

## Istraživanje okratoksina A u ječmu – doprinos mikotoksinskoj hipotezi nastanka endemske nefropatije

*Determination of ochratoxin A in barley-Contribution to the mycotoxin hypothesis on the etiology of endemic nephropathy*

Iva Pavlinić, Dinko Puntarić, Jasna Bošnjir, Dario Lasić, Lidija Barušić,  
Matijana Jergović, Maja Miškulin, Ida Puntarić, Katarina Vučić\*

---

### Sažetak

Cilj istraživanja bio je utvrditi koncentracije okratoksina A (OTA) u ječmu iz okolice Slavanskog Broda, područja pojavljivanja Balkanske endemske nefropatije (BEN), te ih usporediti s koncentracijama u ječmu iz „neendemskih“ Osijeka i Nove Gradiške. Tankoslojna kromatografija (TLC) i visokotlačna tekućinska kromatografija (HPLC) bile su korištene za detekciju okratoksina A u uzorcima ječma skupljenim tijekom 2000. i 2002. godine. Maksimalno dozvoljena koncentracija (MDK) okratoksina A u žitaricama je 5 µg/kg. Najviše koncentracije OTA (medijan 25 µg/kg; interval pouzdanosti 20,0-25,0 µg/kg) utvrđene su u ječmu iz Slavanskoga Broda iz 2000. godine, potom u ječmu iz istog područja prikupljenom 2002. godine (medijan 20 µg/kg; interval pouzdanosti 10,0-20,0 µg/kg;  $p < 0,001$ ). U uzorcima ječma iz Osijeka prosječna koncentracija OTA u uzorcima iz 2000. godine iznosila je 12,5 µg/kg (medijan 12,5 µg/kg; interval pouzdanosti 10,0-20,0 µg/kg), dok niti u jednom uzorku iz 2002. godine, kao i u uzorcima iz Nove Gradiške nije utvrđen OTA. Utvrđena je statistički značajno veća koncentracija OTA u uzorcima sakupljenim 2000. godine u Slavanskom Brodu i Osijeku od onih iz 2002. godine. Uspoređujući međusobno uzorke prema lokaciji uzorkovanja utvrđena je statistički značajna razlika uzoraka iz Slavanskog Broda u odnosu na „neendemska područja“. Vlaga zrna niti u jednom uzorku nije prelazila dozvoljenih 14%. Kontaminacija ječma OTA značajno je viša u okolici Slavanskoga Broda u odnosu na ostala ispitivana područja, te višestruko prelazi dozvoljene koncentracije što govori o mogućoj povezanosti BEN i kontaminacije žitarica OTA i općenito mikotoksinima.

**Ključne riječi:** mikotoksini, okratoksin A, endemska nefropatija, žitarice, ječam, Hrvatska

---

### Summary

The aim of the study was to determine ochratoxin A (OTA) concentration in barley from the Slavonski Brod area endemic for the Balkan endemic nephropathy (BEN) in comparison with barley from Osijek and Nova Gradiška areas free from BEN. Thin-layered chromatography and high-performance liquid chromatography were used on OTA detection in barley samples collected in 2000 and 2002 at Slavonski Brod, Osijek and Nova Gradiška locations. Considering the maximum allowable concentration (MAC) of 5 µg/kg for cereals, the highest OTA concentrations were determined in barley samples collected in the Slavonski Brod area in 2000 (median 25 µg/kg; confidence interval 20.0 – 25.0 µg/kg), followed by barley samples collected in the same area in 2002 (median 20 µg/kg; confidence interval 10.0 – 20.0 µg/kg) ( $p < 0.001$ ). In the Osijek area, the median OTA concentration in barley samples from 2000 was 12.5 µg/kg (confidence interval 10.0 – 20.0 µg/kg), whereas barley samples collected in 2002 were free from OTA as

---

\* Institut za zaštitu bilja Zagreb (mr. sc. Iva Pavlinić, dipl. ing.); Zavod za javno zdravstvo „Dr. Andrija Štampar“, Zagreb, Služba za zdravstvenu ekologiju (prof. dr. sc. Dinko Puntarić, prof. dr. sc. Jasna Bošnjir, dipl. ing., Dario Lasić, dipl. ing., Lidija Barušić, dipl. ing., dr. med. Matijana Jergović); Sveučilište J. J. Strossmayera u Osijeku, Medicinski fakultet Osijek (prof. dr. sc. Dinko Puntarić, doc. dr. sc. Maja Miškulin); Medicinski fakultet Zagreb (Ida Puntarić, studentica 6. god.); Hrvatski zavod za zdravstveno osiguranje Zagreb (dr. med. Katarina Vučić)

