky
- stopky

2.1.5 Složení soupravy

- 48 mikrotitračních jamek s navázanou protilátkou
- 48 červeně označených mikrotitračních jamek na mísení
- Kontrolní standardy: žlutě označené lahvičky (5 ks) o koncentraci:
 - pro DON: 0; 0,25; 0,5; 1 a 2 (mg.kg⁻¹)
 - pro ZEA: 0; 25; 75; 150 a 500 (µg.kg⁻¹)
- Konjugát HRP: modře označená lahvička (1ks)
- Substrát K-blue: zeleně označená lahvička (1ks)
- Red Stop činidlo: červeně označená lahvička (1ks)



Obr. 18: Složení ELISA soupravy pro DON / ZEA

2.1.6 Příprava vzorku a extrakce [68]

Vzorek, který se testoval, bylo nutné odebrat schválenou vzorkovací technikou. Než se začalo s extrakcí, vzorek bylo nutné homogenizovat a důkladně promísit. Před vlastní analýzou je nutné vzorky uchovávat při teplotě 2 – 8 °C.

Byl odebrán reprezentativní vzorek, rozemlel se tak, aby nejméně 75 % prošlo sítím o velikosti ok 20 (tzn. velikosti částic instantní kávy)

Bylo odváženo 10 g přesité směsi (5 g v případě ZEA), přidalo se 100 ml destilované vody (příp. 25 ml 70% methanolu) a třepalo se 3 minuty na třepačce

Vzorek byl následně přefiltrován přes filtrační papír Whatmann #1. K analýze bylo potřeba alespoň 5 ml směsi.

Nakonec bylo změřeno pH filtrátu, které musí mít hodnotu 6 – 8, popř. příliš kyselá nebo zásaditá vzorky byly upraveny pomocí roztoku NaOH popř. H₂SO₄.

2.2 Kvantitativní stanovení deoxynivalenolu v krmných směsích

2.2.1 Princip testu [68]

Souprava VERATOX® je určena pro kvantitativní stanovení DONu v obilovinách a obilných produktech. Je založena na principu přímé kompetitivní ELISA metody. Na mikrotitrační destičce jsou navázány specifické protilátky proti DONu. Z rozemletého vzorku jsou toxiny extrahovány destilovanou nebo deionizovanou vodou. Volný DON ve vzorcích a standardech soutěží o vazebná místa na protilátce s enzymaticky značeným DONem (konjugát). Po inkubaci a odstranění nenavázaných substancí promytím se přidá substrát obsahující chromogen, který reaguje s enzymem, který je označen DON, za vzniku modré barvy. Čím modřejší barva, tím je menší obsah DONu v extraktu vzorku. Test je vyhodnocen pomocí fotometru. Optické denzity standardů tvoří kalibrační křivku (viz. příloha 5), na niž se vynesou optické denzity vzorků a vypočtou přesné koncentrace DONu ve vzorcích.

2.2.2 Provedení testu [68]

Všechna činidla je nutné jednu hodinu před použitím nechat temperovat při laboratorní teplotě 18 – 30 °C.

- Vezme se 1 červeně označená jamka pro každý vzorek plus 5 červeně označených jamek pro 5 kontrolních standardů a umístí se do držáku mikrotitračních jamek.
- Vezme se stejný počet jamek potažených protilátkou a umístí se opět do držáku
- Do každé červeně označené mísicí jamky se napipetuje **100 µl konjugátu**
- Do stejných jamek po **100 µl standardů** DONu a **vzorků** dle schématu

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	St 0	Vz 4					St 0	Vz4				
B	St 0,25	Vz 5					St 0,25	Vz 5				
C	St 0,5	Atd.					St 0,5	Atd.				
D	St 1	Bílé jamky s protilátkou					St 1	Červené jamky na promísení s konjugátem				
E	St 2						St 2					
F	Vz1						Vz1					
G	Vz 2						Vz 2					
H	Vz 3						Vz 3					

Obr. 19: Obrázek představuje umístění standardů a vzorků v mikrotitrační destičce

Pomocí 8-kanálové pipety se promíchá obsah červeně označených jamek (3x se nasaje dovnitř a opět vypustí). Přemístí se po 100 µl do jamek s navázanou specifickou protilátkou. Obsah jamek promíchat po rovném povrchu

inkubace 5 minut při laboratorní teplotě a jamky se promyjí 5x destilovanou vodou

Do jamek se napipetuje **100 µl substrátu**, opět promíchat a 5 minut inkubovat při laboratorní teplotě

Do jamek se napipetuje po **100 µl červeného činidla Red Stop** na zastavení reakce, následuje poslední promíchání po rovném povrchu

Změří se optická denzita na fotometru při **650 nm** a konečné měření se provádí ve speciálním programu zvaný KIM, popřípadě VERATOX.

2.2.3 Parametry metody [68]

- **Mez detekce:** 0,1 mg.kg⁻¹ – tato hodnota byla určena jako střední průměrná hodnota 10 vzorků bez DONu plus 2 standardní odchylky
- **Mez kvantifikace:** 0,25 mg.kg⁻¹ – bod kalibrační křivky, který má nejnižší koncentraci DONu, kterou lze ještě spolehlivě detekovat.
- **Kvantifikační rozsah:** 0,25 – 2,5 mg.kg⁻¹
- **Odkoušené materiály:** pšenice, pšeničné otruby, pšeničný šrot, kukuřice, ječmen.

2.3 Kvantitativní stanovení zearalenonu v krmných směsích

2.3.1 Princip testu [69]

VERATOX® pro zearalenon je kompetitivní přímá ELISA v mikrojамkovém formátu, která umožňuje uživateli získat přesné koncentrace v ppb (µg.kg⁻¹). Volný ZEA ze vzorku a kontroly soutěží se ZEA značeným enzymem (konjugátem) o vazebná místa na protilátce. Po promývacím kroku se přidá substrát, který reaguje s navázaným konjugátem a vytváří modré

zabarvení. Více modré barvy znamená méně ZEA. Test je vyhodnocen pomocí fotometru. Optické density standardů tvoří kalibrační křivku (viz. příloha 5), na niž se vynesou optické density vzorků a vypočtou přesné koncentrace ZEA ve vzorcích.

2.3.2 Provedení testu [69]

Postup je stejný jako v případě DON, pouze se nanáší standardy s jinými koncentracemi.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	St 0	Vz 4					St 0	Vz4				
B	St 0,25	Vz 5					St 0,25	Vz 5				
C	St 0,75	Atd.					St 0,75	Atd.				
D	St 150	Bílé jamky s protilátkou					St 150	Červené jamky na promísení s konjugátem				
E	St 500						St 500					
F	Vz1						Vz1					
G	Vz 2						Vz 2					
H	Vz 3						Vz 3					

Obr. 20: Obrázek představuje umístění standardů a vzorků v mikrotitrační destičce

2.3.3 Parametry metody [69]

- **Mez detekce:** $10 \mu\text{g.kg}^{-1}$ – tato hodnota byla určena jako střední průměrná hodnota 10 vzorků neobsahujících zearalenon plus 2 standardní odchylky
- **Mez kvantifikace:** $25 \mu\text{g.kg}^{-1}$ – bod kalibrační křivky, který má nejnižší koncentraci ZEA, kterou lze ještě spolehlivě detekovat.
- Kvantifikační rozsah: $25 - 500 \mu\text{g.kg}^{-1}$
- **Odzkoušené materiály:** kukuřice, pšenice a ječmen

Tab. 13: Maximální přípustné limity pro mykotoxiny [67]

	VOMITOXIN (DON)		ZEARALENON (ZEA)		
	$\mu\text{g.kg}^{-1}$	mg.kg^{-1}		$\mu\text{g.kg}^{-1}$	mg.kg^{-1}
krmná směs	v normě	v normě	krmná směs	v normě	v normě
prestarter	< 200	< 0,2	prestarter	< 30	< 0,030
šroty, výkrm	< 400	< 0,4	šroty, výkrm	< 100	< 0,1
KPK, KPB	< 300	< 0,3	KPK, KPB	< 50	< 0,050
PCH	< 200	< 0,2	PCH	< 30	< 0,030
drůbež	< 500	< 0,5	drůbež	< 100	< 0,1
nosnice	< 500	< 0,5	nosnice	< 300	< 0,3
žluč	< 100	< 0,1	žluč	< 30	< 30

3 VÝSLEDKY A DISKUZE

Tato diplomová práce byla vypracována pod vedením paní Mgr. Kellnerové v diagnostické laboratoři SEVARON, s.r.o. Tato laboratoř se mimo jiné zabývá problematikou stanovení mykotoxinů ve vzorcích krmiva (pšenice, pšeničná mouka, pšeničné otruby, pšeničný šrot, kukuřice, kukuřičná mouka, ječmen, sladový ječmen, oves), tkáně a žluče.

Diplomová práce se zaměřila na v našich podmínkách nejdůležitější z nich, DON a ZEA. V příloze č. 4 jsou uvedena veškerá naměřená data za období únor 2009 – duben 2010.

V dalších tabulkách (č. 14 až 25) jsou tato data porovnávána z hlediska různých vzorků a dodavatelů a blíže hodnocena s ohledem na platné normy. Veškeré výsledky jsou uvedeny ve tvaru průměr ± SD (n=2).

3.1 Výskyt DON a ZEA v jednotlivých chovech

Max. povolené množství DON v krmné směsi představuje pro chovná prasata $200 \mu\text{g.kg}^{-1}$ a pro žluč $100 \mu\text{g.kg}^{-1}$. Max. povolené množství ZEA v krmné směsi bylo experimentálně zjištěno $30 \mu\text{g.kg}^{-1}$. [67]

Prováděla jsem vyhodnocení vzorků chovů, které od února 2009 do dubna 2010 nejčastěji kontaktovaly diagnostickou laboratoř Sevaron.

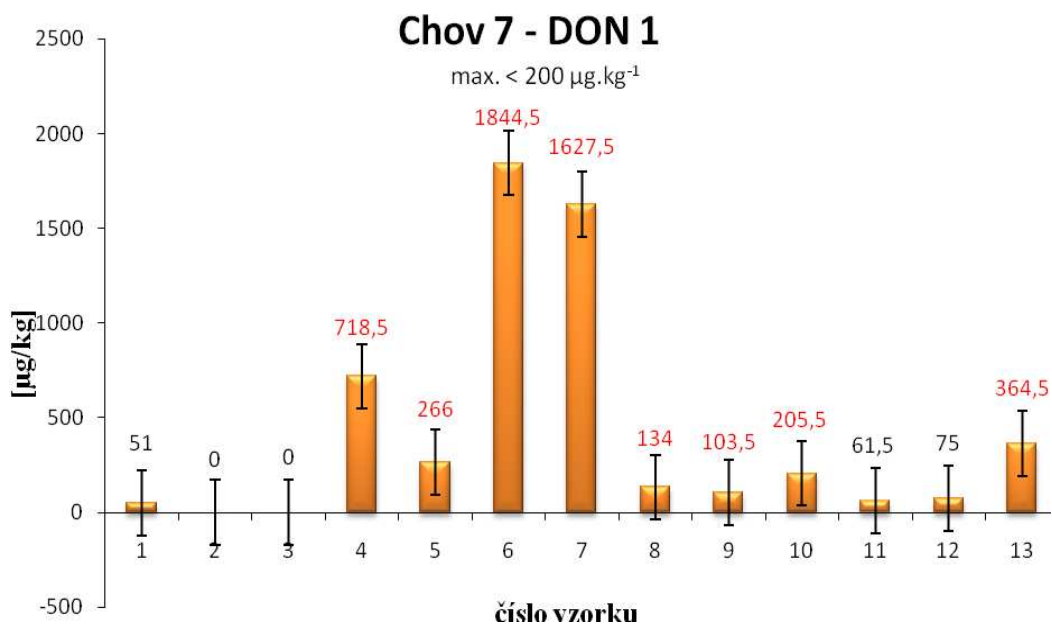
3.1.1 Chov 7

Tab. 14: Vyhodnocení vzorků chovu č. 7 na obsah DON a ZEA v krmivech a žluči

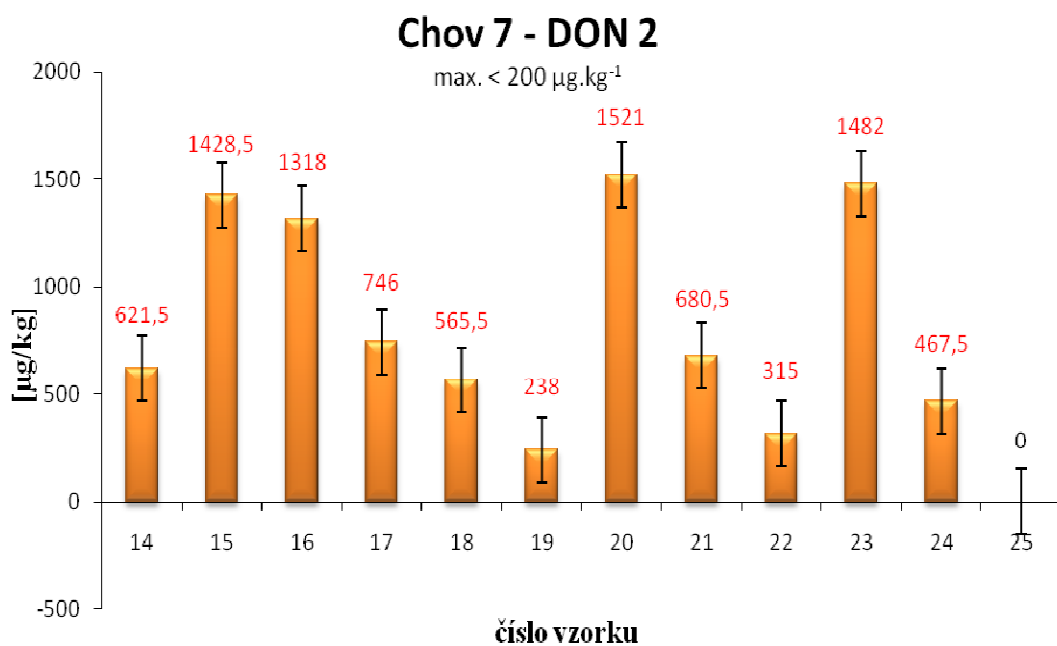
Datum	Lab. číslo	Druh vzorku	Zvíře	DON [$\mu\text{g.kg}^{-1}$]	ZEA [$\mu\text{g.kg}^{-1}$]
09. 03. 2009	1757	krmivo	prase	$51,0 \pm 2,0$	$138,0 \pm 3,0$
22. 05. 2009	6337	žluč	prase	0	0
25. 09. 2009	10990	žluč	prasnice (březí)	0	$185,5 \pm 1,5$
26. 10. 2009	12631	žluč	prase	$718,5 \pm 0,5$	$43,0 \pm 1,0$
	12632	žluč	prase	$266,0 \pm 1,0$	$38,5 \pm 0,5$
	12633	žluč	prase	$1844,5 \pm 0,5$	$73,0 \pm 2,0$
	12634	žluč	prase	$1627,5 \pm 6,5$	$92,5 \pm 0,5$
	12635	žluč	prase	$134,0 \pm 2,0$	$42,0 \pm 1,0$
	12638	žluč	sele	$103,5 \pm 0,5$	$6,5 \pm 0,5$
	12639	žluč	sele	$205,5 \pm 2,5$	$15,5 \pm 2,5$
	12640	žluč	sele	$61,5 \pm 1,5$	$5,5 \pm 0,5$
	12642	žluč	sele	$75,0 \pm 2,0$	$14,5 \pm 0,5$
	12644	žluč	běhoun	$364,5 \pm 0,5$	$46,0 \pm 2,0$
	12646	žluč	běhoun	$621,5 \pm 0,5$	$61,5 \pm 0,5$
	12647	žluč	prasnice vyřazená z chovu	$1428,5 \pm 1,5$	$54,0 \pm 1,0$
	12648	žluč	prasnice vyřazená z chovu	$1318,0 \pm 7,0$	$54,5 \pm 0,5$
	12649	žluč	prasnice vyřazená z chovu	$746,0 \pm 4,0$	$56,5 \pm 0,5$
12650	žluč	prasnice	$565,5 \pm 3,5$	$53,5 \pm 0,5$	

			vyřazená z chovu		
	12651	žluč	prasnice vyřazená z chovu	238,0 ± 5,0	31,5 ± 0,5
	12652	žluč	prasnice vyřazená z chovu	1521,0 ± 1,0	88,5 ± 0,5
	12653	žluč	prasnice vyřazená z chovu	680,5 ± 0,5	45,0 ± 1,0
	12654	žluč	prasnice vyřazená z chovu	315,0 ± 5,0	34,5 ± 2,5
	12655	žluč	prasnice vyřazená z chovu	1482,0 ± 2,0	x
	12656	žluč	prasnice vyřazená z chovu	x	88,5 ± 0,5
20. 11. 2009	13436	krmivo	drůbež	467,5 ± 0,5	x
16. 12. 2009	14214	žluč	mrtvé nenarozené sele	0	6,5 ± 0,5

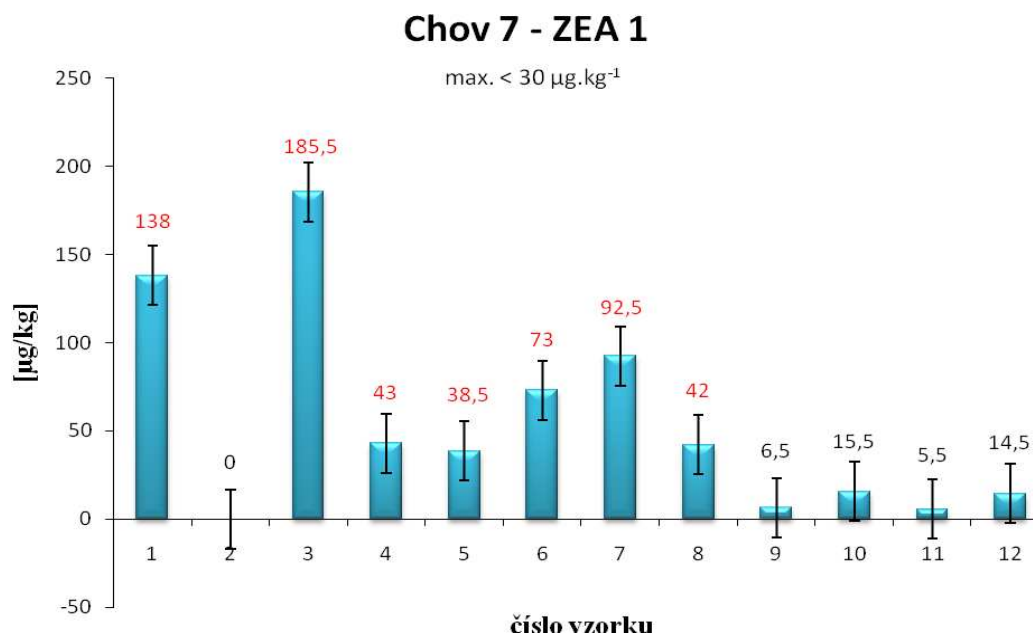
Graf 1: Naměřené koncentrace DON chovu č. 7 (první část)



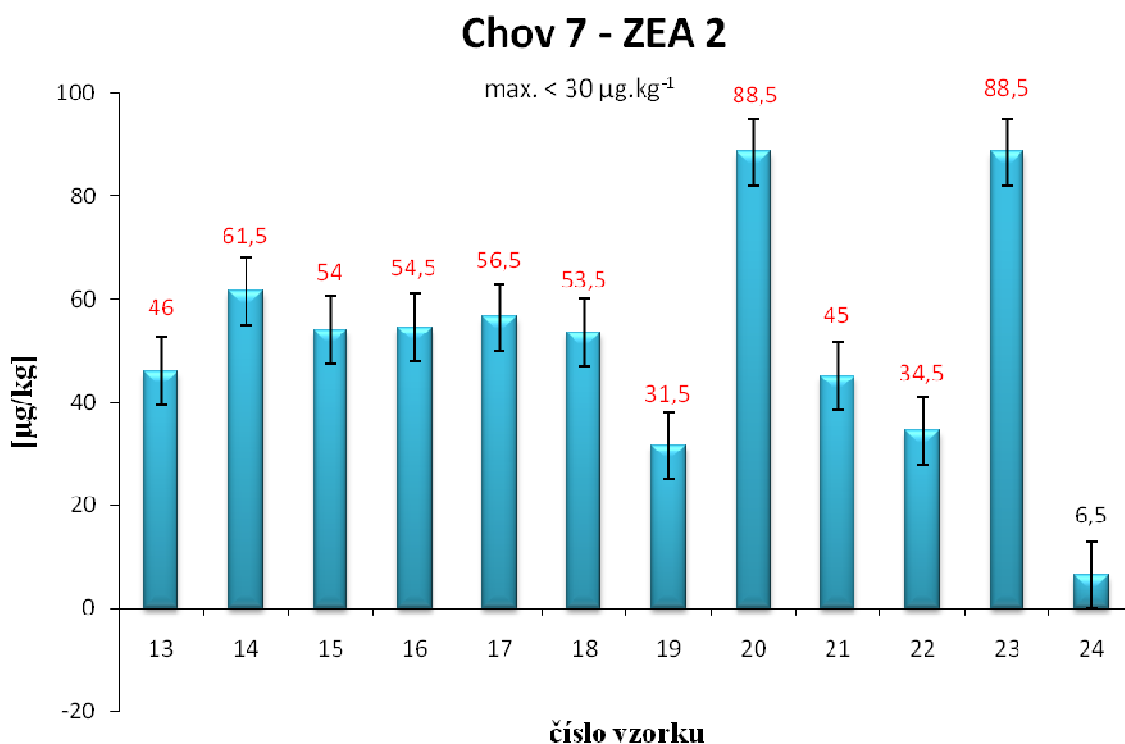
Graf 2: Naměřené koncentrace DON chovu č. 7 (druhá část)



Graf 3: Naměřené koncentrace ZEA chovu č. 7 (první část)



Graf 4: Naměřené koncentrace ZEA chovu č. 7 (druhá část)



Z 25 analyzovaných vzorků chovu 7 bylo vyhodnoceno 19 (červeně vyznačené) – jako pozitivní na obsah deoxynivalenolu. Z tabulky 14 a grafu 1 a 2 je tedy patrné, že pouze 3 vzorky vykazují nulové hodnoty a 76% vzorků přesahuje povolené hodnoty na přítomnost DON. Dále tento chov vyžadoval zhodnotit 24 vzorků na přítomnost ZEA a z grafů 3 a 4 bylo zjištěno, že 23 vzorků obsahuje zearalenon a 74% z celkového množství výrazně překračovalo povolené limity na max. obsah ZEA v krmivu.

