1 Úvod

Mykotoxiny představují význačný fenomén, který se jako závažný problém objevil až ve druhé polovině tohoto století. Pro českého čtenáře (či studenta) není k dispozici příliš mnoho souborných informačních zdrojů. Můžeme zmínit skripta Polstera [66], vydaná v brněnském Ústavu pro doškolování středních zdravotnických pracovníků, a monografii Betinovu, dostupnou ve slovenštině. Ve stejném jazyce je velmi cenným informačním zdrojem i monografie Jesenské [28] o mikroskopických houbách. Rozsáhlejší informace o mykotoxinech nalezneme v monografii Fassatiové [18], Klánově [35] publikaci o houbách a v monografii o škůdcích v mlýnsko pekárenském průmyslu Tiché. Všechny tyto knihy jsou v současné době beznadějně rozprodané a jsou pouze v omezeném množství k dispozici v knihovnách.

Autor tohoto textu vydal spolu s Březinou VŠ skripta [84], která jsou však rovněž obtížně dostupná. Předcházela jim „samizdatová“ vydání v nepatrných nákladech, určená pro studenty v rámci SVOČ na LF MU Brno. Na tématiku těcht skript navázala do značné míry i autorova habilitační práce [83]. Na základě těchto dvou textů byly připraveny WWW stránky, na stránkách LF MU, dnes již nedostupné, z nichž tento text do značné míry vychází. Autor se snaží v maximální možné míře postihnout šíři tématu a přinést jednotlivá dílčí řešení, ke kterým se během své praxe v oboru propracoval.

Na konci úvodní části si dovoluji čtenáře požádat, aby za vše dobré a užitečné, co na této stránce nalezne, poděkoval hlavně mým učitelům (především dnes již bohužel zesnulému Doc. RNDr. M. Polsterovi, CSc.) a spolupracovníkům (především Prof. Ing. P. Březinovi, CSc.), spoluautorovi výše zmíněných skript, ale také řadě dalších.

Speciálně bych se rád zmínil o více než desítce studentů, kteří se věnovali mykotoxinům v rámci SVOČ nebo diplomových prací, a dokázali přinést alespoň dílčí poznatky, které zde jsou na některých místech citovány.

Za vše zmatečné, nedostatečně vysvětlené atd. pak laskavě vynadejte mě (nejlépe e-mailem: jsim@med.muni.cz), jedině tak se to bude moci do příští verze opravit.

Brno, říjen 2019, Jan Šimůnek

2 Úvod pro naprosté laiky

Mykotoxiny představují skupinu organických látek, které spojuje prakticky jediná vlastnost: jsou vytvářeny mikroskopickými houbami, laicky plísněmi. Tyto houby se vyznačují tím, že nevytvářejí makroskopicky viditelné plodnice. Jejich vlákna podhoubí (mycelium) prorůstají různé materiály, popř. na nich vytvářejí povlaky. Za určitých okolností mohou být jako „plíseň“ označeny i ty houby, které tvoří makroskopické plodnice, jestliže jsou v takovém stadiu vývoje, že plodnice nejsou přítomny. Určitý zmatek v názvosloví vytvořili taxonomičtí odborníci tím, že při tvorbě českého odborného názvosloví použili termín „plísně pravé“ k označení jedné konkrétní skupiny mikroskopických hub.

Mykotoxiny jsou toxické vůči člověku i užitkovým zvířatům. Některé z nich jsou prokázanými lidskými karcinogeny (tj. mohou u lidí vyvolat rakovinu), u dalších je tato vlastnost předpoládána na základě testů mutagenity i pokusů na zvířatech.

Počet mykotoxinů není přesně znám, neustále jsou objevovány nové látky této skupiny, na druhé straně dochází i k úbytku, a to tím mechanismem, že látky objevené nezávisle různými výzkumnými týmy jsou později ztotožněny.

Lze odhadnout, že celkem je asi 500 látek patřících do této skupiny.

Ze značného počtu mikroskopických hub je známo asi 150 druhů, které jsou schopny produkovat jeden nebo více mykotoxinů. Naneštěstí mezi ně patří řada běžných druhů, vyskytujících se v prostředí i na potravinách. Z tohoto důvodu je přítomnost porostu plísně na potravinách prakticky vždy spojena s rizikem, že mohla do ní naprodukovat nějakou nežádoucí látku.

Odstranění již naprodukovaných mykotoxinů z potraviny je v běžných podmínkách prakticky nemožné. Z některých krmiv lze mykotoxiny odstranit např. vymýváním kapalným čpavkem, kyselinou octovou nebo kapalným oxidem uhličitým, případně dalšími postupy. Cenou je vždy senzorické znehodnocení a snížení nutriční hodnoty. V domácnosti je nejjednodušším bezpečným řešením likvidace všech plesnivých potravin.

3 Historie mykotoxinů

První doložené zprávy o toxicitě plesnivých potravin pocházejí z konce minulého století z Japonska [89]. Některé z nich navazují na lidové zkušenosti, tradované ve východní Asii po staletí. Zejména je popsána mnohaletá lidová zkušenost, že žlutou rýži je třeba vystavit na několik hodin v tenké vrstvě prudkému slunci, aby pozbyla svoji toxicitu (fotolýza mykotoxinu citreoviridinu) V první polovině tohoto století bylo známo o toxickém účinku plesnivých potravin již více. Ve 30. a 40. letech byly na území tehdejšího SSSR zkoumány vzorky obilí, napadené plísněmi rodu *Fusarium*. Ty, i jejich extrakty vykazovaly toxicitu pro pokusná zvířata a v praxi byly spojeny s onemocněním, které je nyní nazýváno alimentární toxická aleukie (ATA), v té době bylo známo pod mnoha synonymy (např. „septická angína"). Podle některých zpráv byly týmy vědců, řešících tento problém, ve 40. letech rozehnány, protože nedokázaly zvládnout masový výskyt ATA v sovětském zázemí během 2. světové války. Tehdy na tuto chorobu zahynulo snad až několik desítek tisíc lidí (oficiální přiznané číslo [99] je 17 000). Většina tehdejších výzkumů totiž sklouzla ke sledování bakterií, napadajících nemocné. Ty jsou z hlediska patogeneze této choroby v podstatě irelevantní (podobně jako původci sekundární infekce u nemocných s AIDS) a zprávy o toxicitě z obilných extraktů a plísňových kultur byly odmítány či zpochybňovány. (Exaktní modelový pokus, prokazující původ ATA z otravy fusariovými mykotoxiny provedl až Ueno v 70. letech [89].)

Ve 40. letech se objevil na trhu „zázrak z plísní", penicilín, zachraňující životy u dříve naprosto beznadějných pacientů s infekcemi. Jeho rozšíření přispěla i 2. světová válka. Nadšení nad penicilínem a záhy plejádou dalších antibiotik zcela přehlušilo starší poznatky o toxicitě plísní, navíc často publikované pouze v národních jazycích a v periodicích a sbornících lokálního významu. Představa bylinkářů, léčících „podivnou plesnivinou" úspěšně i velmi těžké choroby, nalezla své místo i v krásné literatuře [95] a dodnes přežívá i v literatuře spekulativní či alternativní. Zejména zhusta verbalizovaná představa autorů o penicilínu působí v této souvislosti dost bizarně, a to ze dvou důvodů: přírodní penicilín se rozkládá v žaludku a nelze jej podávat ústy jako lék (V-penicilín v tabletách je produktem farmaceutického průmyslu), takto podaný penicilín může naopak vyvolávat závažné alergické potíže. Může také negativně ovlivňovat mikroflóru trávicího ústrojí. Dle zkušeností autora těchto řádků měl sir Alexander Flemming mimořádné štěstí v tom, že nalezl penicilin produkující kmen, který současně neprodukoval žádný mykotoxin. Kmeny s produkcí penicilínu a neprodukující zároveň žádnou toxickou látku jsou značně vzácné. Sir Alexander Flemming nalezl jeden, jeho pozdější američtí spolupracovníci druhý. Originální produkční kmen nalezli i českoslovenští vědci, vyvíjející na konci 2. světové války v poloilegálních podmínkách preparát Mykoin B, což byl originální československý penicilín. Většina výrobců však nakonec přešla na kmen US provenience, který měl nejvýhodnější produkční vlastnosti.

Obnovení zájmu o toxické látky z plísní přišlo náhle. V roce 1960 uhynulo na farmách Nové Anglie několik desítek tisíc krůťat na chorobu, tehdy pojmenovanou turkey-X disease. V té době již byla pokročilejší analytická chemie. Zatímco ve 30. letech se sovětští vědci nedostali dále než k toxickým extraktům a o vlastnostech toxinu v nich neměli reálnou

představu (vesměs ho považovali za blízký mastným kyselinám [69]) a později sir Alexander Flemming léta sháněl někoho, kdo by mu vyčistil jeho penicilín, v tomto případě bylo již po krátké době objeveno několik toxických látek. Byl také podán průkaz jejich původu z arašídů, které tvořily součást krmné směsi pro krůťata, a rovněž byla zjištěna produkce těchto látek plísněmi, které se v arašídech masově vyskytovaly. Protože se produkující plíseň nazývá *Aspergillus flavus*, byly nalezené jedy nazvány aflatoxiny. K jejich bližší identifikaci byla použita písmena, zprvu B pro modře (blue) a G pro zeleně (green) světélkující pod dlouhovlnným ultrafialovým zářením (365 nm) a číselnými indexy, značící jejich pořadí na chromatogramu při tehdy užívané tenkovrstevné chromatografii. I později byla tato tradice alespoň částečně dodržena, aflatoxiny M byly nalezeny v mléce, H v játrech (hepar), P byly v době svého objevu považovány za specifické pro primáty [7] [99].

Poměrně rychle byla zavedena práce s mykotoxiny i do tehdejší ČSSR. K zahájení výzkumu mykotoxinů na lékařské fakultě v Brně došlo v souvislosti s následující kasuistikou:

V jednom ze závodů tehdejší Fruty došlo k zaplísnění rajčat. To vedlo k výraznému senzorickému znehodnocení výrobků silně hořkou chutí. Navíc, pracovníci hygienické služby, provádějící tehdy senzorické zkoušky, onemocněli s příznaky poškození jater. Řešením problému byl tehdy pověřen doc. RNDr. Miroslav Polster, CSc., který se spojil s řadou zahraničních pracovišť a postupně přešel ze sledování jiných xenobiotik a výzkumu bakteriálního metabolismu na problematiku mykotoxinů. Byl absolventem chemie na přírodovědecké fakultě, ale dlouhá léta pracoval jako mikrobiolog. V jeho osobě se tedy ideálně spojily požadavky na pracovníka v této oblasti: důkladná znalost chemie a mikrobiologická erudice. Posléze začal obdobný výzkum veterinárních toxikóz na tehdejší VŠV Brno (nyní VFU Brno), v Hradci Králové (Dvořáčková) a ve výzkumném ústavu ČSAV v Olešnici v Orlických horách. Referenční laboratoř pro analýzu mykotoxinů byla zřízena při KHS Plzeň. Na Slovensku byl výzkum mykotoxinů a plísní soustředěn na Výzkumném ústavu preventivného lekárstva v Bratislavě. V 70. letech se výzkum i rutinní testování nejdůležitějších mykotoxinů rozšířil na mnoho dalších pracovišť. V současné době představuje vrcholové pracoviště pro mykotoxiny v potravinách a potravinových surovinách Centrum hygieny potravinových řetězců na Státním zdravotním ústavu v Brně.

Každé z pracoviště, která se u nás zabývají mykotoxiny, má svá specifika. Pracoviště na LF MU Brno v sobě díky tradicím, založeným doc. Polsterem, spojuje přístup chemický a mikrobiologický. Zde se systematicky zkoumají vztahy vlastností plísňových kultur a produkce mykotoxinů. Právě do této oblasti je také směřována většina autorových aktivit na poli výzkumu mykotoxinů.

Tabulka 1: Přehled negativního působení houbovitých organismů na člověka

- Přímé napadení člověka (mykóza)
  - Obligátní patogeny
  - Fakultativní patogeny
- Alergie
- Otravy jedovatými houbami
- Mykotoxikózy
- Pulmonální mykotoxikóza
- Nespecifická postižení zdraví
- Podíl na „záhadných“ a zázračných jevech

4 Houbovité organismy a zdraví člověka

Houbovité organismy mohou poškozovat lidské zdraví mnoha různými mechanismy. Jejich výčet téměř vyčerpává možnosti negativního působení mikroorganismů. Přehledně je toto negativní působení shrnuto v tabulce na této straně.

4.1 Přímé napadení člověka houbovitými organismy

Napadení lidského organismu houbovitými organismy vede k chorobám, které se souhrnně označují jako mykózy. Existují obligátní patogeny, napadající i člověka ve stavbu, odpovídajícím fyziologické normě. Mezi ně patří především původci kožních mykóz, dermatofyta. Tyto organismy jsou dokonale přizpůsobeny k invadování do lidské pokožky a dlouhodobému přežívání v kůži a jejích derivátech (vlasy, chlupy, nehty). Invaze jiných organismů je do určité míry „normální“ u stavů na hranici fyziologické normy, jako je velmi nízký věk (novorozenci) a vysoké stáří. I v uvedených případech je okruh původců chorob velice omezený a poměrně stálý.

K invazi houbovitých organismů do lidského těla výrazně disponuje vybočení z fyziologické normy, dané chorobou. V těchto případech se uplatní i tzv. fakultativní (podmíněné) patogeny, pro jejichž invazi vytvářejí některé choroby podmínku (odtud podmíněné). Jako podmínky se uplatňují především choroby oslabující imunitu (leukémie a další vleklé poruchy bílých krvinek, AIDS) nebo zvyšující atraktivitu prostředí v lidského těla pro houbovité organismy (např. cukrovka jednak zvyšuje nabídku glukózy, což urychluje růst zejména kvasinek, jednak je v pokročilejším stádiu choroby oslabena imunita). Úrazy otevírají bránu

vstupu infekce do těla (časté mykózy v ráně po úrazu), při celkovém postižení a zejména poruchách CNS (dlouhodobě resuscitovaní pacienti) je rovněž oslabena imunita.

Rovněž negativní vedlejší účinky léčby mohou oslabovat imunitní systém. Je to častý nežádoucí účinek léků proti leukémii a některých novějších léků proti nádorům. V případě pacientů po transplantaci je oslabení imunity cílem léčby. Superinfekce je stav, kdy léčba antibiotiky a chemoterapeutiky naruší symbiotickou mikrobiální flóru (kůže, dýchací ústrojí, dutina ústní, jícen, střevo, pochva) a na uvolněné místo se dostává flóra nežádoucí, vč. kvasinek a plísní.

Velice nepříznivým jevem je fakt, že se stále častěji setkáváme s mykózami lidí bez zjistitelné poruchy imunitního systému, kdy původce onemocnění nespadá do okruhů výše uvedených obligátních patogenů. Je možné, že takto zachycujeme vznik nových lidských patogenů.

4.2 Alergizace

Houbovité organismy jsou význačnými alergeny, schopnými vyvolat celou škálu známých alergických reakcí. Alergeny však nemusí být jen částečky mycelia a spóry (popřípadě jejich zlomky), ale i některé chemické látky, které houby vytvářejí (nejznámější jsou penicilíny, ale i příbuzný patulin a další). Na porost mikroskopických hub (plesnivé byty) je vázán výskyt nežádoucích organismů, z nichž alespoň některé bakterie a zejména roztoči rovněž představují mohutný zdroj alergenního prachu [37].

Problém představuje mnohdy masívní výskyt mikroskopických hub v domácnostech, kde může dojít i ke vzniku rizika z genotoxických mykotoxinů v prachu [5], v prachu z plísní napadajících byty se objevují látky zastavující činnost řasinkového epitelu [29] a může dojít i ke zvýšené kontaminaci potravin uchovávaných v domácnosti [93].

Na pomezí alergií a mykóz patří stavy, kdy v organismu masivně vyklíčí spóry a vyvolají svým drážděním zánět. Tento stav je známý u pýchavek a prášivek, kdy po masivním vdechnutí výtrusného prachu mohou klíčící spóry vyvolat těžký až smrtný zánět plic.

Otravy patří rovněž mezi velice časté poruchy zdraví, vyvolané houbovitými organismy. Pomineme-li fakt, že naprostá většina konzumovaného alkoholu je produktem kvasinek, soustřeďuje se zájem o houbové toxiny na vláknité houby. Ty se tradičně dělí na makromycety a mikromycety, podle toho, zda tvoří nebo netvoří velké (konzumovatelné) plodnice. Přes určitou chemickou příbuznost jsou toxiny makromycetů a jejich působení na člověka studovány odděleně, a to spíše klinicky a toxikologicky (vč. soudní toxikologie) orientovanými pracovišti.

Otravy uvádíme v alespoň stručném přehledu.

4.3 Toxiny makromycetů

4.3.1 Hepatonefrotoxický syndrom

Toxiny ucháče obecného Ucháč obecný má latinské jméno *Gyromitra esculenta*, což přeloženo znamená „ucháč jedlý“. Ještě na počátku minulého století to byla kodexová

houba (= bylo možno ji prodávat na trhu). Otravy po této houbě se dostavují po latenci několika desítek hodin. Navíc nejde o otravu konstantně se vyskytující, ucháče je možno požívat i opakovaně bez jakýchkoli potíží, potom náhle dojde k otravě. Otravy byly proto dříve považovány za potíže po kyselině hevelové (odstraňuje se ze smržovitých hub, i jedlých, spařením vroucí vodou). Později byl vysloven předpoklad, že se jedná o jed, kumulující se v organismu konzumentů, který vyvolá otravu po opakované konzumaci.

Ing. Kříž, vedoucí mykologické poradny v Brně, zastával názor, že poměrně odolné plodnice ucháče obecného jsou v přírodě napadány bakteriemi a ty že v nich vytvářejí toxin.

Toxin ucháče obecného se nazývá gyromitrin. Jde o derivát hydrazinu, stanovitelný jodometrií. Je však otázkou, zda gyromitrin je skutečně ta látka, která vyvolává otravy z ucháčů.

Toxiny muchomůrky zelené Otravy muchomůrkou zelenou (hlízovitou) *Amanita phalloides* patří mezi nejčastější smrtné otravy u nás. Přestože v posledních cca dvaceti letech bylo při léčbě těchto otrav dosaženo značného pokroku a úmrtnost se dramaticky snížila, pořád ještě zbývají případy oslabených jedinců a případy se špatně stanovenou diagnózou, u nichž je léčba lege artis nasazena příliš pozdě.

Toxiny, amanitiny a phalloidiny, jsou bicyklické okta a dekapeptidy. Vstřebávají se v tenkém střevě a portálním oběhem přecházejí do jater. Část toxinů proniká do nitra hepatocytů (jaterních buněk), kde se navazuje na nitrobuněčné membrány, především endoplasmatické retikulum. Dojde k narušení jejich funkcí a následnému odumření hepatocytu. Nevstřebaně toxiny a snad i toxiny uvolněné z rozpadlých buněk přecházejí do žluče a s ní do dvanáctníku, aby se v dalších partiích tenkého střeva znovu vstřebaly a tím znásobily svůj účinek.

Příznaky otravy se objevují až po narušení většího počtu hepatocytů a selhávání jaterních funkcí. Z toho důvodu se objevují 24 - 48 hodin po požití houby. V první fázi jde o nespecifické narušení funkcí trávicí soustavy s nevolností a zvracením, následují specifické příznaky narušení jaterních funkcí (žloutenka a vzestup hladiny enzymů z nitra hepatocytů v krvi - tzv. „jaterní testy“). Každá nevolnost následující delší dobu po požití hub má být od počátku řešena jako otrava zelenou muchomůrkou, dokud není prokázán opak. Problémem jsou otravy spojené s opakovaným požitím hub v krátkých časových odstupech a otravy mimo sezónu z hub sušených či jinak konzervovaných.

Toxiny lze poměrně snadno stanovit chromatograficky ve zbytcích jídla nebo odpadu z přípravy houbového pokrmu. Po požití přestávají být toxiny poměrně rychle analyticky snadno dostupné. V moči popř. krvi je lze stanovit RIA nebo HPLC, avšak tyto metody nejsou pro toxiny muchomůrky zelené běžně k dispozici (sety pro RIA, speciálně seřízený přístroj pro HPLC). Běžně se proto provádí sledování spor ve zvratcích a výplaších trávicí trubice, pokud nejsou spory odpovídajícího tvaru a velikosti nalezeny, přechází se na méně náročnou léčbu.

Léčba spočívá především v opakovaných výplaších popř. permanentní laváži trávicí trubice, megadávkách penicilínu (až deset milionů jednotek denně) a podávání léků ochraňují-

cích jaterní parenchym (analogy známého Legalonu v injekční podobě). Zkouší se podávání různých materiálů absorbujících toxiny ve střevě. Při časném záchytu otravy má význam hemoperfuse (odstranění toxinů z krve speciálně upraveným aktivním uhlím). Léčba už středně těžké otravy stojí několik desítek tisíc Kč v přímých nákladech (bez započtení sociálních dávek a poměrných nákladů na vznik invalidity resp. úmrtí u části pacientů - v cenách z počátku 90. let minulého století).

Stejné toxiny v nižší koncentraci se v dalších druzích hub. Tzv. faloidní otravy se vyskytují i po požití některých drobných lupenatých hub (skupina menších bedel kolem Bedly žraločí a Bedla zahradní, podobající se silně jedlé Bedle červenající – z toho důvodu se nedoporučuje sbírat k jídlu bedly mimo les). V malém množství se tyto toxiny objevují i u mnoha dalších druhů hub včetně jedlých. Stopové koncentrace byly nalezeny i v hřibu obecném.

4.3.2 Hepatonefrotoxický syndrom

Otrava pavučincem plyšovým Otrava pavučincem plyšovým *Dermocybe orellana* je u nás prakticky neznámá. Někteří odborníci mají za to, že vzhledem k obtížné diagnóze bývá přehlížena a případy končí jako „selhání ledvin nejasné etiologie“. V sousedním Polsku je několik odborníků na uvedené otravy a diagnostikují až několik desítek případů ročně.

Pavučinec plyšový je drobnější skořicově hnědá houba, nelákající příliš ke sběru, nicméně vyskytující se na značné části našeho území. Příznaky otravy - selhávání ledvinných funkcí až totální zhroucení tohoto orgánu - nastupují až za dva týdny po požití pavučinců, popřípadě i za delší dobu.

4.3.3 Otravy s postižením trávicí trubice

Otrava závojenkou olovovou (ev. zvonovkou jarní) Otrava závojenkou olovovou *Entoloma sinuatum* i zvonovkou jarní *Nolanea verna* může mít smrtný průběh u dětí, starších pacientů a pacientů s chorobami snižujícími odolnost vůči ztrátám vody a minerálních látek (například poruchy krevního oběhu, těžší choroby ledvin apod.). Projevuje se především průjmem a zvracením, které pacienta mohou vyčerpat a natolik dehydratovat, že nepřežije (tedy podobně jako některá bakteriální onemocnění).

Závojenka olovová je snadno zaměnitelná s čirůvkou májovkou, roste i na podobných lokalitách a doby jejich fruktifikace se překrývají. Ještě snadnější je záměna s jedlou závojenkou podtrnkou (kulinární užití podobné jako u májovky). Ta by se nikdy neměla sbírat jinde než v sadech se švestkami, kde je růst závojenky olovové prakticky vyloučen (obě závojenky se mohou vyskytovat např. na okraji lesa, kde rostou trnkové keře, zde je sběr podtrnek vysoce rizikový a nelze ho rozhodně doporučit). Zvonovka jarní bývá sbírána spíše náhodně, popř. „houbaři“, kteří sbírají prostě vše.

Otravy jedovatými hřiby Prakticky všechny modrající hřiby (na řezu rychle či pomaleji vzniká modré zabarvení) jsou za syrova jedovaté. K vyvolání explozívního zvracení do několika desítek minut po požití stačí údajně kousek plodnice o velikosti ořechu. Hřib kříšť

obsahuje navíc látky, propůjčující plodnici odpornou chuť (neplést s podhřibem žlučníkem, který je rovněž odporný ale není jedovatý). Ostatní modrající hřiby jsou po dostatečné tepelné úpravě (přes dvacet minut při sto stupních celsia) jedlé, včetně „zlopověstného“ hřibu satana *Boletus satanas*. Smrtné vyústění otravy je vzácné.

Toxiny holubinek a ryzců Rody holubinka a ryzec (*Russula* a *Lactarius*) rozeznáme mezi ostatními lupenatými houbami poměrně snadno podle toho, že jejich dužnina je kruchá jako jablko. (Dužnina ostatnách hub se odlupuje ve vláknech). Ryzce obsahují oproti holubinkám mléčnice, takže po poranění vylučují mléko (otázku mléčících holubinek a nemléčících ryzců ponechme specializovaným odborníkům). Je-li dužnina holubinky (z klobouku) nebo mléko ryzce chuti mírné, je houba jedlá. Některé palčivé druhy holubinek a ryzců jsou jedlé rovněž, ale ty už je třeba dobré znát. Problémem mohou být plodnice vymáčené nebo naopak přeschlé či přestárlé (ale takové by se stejně neměly sbírat ke konzumaci). Některé jinak nejedné nebo jedovaté holubinky a ryzce jsou jedné po speciální úpravě (*Lactarius piperatus* je jedlý razantně opečený na slanině, téměř všechny ryzce a holubinky se stanou jedlými po pro prokvašení bakteriemi mléčného kvašení.

Toxiny holubinek a ryzců vyvolávají dráždění žaludku a tenkého střeva. Vzniká více či méně intenzívní zvracení, popř. následované průjmem. Mezi druhy vyvolávajícími zvracení obligátně (*Russula emetica*) a jedlými druhy je v podstatě plynulý přechod, z tohoto důvodu mohou být ve schopnosti konzumovat jednotlivé druhy bez potíží velké meziindividuální rozdíly.

V ryzcích a holubinkách se vyskytují látky pryskyřičného charakteru, které dráždí trávicí ústrojí.