Adresa za dopisivanje / Correspondence address: Prof. dr. sc. Dinko Puntarić, Zavod za javno zdravstvo „Dr. Andrija Štampar“, Mirogojska cesta 16, 10000 Zagreb, Tel.: ++ 385 1 4696-240, Fax: ++385 1 4678-015, E-mail: dinko.puntaric@stampar.hr

Primljeno / Received 2010-02-19; Ispravljeno / Revised 2010-09-08; Prihvaćeno / Accepted 2010-10-15

were those collected in both 2000 and 2002 in the Nova Gradiška area. Comparison of barley samples in separate Slavonski Brod and Osijek areas yielded statistically significant differences in OTA concentration between the samples collected in 2000 and 2002. Mutual comparison of samples according to the sampling locations established a statistically significant difference between the samples collected in the Slavonski Brod area and those from non-endemic areas in 2000 and 2002. Grain humidity did not exceed the allowable level of 14% in any of study samples. In the Slavonski Brod area, barley contamination with OTA exceeded MAC several fold and was significantly higher in the Slavonski Brod area than in other study areas which suggests the possible connection between BEN and OTA contamination of cereals and mycotoxins in general.

**Key words:** mycotoxins, ochratoxin A, endemic nephropathy, cereals, barley, Croatia

Med Jad 2010;40(3-4):59-65

## Uvod

Žitarice i njihovi proizvodi sve su učestalije namirnice u svakodnevnoj prehrani poznate pod nazivom tzv. „hrana za zdravlje“. Upravo takve namirnice podložne su, tijekom vegetacije i skladištenja, rastu i razvoju velikog broja plijesni koje imaju sposobnost sinteze biološki aktivnih tvari – mikotoksina. Mikotoksini su sekundarni produkti metabolizma nekih vrsta plijesni što se sintetiziraju u slijedu enzima kataliziranih reakcija. Poznato je i opisano više od 400 različitih mikotoksina, a kao prirodni kontaminanti hrane u svijetu su najčešći aflatoksini (G<sub>1</sub>, B<sub>1</sub> i M<sub>1</sub>), okratoksini (A, B i C), fumonizini, zearalenon itd.<sup>1-3</sup>

Okratoksini su skupina toksičnih kemijskih spojeva što ih sintetiziraju plijesni iz skupine *Aspergillus ochraceus* i *Penicillium viridicatum*, a parazitiraju na žitaricama.<sup>1,2</sup> Najpoznatiji i najotrovniji toksin iz te skupine je okratoksin A (OTA), koji je prvi put izoliran 1965. godine.<sup>1-7</sup> Unatoč neupitnoj animalnoj toksičnosti *in vivo* i *in vitro*, učinci okratoksina na ljudsko zdravlje još do sada nisu u potpunosti istraženi. Ipak, sa sigurnošću možemo govoriti o njegovom nefrotoksičnom, genotoksičnom i imunotoksičnom učinku.<sup>7-10</sup> OTA je uzročnik mnogih okratoksikoza ptica i sisavaca. Najpoznatija od njih je nefropatija svinja, otkrivena prije dvadesetak godina.<sup>11-14</sup> OTA je pronađen u mesu, mlijeku i mliječnim prerađevinama, žitaricama, siru, kavi i drugim namirnicama, u Hrvatskoj i na području zemalja EU, a u posljednje vrijeme porastao je interes za istraživanje OTA u vinu.<sup>15-21</sup>

Upravo utvrđena činjenica da je OTA nefrotoksičan za gotovo sve eksperimentalne i domaće životinje, bila je polazište za spominjanje moguće povezanosti plijesni i njihovih štetnih metabolita mikotoksina s nastankom endemske nefropatije kod ljudi. Radi se o teškoj kroničnoj bolesti bubrega, koja se javlja kod stanovništva uz rijeku Dunav i njezine pritoke na ograničenim zemljopisnim područjima