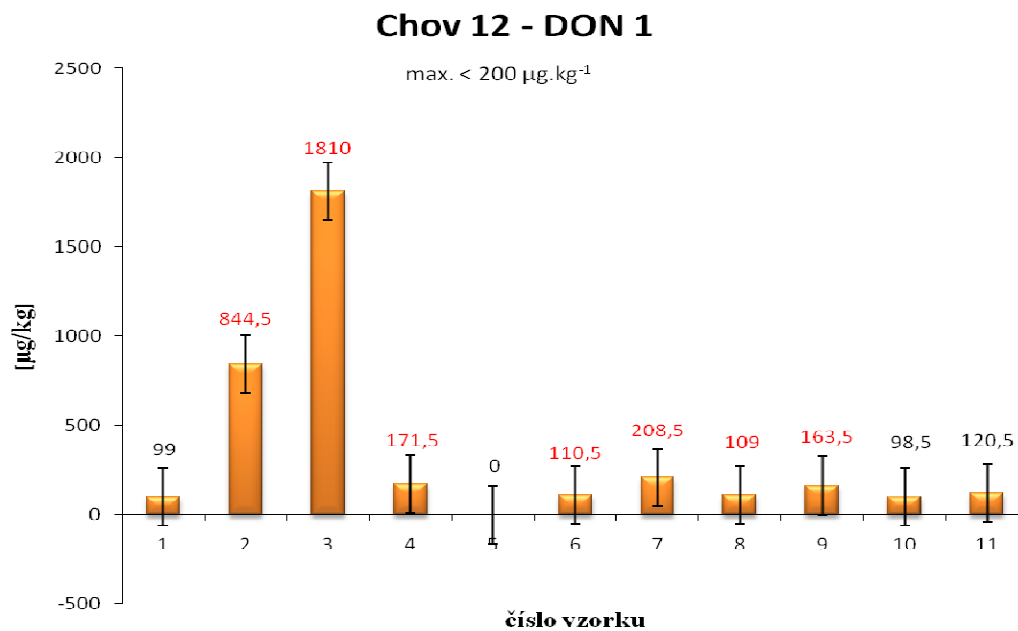
3.1.2 Chov 12

Tab. 15: Vyhodnocení vzorků chovu č. 12 na obsah DON a ZEA v krmivech a žluči

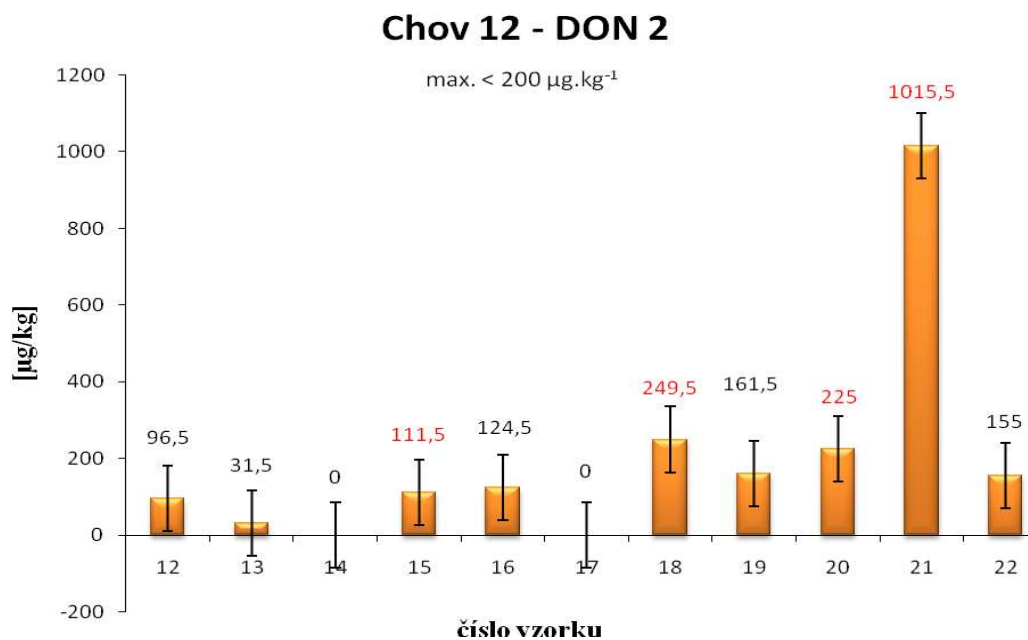
Datum	Lab. číslo	Druh vzorku	Zvíře	DON [µg.kg ⁻¹]	ZEA [µg.kg ⁻¹]
19. 03. 2009	2454	krmivo	prasnička	99,0 ± 3,0	31,0 ± 1,0
30. 04. 2009	5542	žluč	prase	844,5 ± 4,5	60,0 ± 1,0
	5543	žluč	prase	1810,0 ± 10,0	71,0 ± 1,0
	5544	žluč	prase	171,5 ± 1,5	515,5 ± 0,5
05. 05. 2009	5740	žluč	neuveďeno	0	0
	5741	žluč	neuveďeno	110,5 ± 10,5	25,0 ± 1,0
	5742	žluč	neuveďeno	208,5 ± 0,5	22,5 ± 1,5
	5743	žluč	neuveďeno	109,0 ± 0,0	19,5 ± 0,5
	5744	žluč	neuveďeno	163,5 ± 0,5	30,0 ± 1,0
	5745	krmivo	neuveďeno	98,5 ± 0,5	2,0 ± 1,0
	5746	krmivo	neuveďeno	120,5 ± 0,5	1,5 ± 0,5
	5747	otruby	neuveďeno	31,5 ± 00,5	x
	5748	pšenice	neuveďeno	31,5 ± 0,5	x
5749	ječmen	neuveďeno	0	x	

30. 06. 2009	7393	krmivo	prase	111,5 ± 1,5	0,0
	7394	krmivo	prase	124,5 ± 1,5	99,0 ± 1,0
08. 09. 2009	9925	žluč	prase	0	x
13. 10. 2009	12075	krmivo	KPK	249,5 ± 1,5	15,5 ± 1,5
	12076	krmivo	KPK	161,5 ± 0,5	5,0 ± 1,0
	12077	žluč	neuveđeno	225,0 ± 1,0	40,0 ± 1,0
05. 11. 2009	13017	žluč	prase	1015,5 ± 2,5	94,0 ± 3,0
	13018	žluč	prase	155,0 ± 1,0	91,5 ± 0,5

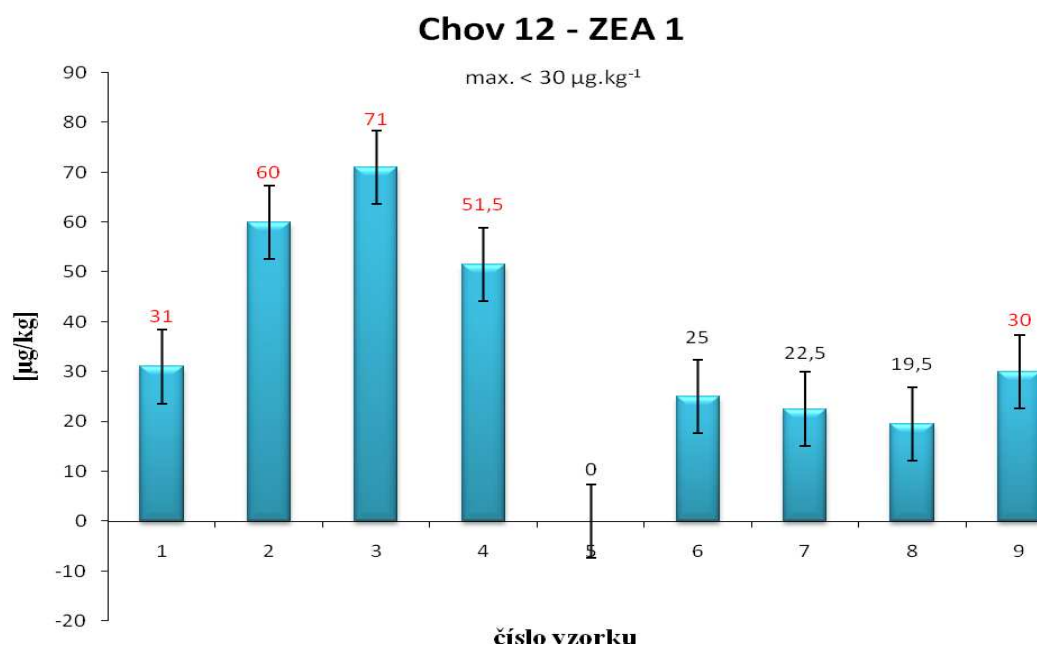
Graf 5: Naměřené koncentrace DON chovu č. 12 (první část)



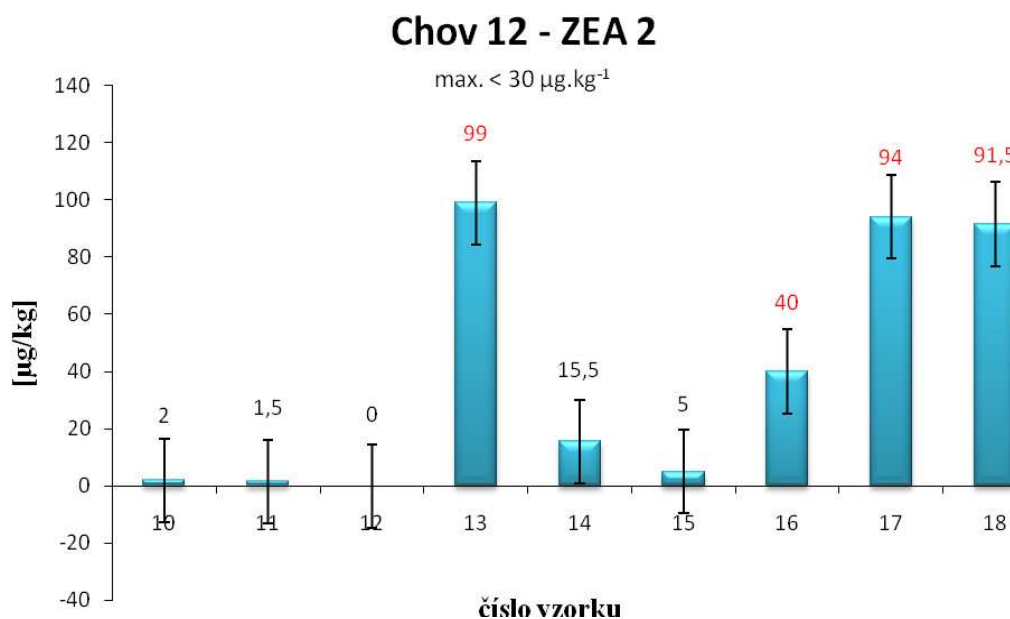
Graf 6: Naměřené koncentrace DON chovu č. 12 (druhá část)



Graf 7: Naměřené koncentrace ZEA chovu č. 12 (první část)



Graf 8: Naměřené koncentrace ZEA chovu č. 12 (druhá část)



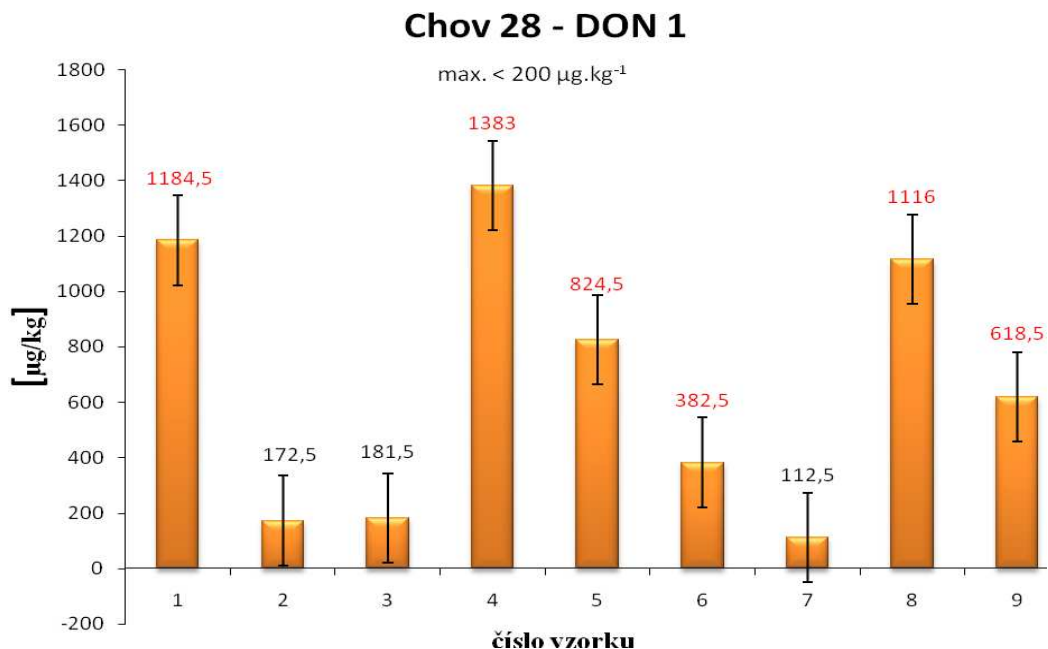
U chovu 12 bylo vyhodnocováno 22 vzorků, přičemž pouze 3 vzorky neobsahovaly žádné množství DON a 50% z celkového množství vykazovalo pozitivní nález překračující povolené hodnoty (viz. graf 5 + 6). Z 18 experimentálně hodnocených vzorků bylo zjištěno, že 2 vzorky žádné množství ZEA nevykazují, viz. graf 7 + 8, přičemž 50% z celkového množství je pozitivních na přítomnost ZEA ve vzorku žluče a krmiva.

3.1.3 Chov 28

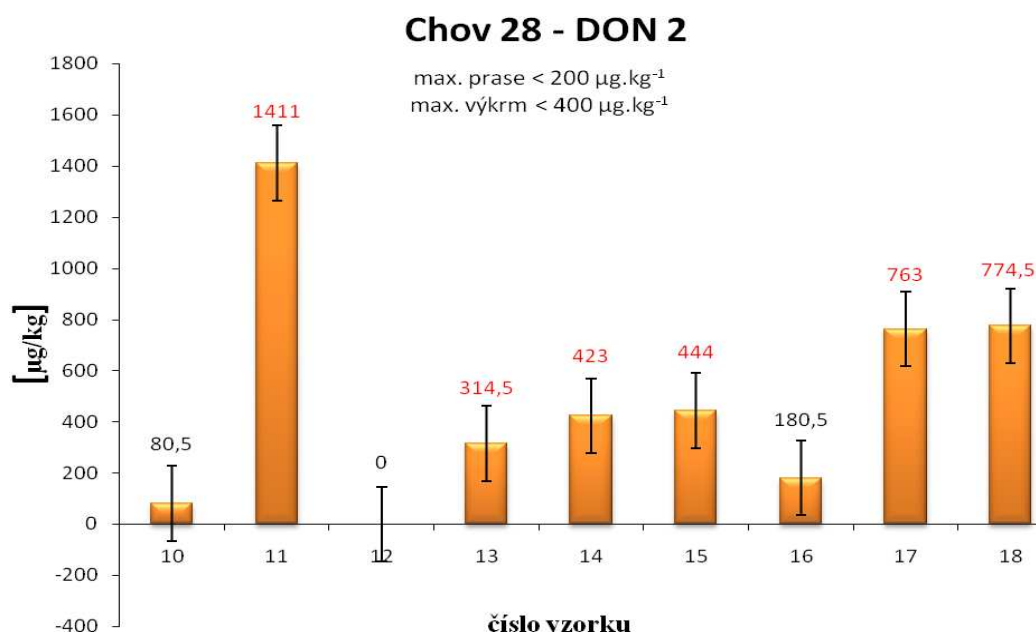
Tab. 16: Vyhodnocení vzorků chovu č. 28 na obsah DON a ZEA v krmivech a žluči

Datum	Lab. číslo	Druh vzorku	Zvíře	DON [$\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$]	ZEA [$\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$]
18. 05. 2009	6184	krmivo	prase	1184,5 ± 1,5	169,0 ± 0,0
	6185	krmivo	prase	172,5 ± 2,5	87,5 ± 0,5
	6186	krmivo	prase	181,5 ± 0,5	54,0 ± 2,0
10. 07. 2009	7661	krmivo	prasnice	1383,0 ± 3,0	26,5 ± 0,5
20. 08. 2009	9378	pšenice	prase	824,5 ± 0,5	8,5 ± 0,5
02. 09. 2009	9654	krmivo	prase	382,5 ± 0,5	x
08. 10. 2009	11521	pšenice	neuvedeno	112,5 ± 1,5	x
09. 11. 2009	13108	krmivo,	prase	1116,0 ± 5,0	x
24. 11. 2009	13578	pšenice	prase	618,5 ± 2,5	x
08. 12. 2009	14005	krmivo	sele	80,5 ± 0,5	x
	14006	krmivo	prase	1411,0 ± 152,0	x
	14007	krmivo	výkrm	0	x
	14008	krmivo	prasnice	314,5 ± 0,5	x
	14009	krmivo	prase	423,0 ± 2,0	x
15. 01. 2010	388	krmivo	prase	444,0 ± 0,0	x
25. 02. 2010	1573	pšenice	prase	180,5 ± 1,5	224,5 ± 3,5
	1574	kukuřice	prase	763,0 ± 1,0	x
02. 04. 2010	2863	kukuřice	prase	774,5 ± 0,5	x

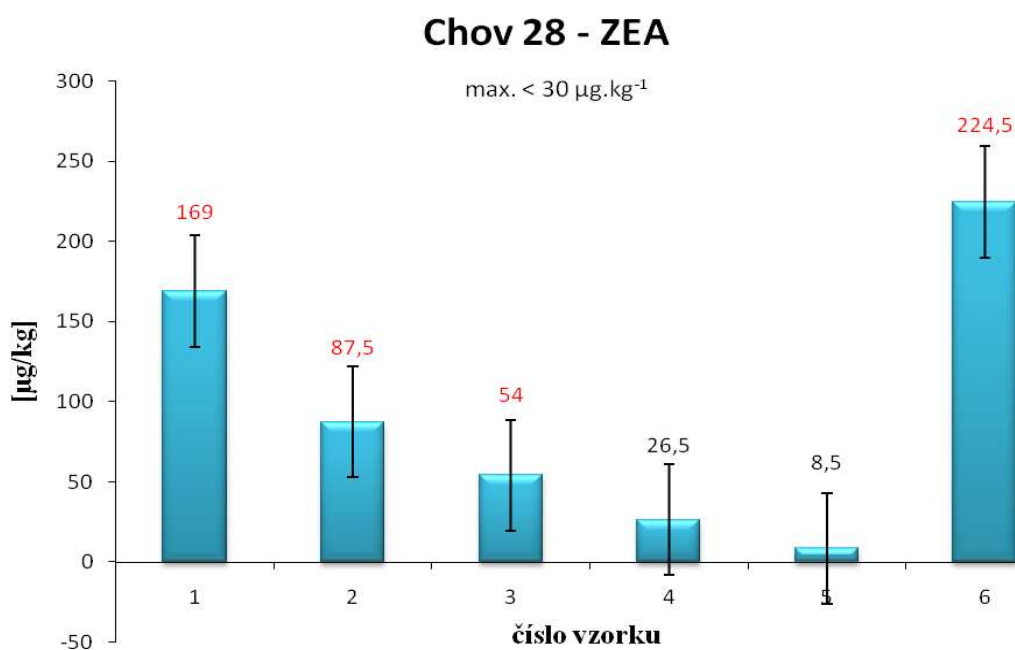
Graf 9: Naměřené koncentrace DON chovu č. 28 (první část)



Graf 10: Naměřené koncentrace DON chovu č. 28 (druhá část)



Graf 11: Naměřené koncentrace ZEA chovu č. 28



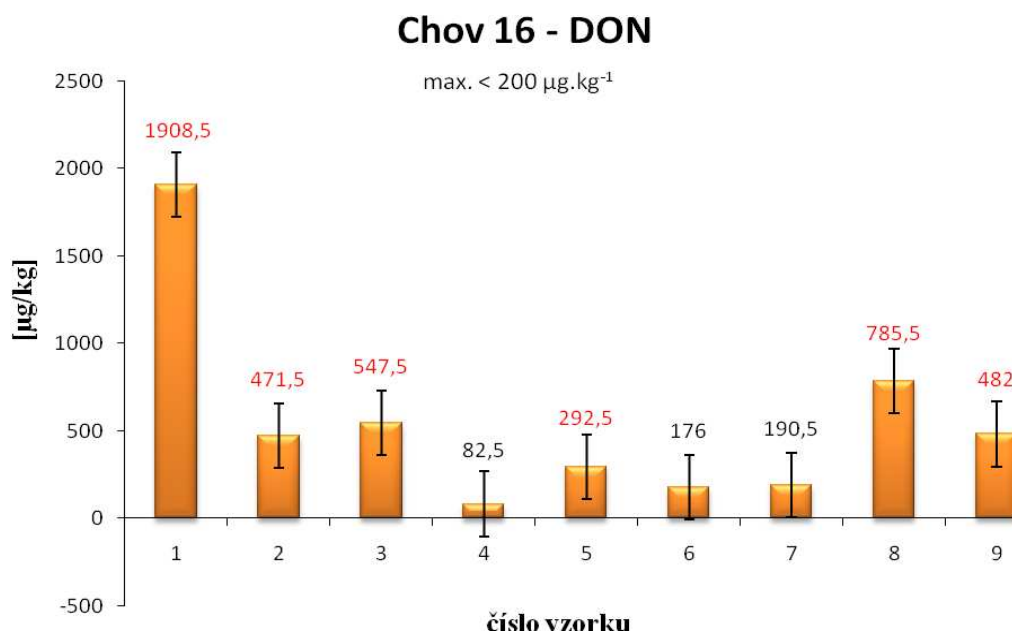
Chov 28 potřeboval prověřit 18 vzorků na přítomnost DON v krmných směsích a bylo zjištěno 66,7% pozitivních a z celého množství pouze jediný vzorek vykazoval nulové množství – viz. graf 9 + 10. Na ZEA bylo vyšetřováno 6 vzorků, přičemž pouze 2 vzorky, tzn. 33,33% byly negativní, jak je zřejmé z grafu 11.

3.1.4 Chov 16

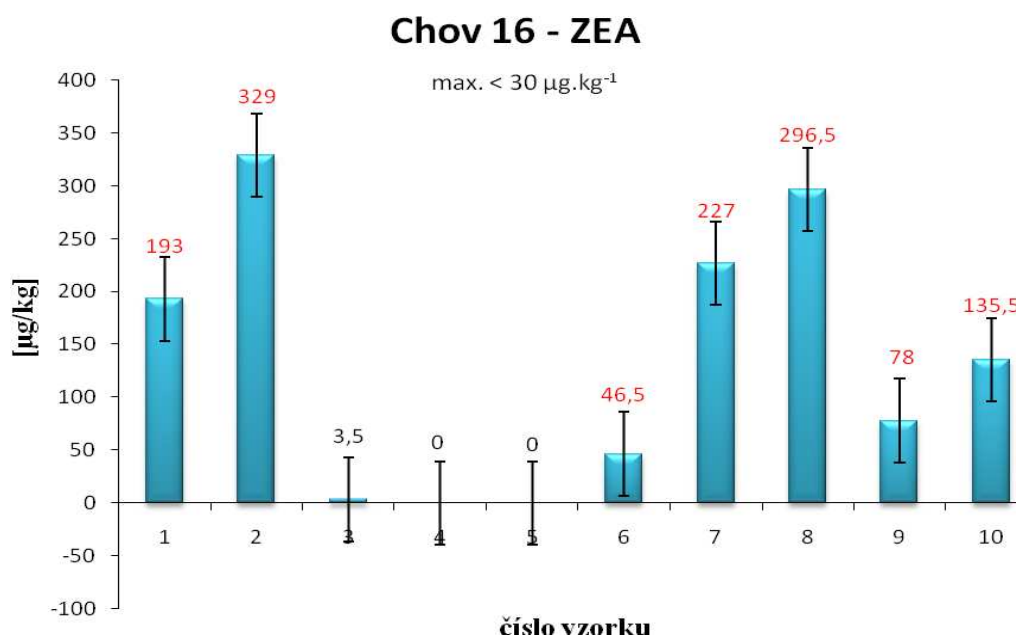
Tab. 17: Vyhodnocení vzorků chovu č. 16 na obsah DON a ZEA v krmivech a žluči

Datum	Lab. číslo	Druh vzorku	Zvíře	DON [$\mu\text{g.kg}^{-1}$]	ZEA [$\mu\text{g.kg}^{-1}$]
02. 04. 2009	3254	žluč	prase	1908,5 ± 1,5	193,0 ± 2,0
	3255	krmivo	prase	x	329,0 ± 4,0
	3256	krmivo	prase	x	3,5 ± 0,5
	3257	krmivo	prase	x	0
	3258	krmivo	prase	x	0
01. 07. 2009	7420	žluč	sele	471,5 ± 0,5	46,5 ± 2,5
17. 09. 2009	10571	žluč	odstavené prase	547,5 ± 1,5	227,0 ± 3,0
	10570	krmivo	odstavené prase	82,5 ± 0,5	296,5 ± 2,5
11. 01. 2010	254	žluč	prase	292,5 ± 1,5	78,0 ± 0,0
26. 01. 2010	761	krmivo	prase	176 ± 3,0	x
25. 02. 2010	1583	pšenice	prase	190,5 ± 0,5	135,5 ± 2,5
	1584	ječmen	prase	785,5 ± 4,5	x
18. 03. 2010	2269	žluč	prase	482,0 ± 1,0	x

Graf 12: Naměřené koncentrace DON chovu č. 16



Graf 13: Naměřené koncentrace ZEA chovu č. 16



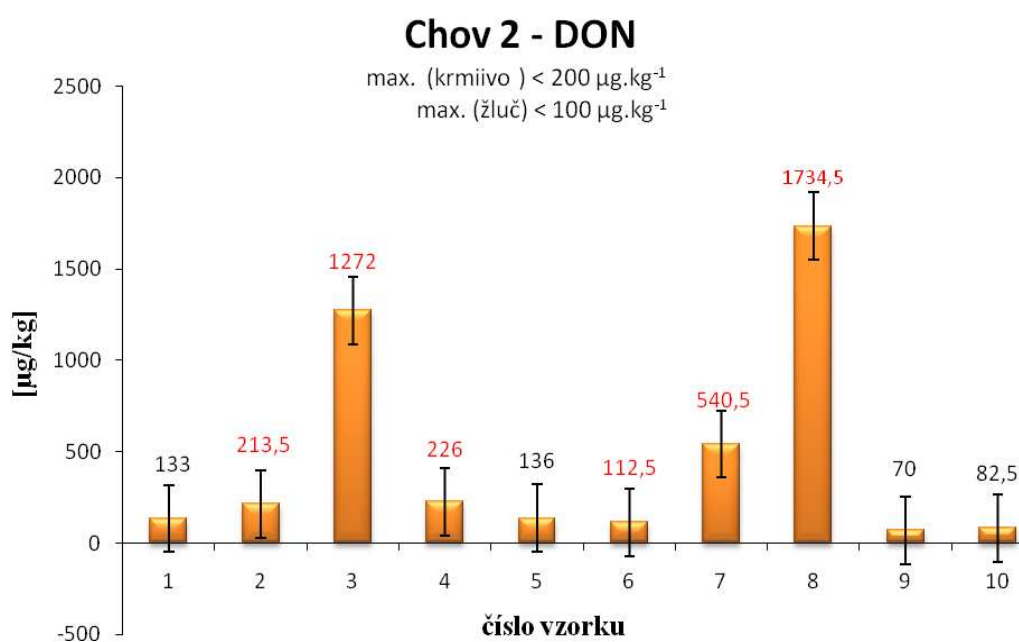
U chovu 16 jsem analyzovala 9 vzorků, ve všech byl vomitoxin přítomen a pouze 33,33% (tzn. 3 vzorky) bylo negativních – viz. graf 12. Na ZEA, kde je množství podstatně menší, bylo z 10 analyzovaných vzorků 30% negativních, zbylých 70% tedy převyšovalo povolené množství mykotoxinu v krmivu – viz. graf 13.