Podobné potíže (a rovněž velice individuálně odlišné) vyvolávají žampiony z okruhu žampionu zápašného. Celá skupina těchto žampionů se vyznačuje žloutnutím cibulky na konci třeně (např. po říznutí nebo škrábnutí nehtem). Ostatní skupiny žampionů na tomto místě zůstávají nezbarveny nebo růžoví (neplést se žloutnutím pokožky klobouku po poranění, to se vyskytuje u řady jedlých druhů i u žampionů zápašných). Ke stanovení tohoto znaku je nutno mít plodnici kompletní, protože se vyskytuje pouze na 1/2 - 1 cm dolního konce třeně. Dalším znakem žampionů zápašných je pach po fenolických látkách, který se při tepelné úpravě zesiluje. Dobře tepelně upravené zápašné žampiony může řada lidí konzumovat bez potíží.

Toxiny kuřátek Jedovatá kuřátka vyvolávají silné dráždění tlustého střeva po latenci jeden až dva dny po požití, kdy se dostavují kruté bolesti břicha a průjmy.

4.3.4 Antabusový syndrom

Toxiny hnojníků (především hnojníku inkoustového) Několik druhů hnojníků vyvolává intoleranci etanolu, zakládající se na stejném principu, jako je záměrně farmakologicky vyvolaná intolerance při některých typech léčby etylismu. Nejznámějším takto účinkujícím druhem je hnojník inkoustový *Coprinus atramentarius*, podobný účinek má snad i hnojník třpytivý *Coprinus micaceus*.

Byl-li požit alkohol do několika hodin před konzumací těchto hub, současně s nimi popř. (v závislosti na dávce) do 12 - 24 hodin po jejich konzumaci, dostavují se vegetativní potíže, nevolnost, špatně od žaludku až mdloby. Principem je zablokování druhého stupně oxidace etanolu v organismu (v prvním stupni se etanol oxiduje na acetaldehyd a ten se normálně ihned oxiduje do druhého stupně na kyselinu octovou). Tím dojde ke hromadění acetaldehydu v organismu a k vyvolání popsaných potíží. Nejsilnější potíže nastávají tehdy, je-li houba požita současně s alkoholem nebo připravena např. na víně.

Z hnojníků byla na začátku 80. let izolována účinná látka a nazvána jako coprinin. V některých zemích byla dokonce zavedena do léčby etylismu, protože je k lidskému organismu šetrnější než antabus. Zatímco po antabusu byla popsána i úmrtí, po hnojnících nikoli. Šlo zejména o případy „Kupte speciální pilulky a sypejte je manželovi – alkoholikovi do jídla, vyléčíte mu alkoholismus“, jak hlásala příslušná reklema. Zatímco lékařské podávání antabusu má řadu kontraindikací, které lékař sleduje, laické podávání (na způsob „Vávrovy kávy“ od Maryši) může skončit i úmrtím.

4.3.5 Halucinogenní syndrom

Halucinace se mohou vyskytovat při otravě celou řadou hub. Dělal jsem rozhovor s pacientem, který přežil požití tří plodnic zelených muchomůrek, ležel 60 dní na intenzívní péči a měl jednak halucinace připomínající tzv. Lazarův syndrom, jednak trpěl bludem, že se na oddělení natáčí další díl tehdy populárního TV seriálu „Nemocnice na kraji města“. Po zlepšení stavu blud korigoval. Podobně se mohou do psychiky promítnout prakticky jakékoli těžké stavy s narušením jaterních funkcí, kdy je mozek zaplavován toxiny z trávicího ústrojí, normálně játry odstraňovanými z krve.

Otrava muchomůrkou červenou *Amanita muscaria* a příbuznými druhy (muchomůrka tygrovaná *Amanita pantherina*, muchomůrka královská *Amanita regalis* apod.) vyvolává stav podobný alkoholickému opojení, který může být doprovázen i halucinacemi. Otrávení někdy končí na záchytce.

Pravý halucinogenní syndrom se objevuje po požití několika druhů rodů kropenatec *Panaeolus* a lysohlávka *Psilocybe*. Tyto houby obsahují psilocybin a jeho derivát psilocyn, jejichž účinek je podobný účinku LSD, avšak otravy jsou zpravidla subjektivně prožívány příjemněji a je menší riziko „bad tripu“ (kdy dochází ke vzniku halucinací s negativním nebo děsivým obsahem). Naše halucinogenní houby jsou poměrně drobné, zato lysohlávky ze Střední Ameriky mohou dosahovat šířky klobouku přes deset cm. Některé z nich jsou pěstovatelné uměle (naše domácí druhy netvoří v kultuře plodnice). Není zcela vyloučen jejich únik do volné přírody nebo skleníků, jak se už stalo u několika jiných exotických druhů hub.

Na našem pracovišti jsme analyzovali i další druhy hub, po nichž se vyskytly při intoxikaci halucinace, šupinovku nádhernou *Gymnopilus junonius* a strmělku kohoutí *Clitocybe gallinacea*. V žádné z nich jsme psilocybin a psilocyn neprokázali, obsahovaly však řadu jiných indol pozitivních látek, které jsme nebyli s to (už vzhledem k omezenému množství hub, které bylo k dispozici) došetřit.

4.3.6 Muskarinový syndrom

Muskarin vyvolává zvýšený tonus parasympatiku. Objevuje se pocení, slinění, slzení, poruchy srdečního rytmu, může se objevit bolest břicha, průjem a zvracení. Nápadné je zúžení zorniček, až na velikost špendlíkové hlavičky. Smrt může nastat především zhroucením krevního oběhu. Účinek toxinu lze snadno zablokovat podáním atropinu, pokud na to ošetřující lékař včas pomyslí. Smrtné otravy jsou popsány především při požití vláknice načervenalé *Inocybe Patouillardii*, která je poměrně statná a obsahuje velké množství toxinu.

Muskarin obsahují rovněž některé menší druhy vláknic a také další drobné lupenaté houby, např. některé strmělky. Otravy těmito druhy jsou vzácnější, protože tyto houby méně lákají k jídlu.

4.3.7 Kumulace cizorodých látek

Zdrojem zdravotních potíží po houbách mohou být nakumulované cizorodé látky. Akutní potíže mohou nastat v souvislosti s postřiky lesních porostů. Problém je v tom, že v houbovém organismu nakumulované pesticidy mohou přetrvat i přes karanténní lhůtu, kdy na jiných lesních plodinách jsou již bezpečně rozloženy (a v lese už nejsou výstražné tabulky).

Z hlediska dlouhodobějšího postižení zdraví je významná schopnost hub kumulovat těžké kovy. Plodnice hub rostoucích kolem silnic bývají silně kontaminovány olovem (kontaminace půdy olovem bude přetrvávat ještě léta po zavedení bezolovnatého benzínu). Na pozemcích hnojených strojenými hnojivy mohou být plodnice hub kontaminovány kadmiem. V obou případech jsou popisovány plodnice s koncentracemi těchto kovů, kdy ve stogramové porci hub může být až několikatýdení doporučený limit příjmu Pb nebo Cd. V oblastech radioaktivních skvrn, především po Černobylu může koncentrace radionuklidů (především izotopy Cs a Sr) na úrovni způsobující ozáření převyšující roční limit pro populaci.

Část těžkých kovů je vázána do stromatu z polysacharidů. Ta se nevstřebá. Nicméně část je vyvázána na specializované „detoxikační“ bílkoviny, velmi podobné od bakterií po člověka (mohou do sebe vyvázat až 50% své hmotnosti atomů těžkého kovu), které se trávením rozpadnou a uvolněné kovy se vstřebají.

4.3.8 Hemolýza a autoimunní reakce

Po požití syrových nebo nedostatečně tepelně opracovaných plodnic čirůvky fialové *Lepista nuda* nebo čirůvky dvoubarvé *Lepista bicolor* může dojít k rozpadu červených krvinek - hemolýze a případně následnému poškození hojně prokrvených tkání (včetně ledvin).

Po opakovaném požití plodnic čechratky podvinuté *Paxillus involutus* může dojít ke tvorbě imunokomplexů, které se vychytávají na membránách glomerulů v ledvinách. Proti temto imunokomplexům dojde k vytváření protilátek, jejichž působení vede k zánětu (glomerulonefritidě) a případně až ztrátě ledvin.

4.3.9 Pseudootravy

Houby jsou obecně obtížně stravitelné, podle individuální citlivosti může dojít k potížím po jejich požití, také při přejedení nebo po nevhodné úpravě nebo při nevhodné kombinaci potravin. Jsou náchylnější ke kažení než zelenina, takže se po nich častěji mohou objevit zdravotní potíže při nevhodném uskladnění. Mimo jiné je to dáno tím, že jsou pravidelně kontaminovány půdními bakteriemi tvořícími spóry, které jsou schopny přežít tepelnou úpravu pokrmu. Mohou být zdrojem otrav i z domácích konzerv.

Při vzniku zdravotních potíží po požití hub je nutné vyloučit i tu možnost, že se jedná o náhodnou časovou souvislost mezi vznikem zdravotních potíží a konzumací jídla s houbami. Takové případy se staly. Hlavní nebezpečí pro pacienta spočívá v tom, že nemusí být adekvátně léčen, popř. jsou léčebné zákroky v rozporu s požadavky na léčbu vzniklé choroby. (Například infarkt může nastat po opulentním jídle s houbami a mít natolik atypický průběh - může k tomu přispět mj. i alkohol - , že bude léčen jako otrava. Přitom výplachy žaludku a další podobné zákroky mohou vést k fatálnímu vyústění této choroby.)

4.4 Pulmonální mykotoxikóza

K pulmonální mykotoxikóze dochází zpravidla při vysoké expozici prachu s obsahem spor plísní, rozprášeného zaplísněného materiálu, fragmentů mycelia apod. Velice často se jedná o profesionální expozici pracovníků, manipulujících s různými krmivářskými a potravinářskými surovinami a polotovary. Zvýšené riziko je při práci v uzavřených prostorách, jako např. vnitřky sil, zásobníků, násypníků apod. V mimoprofesionální sféře jsou ohroženi obyvatelé domů s klimatizací, kdy při jejím delším vypnutí může dojít k pomnožení plísní, které se po zapnutí rozpráší do klimatizovaných prostor. Jsou popsány i případy vzniku zdravotních potíží i po manipulaci s plesnivými matracemi a podobnými součástmi zařízení bytu.

Pulmonální mykotoxikóza se projevuje prudkým záchvatem kašle, dušnosti a dalších dýchacích potíží, horečkou s třesavkou, svalovými bolestmi, narušením srdečního rytmu a popř. dalšími zdravotními problémy. Nástup je zpravidla náhlý, bezprostředně navazující na pobyt ve znečištěném prostředí. Onemocnění probíhá zpravidla benigně, potíže spontánně odezní po zastavení přívodu škodlivin do organismu. S diagnózou nemusejí být potíže, pokud na možnost této choroby ošetřující lékař myslí a správně odebere pracovní anamnézu.

Ta může být podpořena laboratorním nálezem, který je v podstatě negativní. Jsou negativní i laboratorní testa na alergii. Negativita laboratorního nálezu a rychlé odeznění klinických potíží mohou vést i k mylnému závěru, že se jedná o simulaci.

4.4.1 Další jevy, související s toxiny hub

Vedle vzniku onemocnění se specifickými příznaky se mykotoxiny patrně podílejí i na onemocněních, spojených s celkovým oslabením organismu. Jejich projevy závisejí na doprovodných negativních vlivech a dispozicích organismu. Velice dobře jsou tyto chorobné stavy dokumentovány u zvířat; u lidí jsou s jejich zachycením značné metodické problémy.

Nicméně již dnes je jasný podíl mykotoxinů a dalších negativních faktorů spojených s mikroskopickými houbami na tzv. syndromu nemocného domu a některých dalších.

Ve spektru „záhadných“ a „nadpřirozených“ jevů se vyskytují takové, které velice nápadně připomínají otravy některými mykotoxiny. Mnohé příznaky očarování, tradované ve folklóru různých národů, se nápadně podobají postižení při otravě námelovými toxiny. Jiné, dokumentované např. v dochovaných návodech na dotazování čarodějnic, zase korespondují s příznaky hyperestrogenismu, vyvolávanými zearalenonem. Mnohé příznaky vampyrismu, jak je známe z autentických protokolů o vykopání a zničení „upírů“, zase výrazně připomínají soubor příznaků alimentární toxické aleukie a dalších chorob, vyvolávaných mykotoxiny ze skupiny trichothecenů.

Uvedené jevy budou podrobněji zmíněny za přehledem působení mykotoxinů na člověka.

5 Mikroskopické houby

Jako plísně jsou v běžném hovoru označovány veškeré houbovité organismy, vytvářející vlákna mycelia, podhoubí, prorůstající substrát a pokrývající jej vláknitým povlakem. Taxonomové uvedený termín rezervovali pro konkrétní skupinu jednobuněčných hub, tzv. „plísní pravých“ [18]. Problém je v tom, že uvedený termín užívá pouze malá skupina pracovníků, protože odborníci užívají termín latinský, zatímco laici v naprosté většině o této skupině mikroskopických hub ani nevědí. Z tohoto důvodu řada autorů uvedenou českou odbornou terminologii nezohledňuje a ve smyslu hovorové řeči užívá termín „plíseň“ pro veškeré houbovité organismy, nevytvářející velké plodnice. Odborným ekvivalentem tohoto termínu je pojem „mikromyceta“.

Houbovité organismy jsou podle současných názorů samostatnou říší živých organismů. Jediným problémem uvedného řazení je to, že tato skupina není monofyletická. Předpokládá se její vznik z některých skupin rostlin včetně takových, které již vyhynuly. Z toho důvodu má toto zařazení dosud své odpůrce.

Od rostlin se houby odlišují nejen heterotrofií (známe i heterotrofické, nezelené, rostliny), ale i řadou biochemických a metabolických vlastností, jako je spektrum aminokyselin v bílkovinách i obsah chitinu, jinak charakteristický pro členovce.

U hlenek dosud není jednoznačné zařazení mezi houby nebo živočichy. Stejně tak v systému ojedinělý parazit *Pneumocystis carinii* býval řazen střídavě mezi prvoky a kvasinky, poslední práce jej řadí mezi kvasinky [36].

I tyto dva příklady ukazují, že taxonomie hub a mikromycet zvlášť není dořešena. Problém klasické taxonomie spočívá v příliš malém množství zachovaných houbových fosílií, a ty se navíc soustřeďují do skupiny dřevokazných hub (fosílie v uhlí). V současné době je rozpracovávána taxonomie na základě sekvenční analýzy DNA, která může právě v této skupině organismů pomoci zjistit vzájemné vztahy a případné příbuzenství k ostatním skupinám. V současné době je spíše zdrojem zmatků, protože systém podle kladistiky na základě sekvence DNA není v korelaci se systémem podle morfologických znaků.

5.1 Producenti mykotoxinů

Pro ty mikroskopické houby, které nejčastěji produkují významné mykotoxiny, je nejčastěji používán systém skupiny *Fungi imperfecti*, a to i v případech, kdy známe pohlavní stádia a jsme tedy schopni je zařadit i do systému přirozeného. Znaky, se kterými se pracuje při zařazování do systému skupiny *Fungi imperfecti*, se totiž v kulturách vyskytují nepoměrně častěji a spolehlivěji. Vesměs jde o tvar a velikost nepohlavních rozmnožovacích orgánů, popř. další znaky na myceliu.

Určování mikroskopických hub je navíc dosti složité, vyžaduje práci s cizojazyčnou literaturou (především anglickou) a kvalitní mikroskop. (Školní mikroskopy vesměs nepostačují k rozlišení některých zásadních znaků.) Orientační určení lze provést podle monografie Fassatiové [18], zahrnující výběr z nejdůležitějších taxonů. V případě perspektivy častější práce v této oblasti je vhodné absolvovat stáž na zavedeném mykologickém pracovišti.

5.2 Nejdůležitější rody toxinogenních plísní

Mezi nejdůležitější rody, jejichž druhy produkují významné mykotoxiny, patří rody *Aspergillus*, *Fusarium* a *Penicillium*.

5.2.1 Rod*Aspergillus*

Jde o patrně fylogeneticky starý rod. Pohlavní stadia jsou vřeckaté houby, vytvářející plodničky často menší než 1 mm. Nepohlavní rozmnožovací orgány jsou tvořeny vlákénkem na konci ztluštělým. Na tomto konci je paprskovitě rozmístěna řada či více řad válcovitých buněk, z jejichž konců dozrávají a odštěpují se nepohlavní spory. Vlákénko se nazývá *konidiofor*, válcovité buňky *fialidy* a spory *konidie*. V pokračování každé fialidy je zpravidla celý řetízek konidií. Průřez rozmnožovacím orgánem připomínal starým botanikům kropítko, odtud i český název kropidlák. Určování je uvnitř tohoto rodu relativně nejjednodušší (zpravidla ale obtížnější než určování cévnatých rostlin podle botanického klíče). Existující monografie, Raper - Thom a Raper - Fenell, mají stejnou koncepci a navazují na sebe. Problémy mohou nastat uvnitř některých skupin, popř. při rozlišování velmi blízkých druhů (např. *Aspergillus flavus* a *A. parasiticus*). Z ryze hygienického hlediska však často takovéto rozlišení není nutné.

5.2.2 Rod*Penicillium*

Tento rod je příbuzný předcházejícímu, existuje dokonce i skupina druhů na jejich pomezí. Považuje se za fylogeneticky mladší, což se mj. projevuje velmi malými rozdíly v utváření rozmnožovacích orgánů jednotlivých druhů. Nepohlavní rozmnožovací orgány jsou rovněž tvořeny konidioforem, fialidami a konidiemi, fialidy jsou však na neztluštělém konidioforu sestaveny do tvaru štětičky, odtud i český název štětičkovec. Určování v této skupině je obtížné. Situace je navíc komplikována existencí dvou značně rozdílných systémů, a to podle starší monografie Raper - Thom, na niž organicky navázal Ramirezův atlas, a novější monografie Pittova.

Podle monografií Raper - Thom sestavil (s mnoha zjednodušeními) klíč aspergillů a penicillií Pidopličko, tato publikace (v ruštině) je v našich knihovnách zpravidla dostupnější než původní práce.

5.3 Rod*Fusarium*

Na rozdíl od předcházejících rodů, v nichž převažují saprofytické druhy, jsou fusaria především parazité. Jsou však schopna i saprofytického růstu, proto je lze pěstovat na umělých půdách. Jsou ale zpravidla náročnější a zejména obtížněji vytvářejí makrokonidie, sloužící k rozlišení druhů. V kulturách velice často vytvářejí bílé či narůžovělé mycelium, rostoucí ve snopcích od půdy k víčku misky. Některé kmeny zabarvují substrát do růžova až červena. Konidiofory fusarií jsou malé a nenápadné. Konidie jsou dvojí. Mikrokonidie, prakticky nepoužitelné pro druhovou determinaci, jsou tvořeny zpravidla jednou buňkou. Makrokonidie

mají srpovitý tvar, skládají se z většího počtu buněk a nesou důležité druhové znaky. Systematika a určování rodu *Fusarium* je poznamenaná existencí řady (5 hlavních) systémů, které navíc používají stejné či podobné názvy pro naprosto odlišně definované druhy. Samotné uvedení druhu bez informace, jaký systém byl použit, popř. bez uvedení sbírkového čísla kmene, má prakticky nulovou informační hodnotu. U nás byly nejčastěji používány klíče podle Bilajové, nekompatibilní se západními systémy (problém starší literatury, vč. učebnic). Nicméně i práce anglickojazyčné mohou být zavádějící, pokud jsou bez odkazu na určovací klíč.

5.4 Termorezistentní houby

Termorezistentní houby nepředstavují ucelenou taxonomickou skupinu hub, ale spojuje je vlastnost jejich sexuálních spor - odolnost vůči teplotám blízkým bodu varu vody. Samotný jev temorezistence není dosud úplně prozkoumaný, existuje představa, že je vyvolán schopností houby vytvářet velmi dehydratované spory, jejichž bílkoviny se denaturují až při dlouhodobém působení vysokých teplot. Všechny dosud zaznamenané případy termorezistence se týkají askospor.

Askospory mikromycet jsou barvitelné acidorezistentním barvením, následně jsou pozorovatelné s použitím imerzního objektivu. Barvení a pozorování těchto struktur jsme zavzali do laboratorních metod v rámci mikrobiologie pro bakalářské studium výživy člověka. U spor *Neosartorya fischeri* je velmi dobře pozorovatelný charakteristický dvojitý hřeben, pásovitě obepínající celoututo strukturu, jinak známý z elektronové mikroskopie [61]. Termorezistence byla pozorována u druhů *Byssochlamys*, *Dichotomomyces cejpii*, *Neosartorya fisheri* a několika dalších.

Efektu termorezistence se užívá též pro stanovení těchto druhů hub v různých substrátech, kdy substrát nebo výluh do fyziologického roztoku je vystaven po několik desítek minut teplotám větším než 80 ^{o}C (jednotlivé metody se v detailech liší) a poté masivně vyočkován na vhodnou půdu.

Spory některých termorezistentních mikroskopických hub vydrží i krátkodobé působení teploty kolem 100 ^{o}C, tj. spory v lečivých bylinách vydrží přípravu čaje a proniknou vitální do konečného výrobku. Záleží na objemu vody, kterou jsou byliny zalévány. Při zalití vroucí vodou v množství kolem 1/4 l přežívá menší množství spor oproti opracování oplachu při teplotě 80 ^{o}C, při zalití vroucí vodou v objemu kolem 100 ml přežívá spor naopak více [4] [27].

Význam termorezistentních hub je uvažován především z hlediska přípravy tepelně konzervovaných potravin (kompoty apod.), které navíc nelze zahřívat po libovolnou dobu na libovolnou teplotu. V konzervárenském průmyslu dochází k nárůstu mycelia ve sklenicích s kompoty a dalšími výrobky. Tím dochází jednak k senzorickému znehodnocení výrobků (což je z hlediska výrobce nejzávažnější), jednak mohou být konzumenti ohroženi produkovanými toxiny, které nejsou dosud plně prozkoumány.

Jesenská a Piecková konstatovaly vysokou toxicitu extraktů z kultur některých termorezistentních hub vůči epiteliálním buňkám kuřecí trachey [58]. Na našem pracovišti jsme konstatovali, že toxicita termorezistentních hub vůči prvokům a žábronožce *Artemia sa-*

lina převyšuje toxicitu běžných mikroskopických hub z potravin vůči těmto organismům. Rovněž jsme zaznamenali vysokou genotoxicitu metabolitů těchto mikroorganismů [27] [78] [58].

Další možné riziko termorezistentních hub spočívá v možném přímém napadení člověka. *Neosartorya fischeri* je popsána jako podmíněný patogen, schopný vyvolat u pacientů s defektem imunity těžké až smrtné infekce. Byla popsána úmrtí u leukemiků. Faktem je, že leukemie se na počátku onemocnění projevují velmi nespecificky, a že u významné části laiků je tendence léčit „nachlazení“ pitnými kůrami s bylinkovými čaji. Vzhledem k možnosti výskytu leukemického zánětu v lymfatické tkáni hrdla existuje možnost průniku infekce do organismu touto cestou.

5.5 Význam mikromycet

Důležitost hub z hlediska globální ekologie i z hlediska člověka je značná.

Houby patří mezi výrazné dekompository organické hmoty a mají schopnost rozkládat i ty substráty, na které nepostačuje bakteriální aktivita. Tím významným způsobem přispívají ke koloběhu biogenních prvků v přírodě.

Jejich vysoká enzymatická aktivita nalézá i četná uplatnění při výrobě potravin (od komponent tradičních asijských kuchyní po výrobu některých organických kyselin), léků (mj. antibiotika) a dalších komodit. Některé makromycety (vytvářející velké plodnice) jsou přímo či po kuchyňské úpravě poživatelné. Všeobecně se uvádí, že basidiomycety mají širší spektrum a účinnějších enzyymů než ascomycety, což má význam spíše v technické mokrobiologii (např. horší prognóza pro napadenou konstrukci).

Houby se dále uplatňují jako významní rostlinní i živočišní parazité, některé druhy jsou obligátně či podmíněně patogenní i pro člověka. Např. trichofytóza, způsobená houbou *Trichophyton rubrum* je známa jako nejčastější profesionální infekce u nás.

Houby jsou schopny vyvolat povrchové mykózy, kdy napadají především kůži a její deriváty (vlasy, nehty). Mezi takto působící infekční agens patří obligátně patogenní houby, řazené do skupiny tzv. dermatomycet. Uvedené organismy jsou vysoce specializované na parazitický život a jsou s to napadnou prakticky každého, kdo přijde do kontaktu s infekcí.

Řada hub, kvasinek, jednobuněčných i vícebuněčných vláknitých hub patří mezi podmíněné patogeny. Napadají lidské jedince oslabené strádáním (hladovění, vyčerpání, jiná choroba), poruchami imunitního systému (vrozené defekty, AIDS, vedlejší účinky léčby nádorů a leukémií, dlouhodobě resuscitovaní pacienti) či fyziologickým stavem (novorozenci, zejména nedonošení, starci). Velmi důležité je prolomení přirozených ochranných bariér organismu poraněním či alespoň zapařením kůže (neprodyšná obuv, sauna). Z běžných nemocí má pro rozvoj plísňových infekcí význam především cukrovka (oslabení imunity v kombinaci s vyšší hladinou glukózy ve tkáních a horším prokrvením - tedy i dostupností pro buňky imunitního systému - především končetin).

Mezi velmi časté původce podobných infekcí patří především již zmíněná pneumocysta (*Pneumocystis carinii*), vyvolávající těžké zápaly plic u novorozenců (především nedonošených), starých pacientů a pacientů s AIDS a kvasinka *Candida albicans*, vyvolávající

mykózu sliznic dutiny ústní (v horším případě i dalších partií trávicího ústrojí) u novorozenců a kojenců a u jejich matek mykózu prsních bradavek.