3.1.5 Chov 2

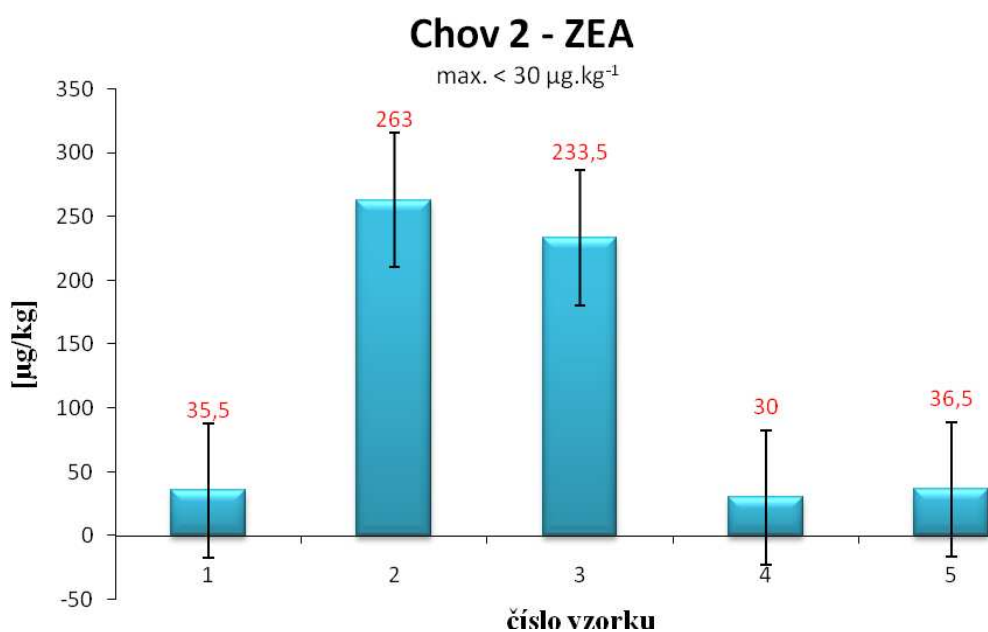
Tab. 18: Vyhodnocení vzorků chovu č. 2 na obsah DON a ZEA v krmivech a žluči

Datum	Lab. číslo	Druh vzorku	Zvíře	DON [µg.kg ⁻¹]	ZEA [µg.kg ⁻¹]
12. 02. 2009	834	krmivo	Prase	133,0 ± 3,0	x
	835	krmivo	Prase	213,5 ± 1,5	x
10. 04. 2009	3421	žluč	Sele	1272,0 ± 1,0	x
22. 04. 2009	4177	krmivo	prase	226,0 ± 0,0	x
	4178	krmivo	prase	136,0 ± 2,0	x
12. 05. 2009	5954	žluč	skot	112,5 ± 2,5	35,5 ± 2,5
17. 09. 2009	10564	žluč	prase	540,5 ± 0,5	263,0 ± 1,0
24. 09. 2009	10892	žluč	prase	1734,5 ± 0,5	233,5 ± 2,5
11. 11. 2009	13153	žluč	skot	70,0 ± 1,0	30,0 ± 0,0
	13154	žluč	skot	82,5 ± 0,5	36,5 ± 0,5

Graf 14: Naměřené. koncentrace DON chovu č. 2



Graf 15: Naměřené koncentrace DON chovu č. 2



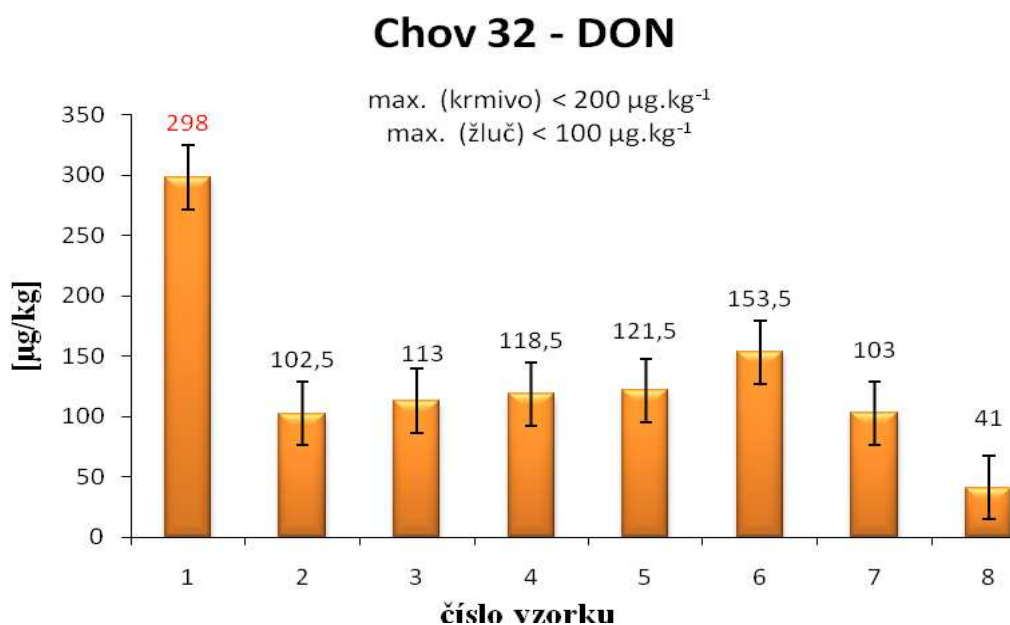
Z 10 vyšetřovaných vzorků chovu 2 byly všechny napadeny příslušným mykotoxinem, ovšem 4 vzorky, tzn. 40% nepřesahovaly povolené množství na přítomnost DON v krmivu či žluči- viz. graf 14. Z 5 vzorků vyšetřovaných metodou ELISA byly všechny napadeny mykotoxinem zearalenonem a jak je patrné z grafu 15, všechny vzorky přesahovaly povolené množství.

3.1.6 Chov 32

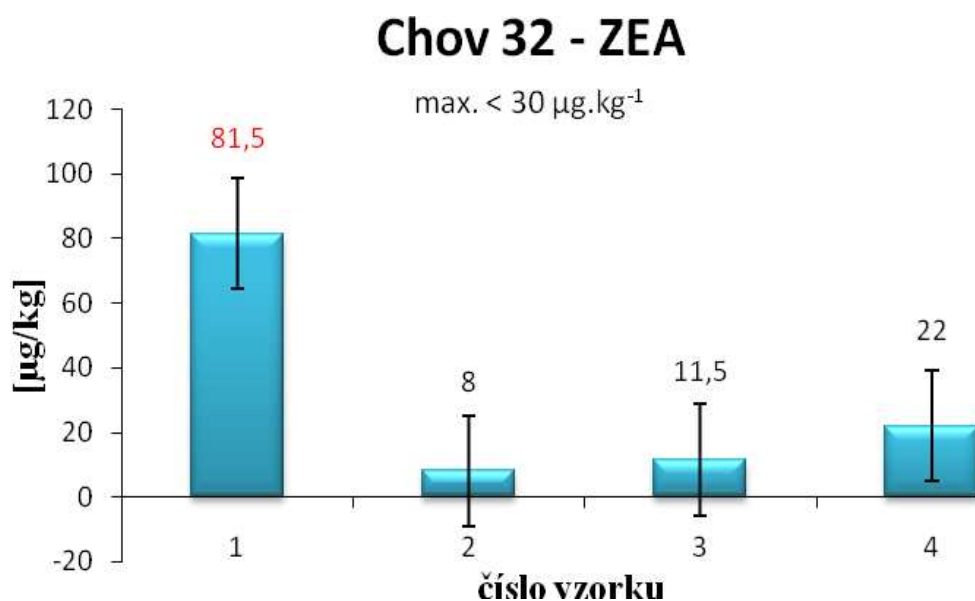
Tab. 19: Vyhodnocení vzorků chovu č. 32 na obsah DON a ZEA v krmivech a žluči

Datum	Lab. číslo	Druh vzorku	Zvíře	DON [$\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$]	ZEA [$\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$]
04. 06. 2009	6677	žluč	neuvedeno	$298,0 \pm 3,0$	$81,5 \pm 0,5$
	6678	krmivo	neuvedeno	$102,5 \pm 0,5$	$8,0 \pm 1,0$
	6679	krmivo	neuvedeno	$113,0 \pm 2,0$	$11,5 \pm 0,5$
14. 12. 2009	14187	krmivo	neuvedeno	$118,5 \pm 0,5$	x
15. 01. 2010	391	krmivo	prase	$121,5 \pm 1,5$	$22,0 \pm 1,0$
18. 01. 2010	432	krmivo	prase	$153,5 \pm 3,5$	x
	433	krmivo	prase	$103,0 \pm 0,0$	x
15. 03. 2010	2101	krmivo	prase	$41,0 \pm 1,0$	x

Graf 16: Naměřené koncentrace DON chovu č. 32



Graf 17: Naměřené koncentrace ZEA chovu č. 32



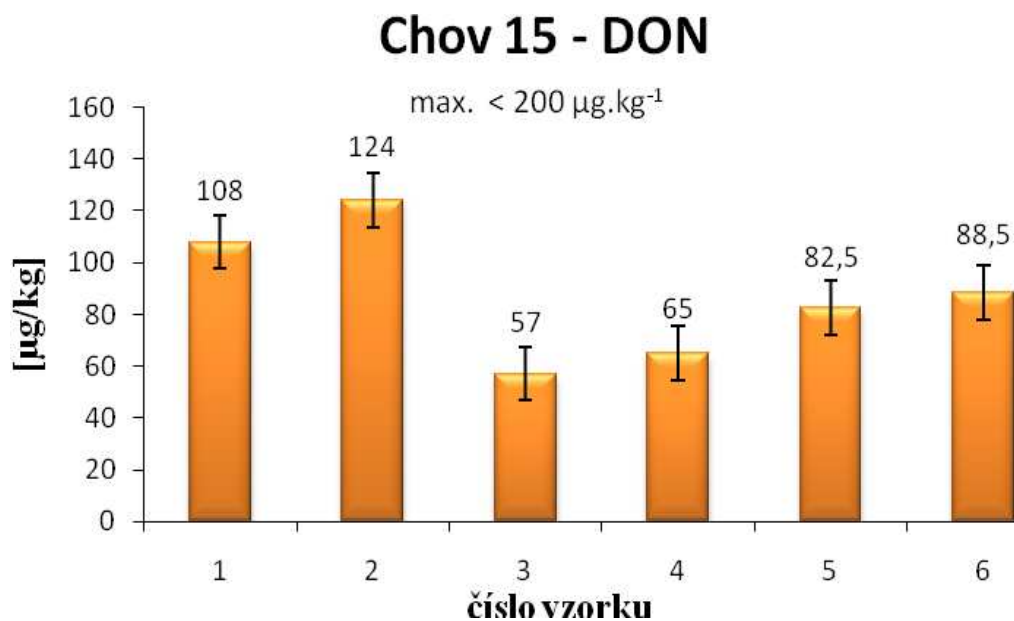
U chovu 32 byl z celkového počtu vzorků (8) zjištěn pouze jediný, který přesahoval limity max. množství DON v krmivu – viz. graf. č. 16. Jak je patrné z grafu č. 17, ZEA byl přítomen ve všech 4 vyšetřovaných vzorcích, pouze 1 vzorek (č. 1) překračoval kritéria na povolené množství.

3.1.7 Chov 15

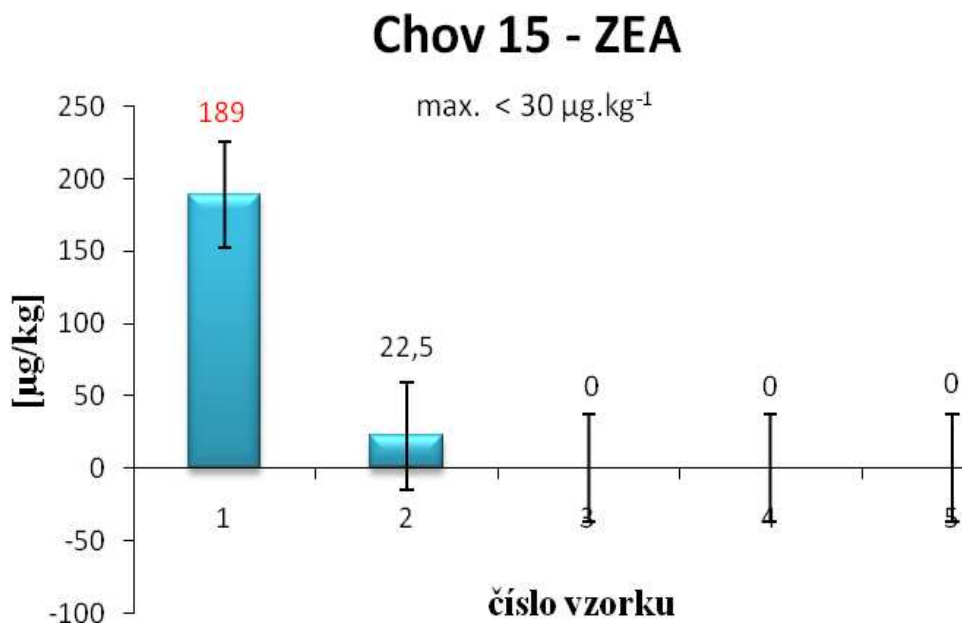
Tab. 20: Vyhodnocení vzorků chovu č. 15 na obsah DON a ZEA v krmivech a žluči

Datum	Lab. číslo	Druh vzorku	Zvíře	DON [$\mu\text{g.kg}^{-1}$]	ZEA [$\mu\text{g.kg}^{-1}$]
31. 03. 2009	2121	krmivo	prase	108,0 \pm 4,0	0
15. 06. 2009	6956	krmivo	prase	124,0 \pm 3,0	189,0 \pm 0,0
	6957	krmivo	prase	57,0 \pm 1,0	22,5 \pm 1,5
26. 06. 2009	7334	krmivo	prase	65,0 \pm 3,0	0
	7335	krmivo	prase	82,5 \pm 1,5	0
15. 10. 2009	12227	pšenice	neuveдено	88,5 \pm 0,5	0

Graf 18: Naměřené koncentrace DON chovu č. 15



Graf 19: Naměřené koncentrace ZEA chovu č. 15



Chov číslo 15 oproti předchozím chovům sice vykazoval přítomný DON ve všech vzorcích krmiva, ale žádný z nich nepřesahoval povolené množství (graf 18). Z 5 analyzovaných vzorků na ZEA 3 vzorky nevykazovaly žádné množství mykotoxinu v krmivu, pouze 1 přesahoval povolený limit (graf 19).

3.2 Vyhodnocení veškerých vzorků žluče na DON

Tab. 21: Vyhodnocení všech chovů na obsah DON ve vzorcích žluče

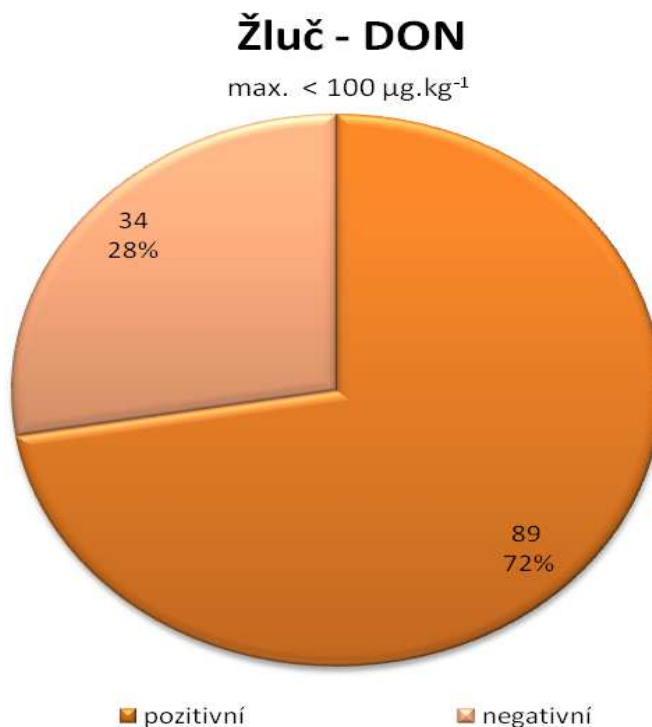
Datum	Chov	laboratorní číslo	Zvíře	DON [$\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$]
09. 03. 2009	Chov 8	1994	prase	1195,0 \pm 0,0
30. 03. 2009	Chov 4	3029	zmetek	33,5 \pm 1,5
02. 04. 2009	Chov 16	3254	prase	1908,5 \pm 1,5
09. 04. 2009	Chov 17	3396	prase	27,0 \pm 1,0
10. 04. 2009	Chov 2	3421	sele	1272,0 \pm 1,0
10. 04. 2009	Chov 19	3443	prase	143,5 \pm 1,5
20. 04. 2009	Chov 21	4148	zmetek	33,0 \pm 1,0
		4149	zmetek	18,0 \pm 0,0
		4150	zmetek	33,0 \pm 2,0
20. 04. 2009	Chov 22	3482	tele	60,5 \pm 0,5
22. 04. 2009	Chov 12	4241	prase	14,5 \pm 0,5
		4242	prase	186,0 \pm 1,0
		4243	prase	46,0 \pm 2,0
27. 04. 2009	Chov 23	4755	prase	559,5 \pm 0,5
30. 04. 2009	Chov 12	5542	prase	844,5 \pm 4,5
		5543	prase	1810,0 \pm 10,0
		5544	prase	171,5 \pm 1,5
05. 05. 2009	Chov 12	5740	neuvedeno	0
		5741	neuvedeno	110,5 \pm 10,5
		5742	neuvedeno	208,5 \pm 0,5
		5743	neuvedeno	109,0 \pm 0,0
		5744	neuvedeno	163,5 \pm 0,5
06. 05. 2009	Chov 24	5796	prase	142,5 \pm 0,5
12. 05. 2009	Chov 27	5953	prase	985,5 \pm 0,5
12. 05. 2009	Chov 2	5954	skot	112,5 \pm 2,5
14. 05. 2009	Chov 25	6127	prase	1782,5 \pm 2,5
14. 05. 2009	Chov 26	6136	prase	154,5 \pm 0,5
20. 05. 2009	Chov 29	6262	prase	584,5 \pm 0,5
22. 05. 2009	Chov 7	6337	prase	0
30. 05. 2009	Chov 4	6558	prase	161,5 \pm 0,5
04. 06. 2009	Chov 32	6677	neuvedeno	298,0 \pm 3,0
07. 06. 2009	Chov 4	6745	prasnice	802,0 \pm 3,0
08. 06. 2009	Chov 27	6761	prase	56,5 \pm 4,5
		6762	sele	1187,5 \pm 12,5
09. 06. 2009	Chov 33	6776	prase	60,0 \pm 2,0
01. 07. 2009	Chov 16	7420	sele	471,5 \pm 0,5
13. 07. 2009	Chov 41	7717	prase	1930,5 \pm 6,5
17. 07. 2009	Chov 42	7881	výkrm	506,5 \pm 2,5
22. 07. 2009	Chov 35	8220	prasnička	464,0 \pm 2,0
05. 08. 2009	Chov 11	8736	prase	213,5 \pm 2,5
06. 08. 2009	Chov 44	8811	prase	205,5 \pm 0,5
14. 08. 2009	chov 45	9272	prase	0
31. 08. 2009	Chov 24	9635	sele	74,5 \pm 1,5

04. 09. 2009	Chov 40	9837	prase	265,0 ± 1,0
08. 09. 2009	Chov 12	9925	prase	0
17. 09. 2009	Chov 2	10564	prase	540,5 ± 0,5
17. 09. 2009	Chov 16	10571	odstavené prase	547,5 ± 1,5
24. 09. 2009	Chov 2	10892	prase	1734,5 ± 0,5
25. 09. 2009	Chov 7	10990	prasnice (březí)	0
02. 10. 2009	Chov 45	11334	prase	927,0 ± 1,0
13. 10. 2009	Chov 50	12058	zmetek	65,5 ± 2,5
	Chov 12	12077	neuvedeno	225,0 ± 1,0
23. 10. 2009	Chov 51	12627	skot	21,5 ± 0,5
26. 10. 2009	Chov 7	12631	prase	718,5 ± 0,5
		12632	prase	266,0 ± 1,0
		12633	prase	1844,5 ± 0,5
		12634	prase	1627,5 ± 6,5
		12635	prase	134,0 ± 2,0
		12638	sele	103,5 ± 0,5
		12639	sele	205,5 ± 2,5
		12640	sele	61,5 ± 1,5
		12642	sele	75,0 ± 2,0
		12644	běhoun	364,5 ± 0,5
		12646	běhoun	621,5 ± 0,5
		12647	prasnice vyřazená z chovu	1428,5 ± 1,5
		12648	prasnice vyřazená z chovu	1318,0 ± 7,0
		12649	prasnice vyřazená z chovu	746,0 ± 4,0
		12650	prasnice vyřazená z chovu	565,5 ± 3,5
		12651	prasnice vyřazená z chovu	238,0 ± 5,0
12652	prasnice vyřazená z chovu	12521,0 ± 1,0		
12653	prasnice vyřazená z chovu	680,5 ± 0,5		
12654	prasnice vyřazená z chovu	315,0 ± 5,0		
12655	prasnice vyřazená z chovu	1482,0 ± 2,0		
02. 11. 2009	Chov 52	12821	zmetek	31,5 ± 0,5

03. 11. 2009	Chov 38	12914	prasnice	336,5 ± 0,5
		12915	prasnice	865,5 ± 2,5
		12916	prasnice	514,5 ± 0,5
		12917	prasnice	633,0 ± 1,0
		12918	prasnice	247,0 ± 0,0
		12919	prasnice	742,5 ± 1,5
		12920	prasnice	270,2 ± 0,2
		12921	prasnice	317,0 ± 1,0
		12922	prasnice	683,0 ± 3,0
		12923	prasnice	290,5 ± 0,5
		12924	prasnice	212,0 ± 0,0
		12925	prasnice	236,0 ± 0,0
		12926	prasnice	393,5 ± 3,5
	12927	prasnice	253,0 ± 1,0	
	Chov 13	12959	prasnička	573,0 ± 3,0
05. 11. 2009	Chov 12	13017	prase	1015,5 ± 2,5
		13018	prase	155,0 ± 1,0
11. 11. 2009	Chov 2	13153	skot	70,0 ± 1,0
		13154	skot	82,5 ± 0,5
13. 11. 2009	Chov 53	13282	prase	104,5 ± 0,5
18. 11. 2009	Chov 54	13236	sele	104,5 ± 1,5
24. 11. 2009	Chov 33	13583	prasnice	1138,5 ± 1,5
		13584	prasnice	565,5 ± 3,5
25. 11. 2009	Chov 55	13648	výkrm 50kg	1292,2 ± 0,5
25. 11. 2009	Chov 56	13655	výkrm	538,0 ± 16,0
09. 12. 2009	Chov 33	14061	sele	864,5 ± 0,5
09. 12. 2009	Chov 59	14062	sele	0
14. 12. 2009	Chov 60	14185	sele	491,5 ± 0,5
16. 12. 2009	Chov 7	14214	mrtvé nenarozené sele	0
28. 12. 2009	Chov 26	14384	sele	1007,0 ± 4,0
04. 01. 2010	Chov 61	12	výkrm	953,5 ± 0,5
07. 01. 2010	Chov 11	180	sele	26,0 ± 3,0
08. 01. 2010	Chov 63	192	mrtvé nenarozené sele	31,5 ± 0,5
		193	prase	1188,0 ± 3,0
11. 01. 2010	Chov 16	254	prase	292,5 ± 1,5
11. 01. 2010	Chov 64	259	prase	0
26. 01. 2010	Chov 5	765	zmetek	24,0 ± 3,0
02. 02. 2010	Chov 66	941	prase	1211,0 ± 1,0
04. 02. 2010	Chov 67	1030	mrtvé nenarozené sele	48,5 ± 1,5
12. 02. 2010	Chov 27	1201	mrtvé nenarozené sele	62,5 ± 1,5
16. 03. 2010	Chov 79	2127	zmetek	0
17. 03. 2010	Chov 80	2191	prase	1405,0 ± 5,0
17. 03. 2010	Chov 81	2196	zmetek	0
18. 03. 2010	Chov 16	2269	prase	482,0 ± 1,0
19. 03. 2010	Chov 11	2304	sele	0

19. 03. 2010	Chov 26	2301	zmetek	181,5 ± 0,5
30. 03. 2010	Chov 82	2686	sele	655,5 ± 1,5
31. 03. 2010	Chov 25	2821	neuvedeno	1108,0 ± 2,0
		2822	neuvedeno	1623,5 ± 3,5

Graf 20: Pozitivní a negativní vzorky žluči na DON



Jak z tabulky č. 20 vyplývá, bylo prověřeno celkem 123 vzorků na přítomnost deoxynivalenolu ve žluči. Pouze 10 vzorků z celkového množství neobsahovalo žádné množství DON a celkově tedy pouze 34 vzorků, což odpovídá 28%, je negativních. Zbýlých 89 vzorků (72%) vykazovalo zvýšené množství DON, které již přesahuje maximální přípustné limity (graf 20).

3.3 Vyhodnocení veškerých vzorků žluče na ZEA

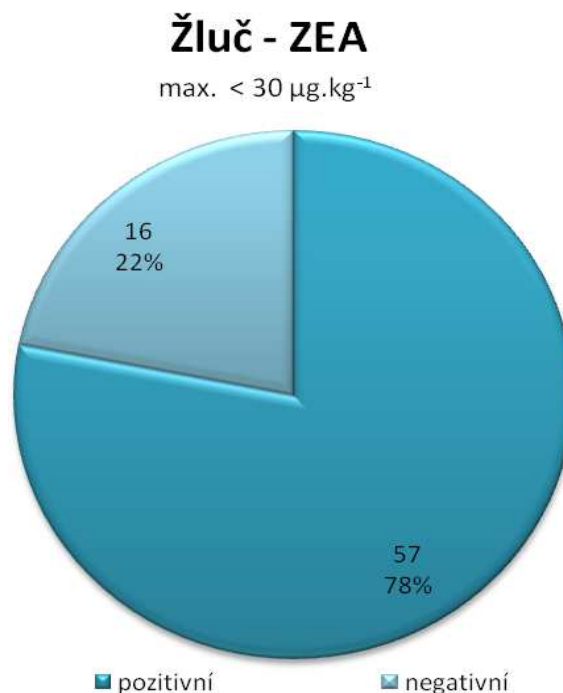
Tab. 22 : Vyhodnocení všech chovů na obsah ZEA ve vzorcích žluče

Datum	Chov	Laboratorní číslo	Zvíře	ZEA [µg.kg ⁻¹]
25. 03. 2009	Chov 13	2988	prase	62,0 ± 2,0
30. 03. 2009	Chov 4	3029	zmetek	110,5 ± 1,5
02. 04. 2009	Chov 16	3254	prase	193,0 ± 2,0
16. 04. 2009	Chov 20	4100	zmetek od prasničky	561,5 ± 4,5
20. 04. 2009	Chov 21	4148	zmetek	22,0 ± 1,0
		4149	zmetek	11,0 ± 1,0
		4150	zmetek	15,5 ± 0,5
30. 04. 2009	Chov 12	5542	prase	60,0 ± 1,0
		5543	prase	71,0 ± 1,0
		5544	prase	515,5 ± 0,5

05. 05. 2009	Chov 12	5740	neuvedeno	0
		5741	neuvedeno	25,0 ± 1,0
		5742	neuvedeno	22,5 ± 1,5
		5743	neuvedeno	19,5 ± 0,5
		5744	neuvedeno	30,0 ± 1,0
06. 05. 2009	Chov 24	5796	prase	55,5 ± 1,5
12. 05. 2009	Chov 27	5953	prase	97,0 ± 1,0
12. 05. 2009	Chov 2	5954	skot	35,5 ± 2,5
14. 05. 2009	Chov 25	6127	prase	168,0 ± 1,0
14. 05. 2009	Chov 26	6136	prase	51,5 ± 0,5
20. 05. 2009	Chov 29	6262	prase	163,0 ± 1,0
22. 05. 2009	Chov 7	6337	prase	0
04. 06. 2009	Chov 32	6677	neuvedeno	81,5 ± 0,5
07. 06. 2009	Chov 4	6745	prasnice	51,5 ± 0,5
09. 06. 2009	Chov 33	6776	prase	17,5 ± 0,5
01. 07. 2009	Chov 16	7420	sele	46,5 ± 2,5
13. 07. 2009	Chov 41	7717	prase	282,5 ± 0,5
14. 08. 2009	Chov 45	9272	prase	3,5 ± 0,5
31. 08. 2009	Chov 24	9635	sele	363,0 ± 1,0
17. 09. 2009	Chov 2	10564	prase	263,0 ± 1,0
17. 09. 2009	Chov 16	10571	odstavené prase	227,0 ± 3,0
24. 09. 2009	Chov 2	10892	prase	233,5 ± 2,5
25. 09. 2009	Chov 7	10990	prasnice (březí)	185,5 ± 1,5
02. 10. 2009	Chov 45	11334	prase	306,5 ± 1,5
13. 10. 2009	Chov 50	12058	zmetek	7,5 ± 1,5
	Chov 12	12077		40,0 ± 1,0
26. 10. 2009	Chov 7	12631	prase	43,0 ± 1,0
		12632	prase	38,5 ± 0,5
		12633	prase	73,0 ± 2,0
		12634	prase	92,5 ± 0,5
		12635	prase	42,0 ± 1,0
		12638	sele	6,5 ± 0,5
		12639	sele	15,5 ± 2,5
		12640	sele	5,5 ± 0,5
		12642	sele	14,5 ± 0,5
		12644	běhoun	46,0 ± 2,0
		12646	běhoun	61,5 ± 0,5
		12647	prasnice vyřazená z Chovu	54,0 ± 1,0
		12648	prasnice vyřazená z Chovu	54,5 ± 0,5
		12649	prasnice vyřazená z Chovu	56,5 ± 0,5
		12650	prasnice vyřazená z Chovu	53,5 ± 0,5
12651	prasnice vyřazená z Chovu	31,5 ± 0,5		
12652	prasnice vyřazená z Chovu	88,5 ± 0,5		

		12653	prasnice vyřazená z Chovu	45,0 ± 1,0
		12654	prasnice vyřazená z Chovu	34,5 ± 2,5
		12656	prasnice vyřazená z Chovu	88,5 ± 0,5
02. 11. 2009	Chov 52	12821	zmetek	0
05. 11. 2009	Chov 12	13017	prase	94,0 ± 3,0
		13018	prase	91,5 ± 0,5
11. 11. 2009	Chov 2	13153	skot	30,0 ± 0,0
		13154	skot	36,5 ± 0,5
18. 11. 2009	Chov 54	13236	sele	21,5 ± 1,5
24. 11. 2009	Chov 33	13583	prasnice	144,5 ± 2,5
		13584	prasnice	147,0 ± 2,0
16. 12. 2009	Chov 7	14214	mrtvé nenarozené sele	6,5 ± 0,5
28. 12. 2009	Chov 26	14384	sele	119,0 ± 1,0
04. 01. 2010	Chov 61	12	výkrm	43,5 ± 0,5
08. 01. 2010	Chov 63	192	mrtvé nenarozené sele	45,5 ± 0,5
		193	prase	144,0 ± 1,0
11. 01. 2010	Chov 16	254	prase	78,0 ± 0,0
11. 01. 2010	Chov 64	259	prase	21,5 ± 1,5
11. 03. 2010	Chov 78	1999	ovce	84,0 ± 2,0
19. 03. 2010	Chov 26	2301	zmetek	2,0 ± 1,0

Graf 21: Pozitivní a negativní vzorky žluči na ZEA



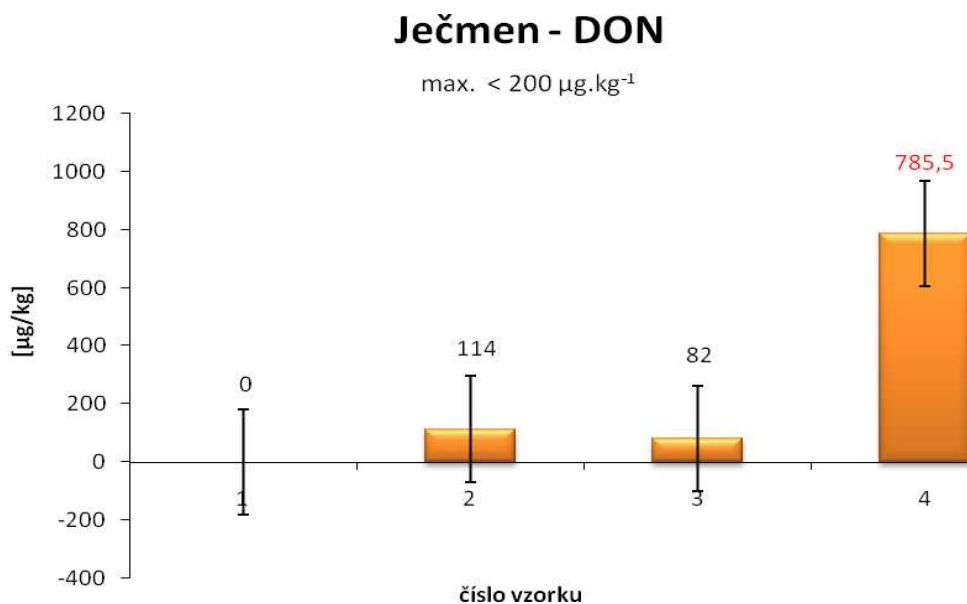
Během sledovaného období bylo nutné prověřit celkem 73 vzorků žluči na přítomnost zearalenonu. Tab. č. 21 ukazuje, že pouze 3 vzorky z celkového množství nevykazovaly žádnou přítomnost ZEA. Z grafu 21 je patrné, že 16 vzorků, tedy 22% je negativních a tedy nepřekračovaly max. limity, kdežto zbylých 57 vzorků, což je 78%, překračovalo povolený limit na přítomnost ZEA ve žluči.

3.4 Vyhodnocení všech vzorků ječmene na DON a ZEA

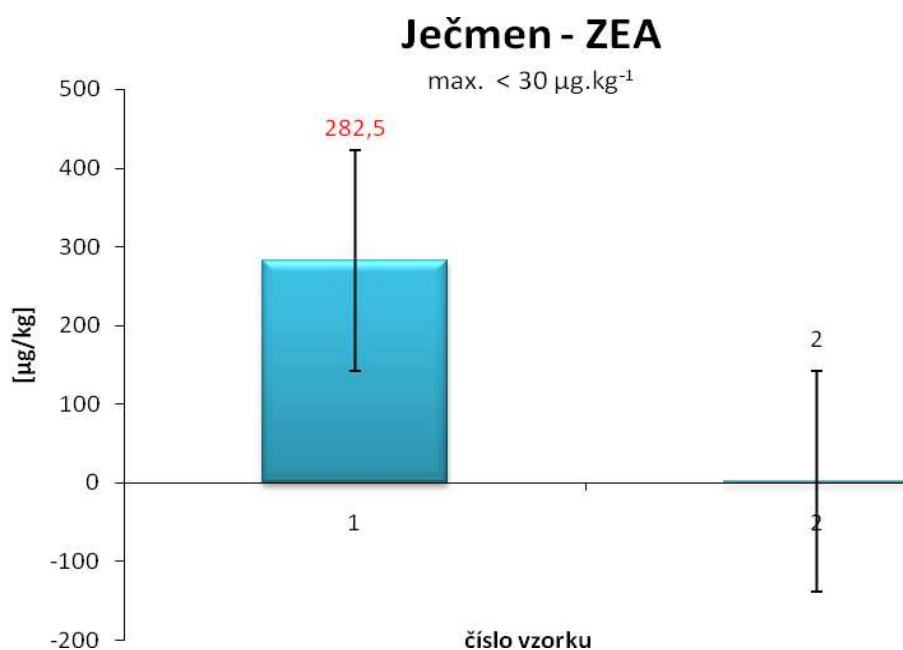
Tab. 23: Přehled všech vyšetřovaných vzorků ječmene na obsah DON a ZEA

Datum	Chov	Lab. číslo	Zvíře	DON [$\mu\text{g.kg}^{-1}$]	ZEA [$\mu\text{g.kg}^{-1}$]
5. 5. 2009	Chov 12	5749	neuvedeno	0	x
24. 8. 2009	Chov 46	9458	prase	$114,0 \pm 1,0$	$282,5 \pm 1,5$
27. 1. 2010	Chov 65	817	prase	$82,0 \pm 2,0$	$2,0 \pm 1,0$
25. 2. 2010	Chov 16	1584	prase	$785,5 \pm 4,5$	x

Graf 22: Naměřené koncentrace DON v ječmeni



Graf 23: Naměřené koncentrace ZEA v ječmeni



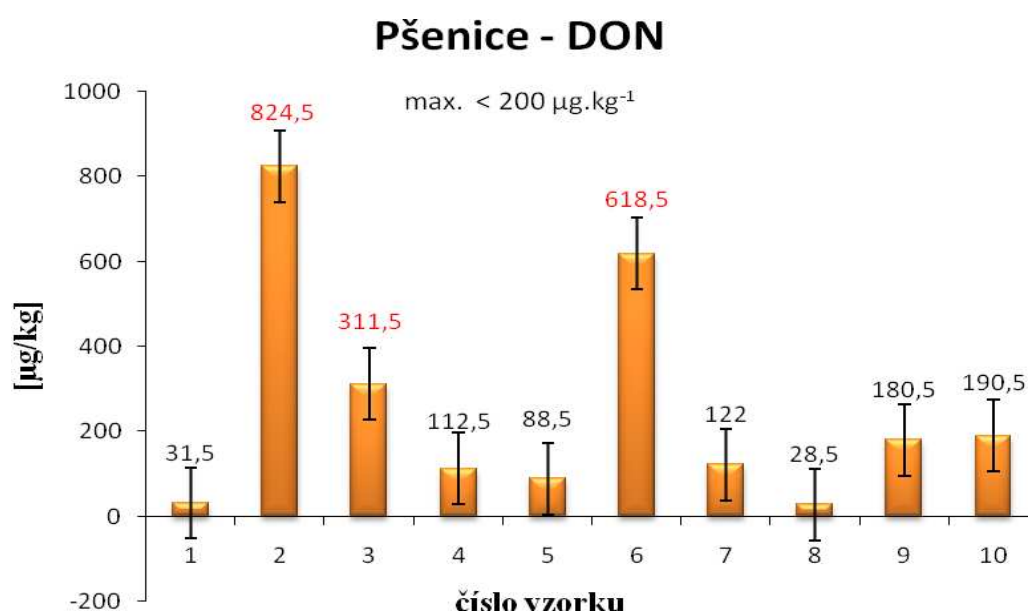
Dalším úkolem bylo zhodnotit vzorky ječmene z hlediska (ne)přítomnosti deoxynivalenolu a zearalenonu. Celkem byly vyhodnoceny 4 vzorky na DON – viz. tab. č. 22 a z grafu 22 je zřejmé, že pouze 1 vzorek (č.1) neobsahoval žádné množství daného mykotoxinu a 1 vzorek (č. 4) překračoval povolený limit. Na přítomnost ZEA byly vyhodnocovány pouze 2 vzorky, přičemž pouze 1 (č. 1) překračoval stanovené hranice (graf 23).

3.5 Vyhodnocení všech vzorků pšenice na DON a ZEA

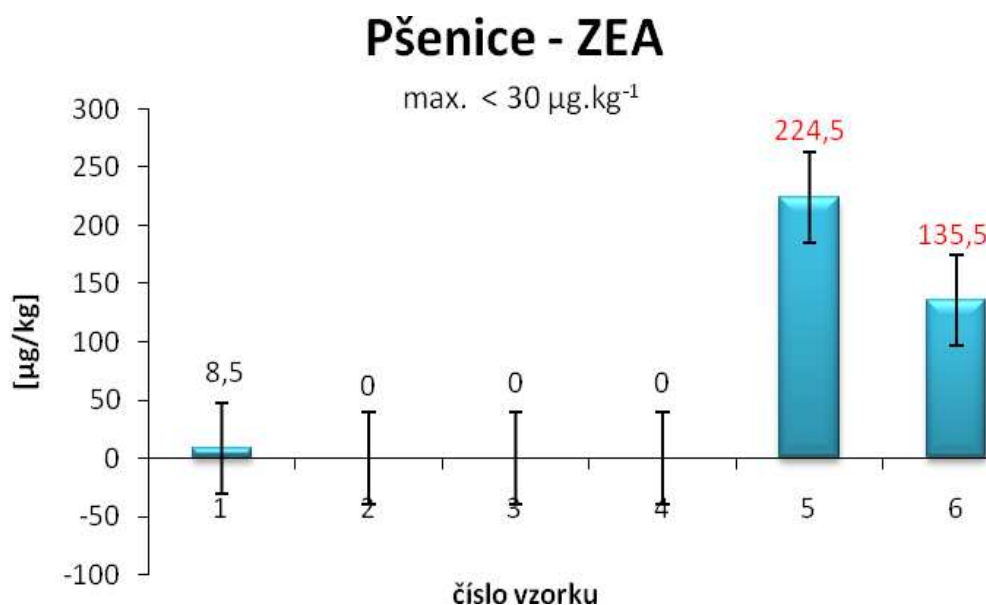
Tab. 24: Přehled všech vyšetřovaných vzorků pšenice na obsah DON a ZEA

Datum	Chov	Lab. číslo	Zvíře	DON [$\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$]	ZEA [$\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$]
05. 05. 2009	Chov 12	5748	neuveďeno	$31,5 \pm 0,5$	x
20. 08. 2009	Chov 28	9378	prase	$824,5 \pm 0,5$	$8,5 \pm 0,5$
24. 08. 2009	Chov 46	9457	prase	$311,5 \pm 0,5$	0
08. 10. 2009	Chov 28	11521	neuveďeno	$112,5 \pm 1,5$	x
15. 10. 2009	Chov 15	12227	neuveďeno	$88,5 \pm 0,5$	0
24. 11. 2009	Chov 28	13578	prase	$618,5 \pm 2,5$	x
27. 01. 2010	Chov 65	816	prase	$122,0 \pm 3,0$	x
17. 02. 2010	Chov 68	1301	neuveďeno	$28,5 \pm 1,5$	0
25. 02. 2010	Chov 28	1573	prase	$180,5 \pm 1,5$	$224,5 \pm 3,5$
25. 02. 2010	Chov 16	1583	prase	$190,5 \pm 0,5$	$135,5 \pm 2,5$

Graf 24: Naměřené koncentrace DON u pšenice



Graf 25: Naměřené koncentrace ZEA u pšenice



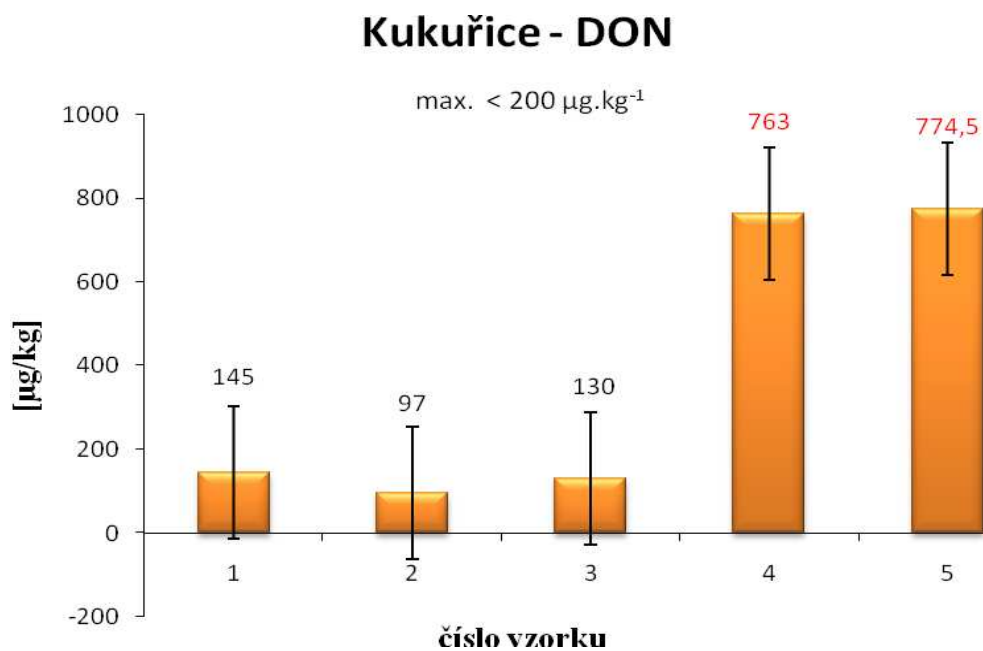
Stejným způsobem jako v předchozím případě byly vyšetřovány vzorky pšenice na uvedené mykotoxiny. V případě DON bylo hodnoceno 10 vzorků, přičemž 3 vzorky překračovaly povolený limit $200 \mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ (viz. graf 24). V případě ZEA (graf 25) bylo zpracovááno 6 vzorků, 3 z celkového množství vykazovaly nulové množství a 2 vzorky, tzn. 33% překračovalo povolený limit $30 \mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$.

3.6 Vyhodnocení všech vzorků kukuřice na DON a ZEA

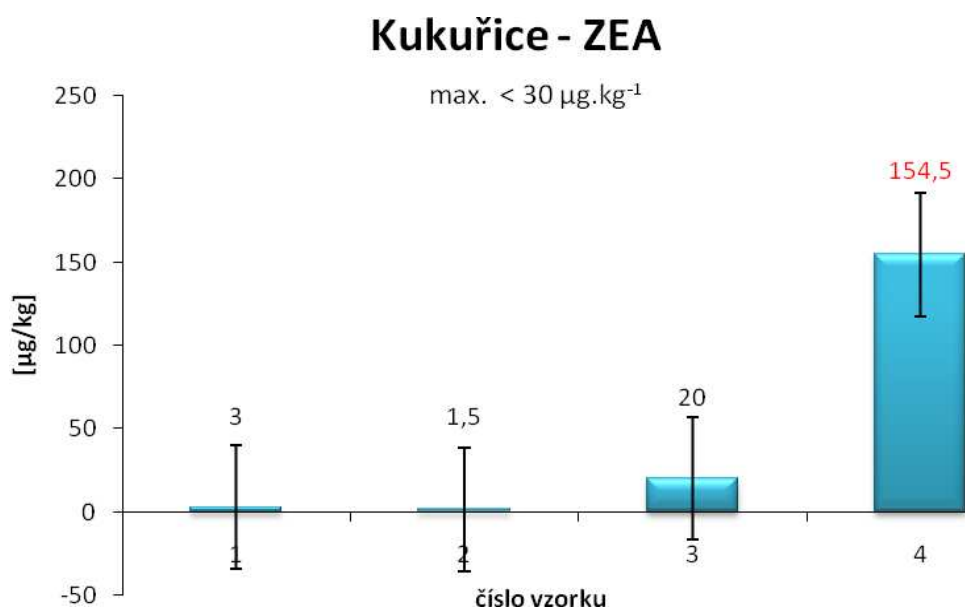
Tab. 25: Přehled všech vyšetřovaných vzorků kukuřice na obsah DON a ZEA

Datum	Chov	Lab. číslo	Zvíře	DON [$\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$]	ZEA [$\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$]
14. 05. 2009	Chov 27	6137	prase	$145,0 \pm 3,0$	$3,0 \pm 1,0$
21. 05. 2009	Chov 30	6321	neuveďeno	x	$1,5 \pm 0,5$
15. 06. 2009	Chov 36	7134	prase	$97,0 \pm 1,0$	$20,0 \pm 2,0$
		7135	prase	$130,0 \pm 2,0$	$154,5 \pm 1,5$
25. 02. 2010	Chov 28	1574	prase	$763,0 \pm 1,0$	x

Graf 26: Naměřené koncentrace DON v kukuřici



Graf 27: Naměřené koncentrace ZEA v kukuřici



V případě kukuřičného vzorku bylo nutné vyhodnotit 5 vzorků na obsah DON v krmivu. Z grafu 26 je patrné, že 2 vzorky (č. 4 + 5) významně překročily povolený limit $200 \mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ v krmivu a z grafu 27 můžeme sledovat, že je pozitivní pouze 1 vzorek (č. 4) z celkového množství.

ZÁVĚR

Mykotoxiny jsou toxické metabolity některých plísní, nacházejících se v krmivech a potravinách. Tyto toxické složky jsou zdrojem alimentárních intoxikací zvířat a člověka nazývaných mykotoxikózy. V současné době je známo asi 400 druhů mykotoxinů. Nejrozšířenější a zdravotně nejvýznamnější mykotoxiny, způsobující největší ekonomické ztráty, jsou aflatoxiny, deoxynivalenol, ochratoxiny, T-2 toxin a zearalenon.

Účinky mykotoxinů na organismus zvířat a člověka jsou velmi rozsáhlé. Příznaky mykotoxikóz mohou být všeobecné, nebo specifické pro určité mykotoxiny, které působí převážně jen na některé orgány a tkáně. Zvláště rizikové pro člověka jsou toxiny s teratogenními, mutagenními a karcinogenními účinky, zejména aflatoxin B₁.

Mykotoxikózy se mohou projevovat v akutních nebo chronických formách. V praxi jsou zdravotně a ekonomicky závažnější chronické formy, protože jsou častější a probíhají skrytě. Jsou důsledkem déletrvajících příjmu nižších dávek mykotoxinů. Klinické projevy onemocnění jsou méně výrazné a nespecifické – špatný příjem nebo odmítání krmiva, snížená konverze živin, pokles užitkovosti, poruchy plodnosti, snížená odolnost proti infekcím a zhoršená tržní jakost živočišných produktů.