6 Toxinogenita

Toxinogenitou se nazývá schopnost organismů tvořit toxiny. Aplikováno na mikroskopické houby - jde o schopnost tvorby mykotoxinů.

Všechny kmeny druhů mikroskopických hub, u nichž byla zjištěna produkce určitého mykotoxinu, považujeme za potenciálně toxinogenní pro daný mykotoxin. Pokud u konkrétních kmenů stanovíme toxinogenitu, hovoříme potom o toxinogenitě (pozitivní) nebo netoxinogenitě (negativní). Pozitivní toxinogenita pak znamená, že daný kmen je za určitých podmínek schopen produkovat daný mykotoxin. Vyšetření konkrétního kmene má tedy vždy vyšší výpovědní hodnotu než pouhé konstatování jeho příslušnosti ke druhu, který je schopen v některých případech produkovat mykotoxiny.

Tvorba mykotoxinů je závislá vedle druhu mikroskopické houby na chemických, fyzikálních a biologických podmínkách růstu.

Mykotoxiny nejsou přímo genové produkty. Jsou to sekundární metabolity, jejichž tvorba závisí na souhře enzymatických aktivit v buňce. Na druhé straně ovšem neexistence genů pro klíčové enzymy této tvorby je spojena s naprostou neschopností kultury tvořit daný mykotoxin (skupinu mykotoxinů).

Z hlediska druhových či genetických podmínek toxinogenity jde o schopnost houby produkovat ty enzymy, které se podílejí na přeměně prekursoru, zpravidla přes meziprodukty, na mykotoxin. Některé prekursory mohou být samy o sobě rovněž mykotoxiny. Nalézáme je u některých druhů, neschopných jejich další přeměny. U druhů, kde biochemická přeměna pokračuje k dalším látkám, je nacházíme často pouze ve stopových koncentracích. Např. versicoloriny jsou poměrně častým toxickým metabolitem některých druhů rodů *Aspergillus* a *Penicillium*. V některých kmenech *A. flavus* nebo *A. parasiticus* dochází k jejich další přeměně, jejímž výsledkem jsou mj. aflatoxiny. V některých případech je popsána schopnost produkovat více konečných sloučenin v závislosti na tom, jaké enzymy jsou v kultuře aktivní. Převahy určité konkrétní sloučeniny v kultuře lze potom dosáhnout např. změnou teploty nebo specifickými inhibitory některých enzymů.

Mezi nejdůležitější fyzikální vlastnosti ovlivňující tvorbu mykotoxinů patří teplota. Zpravidla existuje určité teplotní rozmezí, uvnitř kterého mohou být mykotoxiny vytvářeny, přičemž od optima směrem k limitům klesá jednak množství produkovaného toxinu, jednak často i procento kmenů, schopných produkovat detekovatelné množství mykotoxinu. Polster [65] opakovaně konstatoval. že nenalezl u kmenů *Aspergillus flavus* produkci aflatoxinů při teplotě nižší než 16 ^{o}C. Podobně je tomu i s dalšími toxinogenními plísněmi. U kmenů některých druhů rodu *Fusarium* je nutno provádět kultivaci při nižších teplotách než je laboratorní. Provádí se to ve speciálně upravených chladničkách, zapojených jako termostat.

Důležité jsou osmotické vlastnosti substrátu, charakterizované nejlépe tzv. vodní aktivitou (a_w). I zde existuje zpravidla rozmezí hodnot, uvnitř kterého lze zaznamenat produkci mykotoxinů. Je nutno zdůraznit, že posun a_w mimo optimální hodnoty neznamená usmrcení kultury. Dochází k přežívání spor a za určitých okolností i myceliálních buněk. Po návratu vodní aktivity do rozmezí slučitelného s růstem plísně dojde k jejímu dalšímu nárůstu.

Posun teploty a vodní aktivity mimo optimální či růstové rozmezí kultury nemusí vždy omezit enzymatickou aktivitu kultury a zejména aktivitu těch enzymů, které se uvolnily do substrátu. Některé nežádoucí změny substrátu (potraviny, krmiva, suroviny) mohou tedy probíhat i za podmínek neslučitelných s vitální aktivitou celého plísňového organizmu.

Struktura substrátu, popř. skupenství, může výrazně ovlivňovat jak dostupnost chemických látek ze substrátu, tak i přístup vzduchu k myceliu. Je rozhodující i pro to, zda mycelium bude vytvářet pouze povrchovou vrstvu, nebo zda výrazněji proroste do hloubi substrátu. Z tohoto důvodu bývá větší výnos mykotoxinů na granulovaném substrátu, který plíseň prorůstá v celém objemu. Naopak u kultivace v tekutých půdách bývá při zachování stejné plochy hladiny přidávání dalšího objemu půdy z hlediska produkce mykotoxinů neefektivní (výhodnější je rozdělit půdu do více nádob, aby její vrstva nepřevyšovala cca 2 cm). Lepší laboratorní vybavení umožňuje poržávat třepačkové kultury, které tuto nevýhodu zčásti odstraňují stálým pohybem kultivačního média.

Čas musíme chápat jako rovněž fyzikální veličinu. I na něm závisí obsah mykotoxinů v substrátu, protože mycelium začne produkovat měřitelná množství mykotoxinů až po určité době (*Aspergillus flavus* dle našich zkušeností od období, kdy začne sporulovat) a po vyčerpání zdrojů v substrátu se produkce zastaví. Obsah mykotoxinů poté klesá přirozeným rozkladem, v některých případech i enzymatickou dekompozicí. Polster [66] uvádí rychlejší úbytek aflatoxinů v nedostatečně vyčištěných standardních roztocích.

Z chemických faktorů je důležitý přísun energie a nezbytných chemických látek, které buňky mikroskopických hub potřebují jako vstup do svého metabolismu. V některých případech je ovšem množství živin na škodu produkce mykotoxinu, protože kultura není nucena aktivovat některé enzymatické systémy a jejich nízká aktivita v kultuře vede i k nízké až nedetekovatelné produkci sekundárních metabolitů. Setkali jsme se se snížením až zástavou produkce kyseliny cyklopiazonové na půdách s obsahem peptonu.

Důležitý je přísun kyslíku. Při jeho nedostatku dochází k poklesu produkce mykotoxinů a posléze k zástavě růstu kultury [47] [57].

Naopak je znám vliv látek aktivujících enzymatické systémy, jako jsou např. barbituráty, PCB, některá rozpouštědla a pod., které mohou produkci mykotoxinů až zmnohonásobit. Zvýšení produkce mykotoxinů bylo popsáno rovněž při fortifikaci média některými mikroelementy nebo jejich směsí [15] [16] [17] [52].

Významné jsou i faktory biologické. Je popsán prudký pokles produkce mykotoxinů ve směsných kulturách [88]. Setkali jsme se s prudkým poklesem produkce aflatoxinu B_1 kulturou *Aspergillus parasiticus* NRRL 2999 po několika přeočkováních. Byly zachovány předchozí pasáže i původní kultura, na nichž bylo možno pozorovat, jak produkce aflatoxinu pasáž po pasáži klesá. Při velmi řídkém výsevu a izolaci subkultur z jednotlivých kolonií jsme pozorovali značné rozdíly v produkci mykotoxinů mezi nimi. Podobné pozorování je známo i z literatury [71] u produkce ochratoxinu A.

Silný pokles produkce mykotoxinů lze vysvětlit tím, že při pasážování kultury vznikají netoxinoxenní mutanty. Jejich přibývání ve směsné kultuře poté vede k rychlé ztrátě produkce mykotoxinů. Japonští autoři [88] pozorovali snížení až ztrátu produkce aflatoxinů kulturou *Aspergillus flavus* pokud byla ve sporách produkčního kmene příměs spor netoxinogenního kmene, popř. jiného druhu (*Aspergillus niger*).

Vyčištěním kultury, popř. zajištěním jednotné linie opakovanou monosporickou kultivací lze produkci mykotoxinu kulturou alespoň v některých případech buď zvýšit nebo obnovit. K poklesu produkce často dochází u déle uchovávaných kmenů během pasážování, někdy skokem někdy postupně, a to i při dodržení správných zásad manipulace s kulturou. S tímto nežádoucím jevem se setkali pracovníci Alma-Atského Institutu pitanija. V době mé stáže na uvedeném pracovišti byly sledovány starší a novější subkultury kmene *Aspergillus parasiticus* NRRL 2999. U starších kultur byla produkce aflatoxinů výrazně silnější než u přeočkovaných. Při řídkém roztěru spor a izolaci jednotlivých subkultur byly zjištěny rozdíly v produkci aflatoxinů [6]. V souladu s výsledky japonských autorů [88] se lze domnívat, že výskyt neaflatoxinogenních mutant v potomstvu kultury vede k inhibici produkce aflatoxinů ve směsné kultuře s těmi, které si schopnost produkce aflatoxinů dosud zachovaly. Podobný jev je znám i u producentů ochratoxinu A [39]. Na našem pracovišti jsme podobně sledovali produkci kyseliny cyklopiazonové kmeny *Aspergillus flavus* při opakovaném pasážování na různých substrátech. Pozorovali jsme značné rozdíly v produkci mykotoxinu jednotlivými subkulturami, ale nenalezli jsme jednoznačné vztahy k substrátům, na nichž byly subkultury pasážovány [32]. Tato práce, bohužel, probíhala v době, kdy jsme ještě neměli k dispozici kvantitativní kolorimetrickou metodu stanovení tohoto mykotoxinu. Semikvantitativní porovnání produkce kyseliny cyklopiazonové subkulturami, pasážovanými na různých typech půd a porozených substrátů, vyznělo nepřesvědčivě.

Podobně se při opakovaném pasážování mění morfologické (především makromorfologické) znaky plísňových kultur. Tento nepříjemný jev mj. zabraňuje využití standardních kultur jako porovnávacího materiálu pro výuku začátečníků či laboratorní praxi obecně. Z tohoto důvodu je třeba pracovat především s čerstvě zachycenými či jen krátce pasážovanými kmeny a mít na pracovišti zaškoleného zaměstnance, který je dovede určit [18]. Výhodnější jsou lyofylizáty, které by měly uchovat původní vlastnosti kmene po velmi dlouhou dobu.

V případě mykotoxinů užívaných jako průnikový faktor (např. xanthomegnin a příbuzné látky u některých dermatofyt) lze předpokládat i ovlivnění interakcí parazit - hostitel [89].

V praxi je nejvíce známo o produkci aflatoxinů a trichothecenových mykotoxinů.

U producentů aflatoxinů je znám komplex fyzikálních podmínek umožňujících produkci toxinů. Jsou propracovány vlivy řady chemických látek s inhibičním či naopak stimulujícím účinkem na produkci aflatoxinů. Velmi silně zvyšující účinek mají látky, ovlivňující aktivitu enzymatického komplexu cytochromu P-450 [17].

Jsou rovněž známy kmeny, produkující atypické deriváty aflatoxinů. Například aflatoxiny řady M byly původně popsány jako do mléka přecházející metabolity aflatoxinů řady B [7]. Nyní jsou známy i kmeny *Aspergillus flavus* či *A. parasiticus*, produkující tyto metabolity. Jsou využívány ke komerční produkci těchto aflatoxinových derivátů [19] [74].

U hub z rodu *Fusarium*, produkujících trichotheceny, je zase popsána závislost konkrétního konečného produktu na teplotě. U některých kmenů lze pouhou změnou teploty dosáhnout toho, že je produkován jiný mykotoxin trichothecenové řady [89]. (Obvyklá je masivní produkce jednoho trichothecenu s tím, že při dostatečném množství kultury a dostatečné citlivosti metody lze nalézt ještě několik dalších příbuzných látek, vyskytujících se ve výrazně menším množství.)

Jsou známy i případy, kdy výskyt toxinogenních kmenů je ovlivněn patrně komplexem faktorů. Například je výrazný rozdíl v procentuálním zastoupení toxinogenních kmenů *Aspergillus flavus* (tvorba aflatoxinů a kyseliny cyklopiazonové) v záchytech z různých potravinářských komodit, popř. v rámci téže komodity z různých míst původu. Výskyt producentů aflatoxinů je zpravidla mnohem vyšší mezi kmeny z arašídů než mezi kmeny ze sušeného mléka. U kmenů z arašídů jsou výrazné rozdíly podle produkujícího státu, resp. regionu [2] [68].

U fusarií je známa v Eurasii produkce T-2 toxinu a příbuzných mykotoxinů. V severoamerické obilnici (jih Kanady a sever USA) převažují kmeny produkující deoxynivalenol, 15-acetyl-deoxynivalenol, zearalenon aj. V Austrálii, Japonsku a Itálii byla místo 15-acetyl-deoxynivalenonu pozorována produkce 3-acetyl-deoxynivalenolu.

Toxinogenita je stanovována zpravidla kultivací izolovaného kmene za standardních podmínek, které se podle autora metody blíží optimálním podmínkám produkce mykotoxinu. V některých případech je možné volit takové složení substrátu, které umožňuje zjednodušený postup při jeho analýze. Toto si můžeme demonstrovat na následujícím příkladě:

Pro aflatoxiny byla vypracována metoda stanovení jejich produkce kmeny *Aspergillus flavus* a *A. parasiticus* na karlovarských sucharech. Na uvedeném substrátu dochází poměrně rychle k silné produkci aflatoxinů, dané patrně kombinovaným vlivem struktury, obsahu živin a obsahu mikroelementů v tomto materiálu. Suchary rovněž prakticky neobsahují látky rušící při tenkovrstevné chromatografii, takže lze analyzovat již hrubý acetonový nebo chloroformový extrakt z kultury bez jakékoli další úpravy kromě zahuštění [82].

Uvedená metoda v případě plísně *Aspergillus flavus* nezachytí tvorbu jiného mykotoxinu, kyseliny cyklopiazonové. Její produkci je nutno stanovovat na kapalné půdě se sacharózou a kvasničným autolysátem (popř. yeast extract). Liší se rovněž délka kultivace a teplota. Za těchto podmínek silně aflatoxinogenní kmeny *A. flavus* produkují i aflatoxiny, avšak ve výrazně nižší koncentraci .

Produkci dalších mykotoxinů *Aspergillus flavus*, např. aflatremu, bude nutno stanovovat dalšími postupy.

Správně stanovená toxinogenita by v případě negativního výsledku měla zaručit vysokou pravděpodobnost toho, že testovaný kmen nebude produkovat daný mykotoxin. Pozitivní výsledek znamená pouze to, že zachycený kmen je schopen za jistých okolností stanovovaný mykotoxin produkovat. Určitou orientací může být kvantita a kvalita zaplísnění substrátu. Byl-li nárůst plísně malý a šlo především o vegetativní mycelium, lze očekávat i malý resp. žádný nález mykotoxinu v něm. Pokud byl nárůst masivní a došlo až ke sporulaci kultury, lze očekávat výskyt mykotoxinu (jeho produkce však bude i za těchto okolností ve většině případů nižší, než v modelovém pokusu). V některých případech se mohou v přirozeném substrátu vyskytovat i látky, které v praxi i v experimentu inhibují tvorbu mykotoxinu. V substrátu může být přítomna i mikroflóra, ovlivňující produkci mykotoxinů [66] [84] [88] [99].

Ideální by bylo stanovit produkci mykotoxinů přímo na substrátu, z něhož byly kmeny izolovány. To však často naráží na nepřekonatelné obtíže při zajištění jeho sterility aniž by došlo k jeho výrazným fyzikálním či chemickým změnám. U choulostivých substrátů

s nízkým výskytem mikrobiální flóry je metodou volby masivní kontaminace testovaným kmenem.

Přítomnost spor toxinogenního kmene neznamená zdaleka ještě výskyt mykotoxinů. V naprosté většině případů jsou samy o sobě prosty mykotoxinů, jen několik málo druhů plísní obsahuje významné množství svých mykotoxinů ve sporách (*Stachybotrys atra*, *Pithomyces chartarum*)[70] [79]. Znamená však, že jakmile nastanou vhodné podmínky pro růst mycelia a produkci mykotoxinů, pak k této produkci s vysokou mírou pravděpodobnosti také dojde. Uvedené testy proto chápeme jako pomoc při vytváření postupu, jak bude s testovaným materiálem dále nakládáno, jaký typ dopravy a uskladnění snese atd.

7 Obecně o mykotoxinech

Značný počet mikroskopických hub je s to produkovat toxické látky, pronikající z kultury do okolního substrátu. V některých pracech je rozlišováno mezi endotoxíny, které jsou produkovány do nitra vlastních buněk, a exotoxiny, produkovanými přímo do okolního substrátu[35]. Pro praxi není uvedený rozdíl příliš podstatný, protože každá kultura obsahuje značné množství odumřelých a rozpadajících se buněk, z nichž se endotoxiny uvolňují do okolí. Mykotoxiny nebývají produkovány do spor, výjimkou jsou *Stachybotrys atra* [70] a *Pithomyces chartarum* [3], jejichž výtrusný prach je proto nebezpečně jedovatý. Toxické spory se mohou dostat do dýchacího ústrojí a na povrch těla exponovaných lidí, odkud se toxiny vstřebají do celého organismu.

Větší praktický význam má rozlišení na toxiny bílkovinné a nebílkovinné povahy.

Plísně jsou s to produkovat značné množství bílkovinných toxinů, které mají mnoho shodných rysů s bakteriálními toxiny. Jejich význam z hlediska kontaminace potravin je však zanedbatelný. Některé by se teoreticky mohly uplatňovat jako faktor patogenity u původců mykóz. Jediným onemocněním, které může souviset s působením uvedených toxinů, je pulmonální mykotoxikóza, při níž se zaplesnivělý materiál dostává do bronchů a plicních alveolů, odkud se mohou podobné látky vstřebat. Při požití jsou cizorodé bílkoviny tohoto původu patrně destruovány trávicím procesem a snad již také přípravou stravy. Zatím nebyla u houbovitých organismů popsána produkce nějaké obdoby botulotoxinů, které nejenže vydrží krátkodobý var, ale jsou i odolné vůči trávení. Oligopeptidy těchto vlastností již řadíme k mykotoxinům.

Mykotoxiny proto představují toxické látky nebílkovinné povahy. Nepočítáme mezi ně toxiny velkých hub, přestože některé z nich jsou mykotoxinům podobné (např. toxiny *Amanita phalloides* se podobají cyclochlorotinu).

Uvedené uspořádání odpovídá situaci, jaká se po objevení mykotoxinů vytvořila. Zatímco toxiny velkých hub jsou tradičně sledovány toxikology (popř. soudními toxikology), toxiny bílkovinné povahy bakteriology (jsou na jejich studium metodicky i technicky vybavení), byly od počátku 60. let sledovány nově objevení mykotoxiny především pracovištěmi, zaměřenými na hygienu či toxikologii výživy a krmiv. Z tohoto historického důvodu je oddělení mykotoxinů od ostatních podobných látek poněkud nelogické. Mykotoxiny rovněž rozlišujeme od patotoxinů (vyvolávají onemocnění rostlin), antibiotik (působí na bakterie) a toxinů, působících vůči bezobratlým živočichům. Látky, které působí na uvedené skupiny organismů a vedle toho ještě na člověka a hospodářská zvířata, označujeme však jednoznačně jako mykotoxiny. Minimálně v jednom případě jde hranice vymezení mykotoxinů uvnitř jedné látky. Jde o griseofulvin, který je využíván rovněž jako antibiotikum. (Podává se celkově při některých povrchových mykózách, např. nehtů.) Tato látka má řadu negativních vedlejších účinků (proto jí také nelze léčit každého a za všech okolností) a v potravinách je nežádoucí. Jsou známy i úhyny dobytka, krmeného siláží, zaplísněnou produkujícím kmenem *Penicillium griseofulvum*.

O problému vymezení mykotoxinů bylo jednáno obcí československých mykologů a hygieniků na odborném semináři ČSVSM v Praze, roku 1983, kdy byla konsensem přijata následující definice (již jsem pouze nepatně stylisticky upravil):

Mykotoxiny jsou toxické látky mikroskopických hub nebílkovinné povahy, toxické vůči člověku a (nebo) hospodářským zvířatům a k expozici jimi dochází proti vůli a zájmům člověka.

8 Počet mykotoxinů

Naprosto stejné problémy jsou spojeny se stanovením celkového počtu mykotoxinů. Jde nejen o to, že jsou mykotoxiny na jedné straně nově objevovány, a na straně druhé jsou pak nově objevené mykotoxiny po stanovení chemické struktury ztotožňovány s již známými. Jde rovněž o vymezení mykotoxinů vůči metabolitům v produkujících organismech a v organismech, do nichž pronikly.

Každá produkční plíseň vytváří mykotoxin cestou řady meziproduktů. Ty zpravidla nemají praktický význam a jsou označovány jako menší metabolity (minor metabolites). U některých aberantních kmenů však může některý z těchto metabolitů přestat dále přeměňovat díky metabolickému bloku na některém enzymatickém systému a stát se metabolitem hlavním.

Mykotoxiny jsou dále přeměňovány po vstupu do živočišného (a v některých případech i do rostlinného) organismu. Často vzniká velké množství metabolitů.

V obou uvedených případech chybí jednoznačná hranice mezi mykotoxinem jako takovým a jeho metabolity, které již nemusíme považovat za samostatné mykotoxiny. Situaci komplikují i některé aberantní kmeny, produkující nejen prekursory či vedlejší metabolity jako svůj hlavní toxin, ale i ty, které jsou s to produkovat takové deriváty základního mykotoxinu, které byly v době svého objevu považovány za typické produkty živočišného metabolismu mykotoxinů. Jako nejvýznamnější příklad lze zmínit aflatoxin M_1, objevený jako metabolit aflatoxinu B_1, přecházející do mléka. Toxikologickému ústavu VŠV Brno (nyní VFU) se podařilo zachytit kmen *Aspergillus flavus*, který tento derivát aflatoxinu produkoval. Produkce byla natolik vysoká, že kmen posloužil k přípravě tohoto aflatoxinu pro tvorbu setů na jeho stanovení RIA metodou [19] [74] 85).

Zajímavý je i případ baccharinoidů, což jsou toxiny rostlin rodu *Baccharis*, rostoucích v povodí řeky Orinoko. Uvedené rostliny však toxiny neprodukují. Základní materiál (trichothecenové mykotoxiny) získávají od plísní, rostoucích v okolní bažinaté půdě. Ten ve svém metabolismu pouze upravují do výsledné podoby baccharinoidů [50]. Je zajímavé, že dobytek nerozeznává tyto rostliny jako jedovaté a na pastvě se jimi může až fatálně otrávit. Podobně patrně přichází ke svým toxinům i pro nás méně exotická rostlina *Pteridium aquilinum*, Hasivka orličí, rostoucí i na našem území v podhorských a horských polohách. Také tato kapradina je ochotně spásána a požírána (i jako součást sena) dobytkem, který se jí otráví [76].

Uvedené nejasné a hraniční případy učiní zákonitě počet započtených mykotoxinů silně závislým na subjektivním názoru autora takovéhoto přehledu.

Z uvedených důvodů lze považovat za rozumný odhad počtu reálně existujících myko-

Skupina	Příklady
Furanofurany	aflatoxiny, sterigmatocystin, versicolorin, aj.
Substituované pyreny a hydroxypyreny	kyselina koji, sekalonové kyseliny aj.
Substituované chinony	luteoskyrin, rubratoxin, xanthomegnin, viridicatumtoxin aj.
Nenasycené laktony	patulin, kyselina penicillová, kyselina mykofenolová, alternariol, citreoviridin, ochratoxiny, rubratoxin B, 4,5,8-trimetylpsoralen aj.
Griseofulviny	griseofulvin
Epoxytrichotheceny	T-2 toxin, diacetoxyscirpenol, vomitoxin (=deoxynivalenol), nivalenol, fusarenony, verrucariny, roridiny, satratoxiny aj.
Polycyklické substituované indolové deriváty	kyselina cyklopiazonová, paspaliny, penitremy aj.
Cyklické dipeptidy	gliotoxin, sporidesminy, roquefortin, fumitremorgen, verruculogeny, brevianamidy aj.
Mykotoxiny jiné struktury	zearalenon, curvularin, citrinin, PR-toxin, canthecellin, moniliformin, kyselina betanitropropionová aj.

Tabulka 2: Chemické dělení mykotoxinů podle [66] a [67]

toxinů hodnotu blízkou pěti stům.

Některé mykotoxiny mají i význam diagnostický (z hlediska determinace produkující plísně). Taxonomií některých skupin mikroskopických hub se u nás zabývá především Veselý a spol. [92], jejímu většímu rozšíření do rutinní praxe brání především to, že většina taxonomicky orientovaných pracovišť není zavedena na detekci produkce mykotoxinů.

Onemocnění člověka a hospodářských zvířat, vyvolaná mykotoxiny, se nazývají mykotoxikózy. Je jich značný počet. Můžeme si je rozdělit toho, nakolik jsou prokázány mykotoxiny jako etiologický činitel.

9 Rozdělení mykotoxinů

Mykotoxiny lze rozdělit podle velkého množství kritérií. Žádné z dosud používaných však nelze považovat za univerzálně použitelné. Nejjednodušší je rozdělení podle chemické struktury. Jeho výhodou je poměrně snadné a jednoznačné zařazení jakékoli látky o známé chemické struktuře.

Z hlediska toxikologické praxe má značný význam dělení podle toxicity, popř. vyčlenění mykotoxinů genotoxických a karcinogenních.V na konci 70. let se objevuje i třídění podle způsobu biosyntézy [89] [91]. Jeho výhodou je velice dobré postižení vztahu k produkují-

Biosyntéza moniliforminu	moniliformin (z kyseliny octové)
Biosyntéza z polyketidů	patulin, ochratoxin, emodin, kyselina sekalonová, aflatoxiny aj.
Biosyntéza z isoprenoidů	trichotheceny, roquefortiny aj.
Biosyntéza z aminokyselin	kyselina cyklopiazonová, cyklické dipeptidy aj.