V praktických podmínkách je nález jednoho mykotoxinu vzácný, častěji jde o vícečetné kombinace mykotoxinů v nízkých až mírných hladinách. Vyvolané příznaky onemocnění mohou být odlišné od těch, které jsou uváděny při působení jediného mykotoxinu a zpravidla dochází k synergismu, tj. k zesílení toxických účinků. Vzhledem k současnému působení více druhů mykotoxinů jsou uváděné limity pro určitý mykotoxin často problematické.

Mykotoxiny představují celosvětový problém. V chladnějších oblastech, kde je počasí doprovázeno zvýšenými vlhkostními podmínkami, což se týká také České republiky, jsou krmiva a potraviny nejvíce kontaminovány zearalenonem, deoxynivalenolem, T-2 toxinem a ochratoxiny. Aflatoxiny jsou naopak rozšířené v teplejších a vlhkých zeměpisných šířkách a v naprosté většině případů jsou k nám dovezeny s kontaminovaným krmivem.

K vyšetření krmiv je třeba přistoupit při rizikových klimatických podmínkách příhodných pro růst plísní, při makroskopickém výskytu plísní a při nedodržení technologie uskladnění krmiv. Indikací k vyšetření krmiva jsou plošné zdravotní poruchy zvířat, špatný příjem nebo odmítání krmiva, poruchy reprodukce a zhoršené růstové schopnosti. Vyšetření plísní a mykotoxinů v krmivech se provádí na pracovištích Státních veterinárních ústavů, kde je rovněž možné projednat systém odběru vzorků.

Na rozdíl od potravin chybí ve většině evropských států pro jednotlivé mykotoxiny a jednotlivé kategorie zvířat a krmiv maximálně přípustné koncentrace. Jediným dnes limitovaným mykotoxinem je aflatoxin B₁. Používalo se proto srovnání zjištěných výsledků s doporučenými limity publikovanými ve Spojených státech.

Tato práce probíhala v diagnostické laboratoři SEVARON s.r.o. pod vedením paní Mgr. Dity Kellnerové. Prováděla jsem stanovení obsahu vybraných mykotoxinů v krmivech.

Ze 7 chovů (tab. 13 až 19), jsem vyšetřila celkem 98 vzorků krmiv a žluče na přítomnost DON. Z celkového počtu pouze 6 vzorků, tzn. 6,1%, vykazovalo nulové hodnoty, 55 vzorků, tzn. 56,1%, překračovalo maximální limity (200 $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ v případě krmiva, 100 $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ v případě žluči) pro DON v krmivech či žluči hospodářských zvířat. Těchto 7 chovů jsem hodnotila i z hlediska ZEA. Celkem bylo analyzováno 72 vzorků krmiv a žluče. Pouze 8 vzorků neobsahovalo žádné množství mykotoxinu, 45 vzorků, tedy 62,5%, překračovalo povolený limit 30 $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$.

Dále jsem hodnotila všechny vzorky žluče na obsah DON a ZEA (tab. 20 a 21). Ze 123 vzorků žluče stanovovaných na obsah DON bylo pozitivních 72% (graf 20) a v případě ZEA (graf 21) ze 73 vzorků bylo pozitivních 78%. Pouze zanedbatelné množství vzorků neobsahovalo uvedené mykotoxiny.

V poslední fázi experimentální části jsem prováděla hodnocení všech vzorků ječmene, pšenice a kukuřice (tab. 22, 23, 24). Jak je z grafu 22 patrné, pouze 1 vzorek ječmene (25%) v případě DON a 1 vzorek (50%) v případě ZEA (graf 23) překračují povolené hodnoty. U pšenice překračuje max. hodnoty 30% vzorků na DON a 33% vzorků na ZEA. V případě kukuřice překračuje maximální limit na obsah DON 40% a 25% na obsah ZEA.

Po celkovém zhodnocení vzorků krmiv je tedy patrné, že nulové hodnoty vykazuje jen malé procento vzorků, většina vzorků je napadena příslušným mykotoxinem a více jak 50% vzorků překračuje povolené limity na obsahy mykotoxinů v krmivech. O to více alarmující jsou získaná data v případě žluči – nad 70% vzorků vykazuje nadlimitní hodnoty. Tab. 26 tedy zobrazuje celkový přehled analyzovaných vzorků v jednotlivých chovech, popř. krmiv a počet „nadlimitních“ vzorků.

Kontaminace krmiv mykotoxiny je tedy významným ekonomickým problémem pro chovatele a pro krmivářský průmysl., protože přítomnost mykotoxinů snižuje kvalitu obilovin, krmiv a výnosy plodin.

Prevence by měla být primárním cílem, určité podmínky prostředí během růstu a sklizně plodin však ovlivnit nelze.

Tab. 26: Celkový přehled analyzovaných vzorků z jednotlivých chovů, popř. krmiv a jejich počet přesahující dané limity

	DON		ZEA	
	Celkový počet vzorků	Počet „nadlimitních“ vzorků	Celkový počet vzorků	Počet „nadlimitních“ vzorků
Chov 7	25	19	24	18
Chov 12	22	11	18	9
Chov 28	18	12	6	4
Chov 16	9	4	10	7
Chov 2	10	6	5	4
Chov 32	8	1	4	1
Chov 15	6	0	5	1
Ječmen				
	4	1	2	1
Pšenice				
	10	3	6	2
Kukuřice				
	5	2	4	1

SEZNAM POUŽITÝCH ZDROJŮ

- [1] KUMMER, V., FLADÍKOVÁ, L., HERZIG, I., LÁNÍKOVÁ, A.: *Účinky mykotoxinů na zdraví a reprodukci zvířat, diagnostika a prevence mykotoxikóz*. Brno: Výzkumný ústav veterinárního lékařství, 2001, 43 str.
- [2] VELÍŠEK, J.: *Chemie potravin 3*. Tábor: OSSIS, 1999, 368 str. ISBN 80-902391-5-3
- [3] JEŽKOVÁ, A., DOHNAL, V., SKLÁDANKA, J.: *Sledování obsahu zearalenonu a aflatoxinů v pícech*. FPV UKF Nitra, 6. 4. 2007, roč. 8, s. 246-249.
- [4] ŠIMŮNEK J.: *Mykotoxiny* [online]. c2000, poslední revize 03.2003 [citováno 2010-02-05]. Dostupné z: <<http://www.med.muni.cz/prelek/MYKOTW/mtidx.htm>>.
- [5] BETINA V.: *Mykotoxiny, chemia – biológia – ekológia*. Bratislava: Alfa, 1990, 288 str. ISBN 80-05-00631-4.
- [6] SURAI, P., Dvorska, J.: Interakce mezi mykotoxiny, imunitou a antioxidačními systémy. In *Proceedings From European Mycotoxin Seminar Series – Evaluating the Impact of Mycotoxins in Europe*. Kapitola 7, s. 114- 137.
- [7] PRAŽÁKOVÁ, K.: *Termorezistentní plísně v prostředí*. Brno, 2008. 77 str. Bakalářská práce na Lékařské fakultě Masarykovy univerzity. Vedoucí bakalářské práce doc. MUDr. Jan Šimůnek, Csc.
- [8] SÝKOROVÁ, S., NEDĚLNÍK, J., A KOL.: Mykotoxiny – stav výskytu v zemědělských surovinách a krmivech v ČR a v Evropě. In *Vědecký výbor fyto-sanitární a životního prostředí*, Praha. 31.1.2004, 35 str.
- [9] NEDĚLNÍK, J.: Mykotoxiny, jejich výskyt v surovinách, produktech a krmivech rostlinného původu. In *Vědecký výbor fyto-sanitární a životního prostředí*, Praha. 31.1.2003, 81 str.
- [10] STEIN, M.: *Ein problem von ungeahnter Tragweite: Mykotoxine* [online]. c2009, poslední revize 19.2.2009 [citováno 9. března 2010] <<http://www.animal-health-online.de/gross/2009/02/19/ein-problem-von-ungeahnter-tragweite-mykotoxine/10622/>>.
- [11] HAJŠLOVÁ, J., LANCOVÁ, K., SEHNALOVÁ, M., KRPLOVÁ, A., ZACHARIÁŠOVÁ, M., MORAVCOVÁ, H., NEDĚLNÍK, J., MARKOVÁ, J., EHRENBERGEROVÁ, J.: Occurrence of Trichothecene Mycotoxins in Cereals Harvested in the Czech Republic. *Czech J. Food Sci.*, 2007, Vol. 25, No. 6, pp. 339 – 350.
- [12] VÍTOVÁ, E.: *Hygiena potravin*. Brno: VUT, 2004, 128 str. ISBN 80-214-2680-2.
- [13] SUCHÝ, P., HERZIG, I.: *Plísně a mykotoxiny - Prevence jejich vzniku a dekontaminace v krmivech*. Brno: Vědecký výbor výživy zvířat – studie, 2005, s. 1-22.
- [14] LEFNEROVÁ, D., ŠIMŮNEK, J.: *Přírodní karcinogeny*. Brno: Ústav preventivního lékařství LF MU - studie, 2008, s. 11- 14.
- [15] MORRISSEY, R., VESONDER, R.: *Effect of Deoxynivalenol (Vomitoxin) on Fertility, Pregnancy, and Postnatal Development of Sprague-Dawley Rats*. American Society for Microbiology, May 1985, vol. 49, no. 5, pp. 1062 – 1066.
- [16] VINCELLI, P., PARKER, G.: *Fumonisin, Vomitoxin and Other Mycotoxins in Corn Produced by Fusarium Fungi*. Cooperative extensit service - University of Kentucky – College of Agriculture. 2002, 8 str.
- [17] SCHNEIDEROVÁ, P.: *Bezpečnost krmiv a zdraví zvířat – mykotoxiny*. ÚZPI. 45 str.

- [19] OBRUSNÍKOVÁ, R.: *Vývoj a optimalizace ELISA metody pro stanovení obsahu vykovaného hemoglobinu ve vzorcích krve*. Brno, 2008. 80 str. Bakalářské práce na Přírodovědecké fakultě Masarykovy univerzity. Vedoucí bakalářské práce Mgr. Jan Příbyl, Ph.D.
- [20] BINDER, E. M.: *Managing the risk of mycotoxins in modern feed production*. Animal Feed Science and Technology 133 (2007), č. 1-2, pp. 149-166.
- [21] HUSSEIN, S. H., BRASEL, J. M.: *Toxicity, metabolism, and impact of mycotoxins on humans and animals*. Toxicology 167 (2001), pp 101-134.
- [22] KUIPER-GOODMAN, T.: *Mycotoxins: risk assessment and legislation*. Toxicology Letters, 1995, vol. 82/83, pp. 853-859.
- [23] GILBERT, J., ANKLAM, E.: *Validation of analytical methods for determining mycotoxins in foodstuffs*. trends in analytical chemistry, 2002, vol. 21, no. 6+7, pp. 468-486.
- [24] NEDĚLNÍK, J., MORAVCOVÁ, H. Mykotoxiny a píciny in *Sborník vědeckých prací z mezinárodního symposia Konzervace objemných krmiv*, Brno: VFU Brno, 2006, s. 13 – 24. ISBN 80-7305-555-4.
- [25] RICHARD, J. L.: *Some major mycotoxins and their mycotoxicoses – An overview*. International Journal of Food Microbiology, 2007, vol. 119, pp. 3–10
- [26] GUTLEB, A.C., MORRISON, E., MURK, A. J.: *Cytotoxicity assai for mycotoxins produced by Fusarium strans: a review*. Environmental Toxicology and Pharmacology, 2002, vol. 11, pp. 309- 320.
- [27] CVETNIČ, Z., PEPELJNJAK, S.: *Distribution and mycotoxin-producing ability of some fungal isolates from the air*. Department of Microbiology, 24 March 1995, pp. 491-495.
- [28] PATERSON, R. R. M., LIMA, N.: *How will climate change affect mycotoxins in food?* Food Research International, 2009, pp. 1-13
- [29] BOEIRA, L.S, BRYCE, J.H., STEWARD, G.G., FLANNIGAN, B.: *Influence of cultural conditions on sensitivity of brewing yeasts growth to Fusarium mycotoxins zearalenone, deoxynivalenol and fumonisin B₁*. International Biodeterioration & Biodegradation, 2002, vol. 50, pp. 69 – 81.
- [30] JOUANY, J.P.: *Methods for preventing, decontaminating and minimizing the toxicity of mycotoxins in feeds*. Animal Feed Science and Technology, 2007, vol. 137, pp. 342-362. 0377-8401
- [31] D'MELLO, J.P.F., MACDONALD, A.M.C.: *Mycotoxins*. Animal Feed Science and Technology, 1997, vol. 69, pp. 155-66. PIIS 0377/8401(97)00103-X
- [32] JEŽKOVÁ, A., ŽDÁROVÁ KARASOVÁ, J., DOHNAL, V., POLIŠENSKÁ, I.: *Vývoj metodiky extrakce na tuhé fázi a HPLC-MS pro stanovení deoxynivalenolu v ječmeni a sladu*. Chem. Listy 103, (2009), pp. 679-683.
- [33] STEHLÍKOVÁ, J.: *Zavedení stanovení zearalenonu v obilovinách, krmných surovinách a podobných matricích metodou ELISA*. Brno: Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský - studie, 2007, 11 str.
- [34] KOSTELÁNSKÁ, M., HAJŠLOVÁ, J., ZACHARIÁŠOVÁ, M., MALACHOVÁ, A., KALACHOVÁ, K., POUSTKA, J., FIALA, J., SCOTT, M.P., BERTHILLER, F., KRŠKA, R.: *Occurrence of Deoxynivalenol and Its Major Conjugate, Deoxynivalenol-3-Glucoside, in Beer and Some Brewing Intermediates*. Journal of agricultural and food chemistry, 2009, vol. 57, pp. 3187-3194.

- [35] OSTRÝ, V., RUPRICH, J., HAJŠLOVÁ, J.: *Pravděpodobnostní modelování přívodu deoxynivalenolu z potravin na bázi obilovin*. Vědecký výbor pro potraviny, Brno. 2007, 20 str.
- [36] OSTRÝ, V., RUPRICH, J.: *Pravděpodobnostní modelování přívodu zearalenonu z potravin na bázi obilovin*. Vědecký výbor pro potraviny, Brno. 2007, str. 17.
- [37] NEDĚLNÍK, J., HAJŠLOVÁ, J., SÝKOROVÁ, S.: *Mykotoxiny – detekce, dynamika a podmínky kontaminace potravin a krmiv*. Vědecký výbor fyto-sanitární a životního prostředí. Praha, 2006, 32 str.
- [38] RUPRICH, J., OSTRÝ, V.: *Immunochemical methods in health risk assessment: Cross reactivity of antibodies against mycotoxin deoxynivalenol with deoxynivalenol-3-glucoside*. Centre for the Hygiene of food Chains in Brno, 2008, pp. 37-38.
- [39] VÁŇOVÁ, M., HAJŠLOVÁ, J., HAVLOVÁ, P., LANCOVÁ, K., SPITZEROVÁ, D.: *Effect of spring barley protection on the production of Fusarium spp. Mycotoxins in grain and malt using fungicides in field trials*. The Ministry on Agriculture on the Czech Republic, 2004, pp. 447-455.
- [40] DOHNAL, V., SLÁDKOVÁ, A., KUČA, K., JUN, D.: *Umělé nosy při detekci plísni a mykotoxinů*. Vojenské zdravotnické listy, 2008, vol. 77, č. 2, s. 66-70.
- [41] HUDEC, K.: *Dopad fuzariózy klasu na kvalitu a kvantitu úrody*. Agromanuál – Profesionálna ochrana rastlín, Apríl 2009. 32 str.
- [42] ŠTOLC, R.: *Mykotoxiny – stále podceňované téma*. Sano – Moderní výživa zvířat, spol. s.r.o., 39-44 str.
- [43] JEWERS, K.: *Mycotoxins and their effect on poudry produciton*. Tropical Development and Research Institute, London, 1990, 8 str.
- [44] KRÁLOVÁ, J., HAJŠLOVÁ, J., POUSTKA, J., HOCHMAN, M., BJELKOVÁ, M., ODSTRČILOVÁ, L.: *Occurence of Alternaria Toxins in Fibre Glax, Linseed, and Peas Grown in Organic and Convetional Farms, Monitorin Pilot Study*. Czech J. Food Science, vol. 24, no.6, 2002, pp. 288-296.
- [45] GARCIA, A.: *Dealing with Mycotoxin-contaminated Feeds at Feeding Time* [online], poslední revize jan. 2010 [citováno 15. 04. 2010] Dostupné z <<http://agbiopubs.sdstate.edu/articles/ExEx4043.pdf>>.
- [46] SALAY, E.: *Reducing Mycotoxins in Brazilian Crops*. Food Safety in Food Security and Food trade. September 2003, pp. 15 – 17.
- [47] MALÍŘ, M., OSTRÝ, V.: *Ochratoxin A v potravinách*. Brno: Vědecký výbor pro potraviny, 15.3.2007, 16 str.
- [48] NAKAJIMA, T., YOSHIDA, M., KAWADA, N.: *Fungicide application timing on Fusarium head blight and mycotoxin accumulation in barley in Japan*. 3rd. Int. FHB Symposium. Szeged, 2008, vol. 36, pp. 659-665.
- [49] BERTHILLER, F., SCHUHMACHER, R., ADAM, G., KRŠKA, R.: *Formation, determination and significance of masked and other conjugated mycotoxins*. Anal. Bional. Chem (2009), 395: pp. 1243-1252. DOC 10.1007/s00216-009-2874-x.
- [50] KMOCH, M., ŠAFRÁNKOVÁ, I.: *Occurence of Fusarium spp. on the corn kernel (ZEA Mays L.)*. Department of Crop Science, Breeding and Plant Medicine, Faculty of Agronomy, Mendel University of Agriculture and Forestry in Brno, 2008. str. 8
- [51] BHAT, R.V., SHEFTY, H.P.K., VASANTHI, S.: *Human and animal health significance of mycotoxins in sorghum with special reference to fumonisins*. National Institute of Nutritoin. India, 2000. pp. 107-115.

- [52] BALÁSZ, E., SCHEPERS, J.S.: *The mykotoxin threat to food safety*. International Journal of Food Mycology, 2007, vol. 119, pp. 1-2.
- [53] ŠIBOR, J.: *Působení toxických látek na organismy*. [online]. Poslední revize 2006. [citováno 7. Března 2010]. Dostupné z <<http://svp.muni.cz/ukazat.php?docId=532>>
- [54] OWSLEY, W.F.F.: *Swine herd monitoring: Feed*. Animal Sciences, April, 2003, 3 str.
- [55] PARK, D.L., NJAPAU, H., BOUTRIF, E.: *Minimising risks posed by mycotoxins utilising the HACCP concept*. Third joint FAO/WHO/UNEP international conference on mycotoxins, 3-6 March 1999, 13 str.
- [56] WHITE technical research group: *Myocotoxins. Food safety information papers*. 16.11.2000, str.. 9.
- [57] ADEGOKE, G.O.: *Mycotoxins: Are we neglecting them!* Department of Food technology, 19. January, 2006, 7 str.
- [58] WHITLOW, L.W., HAGLER, W.M.: *Mycotoxins in dairy cattle: Occurrence, toxicity, preventiv and treatment*. Department of Animal Science and department of Poultry science, 2004, pp. 133-152
- [59] WHITLOW, L.: *Mycotoxins & Distillers' Grains*. ANGUS Journal, December 2007, pp. 126-129.
- [60] KAMEL, CH.: *Nový přístup k využití přirozených obranných mechanismů zvířete účinné ochraně před působením mykotoxinů*. Krmivářství, 2007, vol. 4, pp. 20-21.
- [61] LERDA, D.: *Newsletter of CRL Mycotoxins*. Joint Research Centre – Institute for Reference Materials and Measurements. 2009., vol. 1, 14 str.
- [62] TVARŮŽEK, L., LIJING, J.: *Metody rychlé izolace fytopatogenních hub rodu Fusarium spp. ze vzorků zrna a z půdy*. Kroměříž: Agrokrom – Zemědělský výzkumný ústav, 2001, 7 s..
- [63] KUBÍČEK, J.: *Geneticky modifikovaná kukuřice v ČR, důvody pro pěstování a možnosti jejího využití*. Zlín, 2008, 112 str. Diplomová práce na Technologické fakultě Univerzity Tomáše Bati ve Zlíně. Vedoucí diplomové práce Ing. Karel Říha.
- [64] JEDLIČKOVÁ, L.: *Stanovení trichothecenových mykotoxinů v ječmeni a sladu*. Brno, 2007, str. 94. Diplomová práce Přírodovědecké fakulty Masarykovy Univerzity v Brně. Vedoucí diplomové práce Ing. Dagmar Gajdošová.
- [65] KRAFT, W., DÜRR, U.: *Klinická laboratorna diagnostika vo vetetinarnej medicíne*. Bratislava: ŠVÚ, 2001. 365 s. ISBN 80-88700-51-5.
- [66] TOMAN, M. a kol.: *Praktická cvičení z imunologie*. Brno: září 2003. ISBN 80-902963-6-X.
- [67] KELLNEROVÁ, D.: *Maximální limity na vyhodnocování DON a ZEA v krmivech a žluči – ústní podání*, 2009.
- [68] SOP č. 18 Sevaron, s.r.o.: *Kvantitativní stanovení deoxynivalenolu v krmných směsích metodou ELISA*. 27.8.2007.
- [69] SOP č. 19 Sevaron, s.r.o.: *Kvantitativní stanovení zearalenonu v krmných směsích metodou ELISA*. 27.8.2007.
- [70] VAN EMON, J. M.: *Immunoassay and other bioanalytical techniques*. New York: Taylor & Francis Group, 2007. 512 str. ISBN 0-8493-3942-1.
- [71] CROWTHER, J. R.: *The Elisa Guidebook*. Second Edition. Austria: 2009, 566 s. ISBN 975-1-60327-253-7.

SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK A SYMBOLŮ

Ab	Konjugát (protilátka)
Ag	Antigen
ALARA	As Low As Reasonably Achievable; co nejnižší dosažitelná úroveň
Aw	Aktivita vody
DON	Deoxynivalen
CNS	Centrální nervová soustava
EIA	Enzyme Immunoassay; enzymová imunoanalýza
ELISA	Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay; enzymová imunoanalýza
FAO	Food and Agriculture Organization; Organizace pro výživu a zemědělství
IARC	International Agency for Research on Cancer; Mezinárodní agentura pro výzkum rakoviny
KD	Krmná dávka
KPB	Prasnice březí a jalové
KPK	Prasnice kojící
KTJ	Kolonie tvořící jednotky
LD₅₀	Lethal Dose, 50%; smrtelná dávka v 50% případů
OD	Optická denzita
PCH	Prasničky chovné
Prasnice	Prase, které již porodilo
Prasnička	Prase, které ještě nerodilo
RIA	Radioimmunoassay, radioimunoanalýza
SD	Směrodatná odchylka
WHO	World Health Organization; Světová zdravotnická organizace
ZEA	Zearalenon
ZEN	Zearalenon
Zmetek	Mrtvé prase

PŘÍLOHY
PŘÍLOHA 1

Výnos
Ministerstva pôdohospodárstva Slovenskej republiky

ktorým sa mení a dopĺňa výnos Ministerstva pôdohospodárstva Slovenskej republiky zo 7. Októbra 1997 č. 1497/1/1997-100 o kŕmnych surovinách na výrobu kŕmnych zmesí a o hospodárskych kŕmivách v znení neskorších predpisov

Výnos Ministerstva pôdohospodárstva Slovenskej republiky zo 7. Októbra 1997 č. 1497/1/1997-100 o kŕmnych surovinách na výrobu kŕmnych zmesí a o hospodárskych kŕmivách v znení výnosu z 31. januára 2002 č. 39/1-2002-100 a v znení výnosu z 12. februára 2003 č. 149/1/2003-100:

Nežiaduca látka	Kŕmivá	Najvyššie prípustné množstvo v mg.kg⁻¹ kŕmiva v prepočte na 12% vlhkosť
Aflatoxin B ₁	Kŕmne suroviny, okrem: Podzemnice, kopy, bavlníka, palmových a kokosových orechov, kukurice a produktov z nich.	0,05 0,02
	Kompletné kŕmivá pre hovädzí dobytok, ovce a kozy, okrem: dojníc teľiat a jahniat.	0,05 0,005 0,01
	Kompletné kŕmivá pre ošípané a hydinu, okrem kŕmív pre mladé zvieratá.	0,02
	Kompletné kŕmivá pre ostatné zvieratá.	0,01
	Doplňkové kŕmivá pre hovädzí dobytok, ovce a kozy, okrem kŕmív pre dojnice, teľatá a jahňatá.	0,05
	Doplňkové kŕmivá pre ošípané a hydinu, okrem kŕmív pre mladé zvieratá.	0,03
	Doplňkové kŕmivá pre ostatné zvieratá.	0,005
	Deoxynivalenol (DON) T2 – toxín HT 2 - toxín	Obilniny a vedľajšie produkty z obilnín pre monogastre Obilniny a vedľajšie produkty z obilnín pre prežúvavce KZ pre dospelé prežúvavce pri spotrebe KZ nad 5 kg na 1 kŕmny deň KZ pre brojlerové kurčatá KZ pre znáškovú hydinu KZ pre ošípané

Nežiaduca látka	Krmivá	Najvyššie prípustné množstvo v mg.kg ⁻¹ krmiva v prepočte na 12% vlhkosť
Ochratoxín A	KZ pre znáškovú hydinu KZ pre dospelé prežúvavce KZ pre ostatné zvieratá	0,01 0,1 0,025
Zearalenon (F2-toxín)	Kŕmne suroviny KZ pre prežúvavce, okrem KZ pre plemenné zvieratá KZ na výkrm brojlerov, moriek, husí a kačíc KZ pre nosnice a inú hydinu a KZ na výkrm ošípaných	10 2,0 0,5 0,08

DOPORUČENÍ KOMISE

ze dne 17. srpna 2006

o přítomnosti deoxynivalenolu, zearalenonu, ochratoxinu A, T-2 a HT-2 a fumonisinů v produktech

určených ke krmení zvířat

(Text s významem pro EHP)

(2006/576/ES)

KOMISE EVROPSKÝCH SPOLEČENSTVÍ,

s ohledem na Smlouvu o založení Evropského společenství,

a zejména na druhou odrážku článku 211 této smlouvy,

vzhledem k těmto důvodům:

(1) Na žádost Komise přijal Evropský úřad pro bezpečnost potravin (EFSA) stanoviska týkající se mykotoxinů – dne 2. června 2004 (1) k deoxynivalenolu, dne 28. července 2004 (2) k zearalenonu, dne 22. září 2004 (3) k ochratoxinu A a dne 22. června 2005 (4).