Tabulka 3: Dělení mykotoxinů podle způsobu biosyntézy [89] [91]

Silně toxické	aflatoxiny, patulin, luteoskyrin, sporidesminy, ochratoxin A, cyklochlorotin (= islandotoxin), zearalenon (F-2 toxin), T-2 toxin, DAS (diacetoxyscirpenol), citreoviridin, rubratoxiny, penitrem A (nejnižší LD_50 ze známých mykotoxinů)
Středně toxické	citrinin, kyselina penicillová, sterigmatocystin, kyselina cyklopiazonová
Slabě toxické	griseofulvin, kyselina koji, trihothecin, kyselina mykofenolová, chaetomin

Tabulka 4: Dělení mykotoxinů podle toxicity - kvantitativní [67] [89]

címu organismu a do určité míry respektuje i vztahy dané chemickou strukturou.

Nejtoxičtější mykotoxiny mají LD_50 pro běžná laboratorní zvířata blízkou KCN (tj. cca 1 $mg.kg^{-1}$ tělesné hmotnosti) [91]. Této hodnotě se blíží např. penitrem A. Většina důležitých mykotoxinů má LD_50 asi desetinásobnou. Existuje ovšem možnost vysoké toxicity vůči organismům v určité fázi vývoje (např. toxicita aflatoxinu B_1 vůči savčím a ptačím mláďatům bývá i více než desetinásobná proti toxicitě vůči dospělcům), jiné jsou s to vyvolat v dávkách netoxických pro dospělé úhyn a resorpci plodu. Toxicita pro člověka je ovšem pouhým odhadem podle toxicity vůči různým živočichům a dalším biologickým objektům. Karcinogenní účinky se zpravidla projevují již při dávkách, které nemají jiné pozorovatelné účinky. U některých látek je nutné zohledňovat i chronické nekarcinogenní účinky. Na základě extrapolací je poté stanovována tolerovatelná denní dávka, tj. taková, která by ani při dlouhodobém příjmu neměla vyvolávat negativní účinky.

Uvedené rozdělení má některé nevýhody. Již na poměrně malém výběru v tab. 4 lze najít toxiny rovnocenně zařazené do více skupin (trichotheceny mají účinky dermotoxické, neurotoxické i vůči zažívacímu traktu). V podobných případech bývá toxin často zařazen podle historického aspektu - které účinky byly objeveny jako první a více se vžily.

Hepatotoxiny	aflatoxiny, sporidesminy, luteoskyrin, sterigmatocystin aj.
Nefrotoxiny	ochratoxin A, citrinin aj.
Toxiny zažívacího traktu	T-2 toxin další trichotheceny
Neurotoxiny a myotoxiny	tremorgeny (např. penitrem A), citreoviridin
Dermotoxiny	verrucariny, psoraleny, sporidesminy, trichotheceny aj.
Toxiny dýchacího traktu	patulin
Genitotoxiny	zearalenony
Imunotoxiny	aflatoxiny, ochratoxin A, trichotheceny aj.
Toxiny nezařaditelné nebo	málo prozkoumané

Tabulka 5: Dělení mykotoxinů podle toxicity - kvalitativní *Austvickovo schéma z roku 1976 bylo z praktických důvodů doplněno o poslední dvě skupiny* [67]. *V jiných obdobných schématech bývají spojovány neuro- myo- a genitotoxiny do jedné skupiny - toxinů narušujících přenos informací v organismu.*

Inhibitory tvorby energie	citreoviridin, luteoskyrin, xanthomegnin, kyselina sekalonová D, moniliformin
Inhibitory proteosyntézy	trichotheceny, ochratoxin A
Modifikátory cytoskeletu	griseofulvin, cytochalasiny, cyclochlorotin
Estrogenní mykotoxiny	zearalenon
Tremorgeny	penitremy (A B C), fumitremorginy (A a B), verruculogeny
Karcinogenní mykotoxiny	aflatoxin B_1

Tabulka 6: Rozdělení podle účinku na buňku. *Řadu mykotoxinů do tohoto schematu dosud nedovedeme zařadit* [89].

10 Detoxikace mykotoxinů

Mykotoxiny se zpravidla vyznačují značnou odolností vůči vlivům prostředí. Ve velkém se vlastně provádí pouze detoxikace u aflatoxinů. Nejčastěji se užívá promývání substrátů kapalným čpavkem, jsou známy i pokusy o detoxikaci pomocí kyseliny octové. Laboratorní sklo se dekontaminuje lázní s louhem a chlornanem sodným. Touto lázní lze ošetřit i potřísněné povrchy. Hladké bezprašné povrchy lze též ozařovat UV lampou (má spíše podpůrný a doplňující účinek). Rukavice, jednorázový materiál, sanitární materiál, zbytky vzorků apod. likvidujeme spálením.

V některých případech mykotoxiny nepřecházejí do finálního výrobku (u obilí např. do škrobu a do lihu) a kontaminované šarže potraviny je nutno přednostně určit právě pro takové výroby. V minulých letech se velice často používalo ředění kontaminované potraviny nezávadnou, aby koncentrace mykotoxinů klesla pod stanovený limit. Takovéto opatření by mělo být tolerováno jen v krajním případě, protože jednak limity nemají charakter NPK, jednak u karcinogenů (tedy i karcinogenních mykotoxinů) je výskyt nádorů v populaci závislý na celkovém množství karcinogenu požitého populací, nikoli na jeho koncentraci (podobně jako u nádorů vyvolaných ionizujícím zářením).

Domácká dekontaminace potravin je prakticky neproveditelná, cena jejich analytického zkoušení zpravidla mnohonásobně přesahuje cenu zplesnivělé potraviny, po důkladném testování (zpravidla 50 - 100g vzorku na 1 test) také mnoho nezbude. Proto je nejlepší napadenou potravinu bez lítosti vyhodit. Někdy prováděné okrájení má význam jedině u málo a čerstvě napadených pevných potravin (jedna dvě kolonie, ne starší tří dnů), protože mykotoxiny substrátem rychle difundují a v některých substrátech (např. chléb) může být i v hloubce makroskopicky neviditelné mycelium, které však může produkovat mykotoxiny. U kapalných a rosolovitých substrátů (kompoty, džemy, marmelády apod.) je situace ještě jednoznačnější, zde v úvahu padající mykotoxiny (zejména patulin a kyselina penicillová) velice rychle difundují, takže jejich koncentrace je v celém objemu napadeného balení prakticky stejná. Napadené potraviny by měly být rovněž znehodnoceny tak, aby nedošlo k jejich následné konzumaci lidmi, vybírajícími odpad z kontejnerů či ke zkrmení hospodářským zvířatům.

11 Ekologická úloha mykotoxinů

Úloha mykotoxinů v ekologii mikroskopických hub není dosud zcela jasná. Předpokládá se všeobecně, že za určitých okolností je jejich produkce pro daný kmen houby výhodná (dává se do souvislosti s antibiotickou a antifungální aktivitou některých mykotoxinů). Zvláštní otázkou je potom úloha aflatoxinů v parasexuálních procesech.

Uvedené zvýhodnění toxinogenních kmenů platí patrně pouze za zvláštních podmínek. V kulturách se běžně stává, že houby svou mykotoxinogenitu postupně nebo i náhlým skokem ztrácejí. Rovněž je známo, že při současném pěstování toxinogenního a netoxinogenního kmene stačí relativně nízká příměs spor netoxinogenního kmene v kultuře, aby produkce mykotoxinů dramaticky poklesla.

Sami lidé vytvářejí, zejména při velkovýrobě potravin a krmiv, ekologické niky, v nichž se mohou mikroskopické houby dobře množit, a na něž se postupně adaptují. Další podobnou ekologickou niku představují lidé oslabení, dlouhodobě udržovaní při životě pomocí léků a dalších podpůrných prostředků. Existuje určité riziko, že i zde dojde k adaptaci, po jejímž ukončení vzniknou kmeny mikroskopických hub schopné invaze i do imunitně bezvadného lidského organismu.

Mykotoxiny se v takovýchto případech mohou vyskytovat jako faktory patogenity. Je známo, že xanthomegnin a příbuzné toxiny jsou mj. faktory patogenity dermatofyt (kožních plísní). Rovněž je popsán aspergilom, vyvolaný toxinogenním kmenem *A. parasiticus*, v jehož stěnách došlo k maligní přeměně plicních buněk a vzniku karcinomu plic [14].

12 Přehled nejdůležitějších mykotoxinů

12.1 Aflatoxiny

Aflatoxiny jsou skupina příbuzných látek, jejichž objev byl počátkem novodobého mykotoxinového boomu. Aflatoxin B_1 je nejsilnější dosud známý přírodní karcinogen. Za základní považujeme aflatoxiny B_1, B_2, G_1, a G_2. Aflatoxiny dalších řad (M, P, H, Q aj.) byly nejprve zjištěny jako metabolity předchozích v organismu lidí a zvířat, popř. ve tkáňových kulturách. Později byli ovšem nalezeni a vyselektováni producenti některých uvedených mykotoxinů, což mělo značný význam z hlediska jejich ceny a dostupnosti. Důležitý je též derivát aflatoxinů aflatoxikol, který v krvi koluje vázán na albuminy. Některé z z přírodních aflatoxinů se na něj různými biochemickými pochody přeměňují a aflatoxikol sám je schopen přeměny na aflatoxin $B_1$2,3-epoxid, který se váže na DNA a RNA, což je biochemickým podkladem jeho účinků na proteosyntézu a přenos dědičné informace.

V krvi intoxikovaných lze rovněž nalézt glukuronidy a další konjugáty aflatoxinů, což snižuje jejich analytickou dostupnost. Klasické metody (HPLC, TLC apod.) lze aplikovat jen po opracování biologického vzorku glukuronidázou. U RIA a ELISA záleží na tom, vůči které části aflatoxinové molekuly reagují použité protilátky, (tj. jak byl vytvořen hapten použitý pro imunizaci).

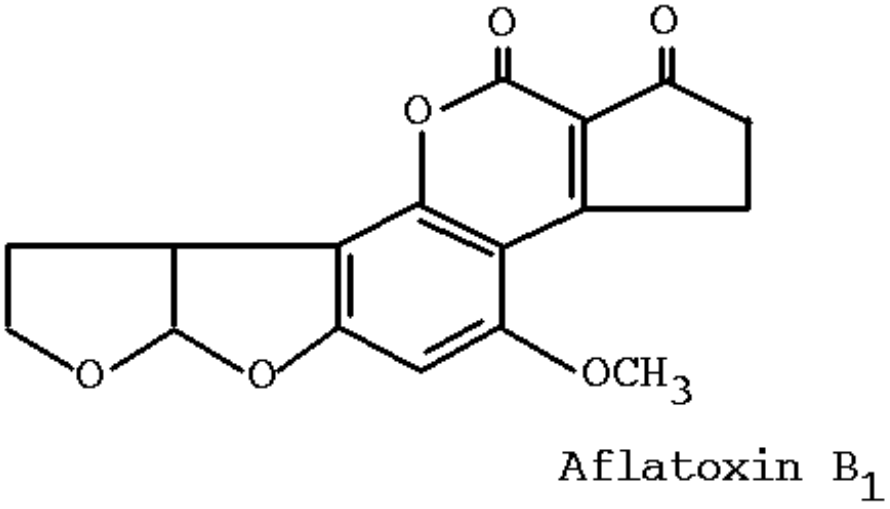
Přes veškeré potíže s výzkumem patří aflatoxiny k nejlépe prozkoumaným karcinogenům a jsou často užívány jako modelový karcinogen, což je patrně jejich jediný pozitivní význam.

Aflatoxiny jsou produkovány téměř výlučně kmeny *Aspergillus flavus*, *A. parasiticus* a *A.nomius*. Produkce aflatoxinů silně závisí na teplotě, vlhkosti, přístupu vzduchu, struktuře a chemickém složení substrátu. Důležité jsou i vlivy doprovodné mikroflóry (např. inhibice tvorby aflatoxinů vlivem *Aspergillus sk. niger*). Existují látky, které jsou s to biosyntézu aflatoxinů do určité míry blokovat (např. kofein), jiné (některé mikroelementy do určité koncentrace a některá organická rozpouštědla) naopak jejich produkci zvyšují [15] [17]. Naše znalosti o významu produkce mykotoxinů a o mechanismech, jakými populace mikroskopických hub nabývá nebo ztrácí schopnost je produkovat, však nejsou valné. Pouze právě u aflatoxinů víme, že jde o velice degenerované vřeckaté houby, nevytvářející pohlavní stadium. Mutace pomocí produkovaného aflatoxinu a následná selekce jsou procesem, který uvedeným druhům spolu s tzv. parasexuálními jevy nahrazuje sexuální proces jako takový.

Aflatoxiny jsou s to vyvolat u člověka Reyův syndrom, zánět jater, primární hepatom, kwashiorkor a stavy útlumu imunity.

12.1.1 Aflatoxiny v prostředí

Vedle příjmu potravinami je důležitý i příjem aflatoxinů související s profesionálním rizikem. Relativně nejmenší význam mají z tohoto hlediska laboratoře, rutinně testující přítomnost aflatoxinů v potravinách a dalších komoditách. Většinou pracují s malými objemy vysoce ředěných roztoků, při manipulaci s nimi i s podezřelými vzorky používají předepsané ochranné pomůcky.



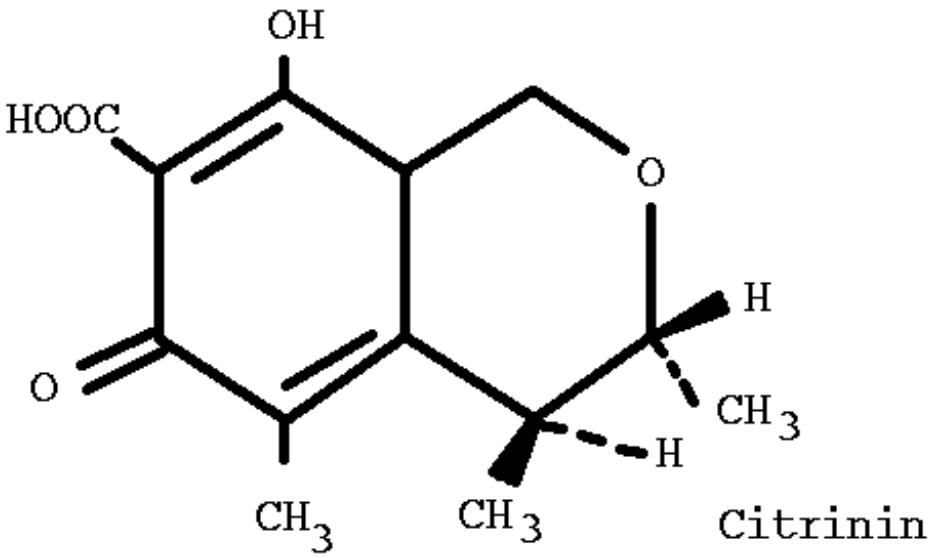
Obrázek 1: Aflatoxin B_1

Problém u nás představuje výroba krmiv a manipulace s nimi. V tomto materiálu se často vyskytují aflatoxiny, které mohou pronikat z prachu do organismu inhalační cestou i vstřebáním pokožkou. Problém je o to závažnější, že v prachu bývá podstatně vyšší koncentrace aflatoxinů než v samotném substrátu (složky, napadené mikroskopickými houbami, se přednostně drolí). Prokázali jsme výskyt aflatoxinů v krvi a moči na konci směny u pracovníků výroben krmných směsí, paralelně jsme prokázali i výskyt aflatoxinů a dalších mykotoxinů v samotném prachu. Též byl prokázán i výskyt aflatoxinů v prachu ve stájích zemědělského družstva [30] [31] [73].

Závěrem je nutno zdůraznit, že většina problémů s aflatoxiny u nás souvisí především s dovezenými potravinami, krmivy a surovinami. Při zajištění dostatečného filtru na hranicích a kvalitního uskladnění surovin, potenciálně obsahujících toxinogenní kmeny mikroskopických hub, by většina problémů s aflatoxiny přestala existovat. Určitým problémem s tím spojeným je nová „protiteroristická“ legislativa, která v podstatnou měrou omezuje dostupnost vyšetření potravin, krmiv i surovin na přítomnost aflatoxinů.

12.2 Citrinin

Je produkován některými druhy rodu *Penicillium* a snad i *Aspergillus*. Původně byl objeven a používán jako antibiotikum, ale pro značnou toxicitu (je nefrotoxický) byl z tohoto použití vyřazen. Může se vyskytovat společně s ochratoxinem a snad jde i o jeho prekursor. Po



Obrázek 2: Citrinin

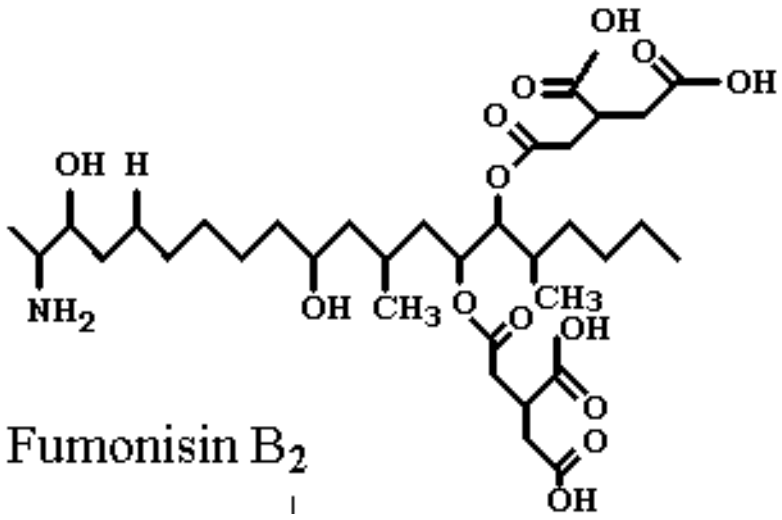
vyvolání metabolických bloků lze u kmenů produkujících ochratoxin zaznamenat pokles této produkce a objevení produkce citrininu. Může se vyskytovat i ve „žluté rýži“, ale v našich podmínkách je zejména kontaminantou obilí [91].

Patří mezi kyselé mykotoxiny, za alkalické reakce přechází do vodného roztoku, ale silně alkalické prostředí vede k jeho rozkladu. Je dobře stanovitelný vzhledem ke zbarvení ve viditelném světle a intenzívní žluté fluorescenci pod ultrafialovým světlem (365 nm). K jeho mikrobiologickému stanovení lze využít i jeho antibakteriální účinky [81].

12.3 Cyclochlorotin

(=islanditoxin)

Starší název byl odvozen od *Penicillium islandicum*, novější od struktury molekuly, kde jsou aminokyseliny uspořádané do kruhu a atom chloru. Mykotoxin atakuje cytoskelet, podobně jako chemicky podobné toxiny *Amanita phalloides*. Celkově se posuzuje jako hepatotoxin, má snad vztah i ke karcinomu jater v zemích s hojným konzumem rýže. U nás bývá nalézán v rýži, z tohoto substrátu lze vypěstovat i silně produkující kmeny [64].



Obrázek 3: Fumonisin B_2

12.4 Fumonisiny

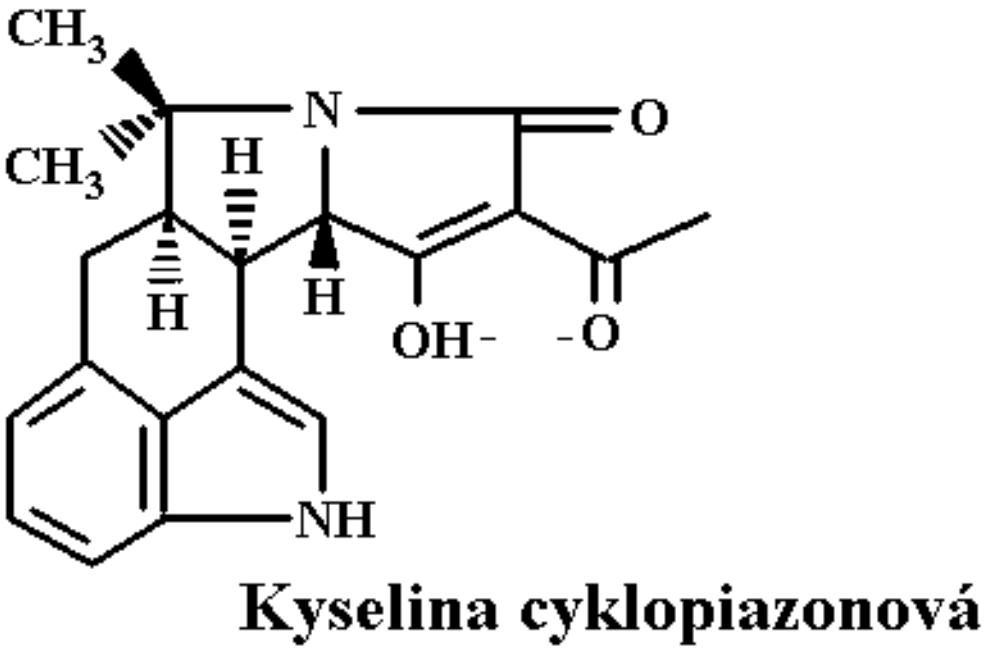
Jde o skupinu látek (fumonisin A_1, A_2, B_1 - B_4; nejčastěji je nalézán fumonisin B_1), odvozených od nenasycených mastných kyselin. Jsou produkovány některými druhy mikroskopických hub rodu *Fusarium* a patrně i dalšími mikroskopickými houbami. Vyvolávají několik typů onemocnění hospodářských zvířat, přičemž nejznámější je leukoencephalomalacie koní a zhoubné nádory u laboratorních potkanů.

Biochemickou podstatou jejich toxických účinků je interference s metabolismem sfingolipidů a tím patrně narušení membránových struktur. Na rozdíl od mnoha jiných mykotoxinů jsou lépe rozpustné ve vodě než v málo polárních rozpouštědlech. V experimentu vyvolávají u některých zvířat zhoubné nádory. U člověka existují epidemiologické souvislosti s výskytem karcinomu jícnu. V našich podmínkách je patrně hlavním zdrojem této skupiny mykotoxinů v lidské výživě kukuřice včetně výrobků z ní (tč. je tento problém studován ve Státním zdravotním ústavu, Centru hygieny potravinových řetězců v Brně). Stanovení fumonisinů se provádí metodou HPLC a imunochemickými metodami. Tyto mykotoxiny jsou nestabilní v roztoku metanolu [54].

12.5 Kyselina cyklopiazonová

Je produkována větším množstvím druhů rodů *Aspergillus* a *Penicillium*. Byla objevena v roce 1968. Paralelně bývají v substrátu přítomny i další příbuzné sloučeniny, amidy a iminy kyseliny cyklopiazonové a její chelát s Fe^{3+}, popsaný samostatně na začátku 70. let jako flavutoxin. Jde o indolovou sloučeninu, barevně reagující s Ehrlichovým činidlem, což lze použít i pro její stanovení [12].

Při způsobu podání obcházejícím jaterní bariéru byly pozorovány u běžných hospodářských a laboratorních zvířat (savců) křeče a úhyn s cyanózou. Byly popsány zejména



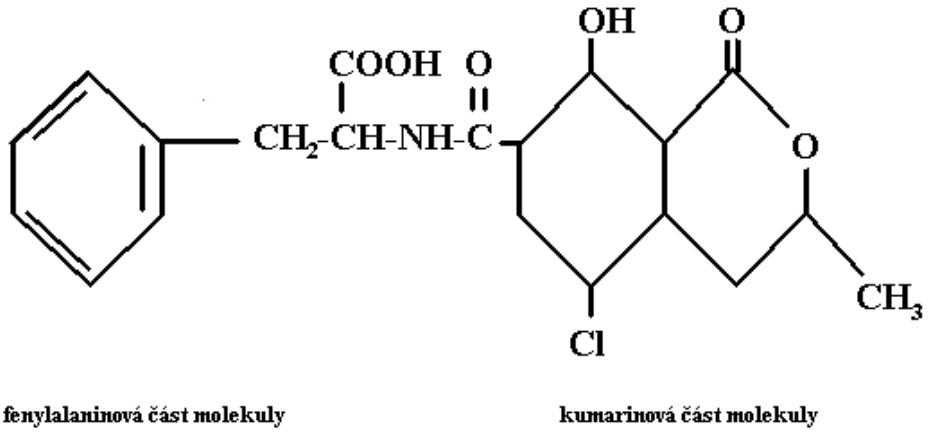
Obrázek 4: Kyselina cyklopiazonová

změny v transportu iontů vápníku, vedoucí k osmotické smrti buněk. Při podání per os dochází především k postižení trávicí trubice (druhová specifita místa postižení je dána místem jejího největšího vstřebávání) a jater. V současné době se uvažuje o účasti kyseliny cyklopiazonové při turkey-X disease, vedoucí k objevu aflatoxinů, nelze vyloučit její účast i na kojeneckých a novorozeneckých Rey-ových syndromech [55].

V menším množství se mykotoxin pravidelně vyskytuje v plísňových sýrech pod pokryvem *Penicillium camemberti*, vyskytuje se i v tavených sýrech (sem se dostává s plesnivými odkrojky), plísňových salámech apod. Nedodržení klasické technologie camembertských sýrů může vést k mohutnému (až o tři řády) vzestupu její koncentrace v plísňovém pokryvu. Dalším uvažovaným zdrojem je drůbeží maso (rezidua vzniklá příjmem kyseliny cyklopiazonové krmivem) [55] [85].

12.6 Kyselina penicillová

Jde o látku chemicky příbuznou patulinu. Její biologické účinky jsou podobné (včetně karcinogenity) a často se vyskytuje za podobných podmínek jako patulin (někdy i společně). Její význam je proti patulinu poněkud menší [91].