(2) Podle těchto stanovisek všechny čtyři mykotoxiny vyvolávají u několika druhů zvířat toxické účinky. Deoxynivalenol, zearalenon a fumonisin B1 a B2 přecházejí z krmiva do masa, mléka a vajec pouze ve velmi malé míře, a potraviny živočišného původu tudíž přispívají k celkové expozici člověka těmto toxinům pouze okrajově. Ochratoxin A může přecházet z krmiva do potravin živočišného původu, ale z hodnocení expozice vyplývá, že potraviny živočišného původu mají na expozici ochratoxinem A prostřednictvím stravy u člověka pouze drobný podíl.

(1) Stanovisko Vědeckého výboru pro kontaminující látky v potravinovém řetězci Evropského úřadu pro bezpečnost potravin (EFSA) vydané na žádost Komise a týkající se deoxynivalenolu jakožto nežádoucí látky v krmivech, přijaté dne 2. června 2004:

http://www.efsa.europa.eu/etc/medialib/efsa/science/contam/contam_opinions/478.Par.0005.File.dat/opinion05_contam_ej73_deoxynivalenol_v2_en1.pdf

(2) Stanovisko Vědeckého výboru pro kontaminující látky v potravinovém řetězci Evropského úřadu pro bezpečnost potravin (EFSA) vydané na žádost Komise a týkající se zearalenonu jakožto nežádoucí látky v krmivech, přijaté dne 28. července 2004:

http://www.efsa.europa.eu/etc/medialib/efsa/science/contam/contam_opinions/527.Par.0004.File.dat/opinion_contam06_ej89_zearalenone_v3_en1.pdf

(3) Stanovisko Vědeckého výboru pro kontaminující látky v potravinovém řetězci Evropského úřadu pro bezpečnost potravin (EFSA) vydané na žádost Komise a týkající se ochratoxinu A jakožto nežádoucí látky v krmivech, přijaté dne 22. září 2004: http://www.efsa.europa.eu/etc/medialib/efsa/science/contam/contam_opinions/645.Par.0001.File.dat/opinion_contam09_ej101_ochratoxina_en1.pdf

(4) Stanovisko Vědeckého výboru pro kontaminující látky v potravinovém řetězci Evropského úřadu pro bezpečnost potravin (EFSA) vydané na žádost Komise a týkající se fumonisinů jakožto nežádoucí látky v krmivech, přijaté dne 22. června 2005: http://www.efsa.europa.eu/etc/medialib/efsa/science/contam/contam_opinions/1037.Par.0001.File.dat/contam_op_ej235_fumonisin_en1.pdf

(3) Údaje o přítomnosti T-2 a HT-2 toxinu v produktech určených ke krmení zvířat jsou v současné době velmi omezené. Je rovněž naléhavě nutné vyvinout a validovat citlivou metodu zkoušení. Existují však náznaky, že by přítomnost T-2 a HT-2 v produktech určených ke krmení zvířat mohla být důvodem k obavám. Proto je nezbytné vyvinout citlivou metodu zkoušení, shromáždit větší množství údajů o výskytu a provést další šetření a výzkum zaměřené na faktory podílející se na přítomnosti T-2 a HT-2 v obilovinách a výrobcích z obilovin, zejména v ovsu a výrobcích z ovsa.

(4) S ohledem na závěry vědeckých stanovisek uvedených v 1. bodě odůvodnění, na nedostatek spolehlivých údajů o T-2 a HT-2 toxinu a na velké rozdíly v přítomnosti těchto mykotoxinů v jednotlivých letech je zapotřebí, aby se kromě údajů, které jsou již k dispozici z koordinovaných kontrolních programů pro roky 2002 (5), 2004 (6) a 2005 (7).

- (5) Ve snaze poskytnout členským státům vodítko, podle kterého by se mohly orientovat v otázce přijatelnosti obilovin a výrobků z obilovin a krmných směsí určených pro krmení zvířat, a s cílem zamezit rozdílnému akceptování hodnot v různých členských státech a z toho plynoucímu nebezpečí narušení hospodářské soutěže je vhodné, aby byly doporučeny směrné hodnoty.
- (6) V případě fumonisinu B1 + B2 by členské státy měly směrné hodnoty používat až od 1. října 2007, aby byl zajištěn soulad s pravidly stanovenými nařízením Komise (ES) č. 856/2005 ze dne 6. června 2005 kterým se mění nařízení (ES) č. 466/2001, pokud jde o fusariové toxiny (8).

-
- (5) Doporučení Komise 2002/214/ES ze dne 12. března 2002 o koordinovaném programu kontrol v oblasti výživy zvířat pro rok 2002 dle směrnice Rady 95/53/ES (Úř. věst. L 70, 13.3.2002, s. 20).
- (6) Doporučení Komise 2004/163/ES ze dne 17. února 2004 o koordinovaném programu kontrol v oblasti výživy zvířat pro rok 2004 dle směrnice Rady 95/53/ES (Úř. věst. L 52, 21.2.2004, s. 70).
- (7) Doporučení Komise 2005/187/ES ze dne 2. března 2005 o koordinovaném programu kontrol v oblasti výživy zvířat pro rok 2005 dle směrnice Rady 95/53/ES (Úř. věst. L 62, 9.3.2005, s. 22).
- (8) Úř. věst. L 143, 7.6.2005, s. 3.

-
- (7) Hodnocení postupu stanoveného v tomto doporučení by mělo být provedeno do roku 2009, zejména za účelem posouzení míry jeho přispění k ochraně zdraví zvířat. Údaje z monitorování získané na základě tohoto doporučení rovněž umožní lépe pochopit každoroční rozdíly a přítomnost těchto mykotoxinů v celé řadě vedlejších produktů používaných ke krmení zvířat, což má prvořadý význam pro případné přijetí dalších právních opatření,

DOPORUČUJE:

1. Členské státy by s aktivním přispěním provozovatelů krmivářských podniků měly posílit monitorování přítomnosti deoxynivalenolu, zearalenonu, ochratoxinu A a fumonisinu B1 + B2, T-2 a HT-2 toxinu v obilovinách a výrobcích z obilovin určených ke krmení zvířat a v krmných směsích.

2. Členské státy by měly zajistit, aby byly vzorky současně analyzovány na přítomnost deoxynivalenolu, zearalenonu, ochratoxinu A, fumonisinu B1 + B2 a T-2 a HT-2 toxinu, aby bylo možné zhodnotit míru společného výskytu.
3. Členské státy by měly věnovat zvláštní pozornost přítomnosti těchto mykotoxinů ve vedlejších nebo druhotných produktech výroby potravin určených ke krmení zvířat.
4. Členské státy by měly zajistit pravidelné poskytování výsledků zkoušek Komisi, aby výsledky mohly být zaneseny do jedné databáze.
5. Členské státy by měly zajistit, aby byly při posuzování přijatelnosti krmných směsí a obilovin a výrobků z obilovin určených pro krmení zvířat používány směrné hodnoty uvedené v příloze. V případě fumonisinu B1 + B2 by členské státy měly tyto směrné hodnoty používat od 1. října 2007.
6. Členské státy by měly zejména zajistit, aby provozovatelé krmivářských podniků směrné hodnoty uvedené v bodě 5 používali ve svém systému analýzy rizik a kritických kontrolních bodů (1) pro stanovení kritických limitů v kritických kontrolních bodech oddělujících přijatelnost od nepřijatelnosti, pro prevenci, vyloučení nebo snížení zjištěných rizik. Při používání těchto směrných hodnot by členské státy měly zohledňovat skutečnost, že směrné hodnoty pro obiloviny a výrobky z obilovin jsou stanoveny pro nejtolerantnější druhy zvířat, a že tudíž mají být považovány za horní směrné hodnoty. U krmiv pro citlivější zvířata by členské státy měly zajistit, aby výrobci krmiv používali pro obiloviny a výrobky z obilovin nižší směrné hodnoty zohledňující citlivost jednotlivých druhů zvířat a umožňující dodržet směrné hodnoty stanovené pro krmné směsi pro tyto druhy zvířat.

V Bruselu dne 17. srpna 2006.

Za Komisi

Markos KYPRIANOU

člen Komise

SMĚRNÉ HODNOTY

Mykotoxin	Produkty určené ke krmení zvířat	Směrné hodnoty v mg.kg ⁻¹ (ppm) pro krmivo s obsahem vlhkosti 12
Deoxynivalenol	Krmné suroviny (*) - obiloviny a produkty obilovin (**) s výjimkou vedlejších produktů kukuřice - vedlejší produkty kukuřice Doplňková a kompletní krmiva s výjimkou: - doplňkových a kompletních krmiv pro prasata - doplňkových a kompletních krmiv pro telata (< 4 měsíce), jehňata a kůzlata	8 12 5 0,9 2
Zearalenon	Krmné suroviny (*) - obiloviny a produkty obilovin (**) s výjimkou vedlejších produktů kukuřice - vedlejší produkty kukuřice Doplňková a kompletní krmiva: - doplňková a kompletní krmiva pro selata a prasničky (mladé prasnice) - doplňková a kompletní krmiva pro prasnice a výkrm prasat - doplňková a kompletní krmiva pro telata, dojnice, ovce (včetně jehňat) a kozy (včetně kůzlat)	2 3 0,1 0,25 0,5
Ochratoxin A	Krmné suroviny (*) - obiloviny a produkty obilovin (**) Doplňková a kompletní krmiva: - doplňková a kompletní krmiva pro prasata - doplňková a kompletní krmiva pro drůbež	0,25 0,05 0,1
Fumonisin B1 + B2	Krmné suroviny (*) - kukuřice a produkty kukuřice (***) Doplňková a kompletní krmiva pro: - prasata, koně (<i>Equidae</i>), králíky a zvířata v zájmovém chovu - ryby - drůbež, telata (< 4 měsíce), jehňata a kůzlata - dospělé přežvýkavce (> 4 měsíce) a norky	60 5 10 20 50
<p>(*) Zvláštní pozornost musí být věnována tomu, aby použití obilovin a produktů obilovin zkrmovaných zvířatům přímo nezpůsobilo v denní krmné dávce, že by zvíře bylo vystaveno vyšší úrovni mykotoxinů, než je odpovídající úroveň expozice stanovená pro případ, kdy jsou v denní krmné dávce použita pouze kompletní krmiva.</p> <p>(**) Termín „obiloviny a výrobky z obilovin“ nezahrnuje pouze krmné suroviny uvedené v bodě 1 „Zrna obilovin, produkty a vedlejší produkty z nich“ neúplného seznamu hlavních krmných surovin v části B přílohy směrnice Rady 96/25/ES ze dne 29. dubna 1996 o oběhu krmných surovin (Úř. věst. L 125, 23.5.1996, s. 35), ale též další krmné suroviny pocházející z obilovin, zejména pícniny a objemná krmiva z obilovin.</p> <p>(***) Termín „kukuřice a kukuřičné produkty“ nezahrnuje pouze krmné suroviny pocházející z kukuřice uvedené v bodě 1 „Zrna obilovin, produkty a vedlejší produkty z nich“ neúplného seznamu hlavních krmných surovin v části B přílohy směrnice 96/25/ES, ale též další krmné suroviny pocházející z kukuřice, zejména pícniny a objemná krmiva z kukuřice.</p>		

DOPORUČENÍ KOMISE

ze dne 17. srpna 2006

k prevenci a snižování fusariových toxinů v obilovinách a výrobcích z obilovin

(Text s významem pro EHP)

(2006/583/ES)

KOMISE EVROPSKÝCH SPOLEČENSTVÍ,

s ohledem na Smlouvu o založení Evropského společenství,

a zejména na druhou odrážku článku 211 této smlouvy,

vzhledem k těmto důvodům:

- (1) V souladu se směrnicí Rady 93/5/EHS ze dne 25. února 1993 o pomoci členských států Komisi a o jejich spolupráci při vědeckém zkoumání otázek týkajících se potravin (1) byl proveden a v září 2003 dokončen úkol vědecké spolupráce 3.2.10 nazvaný „Sběr údajů o výskytu fusariových toxinů v potravinách a posouzení jejich příjmu v potravě obyvatelstvem v členských státech EU“ (2). Z výsledků uvedeného úkolu vyplývá, že fusariové toxiny jsou v potravním řetězci ve Společenství široce rozšířeny. Hlavními zdroji příjmu fusariových toxinů v potravě jsou výrobky z obilovin, zejména z pšenice a kukuřice. Zatímco příjmy fusariových toxinů v potravě jsou u celé populace a u dospělých jedinců často nižší než přijatelný denní příjem (TDI) pro příslušné toxiny, u rizikových skupin, jako jsou například kojenci a malé děti, se hodnotám TDI blíží a v některých případech je dokonce překračují.
- (2) Zejména u deoxynivalenolu se příjem v potravě u malých dětí a mladistvých blíží hodnotě TDI. V případě zearalenonu by se měla věnovat pozornost skupinám obyvatelstva, které nebyly v rámci úkolu vymezeny a které mohou pravidelně ve vysokých dávkách přijímat produkty vysoce kontaminované zearalenonem. U fumonisinů výsledky kontrol sklizně roku 2003 naznačují, že kukuřice a výrobky z kukuřice mohou být fumonisinami značně kontaminovány.
- (3) Nařízení Komise (ES) č. 466/2001 ze dne 8. března 2001, kterým se stanoví maximální limity některých kontaminujících látek v potravinách (3), stanoví maximální limity deoxynivalenolu a zearalenonu a ukládá stanovit maximální limity fumonisinů a T-2 a HT-2 toxinů v obilovinách a výrobcích z obilovin počínaje rokem 2007.
- (4) Maximální limity stanovené pro fusariové toxiny v obilovinách a výrobcích z obilovin zohledňují provedené toxikologické hodnocení, výsledky vyhodnocení expozice a realizovatelnost takových limitů. Uznává se však, že je třeba vynaložit maximální úsilí na další snížení přítomnosti těchto fusariových toxinů v obilovinách a výrobcích z obilovin.
- (5) Co se týká krmiv, doporučení Komise 2006/576/ES ze dne 17. srpna 2006 o přítomnosti deoxynivalenolu, zearalenonu, ochratoxinu A, T-2 a HT-2 a fumonisinů v produktech určených ke krmení zvířat (4) doporučuje posílit monitorování přítomnosti fusariových toxinů v obilovinách a výrobcích z obilovin určených ke krmení zvířat a v krmných směsích a stanoví směrné hodnoty, které se mají používat při posuzování vhodnosti krmných směsí a obilovin a výrobků z obilovin určených pro krmení zvířat.
- (6) Přítomnost fusariových toxinů v produktech určených pro krmení zvířat může vyvolat toxické účinky u všech druhů zvířat, má vliv na zdraví zvířat, vnímavost se však u různých druhů zvířat značně liší. V zájmu ochrany zdraví zvířat a zabránění nepříznivým dopadům na živočišnou produkci je rovněž důležité předcházet a snižovat v co nejvyšší možné míře přítomnost fusariových toxinů v krmných obilovinách a produktech z krmných obilovin.
- (7) Jednotlivé články řetězce zpracování obilí by proto měly být vedeny k přijetí správné praxe s cílem předcházet a snižovat kontaminaci fusariovými toxiny a mělo by se toho dosáhnout prostřednictvím zásad jednotně uplatňovaných v rámci Společenství. Plné zavedení zásad podle tohoto doporučení do praxe by mělo vést k dalšímu snížení úrovně kontaminace.
- (8) Tyto zásady zohledňují „Zásady správné praxe pro prevenci a snižování kontaminace obilovin mykotoxiny, včetně příloh týkajících se ochratoxinu A, zearalenonu, fumonisinů a trichothecenů (CAC/RCP 51-2003)“ přijaté Komisí pro Kodex *Alimentarius* v roce 2003, 29.8.2006 CS Úřední věstník Evropské unie L 234/35

- (1) Úř. věst. L 52, 4.3.1993, s. 18. Směrnice ve znění nařízení Evropského parlamentu a Rady (ES) č. 1882/2003 (Úř. věst. L 284, 31.10.2003, s. 1).
- (2) Zpráva je k dispozici na internetové stránce Evropské komise, GŘ pro zdraví a ochranu spotřebitele (<http://ec.europa.eu/food/fs/scoop/>)

task3210.pdf).

- (3) Úř. věst. L 77, 16.3.2001, s. 1. Nařízení naposledy pozměněné nařízením (ES) č. 199/2006 (Úř. věst. L 32, 4.2.2006, s. 34). (4) Úř. věst. L 229, 23.8.2006, s. 7.

DOPORUČUJE:

aby členské státy při přijímání opatření zaměřených na články řetězce zpracování obilí zohlednily jednotné zásady stanovené v příloze za účelem řízení a zvládnutí kontaminace obilovin fusariovými toxiny.

V Bruselu dne 17. srpna 2006.

Za Komisi

Markos KYPRIANOU

člen Komise

ZÁSADY PREVENCE A SNIŽOVÁNÍ KONTAMINACE OBILOVIN FUSARIOVÝMI TOXINY

ÚVOD

1. Různé houby rodu *Fusarium* ssp běžně se vyskytující v půdě mohou produkovat celou řadu různých mykotoxinů ze skupiny trichothecenů, jako jsou například deoxynivalenol (DON), nivalenol (NIV), T-2 a HT-2 toxiny a některé další toxiny, jako jsou zearalenon a fumonisiny B1 a B2. Houby rodu *Fusarium* ssp běžně napadají obiloviny pěstované v oblastech mírného pásma v Americe, Evropě a Asii. Některé toxikogenní houby rodu *Fusarium* jsou schopny v různé míře produkovat dva nebo i více těchto toxinů.
2. V současné době není možné dosáhnout úplné eliminace komodit kontaminovaných mykotoxiny, úsilí se tedy zaměřuje na minimalizaci výskytu těchto toxinů prostřednictvím správné zemědělské praxe. Cílem těchto zásad prevence výskytu a snižování obsahu fusariových toxinů je poskytnout členským státům na zvážení jednotné pokyny při vynakládání úsilí na řízení a zvládnutí kontaminace těmito mykotoxiny. Aby byly tyto zásady účinné, je třeba, aby producenti v každém členském státě posoudili tyto obecné zásady před jejich uplatněním v praxi s ohledem na místní plodiny, klimatické podmínky a agrotechnickou praxi. Je důležité, aby si producenti uvědomili, že správná zemědělská praxe je základem řízení kontaminace obilovin fusariovými toxiny, po ní následuje uplatňování správné výrobní praxe během manipulace, skladování, zpracování a distribuce obilovin pro potraviny a krmiva. Vypracováním vnitrostátních zásad správné praxe vycházejících z těchto obecných zásad a vytvořením specifických zásad správné praxe pro jednotlivé druhy obilovin se zlepší jejich použitelnost, zejména v případě takových plodin, jako je například kukuřice.
3. V těchto zásadách jsou popsány faktory, které podporují infekci, růst a tvorbu toxinů v obilovinách na úrovni prvovýroby, a metody jejich kontroly. Je třeba zdůraznit, že uplatňovaná opatření v době výsevu, před sklizní a po sklizni budou u každé jednotlivé plodiny záviset na převládajících klimatických podmínkách, přičemž je nutno zohlednit místní plodiny a současnou výrobní praxi v dané zemi či regionu. Proto by všichni, kdo jsou zapojeni do dodavatelského řetězce, měli pravidelně provádět vlastní posuzování rizika, a tak rozhodovat o rozsahu opatření, která je třeba přijmout pro prevenci nebo minimalizaci kontaminace fusariovými toxiny. Toto posouzení je zejména vhodné z hlediska typu plodiny, která se má pěstovat, jako je pšenice nebo kukuřice. Způsob infekce a dynamika tvorby toxinu se liší od plodiny k plodině a jsou ovlivněny agronomickými faktory. Osevní postupy, jejichž součástí je kukuřice, představují vysoké riziko. Pšenice a další obiloviny pěstované v těchto osevních postupech nebo v jejich blízkosti vyžadují rovněž důkladnou péči a kontrolu.
4. Kontaminaci obilovin fusariovými toxiny může způsobit mnoho faktorů. Správná zemědělská praxe nemůže ovlivnit všechny tyto faktory, jako například povětrnostní podmínky. Kromě toho nejsou všechny faktory stejně důležité, navíc kontaminace fusariovými toxiny může být výsledkem kombinace jednotlivých dílčích faktorů. Je proto důležité zaujmout integrovaný přístup zahrnující všechny faktory, které přicházejí v úvahu. Zejména je třeba zamezit kumulaci různých rizikových faktorů vzhledem k jejich možnému vzájemnému působení. Rovněž velmi důležité je zaznamenávat předchozí zkušenosti s prevencí výskytu a tvorby hub rodu *Fusarium* a jejich toxinů z předchozích let, a aby je bylo možné využít při volbě opatření k prevenci tvorby *Fusarium* spp. v následujících letech. Měly by být zavedeny postupy pro správnou manipulaci (např. oddělené uskladnění, mechanické čištění, vracení dodávky nebo změna účelu použití) s obilovinami, které mohou představovat riziko pro zdraví lidí a/nebo zvířat.
5. Níže uvedené zásady se zaměřují na klíčové faktory kontroly kontaminace fusariovými toxiny na poli. Nejdůležitější jsou: střídání plodin, zpracování půdy, výběr odrůdy nebo hybridu a správné použití fungicidů.

RIZIKOVÉ FAKTORY, K NIMŽ JE TŘEBA PŘIHLÉDNOUT PŘI SPRÁVNÉ ZEMĚDĚLSKÉ PRAXI

STŘÍDÁNÍ PLODIN

6. Střídání plodin je všeobecně účinným způsobem snižování rizika kontaminace v závislosti na kmenu houby a odrůdě plodiny. Je velmi účinné zejména při snižování kontaminace ozimů. Dvouděložné plodiny, které nejsou hostiteli druhů rodu *Fusarium*, jež napadá obiloviny, jako jsou brambory, cukrová řepa, jetel, vojtěška nebo zelenina, by se měly používat v systému střídání plodin ke snížení inokula v půdě. K pěstování následných drobnozrnných obilovin, jako je pšenice, by se mělo přistupovat až po posouzení rizika infekce patogeny *Fusarium* spp. Byl zjištěn úzký vztah mezi předplodinou a způsobem zpracování půdy, které poukazují na význam posklizňových zbytků hostitelské plodiny v životním cyklu patogenů *Fusarium* spp.

Pěstovala-li se pšenice po plodinách, jako je například kukuřice nebo obiloviny, které jsou hostiteli druhů rodu *Fusarium*, byl obsah DON vyšší. Obzvláště vysoké koncentrace DON byly zjištěny tam, kde předchází plodinou byla kukuřice, jelikož je možným hostitelem *Fusarium graminearum*, které je známé jako silný producent DON. Obsah DON byl však výrazně nižší u pšenice po plodině, která je hostitelem hub *Fusarium* tam, kde se prováděla orba na rozdíl od pšenice po hostitelské plodině, ale s minimální kultivací.

VOLBA ODRŮDY/HYBRIDU

7. Zvolte hybridy nebo odrůdy, které jsou nejvhodnější pro půdní a klimatické podmínky a běžně používané agronomické postupy. Sníží se tím stres rostlin a plodina bude méně citlivá na houbové infekce. V dané oblasti by se měly pěstovat jen odrůdy doporučené pro použití v členském státě nebo v konkrétní oblasti členského státu. Pokud jsou k dispozici, pěstujte odrůdy odolné vůči houbám přenosným osivem a odolné vůči škodlivému hmyzu. Volba odrůdy z hlediska tolerance vůči infekci patogeny *Fusarium* spp. musí rovněž vycházet z posouzení rizika infekce.