Ochratoxin A

Obrázek 5: Ochratoxin A

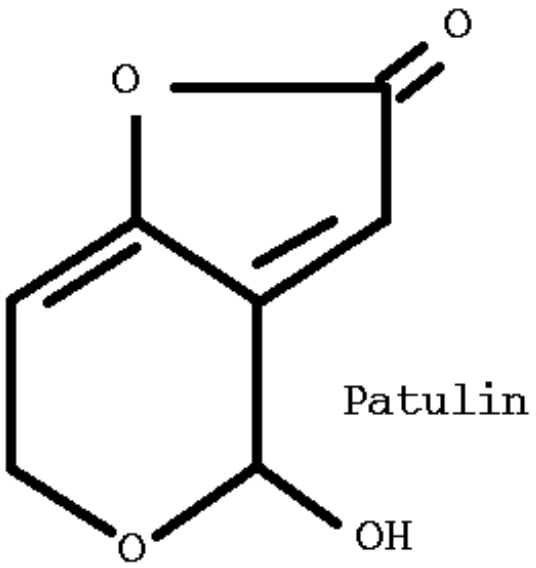
12.7 Ochratoxin A

Ochratoxin A je ze skupiny ochratoxinů nejdůležitější a nejtoxičtější.

Je produkován některými druhy rodů *Aspergillus* a *Penicillium*. Mechanismus jeho toxicity spočívá v tom, že fenylalaninová část jeho molekuly je t-RNA zaměněna za fenylalanin. Ten je však v ochratoxinu A navázán na kumarinovou část, která brání jeho navázání do proteinového řetězce. Tím dojde k zastavení proteosyntézy. Fenylalanin může do určité míry posloužit jako antidotum, protože mezi ním a ochratoxinem A probíhá při vazbě na t-RNA kompetitivní inhibice. V rámci základního výzkumu ochratoxinu A byly připraveny analogy, ve kterých je fenylalanin nahrazen jinou aminokyselinou, jejich toxicita byla srovnatelná [39] [71] [89].

Hlavním účinkem ochratoxinu A na úrovni organismu je útlum imunity a postižení ledvin. Novější práce, zabývající se karcinogenitou ochratoxinu A, prokazují silný efekt promotoru karcinogenního procesu, ale nebyla prokázána schopnost iniciace. Z hlediska praktického přístupu ke kontaminaci potravin ochratoxinem A se tím nic nemění, protože v potravě i prostředí jsme atakování karcinogeny se schopností iniciace z mnoha dalších zdrojů.

Hlavním zdrojem ochratoxinu A je obilí. I naše obilí zpravidla obsahuje detekovatelné ale podlimitní koncentrace. Dalším zdrojem jsou masné výrobky, což je dáno faktem, že ochratoxin A vytváří rezidua ve tkáních. Byla rovněž popsána produkce ochratoxinu A kulturními plísněmi, používanými k finalizaci některých uzenářských výrobku (uherský salám apod). Významným zdrojem ochratoxinu též může být káva. Toto zjištění souvisí s nálezy toxikologicky významných koncentrací ochratoxinu A v lidské krvi v krevních



Obrázek 6: Patulin

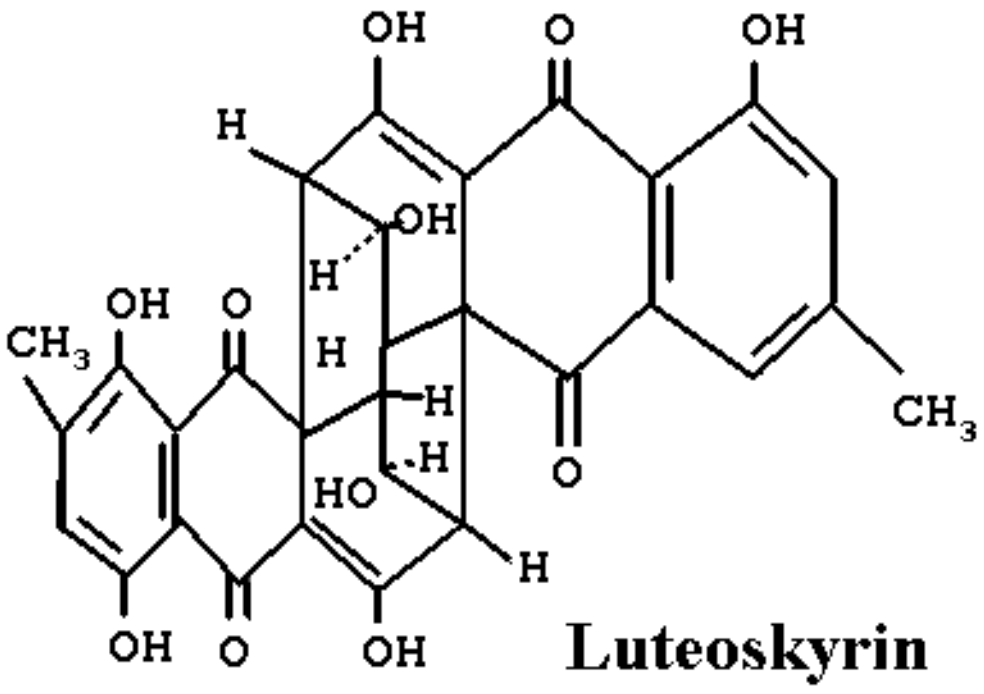
konzervách (Německo, Rakousko, Švýcarsko). Při cíleném pátrání po zdroji byl prokázán právě původ z kávy. U nás je surová káva rozdělena do tří jakostních skupin, I - III. I ochratoxin A zpravidla neobsahuje, II výjimečně a podlimitní koncentrace, III pravidelně a často se vyskytují i nadlimitní koncentrace. Dalším význačným zdrojem ochratoxinu je vepřová krev, v níž je ochratoxin vázán na albumin (domácí zabijačky, krevní speciality) [1].

12.8 Patulin

Patulin byl původně ve 40. letech popsán jako antibiotikum a dokonce po krátký čas léčebně využíván. Po objevení karcinogenity vůči zvířatům byl stažen a dnes je považován za významný mykotoxin.

Je produkován řadou druhů mikroskopických hub rodů *Aspergillus*, *Byssochlamys* a *Penicillium*. (Název je odvozen od *P. patulum*.) V přírodě je poměrně rozšířen, důležitá je zejména jeho produkce na kazícím se ovoci, velice často v jablkách. Jsou rovněž popsány otravy dobytka ze zaplesnivělých siláží [81].

V ovoci se vyskytují ochranné látky (např. vitamín C), které zabrání rozkladu patulinu při tepelném opracování kompotů, dření i moštů (čistý patulin se rozkládá při 80 ^{o}C). Závažnou je zejména kontaminace ovocných dření, určených pro dětskou a kojeneckou výživu. Důležitým faktorem je výrobní praxe, při níž dochází k mechanickému poškozování



Obrázek 7: Luteoskyrin

ovoce a následujícím prodlevám.

Limit patulinu je stanoven z hlediska možné karcinogenity (jde o prokázaný karcinogen pro některá pokusná zvířata; není mutagenní v Amesově testu). Akutní otravy jsou popsány u dobytka, většinou dominuje poškození plic s edémem.

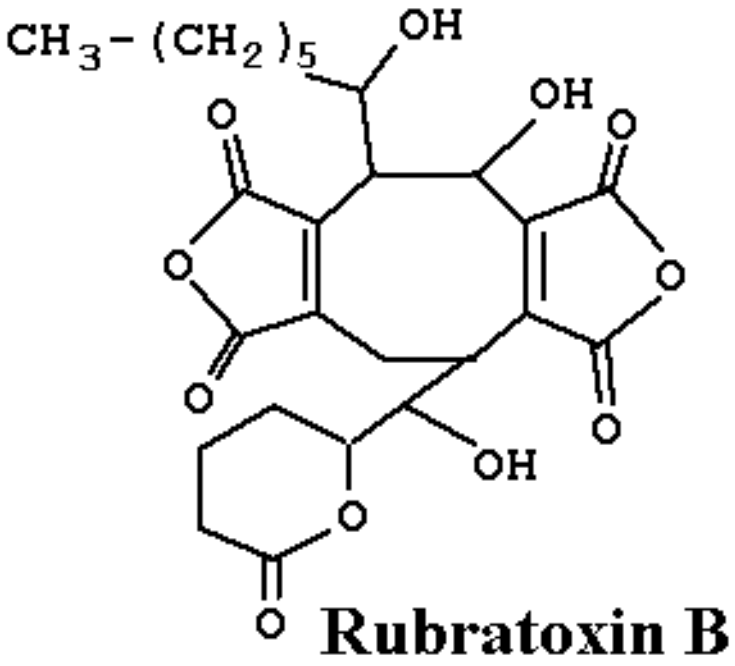
Patulin je jeden z mála dobře detoxikovatelných mykotoxinů. Lze použít např. extrakt z Grahamova chleba, popř. thioglykolát (pozor, je karcinogenní pro člověka). Podstatou detoxikace je reakce patulinu s -SH skupinami. Rovněž byl prokázán rozklad patulinu během alkoholického kvašení [64].

12.9 Luteoskyrin

Je hepatotoxický a karcinogenní. Blokuje v buňkách enzymy oxidativní fosforylace. U nás se může vyskytovat v rýži, zejména takové, která podlehla plesnivění v průběhu transportu [64].

12.10 Rubratoxin

Existují rubratoxin A a rubratoxin B (důležitější). Bývají produkovány *Penicillium rubrum.* Rubratoxin B je hepatonefrotoxický, v akutní otravě má LD_{50} poněkud nižší než aflato-



Obrázek 8: Rubratoxin B

xiny. Je známa přirozená rubratoxikóza prasat. Zpráv o rubratoxinech je málo, u nás se jimi dosud nikdo systematicky nezabýval [66] [91].

12.11 Sterigmatocystin

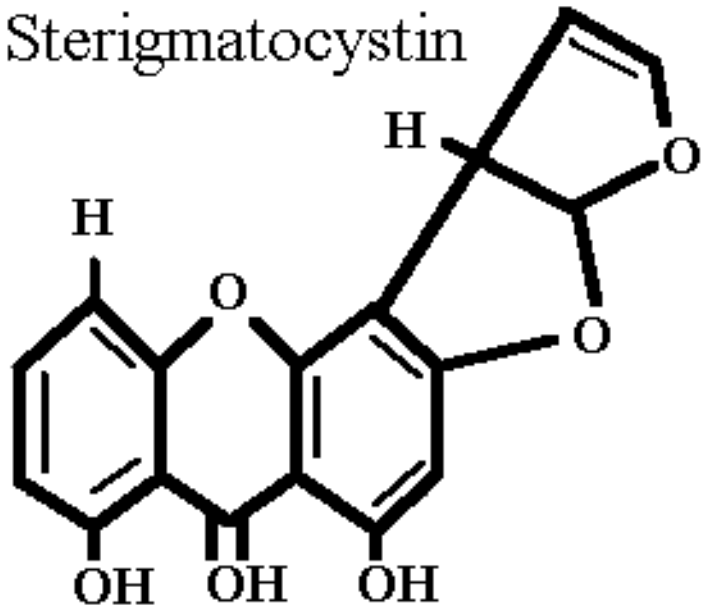
Sterigmatocystin stojí poněkud v pozadí za chemicky příbuznými aflatoxiny. Je produkován širším spektrem druhů *Aspergillus*, *Chaetomium* a *Emericella*, dále druhy *Bipolaris nodulosa*, *Farrovia malayensis* a *Monocillium nordinii*. Je hepatotoxický, jeho karcinogenita je pravděpodobná. U nás byl nalezen v sýrech i dalších substrátech [89].

Zdá se, že část biochemických pochodů, vedoucích ke tvorbě mykotoxinů, mají sterigmatocystin a aflatoxiny společnou. Při uměle zavedených metabolických blocích končí biosyntéza u versicolorinů.

Sterigmatocystin září pod ultrafialovým zářením (365 nm) slabě cihlově, pod krátkovlnným intenzívně žlutě. Po postřiku $AlCl_3$ září i pod UV 360 nm intenzívně žlutě [21].

12.12 Tremorgeny

Tremorgeny jsou chemicky nesourodá skupina mykotoxinů, produkovaných různými druhy mikroskopických hub, především rodů *Aspergillus* a *Penicillium*. Význačnou spojující vlastností těchto látek je skutečnost, že pokusná zvířata po jejich podání hynou za třesů a křečí



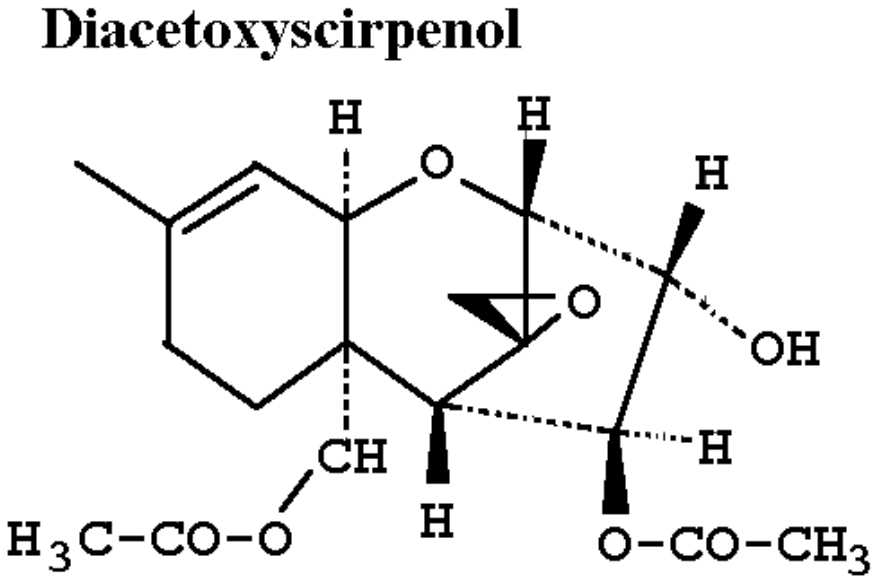
Obrázek 9: Sterigmatocystin

(tremorgenní = doslova „třesotvorné“). Uvedené toxiny tedy atakují nervový systém. Mají poměrně značný letální účinek, podle velikosti LD_{50} patří mezi nejtoxičtější mykotoxiny. Mezi nejdůležitější mykotoxiny patří roquefortiny (pro člověka snad neškodné, ale myši jsou vůči nim vysoce citlivé), citreoviridin, aflatrem, penitremy a další [91]. Do určité míry je možné k nim přiřadit i výše uvedenou kyselinu cyklopiazonovou [12]. Jejich výzkumem se u nás nikdo systematicky nezabývá a i ve světové literatuře jsou práce o nich sporadické.

12.13 Trichotheceny

Trichotheceny tvoří skupinu velice podobných látek, charakterizovaných přítomností tzv. trichothecenového jádra v molekule. V tomto jádře se nalézá epoxidová skupina, která je použitelná pro jejich stanovení. Byly známy už před „mykotoxinovým boomem“ (viz ATA). Připisují se jim rovněž některé starověké a středověké morové rány, Jobovo onemocnění z Bible aj. Z lidských onemocnění vyvolávají ATA a snad se podílejí na kardiomyopatii kobaltového piva a pelagře [45] [62] [75] [89] [90] [91] [99].

Zvláštní skupinu tvoří tzv. makrocyklické trichotheceny, které mají část základní molekuly překlenutou můstkem s vazbou na obou koncích. Tím dochází k překrytí některých funkčních skupina a k potenciaci skupin jiných. Toxicita může vzrůst i o více než jeden řád. typickými zástupci této skupiny jsou satratoxiny, účinné látky *Stachybotrys atra*, a toxiny *Dendrodochium toxicum*. Systematičtěji byly tyto látky studovány v USA a Maďarsku [23] [99]. Další zvláštní skupinou trichothecenů jsou baccharinoidy, které vznikají přeměnou trichothecenových mykotoxinů z půdních mikroskopických hub v organismu cév-



Obrázek 10: Vomitoxin

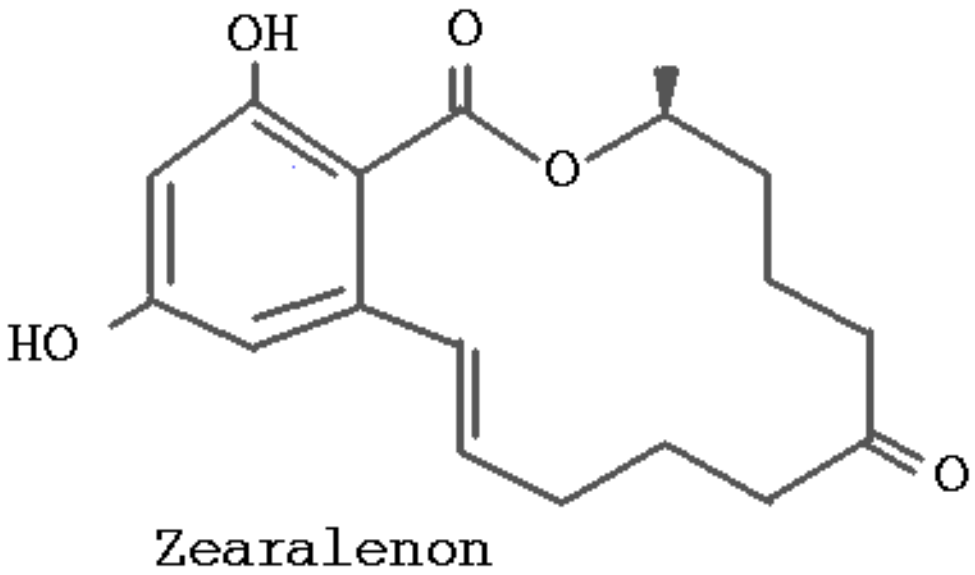
natých rostlin z rodu *Baccharis* (jejich habitus se poněkud podobá rodu *Solidago*). Rostou v povodí Orinoka, hlavní problém s nimi je ten, že je dobytek nerozeznává jako jedovaté. Podobným způsobem vznikají také toxiny naší hasivky orličí [50] [76].

Globální účinky trichothecenů byly popsány u ATA, některé navíc způsobují centrální zvracení. Satratoxiny působí na kůži už ve zlomcích mikrogramu těžké dráždění. Řadou trichothecenů se vedle lékařů a veterinářů zabývají též fytopatologové, protože některé trichotheceny slouží jako faktory patogenity druhů rodu *Fusarium*, napadajících kulturní plodiny [23] [91].

Naše země naštěstí leží mimo oblast výskytu toxinogenních teplomilných i chladnomilných toxinogenních fusarií, takže u nás s nimi bývají citelné problémy jen v teplotně atypických letech.

Ve válkách v jihovýchodní Asii a v Afghanistanu použili SSSR a jeho spojenci tzv. yelow rain, což byl nejspíše hrubý extrakt z kultur fusarií a snad i dalších producentů trichothecenů. Uvedená látka má zpuchýřující účinek podobný yperitu, navíc vyvolává těžké postižení imunity a krvetvorby. Trichotheceny v popředí zájmu i z hlediska jejich radiomimetických účinků (tj. zesilujících následky působení ionizujícím zářením). Po ochránění vlastních vojsk radioprotektivními léky (je známo mnoho látek, všechny je však nutno podat několik hodin předem) a napadení nepřátelských vojsk radiomimetiky by rozdíl v účinku jaderné zbraně na vlastní a nepřátelská vojska mohl být faktorem taktického či strategického významu.

Okolo uvedených údajů se rozpoutala prudká diskuse, jejíž ohlasy přetrvávají v určité míře dodnes. Ještě v roce 1996 vydala Academia učebnici, kde je celá záležitost zpochyb-



Obrázek 11: Zearalenon

ňována [44]. Profesor Mirocha a spolupracovníci [51] i další pracoviště [72] nezávisle trichotheceny ve vzorcích nalezli. Je dost pravděpodobné, že ve „žlutém dešti“ byly přítomny i další toxické látky, vč. makrocyklických trichothecenů [10]. Lze odmítnout představu o přírodním jevu (Rudé právo v této souvislosti uvádělo absurdní teorie o toxickém trusu včel), protože takovéto jevy místní obyvatelé zpravidla znají a dovedou se jim vyhnout.

Kultury toxických mikroskopických hub lze poměrně snadno skrytě zasílat na velké vzdálenosti, výroba účinných hrubých extraktů je (na rozdíl od výroby jaderných či klasických chemických ZHN) snadno utajitelná nejen na vlastním území, ale i v týlu nepřítele. S takovouto eventualitou je nutno počítat a připravit se i na to, že zásobování vojsk a strategických potravinářských výrob a skladů by bylo jedním z možných cílů podobných sabotážních prostředků.

12.14 Zearalenon

Zearalenon je produkován některými plísněmi rodu *Fusarium*, v některých případech i stejnými druhy, které jsou schopny produkovat trichotheceny.

Přestože nemá steroidní strukturu, má účinky steroidních hormonů estrogenů. Rozeznáváme účinky estrogenní, antiestrogenní, antiandrogenní a anabolický, které jsou u jeho derivátů různým způsobem zastoupeny. V organismu se metabolicky aktivuje, asi 5% se vylučuje močí, zbytek stolicí, během laktace asi 40% mlékem [56].

Zearalenon může u lidí i hospodářských zvířat způsobovat hyperestrogenismus [89].

Největší problémy mohou vzniknout u zemědělců - samozásobitelů, kteří v případě napadení obili konzumují vysoké koncentrace. U běžné populace se mykotoxiny z obilí míšením

šarží ředí na velmi nízké koncentrace. Problémy mohou nastat též u konzumace naklíčeného obilí a dalších semen, kdy během klíčení mohou fusaria vyrůst a naprodukovat mykotoxiny (zejména je to problém u vegetariánů a veganů, u nichž tvoří podobné potraviny vyšší procento celkové dávky potravin). Ve světovém písemnictví existují i práce, dokazující přítomnost statistických korelací mezi výskytem zearalenonu a trichothecenů v potravě matek během těhotenství a výskytem některých poruch nervového systému (včetně schizofrenie) v jejich potomstvu. Uvažuje se o podobném vztahu k výskytu mužské homosexuality. Na toto téma byly provedeny i některé pokusy na zvířatech [77].

Některé deriváty zearalenonu mají potlačeny ostatní účinky kromě anabolického a používají se k výkrmu dobytka jako anabolika. Uvedeným látkám se souhrnně říká zearalany. Poslední novinkou v této oblasti jsou implantáty, sycené hormonem, které dávají lepší záruky ochrany zdraví spotřebitele [87].

13 Mykotoxikózy

13.1 Jistá a vyvolávaná pouze mykotoxiny

Mezi choroby uvedených vlastností patří jen ergotismus, akutní kardiální beri-beri a alimentární toxická aleukie.

13.1.1 Ergotismus

Jde o onemocnění, známé ve Starém světě od pradávna. Příčina, nákaza obilí (hlavně žita) *Claviceps purpurea*, byla rozpoznána v minulém století. Od té doby se v Evropě vyskytují pouze náhodné otravy. Prakticky ve všech evropských zemích je zaveden státní výkup obilí, které se mj. také zbavuje námelových sklerocií. Při poslední větší epidemii v r. 1954 byl postižen pouze dobytek. Častěji se vyskytuje v rozvojových zemích (Etiopie). ojedinělé případy bývají občas referovány ze Severní Afriky.

Za první dokumentovanou epidemii ergotismu je považován některými odborníky tzv Thúkididův mor (jedna z morových epidemií, popsaná antickým historikem Thúkididem). Lesný považuje tuto epidemii za některou z hemorrhagických horeček (podobnou nedávno se znovu vynořivší Ebole [41]). Proti jeho koncepci lze namítnout především to, že tyto horečky jsou velice úzce vázány na prostředí tropického deštného pralesa. Navíc, pokud by se dokázala šířit i mimo toto prostředí, by patrně její působení nezůstalo omezeno na celkem přesně definovanou oblast Atiky, což se právě v tomto případě stalo.

V současné době u nás touto chorobou občas onemocní menší děti, pokud nebyly řádně poučeny rodiči a učiteli a ochutnají ze zvědavosti podívná „zrna“, trčící nápadně z žitných klasů. Námelová sklerocia mají údajně vcelku příjemnou houbovou, na konci trochu palčivou, chuť, takže je děti požijí. Naštěstí se většinu takovýchto případů podaří zachránit.

Na našem pracovišti jsme mj. zpracovali metodu zdravotní výchovy školních dětí jako prevenci požití jedovatých rostlin a hub [53].

Onemocnění způsobují alkaloidy, nacházející se ve sklerociích houby. Tyto látky jsou zároveň důležitou surovinou pro farmaceutický průmysl.

Otrava má dvě formy: vaskulární a psychotropní.

U vaskulární formy dominují spasmy drobných cév, vyvolávající při opakovaném působení toxinů a po větších dávkách odumření akrálních částí těla (ušní boltce, nos, brady, rty, prsty apod.). Ve středověku se onemocnění nazývalo „nemoc sv. Antonína“ a byl dokonce založen zvláštní mnišský řád sv. Antonína, pečující o postižené touto chorobou (popř. následkem toho invalidní). Ve stadiu akutní otravy je známo náhlé přechodné oslepnutí, vyvolané spasmem drobných cév na sítnici.

U psychotropní formy se vyskytují zejména tělové a sluchové halucinace, korespondující s lidovými představami o příznacích očarování. Je pravděpodobné, že v pozadí některých čarodějnických procesů byly epidemie ergotismu, nejlépe je toto dokumentováno u tzv. Salemského čarodějnického případu ze sklonku 17. století (USA, Massachussetts - viz níže) [45] [86].

Tabulka 7: Onemocnění člověka vyvolaná mykotoxiny

- Jistá:
  - ergotismus
  - akutní kardiální beri-beri
  - alimentární toxická aleukie (ATA)
- Multifaktoriální kde je mykotoxin jedním z možných činitelů:
  - toxická hepatitida
  - primární hepatom
  - Reyův syndrom
  - kwashiorkor
  - pulmonální mykotoxikóza
  - hyperestrogenismus
  - karcinom jícnu
- Nejistá či nedostatečně prokázaná:
  - kardiomyopatie „kobaltového piva“
  - Kešanská kardiomyopatie
  - pelagra
  - další nádory
  - balkánská endemická nefropatie
  - onyalai
  - poruchy imunity
- „Tajemné“ jevy jako některé případy čarodějnictví a vampyrismu

Příznaky vaskulárního ergotismu rovněž připomínají známou „červenou smrt“ z povídky E. A. Poea [63]. Vzhledem k tomu, že autor žil v oblasti, kde se hojně pěstovalo žito, obilnina nejčastěji napadaná touto houbou, a za studenějších a vlhčích let zde byly podmínky ke vzplanutí menších epidemií, mohl být v tomto svém díle (jako ostatně i v řadě dalších) inspirován realitou.

13.1.2 Akutní kardiální beri-beri

Toto onemocnění bylo popsáno před r. 1910 a poté za 2. sv. války z bojů britských jednotek s Japonci v jižní Asii. Onemocnění se, stejně jako klasická beri-beri, projevuje křečemi a vzestupnou paralýzou. Na srdci je výrazná porucha rytmu, tzv. Wenckebachovy periody. Onemocnění může skončit úmrtím na zástavu srdce v diastole. Není léčitelné vitamínem B_1.

Wenckebachovy periody představují projev určitého typu poruchy převodu vzruchu ze srdečních síní na srdeční komory. Průchod vzruchu mezi síněmi a komorami zajišťuje Hisův svazek (součást tzv. převodního systému srdečního), za normálních okolností trvá cca 80 ms. Při Wenckebachových periodách se uvedená doba přenosu pravidelně prodlužuje, až dojde k vynechání jednoho stahu komor. Poté následuje za dalším stahem síní stah komor se zhruba normálním časovým odstupem, u dalšího stahu je interval delší, atd. Wenckebachovy periody nejsou ovšem nijak specifické, mohou se objevit při řadě chorob s poškozením myokardu [33] [40].

Vyvolávajícím toxinem akutní kardiální beri-beri je citreoviridin, který je produkován především *Penicillium citreoviride* (*P. citreonigrum*) do rýže. Toxin má jasně žlutou barvu, která je na rýži patrná („žlutá rýže“). Vztah mezi žlutým zabarvením rýže a chorobou byl odborně popsán počátkem našeho století, tehdy v japonštině publikované práce zcela zapadly. Obyvatelstvo oblastí s výskytem „žluté rýže“ ji vystavuje v tenké vrstvě slunečním paprskům, čímž dochází k účinné detoxikaci (citreoviridin je silně fotolabilní). Je to jeden z mála případů, kdy lze levně a jednoduše detoxikovat nějaký mykotoxin [62] [89]

Jiná „žlutá rýže“ je vyvolána přítomností pigmentovaných skyrinů (luteoskyrin apod.), které fotolabilní nejsou a jsou hepatotoxické [67] [89].

13.1.3 Alimentární toxická aleukie (ATA)

ATA se vyskytuje v obilném pásu, táhnoucím se od jihu Sibiře přes Ruskou tabuli až na Balkán. Onemocnění je způsobeno T-2 toxinem a příbuznými trichotheceny, produkovanými především houbami z rodu *Fusarium*. Největší epidemie byly ve 40. letech v tehdejším SSSR, kdy v důsledku válečných událostí zůstalo obilí (hlavně proso) na poli pod sněhem a sklízelo se až zjara. Pod sněhem bylo napadeno chladnomilnými fusariemi (mohou růst a produkovat mykotoxiny až při -4 ^{o}C). V důsledku nedostatku jiné potravy bylo konzumováno a dle oficiálních údajů pomřelo celkem asi 17 000 lidí. Později se onemocnění vyskytlo ještě v 50. a 60. letech a také i v jiných zemích (Maďarsko, Francie). V současné době se sporadicky vyskytuje v rozvojových zemích (např. Alžír) [62] [69].

Onemocnění probíhá ve třech fázích:

- V první dochází k prudkému nástupu příznaků na bráně vstupu. Jde zpravidla o trávicí ústrojí - záněty sliznice, zvracení, průjmy - i krvavé. T-2 toxin však do organismu může proniknout i skrze neporušenou pokožku, jak ukázala studie Maxwella a spol. [48].

- Ve druhé se dostavuje zdánlivá úleva, doprovázená poklesem počtu krevních destiček a bílých krvinek (úbytek červených u těžších případů nastává později).

- Ve třetí fázi jsou nemocní postiženi jednak bakteriálními infekcemi, a to banální a pro normálního člověka neškodnou flórou, jednak krvácením (i vykrvácení žen během měsíčků). Často bývají postiženy krční mandle, proto byla choroba známa i pod synonymem „septická angína“.

Přeživší nemocní se dostávají do několikaměsíčního období rekonvalescence. Při chorobě je důležitý zejména přísun plnohodnotných bílkovin, poněkud kompenzující pokles proteosyntézy, vyvolaný trichotheceny.

Existence toxických látek v napadeném obilí byla při výzkumu ATA prokázána už ve 30. letech [69], ale pregnantní důkaz spojitosti této choroby s T-2 toxinem provedl až v 70. letech Ueno [89] [90].

Mechanismem působení trichothecenů na úrovni buňky jsou různé typy blokády tvorby proteinového řetězce. Může být narušena jak iniciace tak prolongace, popř. terminace. Jsou poškozeny především tkáně s vysokou metabolickou aktivitou a bohatou proteosyntézou. Vedle toho mají tyto toxiny v dostatečné koncentraci také místní, nekrotizující, účinky. Je rovněž narušena hemostáza [8].

Některé (charakteristicky deoxynivalenol, tzv. vomitoxin) ještě na působí na příslušná centra v mozku a vyvolávají nechutenství, nauseu a zvracení [89] [90].

13.2 Jistá, ale s možnou další etiologií

U těchto chorob jsou mykotoxiny pouze jedním z mnoha možných etiologických činitelů.

13.2.1 Toxická hepatitida

Jako téměř každý hepatotoxin mohou aflatoxiny při chronické expozici vyvolávat poškození jater, mající charakter zánětu. Totéž mohou způsobovat i jiné hepatotoxické mykotoxiny, jako např. cyklochlorotin či luteoskyrin. Výskyt tohoto onemocnění je u lidí převážně v rozvojových zemích a v chudých vrstvách, častěji se vyskytuje hepatitida hospodářských zvířat.

13.2.2 Primární hepatom

Karcinogenita aflatoxinů se projevuje především indukcí nádoru, vycházejícího z hepatocytů, funkčních buněk jaterního parenchymu. Nádory jater patří u nás k deseti nejčastějším

usmrcujícím nádorům, u obou pohlaví usmrcují přibližně 3% pacientů se zhoubnými nádory (rutinní statistiky podle lokalizace nádoru). Vedle primárního hepatomu se v této lokalizaci uplatňují i další nádory, nicméně primární hepatom je mezi nimi nejčastější. V roce 1994 [20] bylo v jihomoravském kraji diagnostikováno 119 nových případů nádorů v této lokalizaci. Podle jiných statistik [80] se vyskytuje primární hepatom u cca 1% pitvaných zemřelých. Statistiky rovněž ukazují negativní vývojový trend tohoto tumoru. Jeho incidence (počet nových případů za časovou jednotku) stoupá, klesá věk postižených a klesá počet případů s jaterní cirhózou. Naopak, roste zastoupení žen, v roce 1994 je počet mužů a žen s tímto nádorem v rámci kraje prakticky vyrovnaný - 60 : 59.

Karcinogenita aflatoxinu je rozsáhle prozkoumána, a to od biochemických mechanismů účinku přes biologické modely (tkáňové kultury, pokusná zvířata) až po epidemiologické studie na lidských populacích. Navázaný aflatoxin lze nalézt i ve speciálně zpracovaných histologických preparátech jater postižených osob. Takto byl zpracován materiál i pacientů z ČSSR a byl u nich aflatoxin v játrech nalezen.

Primární hepatom má rovněž vztah k nosičství viru infekční hepatitidy B. Prodělání uvedené choroby zvyšuje riziko karcinomu jater cca dvacetinásobně. Tento virus je nyní považován za jeden z prokázaných lidských onkovirů, ovšem k onkogenezi potřebuje přítomnost karcinogenní látky, což je velice často právě aflatoxin. Je prokázán vznik volných radikálů z aflatoxinu, vážících se na DNK. Je rovněž popsána korelace mezi aflatoxiny v potravě a v lidském séru, je též popsán přechod aflatoxinů skrze placentu do plodu a do mateřského mléka. Nejvyšší hodnoty aflatoxinu v lidském biologickém materiálu bývají nalézány v tropických rozvojových zemích [42] [48] [96] [97] [98] [11].

13.2.3 Aflatoxiny vyvolaný Reyův syndrom

Reyův syndrom je polyetiologický chorobný stav, který lze vyvolat i některými léky (např. Acylpyrin), jedy, virovou infekcí a snad existuje i dědičná dispozice. Bylo prokázáno, že u řady kojenců do 1 roku života (a zejména do 6 měsíců), krmených umělou výživou, je etiologickým faktorem aflatoxin.

V Československu bylo publikováno kolem 100 ověřených případů (aflatoxiny byly nalezeny buď ve tkáních dítěte nebo alespoň v toxikologicky významném množství ve výživě), odhady celkového počtu zpravidla přesahují 300 [13] [80].

Onemocnění se vyznačuje rychlým přechodem do těžkého bezvědomí po horečnatém onemocnění s nespecifickými příznaky, připomínajícími virózu. V komatu se projeví současné těžké postižení jater a mozku, které je i příčinou smrti.

Mechanismus průniku aflatoxinů do sušeného mléka pro kojeneckou výživu dodnes není jasný. Existoval patrně určitý vztah k výrobě, protože po přestěhování výroby v souvislosti s Černobylem (větší postižení nasávací oblasti mlékárny spadem) výskyt prakticky ustal a první nový případ aflatoxinového Reyova syndromu byl publikován v ČR až r. 1994, tedy několik let po jejím setrvání na místě. Inkriminované mléko neobsahovalo viditelná vlákna mycelia a nebylo senzoricky změněné. Produkující kmen (*A. flavus* nebo *A. parasiticus*) z něj masivně vyrůstal. Obsahovalo až několik mg aflatoxinů v balení. Dosud se sušené mléko takových vlastností nepodařilo připravit uměle [65].

Nejasná je také ochrana mléka před produkcí aflatoxinů. Ideální jsou balení na jednu dávku, běžná u světových výrobců. Problematické je i doporučení uchovávat mléko v ledničce (*Aspergillus flavus* sice roste, ale při teplotě pod 13 ^{o}C neprodukuje aflatoxiny). Při tomto postupu dochází ke zvlhnutí mléka a mohou se zde prosadit jiné škodlivé mikroorganismy.

Byly popsány i dva případy vrozeného Reyova syndromu, kdy se dítě s jeho příznaky narodilo a zemřelo do 24 hod poté. V obou případech šlo o matky pracující v živočišné výrobě i ve vysokém stupni těhotenství, u nichž se předpokládá profesionální expozice matky (aflatoxiny v prachu z krmiv) a následná intrauterinní expozice plodu [13].

13.2.4 Kwashiorkor

Kwashiorkor se vyskytuje převážně v rozvojových zemích s výskytem hladomorů. Je původně popsán jako výživová dysbalance, kdy při relativním energetickém dostatku (zajištěném převážně sacharidy) je nedostatek plnohodnotných bílkovin. U postižených je normální nebo jen mírně ztenčená vrstva podkožního tuku, ale současně se vyskytují hladové edémy, vyvolané nedostatkem bílkovin v krvi.

Při výzkumech v Etiopii a dalších zemích byl zjištěn úzký vztah mezi výskytem tohoto onemocnění a příjmem aflatoxinů potravou, zejména u dětí. U nejtěžších, marasmických, forem kwashiorkor byly zjištěny vždy aflatoxiny v potravě i tělních tekutinách (krev, moč) v toxikologicky významném množství. V souvislosti s podobnými výzkumy byly v subsaharských afrických zemích prokázány u části populace aflatoxiny v mateřském mléku, a pupečníkové krvi u novorozenců [24] [26] [62] [9] [22].

13.2.5 Útlum imunity

Blokáda proteosyntézy zastavuje množení rychle proliferujících buněk, kam patří i buňky imunitního systému. Ten je znám z experimentálních aflatoxikóz na zvířatech. U člověka se předpokládá jeho uplatnění v karcinogenesi, tj. aflatoxiny nejsou jen iniciátory, ale také promotory karcinogenese [89].

Zajímavým nálezem je výskyt toxikologicky významných množství aflatoxinů v heroinu, upraveném pro pouliční prodej. Dostává se tam v souvislosti se ředěním původně až 80% preparátu distributory a jeho uchováváním v podmínkách, umožňujících růst plísní a produkci aflatoxinů. Byla vyslovena doměnka, že alespoň část celkové tělesné zchátralosti lze u intravenózních heroinových narkomanů připsat na vrub aflatoxinu [25].

Uvedné údaje jsou mj. dávány do souvislosti s adaptací HIV 1 a HIV 2 na lidskou populaci. Dále se uvažuje o spoluúčasti imunosuprese vyvolané mykotoxiny na etiologii epidemií, vč. pravého moru (u této choroby se navíc předpokládá, že mykotoxiny v obilí mohly být primární příčinou hynutí krys, po němž nastala invaze jejich nakažených blech na lidskou populaci) [46] [59].

U zvířat známe ještě účinek aflatoxinu, který lze označit jako „celkové neprospívání“. Při podávání nízkých dávek, hluboko pod prahem chronické toxicity, lze na velkých počtech zvířat prokázat nižší hmotnostní přírůstky a vyšší nemocnost (např. srovnání dvou

vepřínů). Při stovkových počtech zvířat může rozdíl ve hmotnosti exponovaných a neexponovaných činit až hmotnost několika kusů. U lidské populace lze podobný efekt rovněž předpokládat, exaktní epidemiologická studie, která by ho prokázala, je však patrně metodicky nezvládnutelná [60].

13.2.6 Hyperestrogenismus

Zearalenon s účinky estrogenů v potravě (zejména obilniny a výrobky z nich) může vyvolat hyperestrogenní syndrom. Je znám především u dobytka, kdy jsou popsány záněty rodidel, zmetání a poruchy plodnosti u samců [34] [38] [66] [81] [89] [91] [99]. Existuje spekulativní úvaha, že nízký věk puberty dívek v některých rozvojových zemích může souviset s konzumem tohoto mykotoxinu v potravě. V ČSSR bylo zachyceno několik případů hyperestrogenismu u dětí, kde vektorem bylo maso slepic, konzumované rodinami pracovníků drůbežáren v neobvyklém množství (režijní cena). Zearalenon a příbuzné látky byly prokázány jak v drůbeži, tak i v používaném krmivu [65]. Rovněž je znám případ hyperestrogenismu u několika výzkumných pracovnic, provádějících izolaci zearalenonu v hygienicky nevyhovujících podmínkách (zde však šlo o středoškolačky a vysokoškolačky, znalé účinků, takže není vyloučeno působení či spolupůsobení autosugesce) [49]. Anabolické vlastnosti derivátů zearalenonu, zearalanů, jsou využívány v komerčních výkrmových preparátech [87]. Je nutno podotknout, že boj EU proti používání anabolických preparátů ve výkrmu dobytka na maso je ryze politicko-ekonomickou záležitostí a nemá naprosto žádný vztah k ochraně zdraví spotřebitelů.

13.3 Spekulativní a nedostatečně prokázané

Jde o choroby, kde je účast mykotoxinů některými autory předpokládána nebo vyvozována na základě nepřímých důkazů, avšak jednoznačný důkaz zde chybí.

13.3.1 Kardiomyopatie „kobaltového piva“

Uvedené onemocnění způsobilo v letech 1965 - 1966 v Kanadě sérii případů těžkého onemocnění s četnými úmrtími, projevujícího se jako těžká kardiomyopatie. Byla zjištěna souvislost s pijáctvím piva, u něhož byl obsah Co cca 0.5 $mg.l^{-1}$ v souvislosti s používáním protipěnivých prostředků. Později bylo propočteno, že k otravě s takovými příznaky by bylo množství kobaltu nepostačující. V té době byl zjištěn mnohdy masivní výskyt mykotoxinů ve sladu a onemocnění bylo dáno do souvislosti s tímto problémem [62].

13.3.2 Kešanská kardiomyopatie

Uvedené onemocnění se vyskytuje v čínské provincii Kešan (Keschan) s extrémně nízkým výskytem Se v přírodním pozadí. Vysvětluje se nedostatkem Se v organismu. Vzhledem k tomu, že Se se účastní v těle řady významných detoxikačních pochodů, není vyloučeno, že jde o slabou chronickou intoxikaci některými mykotoxiny (snad trichotheceny), jaká se při normálním přísunu Se neprojeví [62].

13.3.3 Pelagra

„Nemoc tří D“ (dermatitis, diarrhoe, demence), je vysvětlována především jako nedostatek vitamínu PP. V poslední době se objevily poukazy na to, že všechna tři D mohou vyvolat mykotoxiny ze skupiny trichothecenů (vč. psychického postižení). Pro tuto teorii svědčí i nálezy mykotoxinů v oblastech s výskytem pelagry. Konkrétně jsou za vyvolávající či spoluvyvolávající faktor považovány trichotheceny vč. T-2 toxinu z kukuřice, napadené houbami rodu Fusarium [22] [45] [62].

13.3.4 Karcinom jícnu v Transkei

V uvedeném bantustanu se vedle vysoké incidence rakoviny jícnu vyskytuje vysoká konzumace kukuřice s obsahem zearalenonu a diacetoxyscirpenolu. Některá epidemiologická data svědčí pro vzájemnou souvislost, v pracech z přelomu 80. a 90. let jsou v popředí zájmu jako možný etiologický činitel fumonisiny [54].

13.3.5 Další nádory

Jako karcinogenní se projevují zejména aflatoxiny, sterigmatocystin, patulin, kyselina penicillová a luteoskyrin. U ochratoxinu A je uvažována příčinná souvislost s nádory močového ústrojí. Asi deset dalších mykotoxinů je z karcinogenity důvodně podezřelých. Jaké konkrétní tumory jsou s to vyvolat u člověka je s uvedenými výjimkami nejasné.

13.3.6 Balkánská endemická nefropatie

Při přívodu vyšších dávek ochratoxinu A se objevuje postižení ledvin. Je popsána ochratoxikóza prasat, ve které dominuje postižení ledvin. Velice podobnou chorobou je Balkánská endemická nefropatie, vyskytující se především v určitých lokalitách v Chorvatsku a Bulharsku. V téže lokalitě bývají postiženi lidé i prasata. Vztah k ochratoxinu A se předpokládá, existují však i další nefrotoxické mykotoxiny, své zastánce mají i teorie virové a genetické. Rozsáhlý výzkum, prováděný v Chorvatsku, byl též narušen válkou [39] [71].

13.3.7 Onyalai

Zprávy o tomto onemocnění se vyskytují vzácně a spíše jen v souhrnných přehledech. Jedná se o chorobu, poněkud připomínající ATA, vyskytující se v rovníkové Africe. Vazba na období dešťů se zvýšeným rizikem plesnivění potravin napovídá, že plísně a jejich toxiny by mohly být příčinou choroby [62].

13.4 Tajemné a zázračné jevy

Zajímavou kapitolou je možná účast mykotoxinů na některých tzv. „tajemných“ jevech. Shoentalová se zabývala možnou účastí mykotoxinů na některých zázracích popisovaných Biblí [75]. Rozebírala podle logického sledu „egyptské rány“, předcházející exodus Židů z

Egypta. Podle její teorie byla známá „smrt prvorozených“ možnou mykotoxikózou. Potraviny v Egyptě totiž musely být po předchozích ranách kontaminovány, mj. i mykotoxiny a musel jich být relativní nedostatek. Z tohoto důvodu společensky preferovaní prvorození synové, kteří dostávali i za této nepříznivé situace větší porce potravin, se mohli snáze otrávit. Rovněž nutričně preferovaní otcové rodin se neotrávili z toho důvodu, že poměr pasážované potravy a tělesné hmotnosti je u dětského organizmu výrazně nepříznivější než u organizmu dospělého.

Jobova choroba podle rozboru Shoentalové připomíná otravu trichotheceny. Také její ukončení dodávkou potravin, bohatých na plnohodnotné bílkoviny, a nezanechání trvalých následků je podle autorky typické pro uvedené mykotoxikózy.

13.4.1 Čarodějnictví

Rozboru známého salemského čarodějnického procesu přinesla Matossianová [45]. Opírá se jak o starší publikace, tak o soudobé soudní záznamy. Podle jejího rozboru je sice jasný vliv společenských faktorů, ale na počátku celého případu stála menší epidemie onemocnění a úmrtí lidí i úhynů dobytka.

Z dobových záznamů lze usuzovat, že uvedené problémy nastaly po atypicky vlhkém a studeném létě, kdy u tehdy a v uvedené oblasti dominantní plodina - žito - musela být oslabena a byly vytvořeny podmínky pro její napadení námelem *Claviceps purpurea*. Námelové alkaloidy mají vedle vasotoxických účinků i účinky halucinogenní, kdy vyvolávají halucinace štípání a píchání, popř. halucinace sluchové (připomeňme si jejich chemickou příbuznost se známým halucinogenem LSD). Tyto toxiny však dovedou vyvolat také poruchy zdraví až smrt, především vyvoláním dlouhodobých cévních spazmů, vedoucích k odumření tkání.

Uvedené příznaky jsou v anglosaském folklóru velice často spojovány s očarováním. Epidemie podobných případů, doprovázená úhyny dobytka a úmrtími lidí pak vytvořila společenskou situaci, vedoucí ke spuštění mechanismu čarodějnických procesů.

V literatuře, zabývající se touto tématikou, se vyskytují i další příznaky očarování, které by mohly souviset s působením některých mykotoxinů [86]. Jedná se o poruchy v oblasti sexu a plodnosti, které by mohly být vyvolány zearalenonem a jeho deriváty. Dále jde o úhyny dobytka (různé mykotoxikózy), krvácení do mléka (mj. patrně trichotheceny) apod.

Konzultoval jsem uvedenou problematiku s pracovníky společenskovědních oborů (včetně autora [86], avšak nepodařilo se mi získat jejich zájem. Nabyl jsem dojmu, že jsou natolik zaujati svými teoriemi o chodu společenských procesů (ať už je jejich prvotní hýbatel materiální či nemateriální povahy), že prostě odmítají působení jakýchkoli činitelů, stojících mimo společnost.

Na základě dochovaných historických dat se zdá být jasné, že existovaly určité frekventně se vyskytující a všeobecně známé případy humánních a veterinárních chorob, které byly teprve druhotně spojeny s představou očarování. Mykotoxiny jako jedno z možných etiologických agens pro některé tyto choroby plně vyhovují.

13.4.2 Vampyrismus

Pokud se týká vampyrismu, zde je situace jiná. Zatím jsem se nesetkal v literatuře s žádným údajem, který by dával do souvislostí alimentární otravy a vampyrismus. Tento problém jsem konzultoval i s odborníky, kteří se problémem vampyrismu dlouhodobě zabývali a prostudovali řadu původních pramenů [43].

V souvislosti s hledáním možných chorob, jež by byly podkladem pro uvedený jev, byly vyslovována nejrůznější domněnky. Některé vyslovované argumenty jsou kuriózní až absurdní. Pro podporu teorie, že šlo o nemocné s určitým druhem porfyrie (dědičné poruchy metabolismu žlučových barviv, vedoucím k alteracím s fotosenzibilací kůže a poruchám krvetvorby) bylo uváděno, že atypické metabolity, které se nacházejí v organismu nemocných, světélkují. Nikoho z autorů uvedené hypotézy nenapadlo vysvětlit, jak byla fluorescence těchto látek vyvolána, když se tak děje pod dopadajícím ultrafialovým světlem. Jeho jediný zdroj ve středověku (i dříve) bylo slunce, resp. měsíc. Tyto zdroje ovšem obsahují největší podíl světla ve viditelné oblasti, které připadnou fluorescenci zcela překryje. Zdroj čistého UV světla v podmínkách středověku je snad ještě bizarnější představou než originální Stockerův hrabě Drákula.

Vcelku instruktivní dobový záznam případu vampyrismu uvádí Vondráček [94]. Jeho záznam lze shrnout do následujících fakt: Ve vsi Medvědje došlo na podzim a v zimě roku 1732 k záhadné epidemii úmrtí. Lidé, zemřelí na tuto epidemii, v hrobě nehnili přestože lidé zemřelí z jiné příčiny a současně či později pohřbení na tomtéž hřbitově vykazovali jasné známky rozkladu. Mrtví měli zachovány vnitřní orgány (ty se zpravidla při dekompozici mrtvého těla kazí nejdříve) a tekutou červenou krev v cévách i tělních dutinách.

Vondráček zpochybňuje citované svědectví vojenských ranhojičů mj. proto, že nalezli krev v tepnách. (Ta bývá většinou během agónie vypuzena křečovitým stahem jejich stěn vypuzena do žilního systému. Z tohoto důvodu nacházeli staří anatomové tepny prázdné a získali představu, že je jimi rozváděn po těle vzduch z plic. Z této představy je odvozen i anatomický název pro tepny - artérie - od „aér“, starořecky „vzduch“. Teprve pokusy s vivisekcí prokázaly, že tepnami proudí krev a umožnily vytvoření správné přestavy o krevním oběhu.)

Právě přítomnost krve v tepnách hovoří pro nějaký činitel, který ponechal krev tekutou, popř. jeho vlivem vznikla sanquinolentní tekutina, která druhotně prosákla do nitra tepen (k jejímu rozlišení od krve neměli tehdejší ranhojiči potřebné vybavení).