OSEVNÍ PLÁN

8. Pokud je to možné, pěstování plodin by mělo být naplánováno tak, aby se vyhnulo klimatickým podmínkám, které prodlužují dozrávání na poli před sklizní. Za rizikový faktor infekce patogeny *Fusarium* je nutné také považovat stres ze sucha.
9. Dbejte, aby hustota výsevu/výsadby nebyla příliš vysoká, dodržujte meziřádkové vzdálenosti a vzdálenosti v řádku, které jsou doporučené pro daný druh nebo danou odrůdu. Informace o hustotě výsevu/výsadby poskytují semenářské společnosti.

ZPRACOVÁNÍ PŮDY A ZPŮSOB PĚSTOVÁNÍ PLODIN

10. Při kultivaci je třeba věnovat náležitou pozornost riziku eroze a zpracování půdy. Jakákoli praxe vedoucí k odstranění, likvidaci nebo zapravení infikovaných zbytků plodin do půdy, jako například zaorávání, může vést ke snížení množství inokula patogenů rodu *Fusarium* u následné plodiny. Půda by se měla kultivovat tak, aby povrch zůstal hrudkovitý nebo tvořil hrubé seťové lůžko, což usnadní infiltraci vody a minimalizuje riziko eroze půdy a související únik živin. Pokud se zvažuje orba, pak optimální doba v rámci střídání plodin je mezi dvěma druhy plodin citlivými na *Fusarium*. Viz též bod 7.
11. Je-li to možné a účelné, připravte seťové lůžko pro každou novou plodinu zaoráním nebo odstraněním starých klasů, stébel a dalších sklizňových zbytků, které mohly nebo potenciálně mohou sloužit jako substráty pro růst tvořících mykotoxiny. V oblastech, které jsou náchylné k erozi, může být v zájmu ochrany půdy žádoucí zvolit potřebný systém zpracování. Jinak je nutné věnovat zvláštní pozornost posklizňovým zbytkům, které by mohly být zdrojem kontaminace následné plodiny houbami rodu *Fusarium*: tyto posklizňové zbytky by měly být co nejjemněji rozdraceny během sklizně nebo po sklizni předplodiny a zapraveny do půdy, aby se umožnil jejich rozklad (mulčování).
12. Pokud je to možné, rostliny by neměly být vystaveny působení stresových faktorů. Těmito mohou být např. sucho, chlad, nedostatek živin a nežádoucí reakce na aplikované přípravky. V rámci vyloučení stresových faktorů, například v důsledku zavlažování, by měly být podniknuty kroky k minimalizaci následného rizika houbové infekce, např. neměla by být používána závlaha postřikem v období kvetení. Zavlažování je cennou metodou snižování stresu u rostlin v některých situacích. Přiměřená výživa je základem prevence oslabení rostlin, které může podporovat jejich náchylnost k infekci patogeny *Fusarium*, jakož i náchylnost k poléhání. Je třeba nastavit dávkování živin diferencovaně pro danou oblast a rostlinu.
13. Všeobecně neexistuje žádný důkaz o vlivu ochrany proti hmyzu na napadení obilných klasů patogeny *Fusarium* spp. Insekticidní ochrana kukuřice však může snížit výskyt napadení klasů patogeny *Fusarium* spp. a následný obsah fumonisinu v kukuřici. Moření osiva fungicidy je účinné proti mnoha chorobám přenosným osivem a půdou, např. padání klíčnic rostlin. Preventivní opatření by se měla uplatňovat v co možná nejvyšší míře, aby se minimalizovalo riziko houbové infekce a poškození plodin hmyzem a pokud je třeba, je možné použít schválené a registrované insekticidy a fungicidy podle doporučení výrobců. V rámci integrovaného nebo organického způsobu ochrany proti škůdcům, kdy není použití pesticidů vhodné, je třeba používat vhodné postupy. Je třeba zdůraznit, že včasná aplikace fungicidů je v boji proti napadení houbami velmi důležitá a měla by být založena na meteorologických informacích a/nebo na vyšetření plodin. K infekci běžně dochází v období květu, což znamená, že může docházet k tvorbě mykotoxinů. Pokud je u plodin následně zjištěna houbová infekce a mykotoxiny, je třeba toto zohlednit při manipulaci, mísení a způsobu užití zrna.

14. Druhy *Fusarium* spp. byly izolovány z široké škály travin a širokolistých plevelů a prokázalo se, že značné zaplevelení vede k nárůstu infekcí patogeny *Fusarium* spp. Plevel je třeba odstraňovat mechanickými metodami nebo použitím registrovaných herbicidů nebo pomocí jiných bezpečných a vhodných postupů k eradikaci plevele.
15. Existují údaje, které indikují, že poléhání má významný vliv na obsah fusariových toxinů v zrně. Proto by se zrně z polehlého porostu nemělo sklízet, pokud je mokré a jsou na něm viditelné první známky porůstání.
Zabraňte poléhání plodin případnou úpravou výsevu, racionálním používáním hnojiv a aplikací regulátorů růstu rostlin.
Vyhněte se nadměrnému zkracování stébla.

SKLIZEŇ

16. Vysoce rizikové situace podle možnosti určujte na základě informací meteorologické a rostlinolékařské služby. Před sklizní posuďte kvalitu zrna, přičemž je třeba zohlednit omezení související s odběrem reprezentativních vzorků a rychlou analýzou na místě. Pokud je to možné, izolujte partie obilovin pocházející z polehlých porostů nebo z porostů, u kterých je potvrzena nebo u kterých je podezření na vysoký stupeň infekce patogeny *Fusarium* spp. Pokud je to možné, rozdělte zrně podle požadavků trhu na kvalitu, jako například zrně potravinářské nebo krmné, a podle sklizňové kvality, např. z polehlých porostů, vlhké, čisté, suché.
17. Pokud je to možné, sklízte při správné vlhkosti zrna. Zpožděná sklizeň zrna již infikovaného druhů rodu *Fusarium* může způsobit výrazné zvýšení obsahu mykotoxinů v plodinách. Zajistěte, aby byly zavedeny takové postupy, jako je např. včasná dostupnost sušících zařízení pro případ, že plodiny není možné sklízet v době optimální vlhkosti.
18. Před obdobím sklizně je třeba se ujistit, že veškerá zařízení, která se budou používat během sklizně a skladování plodin, jsou funkční. Poruchy během této rozhodující doby mohou zapříčinit nižší kvalitu zrna a vést ke zvýšené tvorbě mykotoxinů. V zemědělském podniku by měly být k dispozici důležité náhradní díly, aby se tak minimalizovaly časové ztráty v důsledku oprav. Je třeba zajistit, aby zařízení k měření obsahu vlhkosti bylo dostupné a kalibrované.
19. Pokud je to možné, zabraňte mechanickému poškození zrna a kontaktu s půdou během sklizně. Malé, scvrklé zrně může mít vyšší obsah mykotoxinů než normální zdravé zrně. Odstranění scvrklého zrna správným nastavením kombajnu nebo čištěním po sklizni, kterým se odstraní poškozená zrně a jiné cizí příměsi, pomáhá snížit obsah mykotoxinů. Zatímco některé postupy čištění osiva, jako například třídící stolice, mohou odstranit některá infikovaná zrně, zrně infikovaná, avšak bez příznaků nelze odstranit standardními metodami čištění.

SUŠENÍ

20. Stanovte obsah vlhkosti plodin buď při sklizni, nebo ihned po ní. Vzorky odebrané pro měření vlhkosti by měly být co nejreprezentativnější. Pokud je třeba, plodiny usušte co nejdříve na vlhkost doporučenou pro skladování dané plodiny. Při sklizni mokřích obilovin, které je nutné usušit, jako je tomu zejména v případě kukuřice, by se měla doba mezi sklizní a sušením zkrátit na minimum. V takových případech je tudíž nutné sklizeň plánovat podle kapacity sušiček.
21. Obiloviny by se měly sušit tak, aby vlhkost byla nižší, než ta, která podporuje růst plísní během skladování. Vodní aktivita s hodnotou do 0,65 obecně odpovídá obsahu vlhkosti nižšímu než 15 %. Specifičtější pokyny týkající se vlhkosti by měly být poskytnuty v rámci vnitrostátních zásad, přičemž se zohlední místní podmínky skladování. Toto je nezbytné pro zamezení růstu mnohých druhů hub, které mohou být přítomné na čerstvě sklizeném zrně.
22. V případě, že je nutné obiloviny před usušením skladovat, vzniká riziko růstu plísní v průběhu několika dní, což může být spojeno s jejich zahříváním. Obiloviny by se měly sušit tak, aby riziko poškození zrna bylo minimální. Ukládání mokřích, čerstvě sklizených komodit na hromadu nebo navršování před usušením nebo čištěním by mělo být podle možnosti co nejkratší, aby se snížilo riziko růstu hub. Provětrávejte vlhké zrně před usušením, aby se nezahřívaly. Tam, kde je to možné, by se neměly smíchávat partie obilovin s rozdílným rizikem kontaminace.

23. Pro snížení rozdílů v obsahu vlhkosti v rámci jednotlivých partií by se zrno mělo po usušení přesunout do jiného zařízení nebo sila.

SKLADOVÁNÍ

24. U pytlovaných komodit zajistěte, aby pytle byly čisté, suché a uložené na paletách, nebo zajistěte, aby mezi nimi a podlahou byla pro vodu nepropustná vrstva.
25. V případě možnosti zajistěte cirkulaci vzduchu v prostorách s uskladněným zrnem pro zabezpečení vhodné a rovnoměrné teploty v celém skladovacím prostoru. Po dobu skladování kontrolujte u skladovaného zrna v pravidelných intervalech vlhkost a teplotu. Zápach může naznačovat zahřívání zrna, zejména pokud je skladovací prostor uzavřený.
26. Po dobu skladování měřte u skladovaného zrna v pravidelných intervalech teplotu. Zvýšená teplota může naznačovat mikrobiální růst a/nebo napadení hmyzem. Oddělte evidentně napadené části partie a zajistěte analýzu vzorků. Po vytřídění snižte teplotu u zbývajících částí partie a větrejte. Napadené zrno nepoužívejte na výrobu potravin či krmiv.
27. Používejte správné sanitační postupy k minimalizaci přítomnosti hmyzu a hub ve skladovacím zařízení, např. použití vhodných registrovaných insekticidů a fungicidů nebo vhodných alternativních metod. Je nutné věnovat pozornost výběru přípravků a vybírat jen ty, které nemají negativní účinky nebo nezpůsobují škody s ohledem na plánované konečné použití zrna, přičemž by jejich množství mělo být přísně omezené.
28. Použití vhodných schválených konzervantů, například organických kyselin (kyselina propionová), může mít pozitivní účinek na obiloviny určené pro výrobu krmiv. Propionová kyselina a její soli jsou fungistatické a někdy se používají pro konzervaci vlhkého zrna v zemědělském podniku po sklizni ve snaze zabránit zahřívání a plesnivění před zpracováním. Měly by se aplikovat okamžitě pomocí vhodného aplikačního zařízení, aby se zabezpečilo rovnoměrné rozptýlení v celé ošetřované šarži zrna, přičemž se zajistí bezpečnost osob provádějících ošetření. Pokud bylo zrno ošetřeno po období skladování ve vlhkém stavu, není přítomnost konzervantů zárukou toho, že zrno nebude kontaminované.

PŘEPRAVA ZE SKLADU

29. Převážní kontejnery by měly být suché a neměly by vykazovat viditelný nárůst hub, přítomnost hmyzu a kontaminovaného materiálu. Podle potřeby se přepravní kontejnery vyčistí a dezinfikují a vhodně připraví na určený náklad. Užitečné by mohly být registrované fumiganty nebo insekticidy. Po vyložení je třeba přepravní kontejner zcela vyprázdnit a vhodně vyčistit.
30. Zásilky zrna by měly být chráněny před další vlhkostí pomocí krytých nebo vzduchotěsných kontejnerů nebo nepromokavých plachet. Zabraňte působení kolísání teploty a následné kondenzaci na zrně, což může způsobit lokální zvýšení vlhkosti a následný růst hub a tvorbu mykotoxinů.
31. Zamezte napadení hmyzem, ptáky a hlodavci během přepravy použitím kontejnerů odolných vůči uvedeným škůdcům a jinými vhodnými metodami, a pokud je to třeba, zrno chemicky ošetřete přípravky proti hmyzu a hlodavcům, které jsou schváleny s ohledem na plánované konečné užití zrna.

PŘÍLOHA 4: Obsah DON a ZEA ve vzorcích krmiva a žluče x [μg.kg⁻¹] ± směrodatná odchylka

Datum	Chov	Číslo vzorku	Druh vzorku	Druh zvířete	DON 1 [μg.kg ⁻¹]	DON 2 [μg.kg ⁻¹]	DON [μg.kg ⁻¹]	ZEA 1 [μg.kg ⁻¹]	ZEA 2 [μg.kg ⁻¹]	ZEA [μg.kg ⁻¹]
12. 02. 2009	Chov 1	815	krmivo	prase	294	293	293,5 ± 0,5	x	x	x
	Chov 2	834	krmivo	prase	136	130	133,0 ± 3,0	x	x	x
		835	krmivo	prase	215	212	213,5 ± 1,5	x	x	x
16. 02. 2009	Chov 3	1236	krmivo	prase	215	217	216,0 ± 1,0	x	x	x
		1237	krmivo	prase	204	110	157,0 ± 47,0	x	x	x
		1238	krmivo	prase	256	255	255,5 ± 0,5	x	x	x
		1239	krmivo	prase	284	284	284,0 ± 0,0	x	x	x
		1333	krmivo	prase	93	92	92,5 ± 0,5	0	0	0
20. 02. 2009	Chov 5	1399	krmivo	prase	68	61	64,5 ± 3,5	13	15	14,0 ± 1,0
	Chov 5	1393	krmivo	prase	26	23	24,5 ± 1,5	9	9	9,0 ± 0,0
	Chov 6	1424	krmivo	prase	45	41	43,0 ± 2,0	x	x	x
09. 03. 2009	Chov 7	1757	krmivo	prase	53	49	51,0 ± 2,0	141	135	138,0 ± 3,0
	Chov 8	1994	žluč	prase	1195	1195	1195,0 ± 0,0	x	x	x
10. 03. 2009	Chov 9	2036	krmivo	prase	406	405	405,5 ± 0,5	100	98	99,0 ± 1,0
	Chov 9	2037	krmivo	prase	387	380	383,5 ± 3,5	x	x	x
18. 03. 2009	Chov 10	2048	krmivo	prase	52	57	54,5 ± 2,5	x	x	x
	Chov 11	2396	krmivo	prase	126	120	123,0 ± 3,0	15	10	12,5 ± 2,5
19. 03. 2009	Chov 12	2454	krmivo	prase	96	102	99,0 ± 3,0	30	32	31,0 ± 1,0
	Chov 11	2465	podestýlka	prase	x	x	x	444	440	442,0 ± 2,0
25. 03. 2009	Chov 13	2988	žluč	prase	x	x	x	60	64	62,0 ± 2,0
	Chov 14	3017	krmivo	prase	29	28	28,5 ± 0,5	195	191	193,0 ± 2,0
30. 03. 2009	Chov 4	3029	žluč	zmetek	32	35	33,5 ± 1,5	112	109	110,5 ± 1,5
	Chov 15	2121	krmivo	prase	104	112	108,0 ± 4,0	x	x	x
02. 04. 2009	Chov 16	3254	žluč	prase	1910	1907	1908,5 ± 1,5	195	191	193,0 ± 2,0
		3255	krmivo	prase	x	x	x	333	325	329,0 ± 4,0
		3256	krmivo	prase	x	x	x	4	3	3,5 ± 0,5
		3257	krmivo	prase	x	x	x	0	0	0

			3258	krmivo	prase	x	x	x	0	0	0	0
09. 04. 2009	Chov 17	3396	žluč	prase	28	26	27,0 ± 1,0	x	x	x	x	x
10. 04. 2009	Chov 18	3404	krmivo	prasnice	x	x	x	212	211	211	211	211,5 ± 0,5
10. 04. 2009	Chov 2	3421	žluč	sele	1271	1273	1272,0 ± 1,0	x	x	x	x	x
10. 04. 2009	Chov 19	3443	žluč	prase	145	142	143,5 ± 1,5	x	x	x	x	x
16. 04. 2009	Chov 20	4100	žluč	zmetek od prasnicky	x	x	x	557	566	566	566	561,5 ± 4,5
		4148	žluč	zmetek	34	32	33,0 ± 1,0	21	23	23	23	22,0 ± 1,0
20. 04. 2009	Chov 21	4149	žluč	zmetek	18	18	18,0 ± 0,0	10	12	12	12	11,0 ± 1,0
		4150	žluč	zmetek	35	31	33,0 ± 2,0	15	16	16	16	15,5 ± 0,5
20. 04. 2009	Chov 22	3482	žluč	tele	61	60	60,5 ± 0,5	x	x	x	x	x
22. 04. 2009	Chov 2	4177	krmivo	neuvedeno	226	226	226,0 ± 0,0	x	x	x	x	x
		4178	krmivo	neuvedeno	138	134	136,0 ± 2,0	x	x	x	x	x
		4241	žluč	prase	15	14	14,5 ± 0,5	x	x	x	x	x
22. 04. 2009	Chov 12	4242	žluč	prase	185	187	186,0 ± 1,0	x	x	x	x	x
		4243	žluč	prase	44	48	46,0 ± 2,0	x	x	x	x	x
27. 04. 2009	Chov 23	4755	žluč	prase	559	560	559,5 ± 0,5	x	x	x	x	x
		5542	žluč	prase	849	840	844,5 ± 4,5	59	61	61	61	60,0 ± 1,0
30. 04. 2009	Chov 12	5543	žluč	prase	1800	1820	1810,0 ± 10,0	70	72	72	72	71,0 ± 1,0
		5544	žluč	prase	170	173	171,5 ± 1,5	52	51	51	51	515,5 ± 0,5
		5740	žluč	neuvedeno	0	0	0	0	0	0	0	0
		5741	žluč	neuvedeno	100	121	110,5 ± 10,5	26	24	24	24	25,0 ± 1,0
		5742	žluč	neuvedeno	209	208	208,5 ± 0,5	24	21	21	21	22,5 ± 1,5
		5743	žluč	neuvedeno	109	109	109,0 ± 0,0	20	19	19	19	19,5 ± 0,5
		5744	žluč	neuvedeno	164	163	163,5 ± 0,5	29	31	31	31	30,0 ± 1,0
05. 05. 2009	Chov 12	5745	krmivo	neuvedeno	99	98	98,5 ± 0,5	1	3	3	3	2,0 ± 1,0
		5746	krmivo	neuvedeno	120	121	120,5 ± 0,5	2	1	1	1	1,5 ± 0,5
		5747	otruby	neuvedeno	96	97	31,5 ± 00,5	x	x	x	x	x
		5748	pšenice	neuvedeno	31	32	31,5 ± 0,5	x	x	x	x	x
		5749	ječmen	neuvedeno	0	0	0	x	x	x	x	x
06. 05. 2009	Chov 24	5796	žluč	prase	143	142	142,5 ± 0,5	57	54	54	54	55,5 ± 1,5

12. 05. 2009	Chov 27	5953	žluč	prase	986	985	985,5 ± 0,5	96	98	97,0 ± 1,0
12. 05. 2009	Chov 2	5954	žluč	skot	110	115	112,5 ± 2,5	38	33	35,5 ± 2,5
13. 05. 2009	Chov 14	5956	krmivo	prase	117	118	117,5 ± 0,5	4	2	3,0 ± 1,0
14. 05. 2009	Chov 25	6127	žluč	prase	1785	1780	1782,5 ± 2,5	169	167	168,0 ± 1,0
14. 05. 2009	Chov 26	6136	žluč	prase	155	154	154,5 ± 0,5	52	51	51,5 ± 0,5
14. 05. 2009	Chov 27	6137	kukuřice	prase	148	142	145,0 ± 3,0	4	2	3,0 ± 1,0
18. 05. 2009	Chov 28	6184	krmivo	prase	1183	1186	1184,5 ± 1,5	169	169	169,0 ± 0,0
20. 05. 2009	Chov 29	6185	krmivo	prase	175	170	172,5 ± 2,5	87	88	87,5 ± 0,5
20. 05. 2009	Chov 29	6186	krmivo	prase	181	182	181,5 ± 0,5	56	52	54,0 ± 2,0
20. 05. 2009	Chov 29	6262	žluč	prase	584	585	584,5 ± 0,5	162	164	163,0 ± 1,0
20. 05. 2009	Chov 14	6263	krmivo	neuveдено	150	154	152,0 ± 2,0	x	x	x
21. 05. 2009	Chov 30	6321	kukuřice	neuveдено	x	x	x	1	2	1,5 ± 0,5
22. 05. 2009	Chov 7	6337	žluč	prase	0	0	0	0	0	0
29. 05. 2009	Chov 31	6529	krmivo	prase	48	42	45,0 ± 3,0	3	4	3,5 ± 0,5
30. 05. 2009	Chov 4	6530	krmivo	prase	84	83	83,5 ± 0,5	3	4	3,5 ± 0,5
30. 05. 2009	Chov 4	6558	žluč	prase	162	161	161,5 ± 0,5	x	x	x
03. 06. 2009	Chov 4	6632	krmivo	prase	79	72	75,5 ± 3,5	12	14	13,0 ± 1,0
04. 06. 2009	Chov 32	6677	žluč	neuveдено	295	301	298,0 ± 3,0	82	81	81,5 ± 0,5
07. 06. 2009	Chov 4	6678	krmivo	neuveдено	103	102	102,5 ± 0,5	7	9	8,0 ± 1,0
08. 06. 2009	Chov 27	6679	krmivo	neuveдено	111	115	113,0 ± 2,0	11	12	11,5 ± 0,5
09. 06. 2009	Chov 33	6745	žluč	prasnice	799	805	802,0 ± 3,0	51	52	51,5 ± 0,5
10. 06. 2009	Chov 34	6761	žluč	prase	52	61	56,5 ± 4,5	x	x	x
11. 06. 2009	Chov 35	6762	žluč	sele	1175	1200	1187,5 ± 12,5	x	x	x
15. 06. 2009	Chov 15	6776	žluč	prase	58	62	60,0 ± 2,0	17	18	17,5 ± 0,5
15. 06. 2009	Chov 36	6834	krmivo	prase	6	7	6,5 ± 0,5	5	3	4,0 ± 1,0
15. 06. 2009	Chov 36	6835	krmivo	prase	55	52	53,5 ± 1,5	11	12	11,5 ± 0,5
15. 06. 2009	Chov 36	6836	krmivo	prase	53	54	53,5 ± 0,5	5	6	5,5 ± 0,5
15. 06. 2009	Chov 36	6892	krmivo	prase	81	82	81,5 ± 0,5	x	x	x
15. 06. 2009	Chov 36	6956	krmivo	prase	121	127	124,0 ± 3,0	189	189	189,0 ± 0,0
15. 06. 2009	Chov 36	6957	krmivo	prase	58	56	57,0 ± 1,0	21	24	22,5 ± 1,5
15. 06. 2009	Chov 36	7133	krmivo	prase	123	121	122,0 ± 1,0	23	19	21,0 ± 2,0

15. 06. 2009	Chov 36	7134	kukuřice	prase	96	98	97,0 ± 1,0	18	22	20,0 ± 2,0
		7135	kukuřice	prase	132	128	130,0 ± 2,0	156	153	154,5 ± 1,5
22. 06. 2009	Chov 37	7136	krmivo	prase	1520	1545	1532,5 ± 12,5	843	851	847,0 ± 4,0
		7137	krmivo	prase	800	762	781,0 ± 19,0	371	369	370,0 ± 1,0
22. 06. 2009	Chov 38	7033	krmivo	prase	32	36	34,0 ± 2,0	35	36	35,5 ± 0,5
24. 06. 2009	Chov 39	7319	krmivo	drůbež	37	65	51,0 ± 14,0	0	0	0
		7320	krmivo	drůbež	20	21	20,5 ± 0,5	0	0	0
26. 06. 2009	Chov 15	7334	krmivo	prase	68	62	65,0 ± 3,0	0	0	0
		7335	krmivo	prase	84	81	82,5 ± 1,5	0	0	0
30. 06. 2009	Chov 12	7393	krmivo	prase	113	110	111,5 ± 1,5	0	0	0
		7394	krmivo	prase	126	123	124,5 ± 1,5	100	98	99,0 ± 1,0
01. 07. 2009	Chov 16	7420	žluč	sele	472	471	471,5 ± 0,5	49	44	46,5 ± 2,5
	Chov 36	7509	krmivo	neuvedeno	345	361	353,0 ± 8,0	x	x	x
		7510	krmivo	neuvedeno	306	304	305,0 ± 1,0	x	x	x
10. 07. 2009	Chov 28	7661	krmivo	prasnice	1386	1380	1383,0 ± 3,0	26	27	26,5 ± 0,5
	Chov 40	7685	krmivo	prase	96	93	94,5 ± 1,5	x	x	x
		7686	krmivo	prase	87	81	84,0 ± 3,0	x	x	x
13. 07. 2009	Chov 41	7717	žluč	prase	1937	1924	1930,5 ± 6,5	283	282	282,5 ± 0,5
16. 07. 2009	Chov 22	7822	krmivo	prase	99	93	96 ± 3,0	x	x	x
		7823	krmivo	prase	63	66	64,5 ± 1,5	x	x	x
17. 07. 2009	Chov 42	7881	žluč	výkrm	509	504	506,5 ± 2,5	x	x	x
22. 07. 2009	Chov 35	8220	žluč	prasnice	466	462	464,0 ± 2,0	x	x	x
24. 07. 2009	Chov 40	8384	krmivo	prase	87	93	90,0 ± 3,0	1	1	1,0 ± 0,0
29. 07. 2009	Chov 43	8569	krmivo	prase	46	42	44,0 ± 2,0	x	x	x
05. 08. 2009	Chov 11	8736	žluč	prase	216	211	213,5 ± 2,5	x	x	x
06. 08. 2009	Chov 44	8811	žluč	prase	205	206	205,5 ± 0,5	x	x	x
14. 08. 2009	Chov 45	9271	krmivo	prase	227	228	227,5 ± 0,5	56	59	57,5 ± 1,5
		9272	žluč	prase	0	0	0	4	3	3,5 ± 0,5
20. 08. 2009	Chov 28	9378	pšenice	prase	825	824	824,5 ± 0,5	9	8	8,5 ± 0,5
24. 08. 2009	Chov 46	9457	pšenice	prase	311	312	311,5 ± 0,5	0	0	0
		9458	ječmen	prase	113	115	114,0 ± 1,0	284	281	282,5 ± 1,5

31. 08. 2009	Chov 24	9635	žluč	sele	76	73	74,5 ± 1,5	364	362	363,0 ± 1,0
02. 09. 2009	Chov 28	9654	krmivo	prase	383	382	382,5 ± 0,5	x	x	x
04. 09. 2009	Chov 40	9837	žluč	prase	266	264	265,0 ± 1,0	x	x	x
08. 09. 2009	Chov 12	9925	žluč	prase	0	0	0	x	x	x
17. 09. 2009	Chov 2	10564	žluč	prase	540	541	540,5 ± 0,5	262	264	263,0 ± 1,0
17. 09. 2009	Chov 16	10571	žluč	odstavené prase	546	549	547,5 ± 1,5	224	230	227,0 ± 3,0
		10570	krmivo	odstavené prase	82	83	82,5 ± 0,5	294	299	296,5 ± 2,5
24. 09. 2009	Chov 2	10892	žluč	prase	1734	1735	1734,5 ± 0,5	236	231	233,5 ± 2,5
25. 09. 2009	Chov 7	10990	žluč	prasnice (břeží)	0	0	0	187	184	185,5 ± 1,5
30. 09. 2009	Chov 38	11175	krmivo	neuvedeno	55	52	53,5 ± 1,5	156	155	155,5 ± 0,5
02. 10. 2009	Chov 47	11331	krmivo	prase	123	124	123,5 ± 0,5	177	178	177,5 ± 0,5
		11334	žluč	prase	926	928	927,0 ± 1,0	305	308	306,5 ± 1,5
07. 10. 2009	Chov 48	11495	krmivo	neuvedeno	63	60	61,5 ± 1,5	83	81	82,0 ± 1,0
08. 10. 2009	Chov 28	11521	pšenice	neuvedeno	114	111	112,5 ± 1,5	x	x	x
12. 10. 2009	Chov 49	12008	krmivo	neuvedeno	89	82	85,5 ± 3,5	7	8	7,5 ± 0,5
		12058	žluč	zmetek	68	63	65,5 ± 2,5	9	6	7,5 ± 1,5
13. 10. 2009	Chov 50	12059	krmivo	zmetek	47	47	47,0 ± 0,0	0	0	0,0
		12075	krmivo	KPK	248	251	249,5 ± 1,5	17	14	15,5 ± 1,5
15. 10. 2009	Chov 12	12076	krmivo	KPK	162	161	161,5 ± 0,5	6	4	5,0 ± 1,0
		12077	žluč	neuvedeno	226	224	225,0 ± 1,0	41	39	40,0 ± 1,0
23. 10. 2009	Chov 15	12227	pšenice	neuvedeno	89	88	88,5 ± 0,5	0	0	0
		12627	tkaň	skot	22	21	21,5 ± 0,5	x	x	x
26. 10. 2009	Chov 51	12631	žluč	prase	719	718	718,5 ± 0,5	44	42	43,0 ± 1,0
		12632	žluč	prase	267	265	266,0 ± 1,0	38	39	38,5 ± 0,5
		12633	žluč	prase	1845	1844	1844,5 ± 0,5	71	75	73,0 ± 2,0
		12634	žluč	prase	1621	1634	1627,5 ± 6,5	92	93	92,5 ± 0,5
		12635	žluč	prase	136	132	134,0 ± 2,0	43	41	42,0 ± 1,0
		12638	žluč	sele	103	104	103,5 ± 0,5	7	6	6,5 ± 0,5

12639	žluč	sele	203	208	205,5 ± 2,5	18	13	15,5 ± 2,5
12640	žluč	sele	60	63	61,5 ± 1,5	5	6	5,5 ± 0,5
12642	žluč	sele	73	77	75,0 ± 2,0	14	15	14,5 ± 0,5
12644	žluč	běhoun	364	365	364,5 ± 0,5	48	44	46,0 ± 2,0
12646	žluč	běhoun	622	621	621,5 ± 0,5	61	62	61,5 ± 0,5
12647	žluč	prasnice vyřazená z chovu	1427	1430	1428,5 ± 1,5	53	55	54,0 ± 1,0
12648	žluč	prasnice vyřazená z chovu	1311	1325	1318,0 ± 7,0	55	54	54,5 ± 0,5
12649	žluč	prasnice vyřazená z chovu	742	750	746,0 ± 4,0	56	57	56,5 ± 0,5
12650	žluč	prasnice vyřazená z chovu	569	562	565,5 ± 3,5	54	53	53,5 ± 0,5
12651	žluč	prasnice vyřazená z chovu	233	243	238,0 ± 5,0	31	32	31,5 ± 0,5
12652	žluč	prasnice vyřazená z chovu	1522	1520	12521,0 ± 1,0	89	88	88,5 ± 0,5
12653	žluč	prasnice vyřazená z chovu	680	681	680,5 ± 0,5	44	46	45,0 ± 1,0
12654	žluč	prasnice vyřazená z chovu	310	320	315,0 ± 5,0	37	32	34,5 ± 2,5
12655	žluč	prasnice vyřazená z chovu	1484	1480	1482,0 ± 2,0	x	x	x

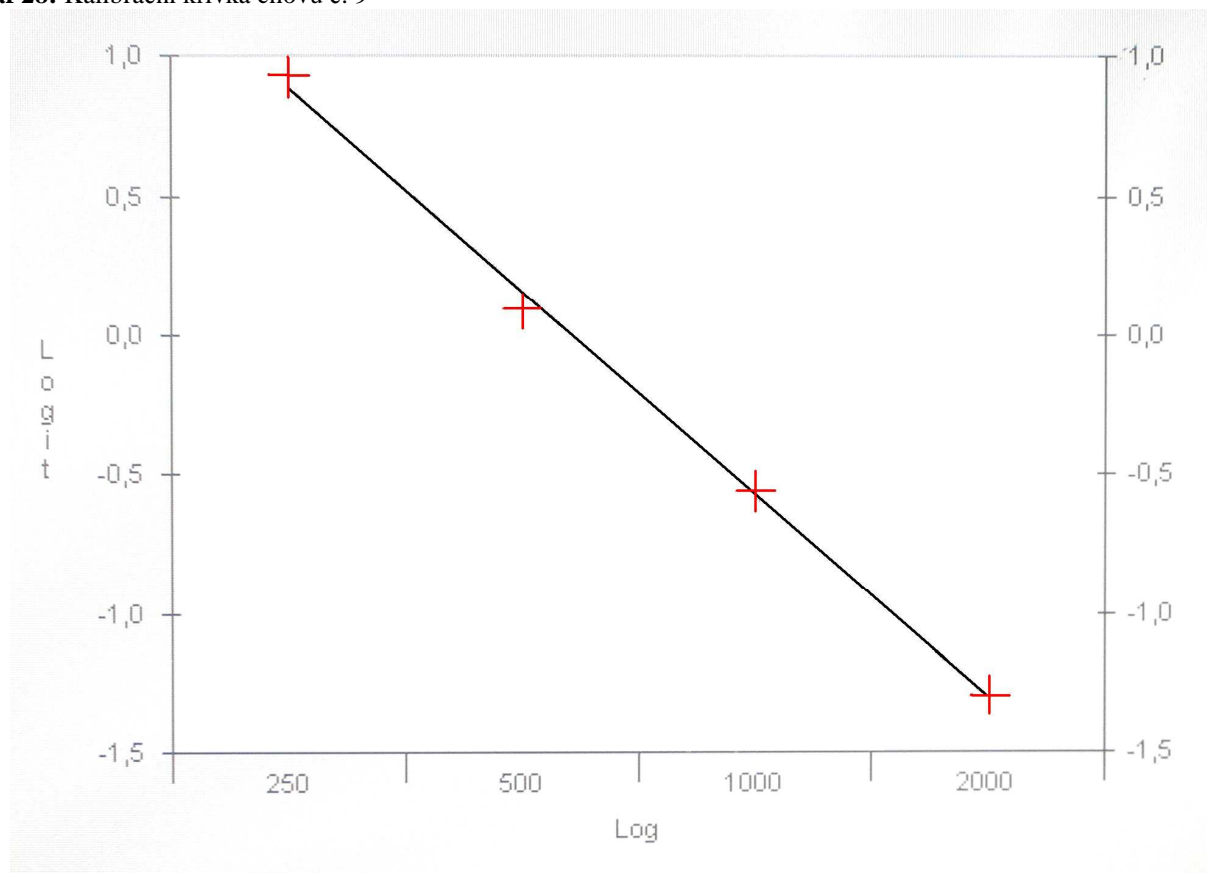
		12656	žluč	prasnice vyřazená z chovu	x	x	X	89	88	88,5 ± 0,5
02. 11. 2009	Chov 52	12821	žluč	zmetek	31	32	31,5 ± 0,5	0	0	0,0
02. 11. 2009	Chov 3	12805	krmivo	předvýkrm	140	141	140,5 ± 0,5	7	6	6,5 ± 0,5
		12806	krmivo	předvýkrm	304	305	304,5 ± 0,5	17	17	0,0
03. 11. 2009	Chov 38	12914	žluč	prasnice	337	336	336,5 ± 0,5	x	x	x
		12915	žluč	prasnice	863	868	865,5 ± 2,5	x	x	x
		12916	žluč	prasnice	514	515	514,5 ± 0,5	x	x	x
		12917	žluč	prasnice	632	634	633,0 ± 1,0	x	x	x
		12918	žluč	prasnice	247	247	247,0 ± 0,0	x	x	x
		12919	žluč	prasnice	744	741	742,5 ± 1,5	x	x	x
		12920	žluč	prasnice	270	270,3	270,2 ± 0,2	x	x	x
		12921	žluč	prasnice	316	318	317,0 ± 1,0	x	x	x
		12922	žluč	prasnice	686	680	683,0 ± 3,0	x	x	x
		12923	žluč	prasnice	290	291	290,5 ± 0,5	x	x	x
		12924	žluč	prasnice	212	212	212,0 ± 0,0	x	x	x
		12925	žluč	prasnice	236	236	236,0 ± 0,0	x	x	x
		12926	žluč	prasnice	390	397	393,5 ± 3,5	x	x	x
		12927	žluč	prasnice	252	254	253,0 ± 1,0	x	x	x
		04. 11. 2009	Chov 11	12943	krmivo	neuvedeno	127	126	126,5 ± 0,5	12
05. 11. 2009	Chov 12	12959	žluč	prasnice	576	570	573,0 ± 3,0	x	x	x
		13017	žluč	prase	1013	1018	1015,5 ± 2,5	91	97	94,0 ± 3,0
09. 11. 2009	Chov 28	13018	žluč	prase	156	154	155,0 ± 1,0	91	92	91,5 ± 0,5
11. 11. 2009	Chov 2	13108	otruby	prase	1111	1121	1116,0 ± 5,0	x	x	x
		13153	žluč	skot	69	71	70,0 ± 1,0	30	30	30,0 ± 0,0
13. 11. 2009	Chov 53	13154	žluč	skot	83	82	82,5 ± 0,5	37	36	36,5 ± 0,5
		13282	žluč	prase	104	105	104,5 ± 0,5	x	x	x
18. 11. 2009	Chov 54	13236	žluč	sele	106	103	104,5 ± 1,5	20	23	21,5 ± 1,5
20. 11. 2009	Chov 7	13436	krmivo	drůbež	468	467	467,5 ± 0,5	x	x	x
24. 11. 2009	Chov 28	13578	pšenice	prase	616	621	618,5 ± 2,5	x	x	x

24. 11. 2009	Chov 33	13583	žluč	prasnice	1137	1140	1138,5 ± 1,5	147	142	144,5 ± 2,5
		13584	žluč	prasnice	562	569	565,5 ± 3,5	149	145	147,0 ± 2,0
25. 11. 2009	Chov 55	13648	žluč	výkrm 50kg	1292	1293	1292,2 ± 0,5	x	x	x
25. 11. 2009	Chov 56	13655	žluč	výkrm	522	554	538,0 ± 16,0	x	x	x
26. 11. 2009	Chov 27	13672	krmivo	drůbež	261	262	261,5 ± 0,5	x	x	x
		13673	krmivo	drůbež	245	240	242,5 ± 2,5	x	x	x
27. 11. 2009	Chov 57	13430	krmivo	nosnice	0	0	0	0	0	0,0
		13431	krmivo	nosnice	28	31	29,5 ± 1,5	1	3	2,0 ± 1,0
07. 12. 2009	Chov 58	13817	krmivo	prase výkrm	1614	1610	1612,0 ± 2,0	x	x	x
08. 12. 2009	Chov 28	14005	krmivo	sele	81	80	80,5 ± 0,5	x	x	x
		14006	krmivo	prase	1259	1563	1411,0 ± 152,0	x	x	x
		14007	krmivo	výkrm	0	0	0	x	x	x
		14008	krmivo	prasnice	315	314	314,5 ± 0,5	x	x	x
		14009	krmivo	prase	421	425	423,0 ± 2,0	x	x	x
09. 12. 2009	Chov 33	14061	žluč	sele	865	864	864,5 ± 0,5	x	x	x
		14062	žluč	sele	0	0	0,0	x	x	x
09. 12. 2009	Chov 59	14063	krmivo	sele	112	114	113,0 ± 1,0	15	12	13,5 ± 1,5
		14064	krmivo	sele	219	236	227,5 ± 8,5	5	4	4,5 ± 0,5
14. 12. 2009	Chov 60	14185	žluč	sele	492	491	491,5 ± 0,5	x	x	x
14. 12. 2009	Chov 32	14187	krmivo	neuveдено	119	118	118,5 ± 0,5	x	x	x
16. 12. 2009	Chov 7	14214	žluč	mrtvé nenarozené sele	0	0	0	7	6	6,5 ± 0,5
		14384	žluč	sele	1003	1011	1007,0 ± 4,0	118	120	119,0 ± 1,0
04. 01. 2010	Chov 4	1	krmivo	prasníčka	176	174	175,0 ± 1,0	x	x	x
04. 01. 2010	Chov 61	12	žluč	výkrm	953	954	953,5 ± 0,5	43	44	43,5 ± 0,5
07. 01. 2010	Chov 62	96	krmivo	neuveдено	394	392	393,0 ± 1,0	x	x	x
		97	krmivo	neuveдено	2029	2034	2031,5 ± 2,5	3	2	2,5 ± 0,5

07. 01. 2010	Chov 14	169	krmná směs	sele	86	81	883,5 ± 2,5	3	3	3,0 ± 0,0
		170	krmná směs	sele	66	62	64,0 ± 2,0	0	0	0,0
07. 01. 2010	Chov 11	180	žluč	sele	23	29	26,0 ± 3,0	x	x	x
		182	krmivo	prase	962	961	961,5 ± 0,5	39	33	36,0 ± 3,0
08. 01. 2010	Chov 63	192	žluč	mrtvé nenarozené sele	31	32	31,5 ± 0,5	45	46	45,5 ± 0,5
		193	žluč	prase	1185	1191	1188,0 ± 3,0	145	143	144,0 ± 1,0
11. 01. 2010	Chov 16	254	žluč	prase	294	291	292,5 ± 1,5	78	78	78,0 ± 0,0
11. 01. 2010	Chov 64	259	žluč	prase	0	0	0	20	23	21,5 ± 1,5
15. 01. 2010	Chov 28	388	krmivo	prase	444	444	444,0 ± 0,0	x	x	x
15. 01. 2010	Chov 32	391	krmivo	prase	120	123	121,5 ± 1,5	23	21	x
18. 01. 2010	Chov 32	432	krmivo	prase	157	150	153,5 ± 3,5	x	x	x
		433	krmivo	prase	103	103	103,0 ± 0,0	x	x	x
		446	krmivo	prasníčka	312	313	312,5 ± 0,5	18	23	x
		447	krmivo	prasnice	535	538	536,5 ± 1,5	16	11	x
19. 01. 2010	Chov 46	448	krmivo	prasnice	115	110	112,5 ± 2,5	2	1	x
		449	krmivo	výkrm	102	98	100,0 ± 2,0	5	4	4,5 ± 0,5
		450	krmivo	neuvvedeno	1519	1511	1515,0 ± 4,0	41	48	44,5 ± 3,5
26. 01. 2010	Chov 63	451	krmivo	neuvvedeno	89	83	86,0 ± 3,0	7	5	6,0 ± 1,0
		747	krmivo	prase	209	199	204,0 ± 5,0	x	x	x
		748	krmivo	prase	46	41	43,5 ± 2,5	x	x	x
26. 01. 2010	Chov 16	761	krmivo	prase	179	173	176 ± 3,0	x	x	x
26. 01. 2010	Chov 5	765	žluč	zmatek	21	27	24,0 ± 3,0	x	x	x
27. 01. 2010	Chov 65	816	pšenice	prase	119	125	122,0 ± 3,0	x	x	x
		817	ječmen	prase	84	80	82,0 ± 2,0	1	3	2,0 ± 1,0
02. 02. 2010	Chov 66	941	žluč	prase	1212	1210	1211,0 ± 1,0	x	x	x
04. 02. 2010	Chov 67	1030	žluč	mrtvé nenarozené	50	47	48,5 ± 1,5	x	x	x

PŘÍLOHA 5

Graf 28: Kalibrační křivka chovu č. 9



Tab. 27: Hodnoty nutné pro sestavení kalibrační křivky chovu č. 9

Číslo standardu	Koncentrace [$\mu\text{g.kg}^{-1}$]	Optická denzita	Výsledek
1	0	2,228	0,0
2	250	1,598	241,5
3	500	1,169	530,0
4	1000	0,810	987,6
5	2000	0,479	1978,6

SEZNAM OBRÁZKŮ

Obr. 1: Faktory ovlivňující výskyt mykotoxinů v potravinách a krmivech	14
Obr. 2: Výskyt mykotoxinů ve světě	16
Obr. 3: Aflatoxin B ₁	18
Obr. 4: Patulin.	19
Obr. 5: Ochratoxin A	20
Obr. 6: Kukuřice napadená plísní rodu <i>Fusarium</i> (vlevo) a <i>Gibberella</i> (vpravo)	21
Obr. 7: Porovnání zdravých (vpravo) a napadnutých zrn pšenice	21
Obr. 8: Deoxynivalenol	21
Obr. 9: T-2 toxin	22
Obr. 10: Cyklus choroby napadení mikromycetami rodu <i>Fusarium</i>	22
Obr. 11: Zearalenon	23
Obr. 12: Systémové účinky mykotoxinů na organismus hospodářských zvířat	24
Obr. 13: Hlavní mechanismy mykotoxinové toxicity	26
Obr. 14: ELISA rámeček se stripy (vlevo). Speciálně připravené ELISA desky (vpravo)	36
Obr. 15: Přímá ELISA.	37
Obr. 16: Nepřímá ELISA	38
Obr. 17: „Sendvičová“ ELISA	39
Obr. 18: Složení ELISA soupravy pro DON / ZEA	41
Obr. 19: Obrázek představuje umístění standardů a vzorků v mikrotitrační destičce	42
Obr. 20: Obrázek představuje umístění standardů a vzorků v mikrotitrační destičce	43

SEZNAM TABULEK

Tab. 1: Třídění vybraných mykotoxinů podle rodu a druhu plísní	12
Tab. 2: Nálezy mykotoxinů v krmivech vyšetřených v České republice	15
Tab. 3: Nejčastější výskyt mykotoxinů u vybraných krmiv	15
Tab. 4: Výskyt mykotoxinů v Evropě	16
Tab. 5: Výskyt mykotoxinů v ostatních světadílech	17
Tab. 6: Maximální přípustné koncentrace některých mykotoxinů v krmivech	25
Tab. 7: Tolerované koncentrace [mg.kg ⁻¹] některých mykotoxinů v kompletním krmivu	25
Tab. 8: Orientační hodnoty pro kritické koncentrace mykotoxinů v krmivu [mg.kg ⁻¹]	25
Tab. 8: Karcinogenita a expoziční standardy některých mykotoxinů	27
Tab. 9: Hodnoty LD ₅₀ některých mykotoxinů (mg.kg ⁻¹ živé hmotnosti)	28
Tab. 10: Citlivost některých druhů zvířat na mykotoxiny	28
Tab. 11: Toxické koncentrace některých mykotoxinů v krmivech	28
Tab. 12: Třídění a obecná charakteristika mykotoxikóz u hospodářských zvířat	29
Tab. 13: Maximální přípustné limity pro mykotoxiny	43
Tab. 14: Vyhodnocení vzorků chovu č. 7 na obsah DON a ZEA v krmivech a žluči	44
Tab. 15: Vyhodnocení vzorků chovu č. 12 na obsah DON a ZEA v krmivech a žluči	47
Tab. 16: Vyhodnocení vzorků chovu č. 28 na obsah DON a ZEA v krmivech a žluči	50
Tab. 17: Vyhodnocení vzorků chovu č. 16 na obsah DON a ZEA v krmivech a žluči	52
Tab. 18: Vyhodnocení vzorků chovu č. 2 na obsah DON a ZEA v krmivech a žluči	53
Tab. 19: Vyhodnocení vzorků chovu č. 32 na obsah DON a ZEA v krmivech a žluči	55
Tab. 20: Vyhodnocení vzorků chovu č. 15 na obsah DON a ZEA v krmivech a žluči	56
Tab. 21: Vyhodnocení všech chovů na obsah DON ve vzorcích žluče	58
Tab. 22 : Vyhodnocení všech chovů na obsah ZEA ve vzorcích žluče	61
Tab. 23: Přehled všech vyšetřovaných vzorků ječmene na obsah DON a ZEA	64
Tab. 24: Přehled všech vyšetřovaných vzorků pšenice na obsah DON a ZEA	65
Tab. 25: Přehled všech vyšetřovaných vzorků kukuřice na obsah DON a ZEA	67
Tab. 26: Celkový přehled analyzovaných vzorků z jednotlivých chovů, popř. krmiv a jejich počet přesahující dané limity	70
Tab. 27: Hodnoty nutné pro sestrojení kalibrační křivky chovu č. 9	96

SEZNAM GRAFŮ

Graf 1: Naměřené koncentrace DON chovu č. 7 (první část)	45
Graf 2: Naměřené koncentrace DON chovu č. 7 (druhá část)	46
Graf 3: Naměřené koncentrace ZEA chovu č. 7 (první část)	46
Graf 4: Naměřené koncentrace ZEA chovu č. 7 (druhá část)	47
Graf 5: Naměřené koncentrace DON chovu č. 12 (první část)	48
Graf 6: Naměřené koncentrace DON chovu č. 12 (druhá část)	48
Graf 7: Naměřené koncentrace ZEA chovu č. 12 (první část)	49
Graf 8: Naměřené koncentrace ZEA chovu č. 12 (druhá část)	49
Graf 9: Naměřené koncentrace DON chovu č. 28 (první část)	50
Graf 10: Naměřené koncentrace DON chovu č. 28 (druhá část)	51
Graf 11: Naměřené koncentrace ZEA chovu č. 28	51
Graf 12: Naměřené koncentrace DON chovu č. 16	52
Graf 13: Naměřené koncentrace ZEA chovu č. 16	52
Graf 14: Naměřené koncentrace DON chovu č. 16	54
Graf 15: Naměřené koncentrace DON chovu č. 16	54
Graf 16: Naměřené koncentrace DON chovu č. 32	55
Graf 17: Naměřené koncentrace ZEA chovu č. 32	56
Graf 18: Naměřené koncentrace DON chovu č. 15	57
Graf 19: Naměřené koncentrace ZEA chovu č. 15	57
Graf 20: Pozitivní a negativní vzorky žluči na DON	61
Graf 21: Pozitivní a negativní vzorky žluči na ZEA	63
Graf 22: Naměřené koncentrace DON v ječmeni	64
Graf 23: Naměřené koncentrace ZEA v ječmeni	65
Graf 24: Naměřené koncentrace DON u pšenice	66
Graf 25: Naměřené koncentrace ZEA u pšenice	66
Graf 26: Naměřené koncentrace DON v kukuřici	67
Graf 27: Naměřené koncentrace ZEA v kukuřici	68
Graf 28: Kalibrační křivka chovu č. 9	96