Vondráček považuje celou historii za „epidemii purpury“. Purpura je ovšem příznak, resp. soubor příznaků, vznikajících při nedostatečném strážení krve a popř dalších změnách v organismu postiženého. Krev se v drobných či větších skvrnkách vylévá do tkání (včetně povrchových). Může být vyvolána řadou činitelů, mezi jiným i některými původci infekčních chorob. U některých těžce probíhajících infekcí se rozvine DIK (disseminovaná intravaskulární koagulace), kdy se aktivuje produkty metabolismu bakterií srážení krve přímo v cévním řečišti. Faktory srážení krve vyvločkují přímo v cévách (samotné vločky jsou velikostí blízké krvinkám, takže v zásadě hemodynamicky nevadí) a krev se stane totálně nesrážlivou. Nemocnému není možno podat faktory srážení krve (ty se ihned spotřebují), ale je nutné nejprve zablokovat tento proces antikoagulancii a teprve po jeho zastavení

a vyčištění krevního oběhu od sraženin (postarají se o ně fagocyty) je možno obnovovat srážlivost krve. Nemocný je v době, kdy má díky chorobě i léčbě totálně nesrážlivou krev, značně ohrožen krvácením, a proto je léčba tohoto onemocnění krajně nejistá.

Uvedený stav však bývá spuštěn bakteriální infekcí, která při nemožnosti aplikace antibiotik vede k rychlé smrti a rychlému posmrtnému rozkladu (některé dobové popisy uvádějí mrtvolný rozklad končetin ještě žijících pacientů). Proto je krajně nepravděpodobné, že by těla lidí, zemřelých z této příčiny, byla nalézána v hrobě nedotčená. V takovémto případě lze naopak předpokládat prudký bakteriální rozklad.

Trichotheceny, popř. v kombinaci s ochratoxinem a některými dalšími mykotoxiny, však uvedenému obrazu naprosto vyhovují. Došlo by k úmrtí za příznaků purpury (viz klinický obraz ATA), krev by zůstala nedotčena a mrtvolný rozklad by tyto mykotoxiny přinejmenším zbrzdily.

Uvedené argumenty svědčí pro to, že za středověkými (a snad ještě staršími) představami o vampyrismu se skrývá konkrétní zkušenost s podobnými alimentárními otravami.

Tabulka 8: Pozitivní působení mikroskopických hub

Využití	**Oblast**	**Druhy**
Finální úprava některých potravin	Masný a mlékárenský průmysl	*Penicillium*
Výroba organických látek	Chemický průmysl	*Aspergillus niger*
Výroba léků, především antibiotik	Zdravotnictví, farmaceutický průmysl	Různé
Produkce enzymů	Od potravinářství po výrobu pracích a mycích prostředků	Různé
Výzkum	Od základního výzkumu na univerzitách po aplikovaný výzkum jednotlivých firem	Různé

14 Něco pozitivního o mikroskopických houbách

Vedle řady negativních vlastností a vlivů, jejichž popis tvoří hlavní část tohoto textu, mají některé mikroskopické houby také některé vlastnosti pozitivní.

Jejich přehled uvádí tabulka:

14.1 Využití v potravinářství

Patrně všichni známe (alespoň z televizních reklam) různé typy sýrů, zrajících pod příkrovem bílé plísně (vesměs se jedná o druh *Penicillium camemberti*, alespoň v širším druhovém pojetí - existuje více než deset druhů, které jsou považovány za synonymické). Odlišným druhem bylo *Penicillium nalgovinesis*, které bylo využíváno k výrobě velmi podobných sýrů na Šumavě. Tato výroba v 50. letech zanikla a pracovníkům SZÚ se na konci minulého století již nepodařilo v původních sklepích nalézt spory tohoto druhu.

Zástupcem těchto sýrů je náš Hermelín, slovenský Horec a Encián, přičemž je v současnosti možné zakoupit (za cca 2 - 3 násobnou cenu) též obdobné sýry ze západních zemí, především Francie.

Tradice výroby těchto sýrů existuje ve Francii od dob říše Římské, tedy cca 2000 let. V novější době byly odzkoušeny tyto plísně pro finalizaci zráni dalších typů sýrů, avšak ne vždy s jednoznačně pozitivními výsledky (např. Kamadet na bázi měkkého zrajícího sýra Zlato).

O něco novější (doloženo od středověku) je tradice sýrů s plísní uvnitř, jejichž hmota je prostoupena dutinkami, porostlými modrozelenou plísní z okruhu druhu *Penicillium rocqueforti*. Z našich výrobků je to sýr Niva, opět jsou na našem trhu v hojném počtu i výrobky různých západních producentů.

V novější době se u nás i v zahraničí objevují i sýry dvojplísňové, které mají na povrchu *Penicillium camemberti* a uvnitř *P. rocqueforti*. Z našich výrobků je to nyní Sedlčanský

Vltavín, na který můžeme vidět i reklamy v televizi. Původní výroba byla v Čáslavi a k nám se tyto výrobky dostávaly jen výjimečně, protože stačily prakticky jen pro pražský trh. Existují opět i obdobné výrobky zahraniční a jsou tu a tam k dostání, spíše ve specializovaných obchodech.

Plesnivý sýr máme doložen i z našich středověkých pramenů, už Kosmova kronika hovoří o tom, že Přemysl, když pro něj přišlo poselstvo od kněžny Libuše, odeslal volky do skály, zatkl otku a následně pojedl chléb a plesnivý sýr. Z kontextu není zcela jasné, zda to mělo být zdůraznění Přemyslovy chudoby (musel jíst zplesnivělý sýr) nebo strohé konstatování druhu potraviny (tím přinejmenším doložené pro Kosmovu dobu). Kosmas byl člověk zcestovalý, patrně část svého vzdělání nabyl v tehdejší Římské říši a mohl se proto přinejmenším v zahraničí setkat s výše uvedenými plísní fermentovanými sýry.

Asi prozradím ošklivé tajemství, ale zrání sýra pod plísňovou vrstvou je z hlediska výrobce velice pozitivní jev, protože délka tohoto zrání je výrazně kratší oproti výlučně bakteriálním procesům (jaké vidíme u neplísňových sýrů). Protože se doba pobytu ve zracím sklepě výrazně promítá do ceny finálního výrobku, výrobce má nižší náklady. Na druhé straně lze uvést, že výroba těchto sýrů (nejvíce to platí pro sýry dvouplísňové) je podstatně náročnější, vyžaduje speciální know-how a velmi dobrou technologickou kázeň u všech účastníků výroby. Z tohoto důvodu je kvalitně a rovnoměrně proplesnivělý sýr zárukou určitého dodržení kvality práce ve výrobě.

Z hlediska výživářského mají plísňové sýry jednu pozitivní vlastnost. Je tím velmi silné profermentování sýrové hmoty, především u sýrů rocquefortského typu. Tím je téměř zcela zničena laktóza, která ve vyšším věku může u části naší populace vyvolávat po požití mléčných výrobků zažívací potíže (plynatost, bolesti břicha, průjmy - případně s pěnou a hlenem ve stolici). Tyto sýry mají velmi příznivý poměr vápník : laktóza, takže jsou relativně dobrám zdrojem vápníku i pro tu část populace, která jinak mléčné výrobky nesnáší. Srovnatelným zdrojem vápníku jsou velmi dlouho fermentované sýry typu Parmezánu, které jsou na podstatně vyšší cenové hladině právě pro velmi dlouhou dobu zrání.

Jako negativní se zde jeví dva momenty:

- Většina sýrů rocquefortského typu je velice slaná a jako taková není vhodná pro lidi s vyšším krevním tlakem

- Sýry camembertského typu mohou obsahovat kyselinu cyklopiazonovou, která může interferovat s blokátory kalciových kanálů, což jsou opět léky podávané při vyšším krevním tlaku, případně chronických srdečních potížích. V takovém případě by byl asi nejlepší blokový Hermelín (ne okrajové kousky), protože u něj je nejpříznivější poměr mezi objemem cca 2 mm vrstvy na povrchu, obsahující tuto látku, a celkovým objemem (zbytek sýra tuto látku neobsahuje). Určitou rezervovanout je nutno mít k sýrům s netradiční recepturou. Naši studenti v rámci diplomových prací prokázali také zvýšení produkce kyseliny cyklopiazonové plísní *Penicillium camemberti*, pokud je pěstována ve smíšené kultuře s *Penicillium rocqueforti*, takže lidé beroucí výše uvedené léky by neměli jíst velká kvanta dvouplísňových sýrů.

Teoretické riziko existuje také při excesívním pojídání těchto sýrů (stovky gramů denně)

na počátku těhotenství (u kyseliny cyklopiazonové byl popsán teratogenní účinek na plod u myší a kura domácího).

Vedle sýrů bývají tradičně pokryty vrstvou bílé plísně i některé masné výrobky. Jedná se především o některé druhy šunky a salámů. V některých případech jsou použité plísně schopny produkovat mykotoxiny. Vzpomínám si na jeden kuriózní případ z 80. let minulého století, kdy jsme vyšetřovali plíseň z povrchu trvanlivých salámů jednoho našeho výrobce, který se v daných podmínkách nedokázal plísně zbavit. Nakonec se celý případ vyřešil tak, že zde se vyskytující kmen plísně (podle našeho určení *Penicillium viridicatum*) byl otestován jako netoxický na laboratorních zvířatech (jak v kultivaci na umělých půdách, tak přímo na odpovídajícím masném výrobku), a tak si výskyt bílé plísně na povrchu dali do normy. Je docela možné, že historicky takto vznikly i některé plísňové masné výrobky i dříve.

14.2 Produkce organických látek

Některé mikroskopické houby jsou schopny s vysokou efektivitou na levných substrátech produkovat některé žádoucí organické látky, mající užití jak v potravinářství tak i v různých technologiích. Jako první mě napadá produkce kyseliny citrónové kmeny *Aspergillus niger*, a to ze dvou důvodů:

1. Svého času byla vedena diskuse o bezpečnosti takto vyráběné potravinářské kyseliny citronové, protože v hotovém výrobky byly detekovány nějaké neznámé látky, světélkující pod UV lampou.

2. Tato výroba byla v Rakousku v blízkosti hranic s jižní Moravou. Odpad z ní odtékal říčkou Pulkavou do Dyje a s Dyjí do Novomlýnských nádrží, kde masa organických látek vyvolávala hnilobné procesy ve vodě.

14.3 Produkce antibiotik

Produkce antibiotik mikroskopickými houbami je velice známá. Už objev antibiotik úzce souvisí s plísněmi a dokonce i některé mykotoxiny byly objeveny v rámci výzkumu antibakteriálních látek, produkovaných plísněmi.

V současné době je většina antibiotik tzv. polosyntetická. Znamená to, že základní látka je vyrobena fermentací vhodného mikroba (vedle plísní to jsou i některé bakterie) a následně je chemicky upravována do konečné podoby. Prakticky všechna antibiotika již byla připravena zcela uměle z jednoduchých organických látek, nicméně uvedená „polosyntetická“ cesta přijde podstatně levněji.

14.4 Produkce enzymů

Různé mikroorganismy jsou potenciálním nebo i využívaným zdrojem enzymů. Ty se používají od velmi sofistikovaných reakcí v rámci chemického nebo farmaceutického průmyslu až po enzymové prášky na praní nebo prostředky na čištění kanalizace.

Velmi dobrým prostředkem k tomu poslednímu jsou obyčejné kvasnice (pekařské droždí). Před odjezdem (třeba na víkend) do kanálu (umyvadlo, kuchyňská výlevka) nasypeme obyčejný cukr a pekařské droždí ve větší dávce (tak za 1-2 Kč). Prolijeme tak hrníčkem vody a ucpeme. Po příjezdu pustíme zprudka vodu a gumovým zvonem kanál protáhneme. Uvolní se téměř všechny nánosy na stěnách trubek. Kvasnice je rozloží jednak enzymaticky, jednak „načechrají“ tvorbou plynu ze sacharózy (řepného cukru). Také ovšem můžeme použít enzymatický prostředek (láhev za několik set Kč) ...

14.5 Vědecký výzkum

Mikroskopické houby představují relativně vděčný výzkumný objekt

Z toho důvodu jsou každým rokem publikovány stovky prací (pokud bereme v úvahu jen ty nejvýznamnější časopisy), kde je mikroskopická houba používána jako pokusný organismus, a o něco větší množství prací, kde je mikroskopická houba zdrojem nějaké látky, která je v práci potom studována.

15 Analytika mykotoxinů

Ke stanovení mykotoxinů je možné využít jejich fyzikální, chemické a biologické vlastnosti. Metody stanovení se rozpadají na skupinu metod fyzikálně chemických a metod biologických. Existují i metody kombinované. Každá analytická metoda zahrnuje proces získání vzorku, jeho extrakci, čištění a detekci mykotoxinu. V některých případech však mohou být jednotlivé fáze sloučeny či silně redukovány.

15.1 Získání vzorku

Odběr vzorku představuje samostatnou kapitolu, přesahující rozsah a zaměření této publikace. Lékaři a zdravotničtí pracovníci obecně mívají tendenci tuto otázku podceňovat, protože se s ní při odběrech u pacientů prakticky nesetkáváme. Odběr a zpracování vzorků bývají pro některé potraviny a suroviny upraveny zvláštní normou a k dosažení reprodukovatelných výsledků je nutno předepsané postupy striktně dodržovat.

15.2 Extrakce

Extrakce má za účel převést co největší podíl testované látky ze vzorku do co nejmenšího objemu vhodného rozpouštědla z co nejmenším podílem rušících látek. Z tohoto důvodu bývají často pro určité mykotoxiny v konkrétních substrátech předepsány směsi rozpustidel, které co nejlépe vyhovují uvedeným kritériím.

Vedle klasické extrakce rozpustidly nebo směsmi rozpustidel nabývá na významu tzv. superkritická fluidní extrakce. Jejím principem je uvedení rozpustidla do superkritického stavu (překonání tzv. kritického bodu na diagramu teplota - tlak, za nímž již sebevětším tlakem není možno dosáhnout zkapalnění látky). Extrakce probíhá za teplot nejčastěji v rozmezí 25 - 200 ^oC a tlaku 7 - 60 MPa. (Je tedy použitelná jen pro látky, snášející uvedené podmínky.) Extrakčním činidlem jsou různé odolné plyny, metoda byla zavedena pro aflatoxiny s extrakcí CO_2 s přídavkem dalších látek. Výhodou této extrakce je vysoká účinnost velmi malá spotřeba rozpouštědel. Nevýhodou je instrumentální náročnost.

15.3 Čištění extraktu

Čištěním zbavujeme primární extrakt dalších nežádoucích látek tak, aby bylo možné provést závěrečnou detekci. Rozeznáváme čištění ve fázích kapalina - kapalina, kapalina - pevná látka a čištění imunoafinní.

V případě čištění kapalina-kapalina převádíme testovanou látku z jednoho rozpustidla do druhého, popř. převádíme do jiného rozpustidla nežádoucí koextrahované látky. Výhodný je tento postup zejména u organických kyselin (z mykotoxinů například ochratoxin A nebo kyselina cyklopiazonová), které přecházejí z málo polárních rozpouštědel (dietyléter, chloroform) do alkalických vodných roztoků a po jejich okyselení zpět do méně polární fáze.

V případě čištění kapalina - pevná látka dochází k sorpci testované látky na povrchu vhodného sorbentu, vymytí nežádoucích zároveň adsorbovaných látek a následnému vymytí testované látky. Klasická sloupcová chromatografie postupuje tak, že sorbent je rozptýlen ve vhodné směsi rozpustidel a ponechán sedimentovat ve skleněné trubici. Poté skrze něj proléváme extrakt ze vzorku. Následuje prolévání vhodné soustavy rozpustidel, která vyplaví sledovanou látku ze sloupce. Nebo nejprve ze sloupce vyplavíme látky balastní a poté jinou soustavou vyplavíme analyzovanou látku. Ta je potom buď stanovována jinými postupy ve vytékající tekutině, nebo je přímo zachycována na výstupu (kapalinová chormatografie i vysokotlaká kapalinová chromatografie).

V současné době existují speciální kolonky, mnohdy připravené pro stanovení konkrétního mykotoxinu v určitém materiálu - skupině materiálů. Při jejich použití je nutno přesně dodržet návod výrobce.

U barevných látek nebo látek detekovatelných UV zářením lze provést vyčištění rovněž na desce pro tenkovrstevnou chromatografii, skvrnu vyškrábat a testovanou látku ze sorbentu eluovat.

Imunoafinní kolonky představují prostupný gel v němž jsou ukotveny specifické protilátky proti mykotoxinu - skupině mykotoxinů. Extrakt je protlačen (nebo volně proteče) přes kolonku, nežádoucí látky jsou vymyty a poté je kolonka promyta rozpouštědlem, které ruší vazbu mykotoxin - protilátka. Výhodou jsou velmi malé objemy rozpouštědel a značná rychlost stanovení. Nevýhodou je vysoká cena kolonek, které jsou zpravidla výrobcem určeny k jednomu použití.

15.4 Detekce

Rozlišujeme detekci kvalitativní (látka je-není přítomna), semikvantitativní a kvantitativní (stanovujeme též množství). Použité metody lze rozdělit na fyzikálně-chemické a biologické.

15.5 Fyzikálně chemické metody

Z fyzikálně chemických metod je nejčastější chromatografie. Využívá různé rychlosti prostupu jednotlivých látek unášených směsí rozpouštědel skrze vrstvu vhodného sorbentu. Nejznámější a nejčastěji používané úpravy chromatografie jsou:

1. Sloupcová chromatografie , kdy sorbent je v kompaktním sloupci, obklopeném trubicí ze vhodného materiálu. Od této metody, v nynější době spíše zastaralé, jsou generický odvozeny další, vysoce moderní metody kapalinové chromatografie, vysokotlaké kapalinové chromatografie (a provedením blízká je i chromatografie plynová).

   V některých případech je možné vyčištěné látky na sloupci pozorovat ve viditelném nebo UV světle, popř. i stanovit jejich množství. V současné době jsou však tyto metody zastaralé.

   Sloupcová chromatografie je v současné době používána k předčišťování vzorků, které jsou poté analyzovány jinou metodou, citlivou na přítomnost balastních látek (viz výše).

Jinou doménou použití sloupcové chromatografie je preparace většího množství látek za účelem jejich přípravy.

2. Tenkovrstevná chromatografie (TLC) je založena na vzlínání směsi rozpustidel v tenké vrstvě sorbentu na povrchu vhodného nosiče. Vzorek se zpravidla na vrstvu nanese předem. Po přechodu rozpustidla přes nanesený vzorek jsou jednotlivé jeho složky unášeny různou rychlostí po vrstvě sorbentu. Jakmile dojde čelo rozpustidla na konec desky, jeho pohyb se zastaví. Analyzovanou látku pak sledujeme buď přímo (barevné) nebo pod ultrafialovým světlem (ty, které světélkují pod UV světlem dostupných vlnových délek) nebo ji vizualizujeme postřikem vhodným chemickým činidlem.

   Hodnota Rf udává, jak daleko zaostává skvrna sledované látky proti čelu rozpustidla na desce. Rf 1,0 mají látky jdoucí s čelem soustavy, Rf 0 mají látky, zůstávající na startu.

   Tenké vrstvy jsou v současné době používány prakticky jen kupované od různých výrobců. U nás je to nejčastěji Silufol od výrobce Chevalier. Při použití vrstvy musíme znát její vlastnosti, z níž plynou některá omezení. Například Silufol je na aluminiové fólii a silikagel ve vrstvě je spojen škrobem. Nelze proto používat jako unášecí soustavy či detekční činidla silné kyseliny a zásady, které by destruovaly hliníkovou vrstvu. Je problémem použití detekčních činidel s obsahem jódu, který ve větším množství zabarvuje desku intenzívně modře (reakce se škrobem). Je nepoužitelná i všeobecná detekce postřikem koncentrované kyseliny sírové a zahřátím (kdy detekujeme většinu organických látek na základě zčernání - vyredukování uhlíku). Zato je však deska daleko pružnější než desky skleněné, levnější než teflonové (např. od fy. Kodak).

   Při tenkovrstevné chromatografii mykotoxinů se osvědčuje nanášet na desku vždy vzorek, standard mykotoxinu a vzorek s přidaným standardem. Za těchto podmínek velice snadno odhadneme ovlivnění Rf mykotoxinu balastními látkami ve vzorku. Zjistíme i případy, kdy balastní látky různými mechanismy blokují detekci mykotoxinu nebo jeho oddělení od balastu. Rovněž takto snadněji objevíme látky, které se sledovanému mykotoxinu velmi podobají (barva, fluorescence, barevná reakce) a mají velmi podobné Rf (skvrna ve vzorku se standardem je jakoby rozštěpená).

   Výhodou tenkovrstevné chromatografie je relativní odolnost vůči příměsem balastních látek. Vzorek zpravidla není nutno tak důkladně čistit, což vedle úspory práce, času a materiálních nákladů znamená i menší riziko ztrát při čištění. Druhou výhodou je získání celkového přehledu o vzorku (jsme schopni např. zaznamenat výskyt látek, dávajících podobné nebo identické chemické reakce) a možnost důkladnějšího studia chemických a fyzikálních vlastností podezřelé látky. Nevýhodou je obtížnější a méně přesná kvantifikace.

   Kvantifikace výsledku se provádí přístroji, měřícími odražené světlo popř. fluorescenci chromatografické desky. Přístrojů k tomuto stanovení existuje celá řada, modernějšími lze odečíst i excitační a emisní maxima fluoreskujících skvrn (tj. jaká vlnová

délka UV záření vyvolá nejvyšší fluorescenci a jaká vlnová délka je emitována - popř. jaká jsou maxima emise). Excitační a emisní maxima jsou pro soustavu látka - sorbent značně specifická a porovnání se standardem toxinu na téže desce snižuje možnost falešně pozitivních výsledků na minimum.

Existuje rovněž vysokoúčinná tenkovrstevná chromatografie (HPTLC), která pracuje se speciálními deskami, jejichž sorbent je velmi jemný a zejména je zajištěna vysoká stejnorodost jeho zrn z hlediska velikosti a tvaru. Pracuje se s malými deskami a množství nanášeného vzorku je velmi malé.

Zastaralá je kdysi rozšířená papírová chromatografie - mimo speciální případy nebo výuku.

3. Vysokotlaká kapalinová chromatografie (HPLC) používá drobné kolonky, skrze něž je unášecí soustava protlačována pumpou. Modernější přístroje umožňují také např. kontinuálně měnit složení unášecí soustavy. Průchod sledovaných látek skrze kolonu je detekován na výstupu zpravidla na základě fyzikálních vlastností roztoku. Nejčastěji jde o absorpci viditelného, infračerveného nebo ultrafialového světla. Existují i detektory fluorescence, vyvolané ultrafialovým světlem. V případě analýzy aflatoxinů se používá tzv. packed flow cell, což je kyveta z křemenného skla naplněná silikagelem. Ten totiž značně zesiluje fluorescenci aflatoxinů a tím vzrůstá až o řád citlivost detekce.

   Při praktickém provádění analytiky pomocí vysokotlaké kapalinové chromatografie je nutno se velice striktně držet již vypracovaných metod včetně takových detailů, jako je použití chemikálií a kolonek od konkrétního výrobce. Metody bývají také zpravidla vypracovány pro určitý okruh materiálů a u jiných je nutno změnit alespoň úvodní čištění vzorků. Nevýhodou je také značná materiálová náročnost plynoucí z nákladů na pořízení a provoz přístroje.

   Hlavním problémem vysokotlaké kapalinové chromatografie jsou ztráty při čištění. Mohou se měnit podle použité metody i analyzovaného materiálu.

   Kapalinová chromatografie pracuje na stejném principu, ale vzorek a soustava protékají kolonkou samospádem nebo mírným přetlakem. Proto musí být sorbent v kolonce hrubozrnnější a kolonka celkově větší. Je méně používána než vysokotlaká chromatografie, ale v některých případech dosahuje plně postačujících výsledků.

Porovnáme-li kvantifikaci mykotoxinů tenkovrstevnou a vysokotlakou kapalinovou chromatografií, pak obě metody mají výhody a nevýhody. Kvantifikace TLC je zpravidla méně přesná (chyba 5 - 10%, podle použitého přístroje), ale čištění vzorku může být méně náročné. HPLC kvantifikuje s vysokou přesností, ale je nutno použít velmi účinné čistící postupy, při nichž dochází ke značným ztrátám. V závislosti na složení substrátu procento ztrát při čištění kolísá. Při testování velkého množství různorodých materiálů, pro něž ztráty nejsou přesně známy, můžeme v praxi dosáhnout méně přesných výsledků než při TLC.

15.6 Biologické metody

Z biologických metod se nejčastěji používají imunologické metody RIA a ELISA. Jsou založeny na imunitní reakci sledované látky s protilátkami. Mykotoxiny zpravidla nevyvolávají imunitní odezvu s tvorbou protilátek, ale působí jako hapteny. To znamená, že po navázání na vhodný nosič (např. bílkovinu) vyvolají tvorbu specifických protilátek.

Ty se buď získávají ze séra imunizovaného zvířete, nebo jde o tzv. monoklonální protilátky. Pro jejich výrobu se užívá lymfocytů B z imunizovaného zvířete, které fúzují s vhodnou nádorovou či leukemickou buňkou. Jejich splynutím vzniká „nesmrtelná“ buňka, která se v zásadě neomezeně dělí a produkuje specifické protilátky. Monoklonální se tyto protilátky nazývají z toho důvodu, že produkující buňky jsou všechny potomky jediné buňky. Proto produkují též zcela shodnou protilátku. V případě séra z imunizovaného zvířete jde o směs sice podobných ale v detailech odlišných protilátek, jejíž reakce jsou méně jednoznačné a jejíž vlastnosti mohou šarži od šarže mírně kolísat. Monoklonální protilátky zajišťují vyšší úroveň standardizace metody. Lze očekávat, že časem budou klasickým protilátkám konkurovat i cenově.

Metoda existuje v četných úpravách.

Např. je možno do vzorku přidat standardní množství značeného mykotoxinu a oba nechat vyvazovat na protilátky, fixované na stěně zkumavky. Při vazbě dochází ke kompetici mezi značeným a neznačeným mykotoxinem. Radioaktivita či enzymatická aktivita zkumavky po šetrném odstranění nevyvázaného značeného mykotoxinu je nepřímo úměrná množství mykotoxinu ve vzorku. Existují i postupy, při nichž probíhá imunologická reakce v prostředí gelu, nikoli na stěně zkumavky. U řady látek (nejen mykotoxinů) je možno detekovat až pikogramové koncentrace, což odpovídá desítkám molekul v mililitru testovaného roztoku.

ELISA má proti RIA výhodu jednoduššího odečítání výsledku (zpravidla v závěru stačí změření intenzity zabarvení roztoku jednoduchým fotometrem), zavádí však do reakce další citlivou bílkovinnou molekulu (enzym), jejíž vlastnosti mohou být pozměněny balastními látkami ze vzorku a podílejí se na stárnutí analytického kitu (sady).

Obě metody, RIA i ELISA, bývají zpravidla vypracovávány pro konkrétní přesně definované látky. Např. stačí již přechod z mléka kravského na mléko mateřské aby metoda přestala dávat uspokojivé výsledky a bylo nutno ji přepracovat. Jsou popsány také četné falešně pozitivní výsledky (např. aflatoxin B_1 má zkříženou reakci s vanilinem). Velmi nepřehledné jsou zkřížené reakce mezi mykotoxiny vzájemně genericky odvozenými (skupina aflatoxinů, zearalenon a příbuzné, trichotheceny apod.). Rovněž je zdrojem laboratorních chyb i fakt, že mnohé mykotoxiny jsou v biologickém materiálu konjugovány s glukuronidy, přičemž o reakci výsledných komplexů s protilátkami proti mykotoxinu se vesměs málo ví. Zpravidla existuje více možností vazby mykotoxinu s kyselinou glukuronovou a výsledné látky mohou mít afinitu k protilátkám proti mykotoxinu výrazně odlišnou. Z tohoto důvodu se používá imunologických metod především v rámci výzkumu, popř. vnitropodnikového sledování, kde vynikne jejich vysoká citlivost (alespoň v případě aflatoxinů, ochratoxinu, zearalenonu apod.) a možnost automatizace celého postupu. V případě právně závazného porovnání s normou jsou naměřené hodnoty kontrolovány fyzikálně chemickými metodami.

Rozvoj výroby protilátek proti mykotoxinům umožnil jejich vyzkoušení v terapii mykotoxikóz. Klinická odezva byla pozitivní (u prasete), jejich nasazení v případě např. laboratorní nehody je záležitostí ceny a rychlé dostupnosti.

15.7 Toxikologické metody

Toxikologické metody se v současné době používají minimálně. V souvislosti s akcemi tzv. „ochránců zvířat“ poklesla dostupnost a zvýšily se náklady. Velmi účinné byly testy, detekující estrogenní látky (mykotoxin zearalenon) na základě zvětšení dělohy u nedospělých samiček potkanů a myší. Výhodou těchto testů je detekce všech látek s daným biologickým účinkem, tedy i metabolitů obtížně stanovitelných klasickými chemickými metodami (nejsou k dispozici standardy toxinů).

Určitý význam zůstává u testů na kuřecím embryu (příslušná legislativa se vztahuje až na vylíhnutá kuřata).

Orientační hodnotu mají testy na bezobratlých. V případě mykotoxinů je užívána zejména žábronožka (*Artemia salina*, popř. *A. minima*). Podobně lze užít i prvoky - *Paramecium caudatum* aj. Takovéto testy byly např. užity při detekci satratoxinů a dalších makrocyklických trichothecenů maďarskými autory. Velmi výhodná je úprava s použitím mikrotitračních destiček. Materiál s mykotoxinem je nejlépe aplikovat tak, že do jamky s detekčními organismy ve vhodném médiu ponoříme disky z filtračního papíru, nasáknuté studovaným extraktem a dobře usušené. Při použití skleněných destiček je možno aplikovat roztoky na dno jamek a po usušení přidat médium s organismy; použitá rozpustidla zpravidla rozpouštějí hmotu mikrotitračních destiček, takže s nimi je tento klasický postup nepoužitelný.

Různí autoři studovali vliv některých mykotoxinů na tkáňové kultury, ale spíše v rámci výzkumu jejich účinků než jako detekční systém.

V některých případech jsou popsány účinky dosti specifické, např. vymizení chloroplastů u rostlinných buněk vyvolané aflatoxiny.

Lze detekovat i vznik mutagenních metabolitů v exponovaných organismech či samotnou mutagenní aktivitu některých mykotoxinů (Amesův test, SOS - chromotest). Tyto testy jsou však velice drahé, náročné na přesnost postupu a použité chemikálie a nejsou specifické. Pokud je potřebujeme provést u malého množství vzorků, je vhodné zadat tuto práci specializované laboratoři.

15.8 Mikrobiologické metody

Relativně nenáročné, zejména z hlediska materiálního vybavení, jsou testy mikrobiologické. Lze detekovat blokádu růstu testovacího kmene kolem disků s obsahem mykotoxinu. Podezření na konkrétní mykotoxin je dáno jednak postupem přípravy vzorku (který vyloučí přítomnost některých mykotoxinů na disku) jednak použitím kmene se selektivně vysokou citlivostí k určitému mykotoxinu - skupině mykotoxinů.

V některých případech lze použít selektivní blokádu účinku mykotoxinů některými látkami. V literatuře je popsána blokáda účinku aflatoxinů kumarinovými preparáty a blokáda

patulinu a kyseliny penicillové látkami s -SH skupinami. Ve druhém případě se podařilo na LF MU vyvinout metodu stanovení patulinu, spočívající v aplikaci dvou disků s hrubým etylacetátovým extraktem vzorku na půdu s citlivým mikrobem, přičemž na jednom je vedle vzorku přidáno i standardní množství thioglykolátu sodného. Pro přítomnost patulinu je charakteristický výrazný rozdíl velikostí zón inhibice růstu použitého mikroba kolem disků.

Rozhodujícím momentem všech uvedených metod je konstantní tloušťka a rovnoběžnost vrstvy vylité půdy, což je technicky dosti náročné. Zdrojem chyb mohou být antibioticky působící látky, proto je použití metod omezeno především na substráty, kde není výskyt podobných látek obvyklý.

Je možná úprava mikrobiologické metody k odečítání chromatogramů. Je nutno zajistit planparalelnost vrstvy živné půdy (nejčastěji s inkorporovaným mikrobem).

Baktericidní substance se na půdě projeví ploškou s inhibovaným růstem. Vedle citlivosti použitého mikroba je zde důležitým ukazatelem i Rf skvrny, které lze porovnávat s Rf standardu (v takovém případě aplikace mikroba pouze nahrazuje postřik chromatogramu detekčním činidlem).

Uvedené metody mají svůj význam hlavně pro mikrobiologické laboratoře, nevybavené k použití složitějších chemických metod. Mohou mít svůj význam u těch toxinů, kde jsou nedostupné specifické chemické reakce, proveditelné přímo na chromatogramu, a látky je příliš málo pro její bližší určení fyzikálně chemickými metodami.

Reference

[1] Adensam, L.: [Sdělení v diskusi na konferenci komise pro mikrobiologii potravin], Čeladná, 1993

[2] Andreou, N., Vasuris, N.: Výskyt kmenů *Aspergillus flavus*, produkujících kyselinu cyklopiazonovou. LF UJEP, Brno, 1984, 7 str. [práce SVOČ]

[3] Atherton L. G., Brewer D., Taylor A.: *Pithomyces chartarum:* a fungal parameter in the aethiology of some diseases of domestic animals; in: Purchase, I., F., H.: Mycotoxins; Elsevier, Amsterodam - Oxford - New York, 1974, 29 - 68

[4] Baldermannová, A.: Termorezistentní mikroskopické houby, jejich význam a ochrana proti nim; [diplomová práce] Pedagogická fakulta MU, Brno, 1999, 85 stran

[5] Benešová, I.: Toxicita a genotoxicita produktů nižších hub izolovaných v panelových domech. Disertační práce, Přírodovědecká fakulta MU, Brno, 1995

[6] Božko, D.: osobní sdělení

[7] Butler, W. H.: Aflatoxin; in: Purchase, I., F., H.: Mycotoxins; Elsevier, Amsterodam - Oxford - New York, 1974, 1 - 28

[8] Cosgriff, T. M., Bunner, D. L., Wanemacher, R. W. Jr., Hogson, L. A., Ddinterman, R. E.: The hemostatic derangement produced by T-2 toxin in cynomolgus monkeys. Toxicol. Appl. Pharmacol., 82, 1986, 532 - 539

[9] Coulter, J. B. S., Hendrickse, R. G., Lamplugh, S. M., Macfarlane, S. B., Moody, J. B., Omer, M. I. A., Suliman, G. I., Williams, T. E.: Aflatoxins and kwashiorkor. clinical studies in Sudanese children; Trans. Royal Soc. Trop. Med. Hyg., 80, 1986, 945 - 951

[10] Dashek, W. V., Mayfield, J. E., Llewellyn, G. C., Rear O, C. E., Bata, A.: Trichothecenes and yellow rain: Possible biological warfare agents. BioEssays, 4, 1, 1986, 27 - 30

[11] Denning, D. W., Allen, R., Wilkinson, A. P., Morgan, M. R. A.: Transplacental transfer of aflatoxin in humans; Carcinogenesis, 11, 6, 1990, 1033 - 1035

[12] Dorner, J., W., Cole, R. J., Lomax.,: Toxicity of cyclopiazonic acid. In: Trichothecenes and other mycotoxins, edited by J. Lacey, John Willey and Sons Ltd.,Chichester, New York, Brisbane, Toronto, Singapore, 1985, 529 - 535

[13] Dvořáčková, I: Aflatoxin jako rizikový faktor lidského zdraví; Mikroskopické houby a jejich toxické produkty jako faktory ovlivňující zdraví zvířat a člověka. [sborník konference], Brno, 1989, 13 - 16 str.

[14] Dvořáčková, I., Polster, M.: Relation between aflatoxin producing aspergilloma and lung carcinoma. Microbiologie - Aliments - Nutrition, 2, 1984, 187 - 192

[15] Failla, L. J., Lynn, D., Niehaus, W. G.: Correlation of Zn^{2+} content with aflatoxin content of corn. Appl. Environm. Microbiol., 52, 1, 1986, 73 - 74

[16] Failla, L. J., Niehaus, W. G.: Cadmium ion stimulation of growth and versicolorin synthesis in a mutant strain of *Aspergillus parasiticus*. Experimetal Mycol., 10, 1986, 144 - 149

[17] Fanelli, G., Fabro, A.A., Boniforti, L., Passi, S.: Inhibition of CCl_4-stimulated aflatoxin production of *Aspergillus parasiticus* by mercaptomethyldimethylamine; Periodicum Biologorum, 88, 3, 1986, 277 - 285

[18] Fassatiová, O.: Plísně a vláknité houby v technické mikrobiologii. SNTL, Praha, 1979, 211 str.

[19] Gavelová, M., Ruprich, J., Vereš, K.: Vývoj súprav RIA-test-AFLA M_1B_1 na stanovenie aflatoxinov v mlieku. Veterinární péče v potravinářském průmyslu 4, 1987, 33 - 35

[20] Geryk, E. a kol.: Zhoubné novotvary, jižní Morava - rok 1994, předběžné údaje. Masarykův onkologický ústav, Brno, 1996, 32 str.

[21] Gorst-Allman, C. P., Steyn, P. S.: Screening method for detection of 13 common mycotoxins. J. Chromatogr., 175, 1979, 325 - 331

[22] Hadidane, R., Roger-Regnault, C., Boauttour, H., Ellouze, F., Bacha, H., Creppy, E. E., Dirheimer, G.: Correlation between alimentary mycotoxin contamination and specific diseases. Human Toxicol., 4, 1985, 491 - 501

[23] Harrach, B., Mirocha, C. J., Pathre, S. V., Palyusik, M.: Macrocyclic trichothecene produced by a strain of *Stachybotrys atra* from Hungary. Applied and Environmental Microbiology, 1981, 1428 - 1432

[24] Hendrickse, R. G.: Kwashiorkor and aflatoxins; J. Pediatric Gastroenterology and Nutrition, 7, 1988, 633 - 636

[25] Hendrickse, R. G., Maxwell, S. M.: Heroin addicts, AIDS, and aflatoxins; Brit. Med. J., 269, 1988, 1257

[26] Hendrickse, R. G., Maxwell, S. M.: Aflatoxins and child health in the tropics; J. Toxicol. - Toxin Reviews, 8, 1 - 2, 1989, 31 - 41

[27] Hořáková, M.: Přítomnost a toxicita termorezistentních plísní v léčivých bylinách experimentální botanické zahrady LF MU Brno; bakalářská práce, Lékařská fakulta MU Brno, Brno, 1999, 47 stran

[28] Jesenská, Z.: Mikroskopické huby v požívatinách a krmivách; Alfa, Bratislava, 1987, 320 str.

[29] Jesenská, Z.: Osobní sdělení o experimentech na VÚPL Bratislava

[30] Jindřichová, J. a spol. : Stav imunity pracujících v míchárnách krmiv. [závěrečná zpráva SVÚ P 12-1365], Pardubice, 1988, OÚNZ, I. část

[31] Jindřichová, J. a spol. : Stav imunity pracujících v míchárnách krmiv. [závěrečná zpráva SVÚ P 12-1365], Pardubice, 1988, OÚNZ, II. část

[32] Kachlík, P.: Ovlivnění produkce mykotoxinu kyseliny cyklopiazonové kmenem plísně *Aspergillus flavus* odděleným pasážováním. LF UJEP, Brno, 1987, 12 str. [práce SVOČ]

[33] Keidel, W. D. a kol.: Stručná učebnica fyziológie. Vydavatelstvo Slovenskej akadémie vied, Bratislava, 1973, str. 77 - 80

[34] Kiessling, K. H.: The effect of zearalenone on growth rate, organ weight and muscel fibre composition in growing rats. Act. Pharm. Toxicol., 51, 1982, 154 - 158

[35] Klán J.: Co víme o houbách; SPN Praha, 1989, 310 str.

[36] Kocková - Kratochvílová, A.: Taxonómia kvasiniek a kvasinkovitých mikroorganizmov. Alfa, Bratislava, 1990, 700 str.

[37] Kolektiv: Strategie diagnostiky, prevence a léčby průduškového stmatu v České republice; ČLS J. E. Purkyně, Praha 1996, str. 20

[38] Kuipier-Goodman, T.: Uncertainities in the risk assessment of three mycotoxins: aflatoxin, ochratoxin, and zearalenone. Can. J. Physiol. Pharmacol., 68, 1989, 1017 - 1024

[39] Kuipier-Goodman, T., Scott, P. M.: Risk assesment of the mycotoxin Ochratoxin A; Biomedical and Environmental Sciences, 2, 1989, 179 - 248

[40] Lazarovskis, I.: Přehled klinických symptomů a syndromů. Avicenum, Praha, 1986, str. 434

[41] Lesný, I.: Druhá zpráva o nemocech slavných. VPK, Praha, rok vydání neudán, str. 19 - 22

[42] Liu, Z. a kol.: A new method for the quantitation of aflatoxin M_1 in urine by high performance liquid chromatography and its application to the etiologic study of hepatoma. Biomed. Chromatogr., 4, 2, 1990, 83 - 86

[43] Mackrle, I.: Drákulovi v patách. Magnet press, Praha, 1992

[44] Mann, J.: Jedy, drogy, léky; Academia, Praha, 1996 str.: 47 - 48

[45] Matossian, M. K.: Ergot and the Salem witchcraft affair; American Scientist, 70, 4, 1982, 355 - 357

[46] Matossian, M. K.: Did mycotoxins play the role in bubonic plague epidemics?; Perspectives in biology and medicine, 29 (2), 1986, 244 - 256

[47] Matoušková, J., Kaláčová, D: Podmínky produkce mykotoxinu kyseliny cyklopiazonové kmeny *Aspergillus flavus* Link. LF UJEP, Brno, 1989, 20 str. [práce SVOČ]

[48] Maxwell, S. A., Brown, R. F. R., Upshall, D. G.: The in vitro penetration and distribution of T-2 toxin through human skin. Toxicology, 40, 1986, 59 - 74

[49] MBÚ Praha, 1984 - osobní sdělení

[50] Mirocha, C. J., Abbas, H. K., Treeful, L., Bean, G.: T-2 toxin and diacetoxyscirpenol metabolism by Baccharis sp. Appl. Environm. Microbiol., 54, 9, 1988, 2277 - 2280

[51] Mirocha, C. J., Watson, S., Hayes, W. A.: Occurence of trichothecenes in samples from Southeast Asia associated with „yellow rain". Proc. V. Internat. IUPAC Symposium on Mycotoxins and Phycotoxins, Vienna, 1982, 130 - 133

[52] Niehaus, W. G.: Versicolorin synthesis by *Aspergillus parasiticus*: Regulation by temperature and zinc. Experimental Mycol., 13, 1989, 20 - 26

[53] Nováček, P.: Seznámení žáků 1. stupně základní školy s jedovatými a nebezpečnými rostlinami a houbami. dipl. práce, PedF MU Brno, 1995, 96 str. + přílohy

[54] Ostrý, V.: Zdravotní a hygienický význam mykotoxinů fumonisinů v potravinách, průběžná zpráva grantového projektu IGA MZ ČR, Brno, 1995

[55] Ostrý, V.: The presence and estimaton of the mycotoxin cyclopiazonic acid in foods and selected feeds. [autoref. of dissert work], Brno, 1989, Vysoká škola veterinární, 1 - 17

[56] Palyusik, M., a spol.: Transmission of zearalenone and alfa-zearalanol into porcine milk. Act. Vet. Acad. Sci. Hung., 28, 2, 1980, 217 - 222

[57] Paster, N., Lisker, N.: Effects of controlled atmospheres on *Penicillium patulum* growth and patulin production. In: Trichothecenes and other mycotoxins, edited by J. Lacey, John Willey and Sons Ltd., Chichester, New York, Brisbane, Toronto, Singapore, 1985, 233 - 241

[58] Piecková, E.: Charakterizácia niektorých vlastností termorezistentných mikromycét z pody,; doktorská disertační práce, Bratislava, 1996, 89 stran

[59] Pier, A. C., Mcloughin, M. E.: Mycotoxic suppresion of immunity. In: Trichothecenes and other mycotoxins, edited by J. Lacey, John Willey and Sons Ltd., Chichester, New York, Brisbane, Toronto, Singapore, 1985, 507 - 519

[60] Píchová, D. a spol.: Vliv mykotoxinu na užitkové vlastnosti zvířat. [závěrečná zpráva], SPOFA, Výzkumný ústav pro biofaktory a veterinární léčiva, Pohoří-Chotouň, 1982, 76 str.

[61] Pitt, J. I., Hocking, A. D.: Fungi and food spoilage. Blackie Academic and Professional, London, 1997, 593 str.

[62] PITT, J., HOCKING, A. D.: Mycotoxins in foods, implications in human health. in: Recent advances in clinical nutrition: 2, J. Libbley & Comp. Ltd, London - Paris, 161 - 168

[63] Poe, E. A.: Maska červené smrti. in: Zrádné srdce, výbor z díla, Naše vojsko, Praha, 1959, str.181 - 191

[64] Polster, M.: Nižší houby. in Hrubý, S. a spol.: Mikrobiologie v hygieně výživy. Avicenum, Praha, 1984, 21 - 42

[65] Polster, M.: osobní sdělení

[66] Polster, M.: Toxinogenní plísně a mykotoxiny v potravinách. Ústav pro další vzdělávání středních zdravotnických pracovníků, Brno, 1971, 84 str.

[67] Polster: Mykotoxiny. [přednáška pro brněnskou pobočku ČSVSM], Brno, 1975

[68] Polster, M., Šimůnek, J., Ostrý, V., Albrechtová, A.: Výskyt kyseliny cyklopiazonové a aflatoxinů u plísní *Aspergillus flavus* izolovaných z poživatin a krmiv. Čs hygiena, 35, 3, 1990, 144 - 148

[69] Pollak, G. F.: Alimentární otravy, disertační práce, díl 3. část 1., Čeljabinsk - Moskva, 1946

[70] Rodricks J. V., Eppley R. M.: Stachybotrys and stachybotryotoxicosis; in: Purchase, I., F., H.: Mycotoxins; Elsevier, Amsterodam - Oxford - New York, 1974, 181 - 198

[71] Roschenthaller, R., Creppy, E.E., Dirheimer, G.: Ochratoxin A, On the mode of action of a ubiquitous mycotoxins. J. Toxicol. - Toxin Reviews, 3 (1) 1984; 53 - 86

[72] Rosen, R. T., Rosen, J. D.: Presence of four fusarium mycotoxins and synthetic material in „yellow rain“. Evidence for the use of chemical weapons in Laos. biomed. mass Spectrom., 9, 1982, 443 - 450

[73] Rozehnalová, I., Ryšánková, J.: Plísně a mykotoxiny v prostředí stájí JZD [SVOČ]. LF UJEP, Brno, 1988, 14 str.

[74] Ruprich, J., Piskač, A.: Veterinářství, 33, 1983, 555 - 557

[75] Shoental, R.: Mycotoxins and the Bible. Perspectives in Biology and Medicine, 28, 1, 1984, 117 - 120

[76] Shoental, R.: Bracken toxicity and soil mycotoxins. Veterinary Record, 155, 1984, 500

[77] Shoental, R.: Fusarium mycotoxins: Possible implications for psychiatric disorder. Brit. J. Psychiat., 146, 1985, 115 - 119

[78] Skalníková, H.: Toxicita termorezistentních mikromycet izolovaných z čajů; bakalářská práce, Lékařská fakulta MU, Brno, 1998, 69 stran + příloha

[79] Sorenson, W. G. et al.: Trichothecene mycotoxins in aerosolized conidia of *Stachybotrys atra*. Appl. Envirin. Microbiol., 53, 6, 1987, 1370 - 1375

[80] Stora, C., Dvořáčková, I.: Contribution a l étude du role relatif de l aflatoxine et de l hépatide B dans la genése du cancer primitif du foie chez l homme. Bull. Acad. Natle Med., 170, 6, 1986, 763 - 775

[81] Šimůnek, J.: Biologické metody stanovení zdravotního rizika mykotoxinů v požívatinách. kandidátská disertační práce, LFH UK, Praha, 1985 [OBHAJOBA 1987], 96 str.

[82] Šimůnek, J.: Determination of toxinogenic activity of *Aspergillus flavus*. Scripta medica 54 (1) 1981, 61 - 64

[83] Šimůnek, J.: Studium metod sledování a rizika výskytu mykotoxinů v potravinách; habilitační práce, VVŠ PV, Vyškov, 1997, 117 stran

[84] Šimůnek, J., Březina, P.: Mykotoxiny. 1. vydání, Vyškov, Vysoká vojenská škola pozemního vojska, fakulta ekonomiky obrany státu, 1996, 70 str.

[85] Šimůnek, J., Březina, P., Ježová. J.: Riziko mykotoxinu kyseliny cyklopiazonové ze sýrů fermentovaných kulturní plísní Penicillium camemberti. Veterinární péče v potravinářském průmyslu, 1990, 2, 126 - 128

[86] Šindelář, B.: Hon na čarodějnice. Svoboda, Praha, 1986, 256 str.

[87] Truhaut, R., Shubik, P., Tuchmann - Duplessis, A.: Zeranol and 17-beta estradiol: A critical review of the toxicological properties when used as anabolic agents. Regulatory Toxicol. Pharmacol, 5, 1985, 276 - 283

[88] Tsubouchi, H., Yamamoto, K., Hisada, K., Sakaabe, Y., Tsuichihira, K.: Inhibitory effects of non-aflatoxinogenic fungi on aflatoxin production in rice cultures by *Aspergillus flavus*. Trans. Mycol. Soc. Japan, 22, 1981, 103 - 111

[89] Ueno, Y.: Toxicology of mycotoxins. CRC Crit. Rev. Toxicol., 14 (2) 1985, 99 - 132

[90] Ueno, Y.: Toxicology of trichothecene mycotoxins. ISI Atlas of Science: Pharmacology, 1988, 121 - 124

[91] Uraguchi, K., Yamazaki, M.: Toxicology biochemistry and pathology of mycotoxins. Kodansha LTD., Tokyo, 1978, 290 str.

[92] Veselý D., Veselá, D.: Využití produkce mykotoxinů při druhové determinaci penicilií. in: Kubátová, A., Prášil, K.: Současný stav, využití moderních metod a perspektivy studia rodu *Penicillium*; sborník referátů ČSVSM při ČSAV, Praha, 1995, [akce - červen 1994], 98 - 102

[93] Vojtová, R.: Mikroskopické houby v sušeném mléce pro kojeneckou a dětskou výživu, jiné rody než *Aspergillus* a *Penicillium*. [diplomová práce], PřF MU, Brno, 1993, 84 str.

[94] Vondráček, V., Holub, F.: Fantastické a magické z hlediska psychiatrie. III. vydání, Columbus, Bratislava, str. 196 - 201

[95] Waltari, M.: Egypťan Sinuhet; Vyšehrad, Praha, 1969, 990 str.

[96] Wild, C. P., Jiang, Y-Z., Sabbioni, G., Chapot, B., Montesano, R.: Evaluation of methods for quantitation of aflatoxin-albumin adducts and their applications to human exposure assesment. Cancer Res., 50, 1990, 245 - 251

[97] Wilkinson, A., Denning, D. W., Morgan, R. A.: An ELISA method for the rapid and simple determination of aflatoxin in human serum. Food Additives and Contaminants, 5, 4, 1988, 609 - 619

[98] Wilkinson, A., Denning, D. W., Morgan, R. A.: Immunoassay of aflatoxins in food and human tissue. J. Toxicol. - Toxin Reviews, 8, 1-2, 1989, 69 - 79

[99] Wyllie, T. D., Morehouse, L. G.: Mycotoxic fungi, mycotoxins mycotoxicoses, an encyclopedic handbook. Marcel Dekker Inc., New York and Basel, 1978, vol. 3 , 202 str.