Bugarske, Rumunjske i ex-Jugoslavije (u Hrvatskoj u selima uz rijeku Savu u okolici Slavnskoga Broda), poznatijoj pod imenom Balkanska endemska nefropatija (BEN). Bolest karakterizira postepena i progresivna bubrežna insuficijencija kod domaćinstva, koja dovodi do uremije.<sup>1,14,21-25</sup> Među stanovništvom s endemskog područja, a često upravo kod pacijenata oboljelih od endemske nefropatije, povećana je i učestalost tumora mokraćnog trakta.<sup>21,23,25</sup>

Nalazi nekoliko karakterističnih OTA–DNA adukta u tumorima urinarnog trakta bugarskih stanovnika, te stanovnika s endemskih područja Hrvatske i Srbije, premda kontroverzni, dodatno su „ojačali“ teoriju o povezanosti OTA s BEN.<sup>26-29</sup> Zadnji opisi bolesti slične BEN zabilježene u Tunisu, koju uzrokuje OTA i uzročna veza OTA i tzv. *karyomegalic* intersticijske nefropatije, oblika nefropatije koji u nekim morfološkim i kliničkim aspektima nalikuju BEN, dodatni je prilog tezi o OTA kao mogućem etiološkom uzročniku endemske nefropatije.<sup>8,30-32</sup>

OTA studije koncentriraju se na njegovu prisutnost (i koncentraciju) u pojedinim namirnicama i u serumu osoba s endemskog područja pojavljivanja BEN, u odnosu na neendemska područja.<sup>21,24-27,30,31,33-35</sup>

Svrha ovoga rada bila je, kao nastavak vlastitih prethodnih istraživanja, utvrditi da li i ječam iz okolice Slavnskoga Broda, endemskog područja BEN, sadrži veću koncentraciju OTA u odnosu na neendemska područja (Osijek i Nova Gradiška). Osim toga, cilj je bio utvrditi postoji li razlika u koncentraciji OTA u žetvi iz 2000. godine u odnosu na žetvu iz 2002. godine.

## Materijali i metode

Uzorci ječma iz 2000. i 2002. godine s 3 područja: Slavnskoga Broda, Osijeka i Nove Gradiške, sakupljeni su metodom slučajnog uzorkovanja u tamošnjim seoskim domaćinstvima. Početni uzorak je sadržavao 1 kg ječma raznih sorti, a za analizu je korišteno 25 g uzorka. Uzorci su sakupljeni tijekom

mjeseca ožujka 2001. godine za žetvu iz 2000. godine, odnosno u istom mjesecu 2003. za žetvu iz 2002. godine. U oba slučaja uzorci su sakupljeni u vrlo kratkom roku (u jednom danu), početkom mjeseca ožujka.

Ukupno je sakupljeno 120 različitih uzoraka ozimog ječma, svaki u količini od 1 kg, po 20 uzoraka iz 2000. godine i 20 uzoraka iz 2002. godine sa svakog od navedena 3 područja, što iznosi 60 + 60 (120) uzoraka za te dvije godine žetve. Uzorci su do analize čuvani u suhoj, tamnoj prostoriji na sobnoj temperaturi u polipropilenskim posudama s poklopcem na navoj, u Odjelu za analize hrane i predmeta opće uporabe Zavoda za javno zdravstvo grada Zagreba, kako ne bi došlo do naknadne kontaminacije ječma plijesnima i tvorbe mikotoksina.

Nakon homogenizacije i usitnjavanja laboratorijskog uzorka od 25 g, slijedila je obrada uzorka ječma organskim otapalima (faze ekstrakcije, pročišćavanja uzorka na SiOH koloni uz upotrebu organskih otapala i na kraju faza koncentriranje uzorka uparavanjem). Za identifikaciju i kvantifikaciju prisutnosti OTA u uzorcima korištena je metoda tankoslojne kromatografije (Thin Layer Chromatography – TLC, Merck, Darmstadt, Germany), a kao potvrdna metoda korištena je metoda visokoučinske tekućinske kromatografije (High Performance Liquid Chromatography – HPLC, Hewlett Packard, Waldbron, Germany).<sup>36-39</sup> Granica detekcije korištenih metoda bila je 0,02 µg/kg.

Sukladno nepravilnoj raspodjeli dobivenih rezultata, korišten je neparametrijski Man-Whitney U-test

za analizu razlika koncentracija OTA između pojedinih lokacija uzorkovanja ječma. Statistički značajnom određena je P vrijednost < 0,05. Upotrebljen je statistički softver SPSS, verzija 13.0.

### Rezultati

Koncentracija OTA u uzorcima s područja Slavnskoga Broda i Osijeka bila je statistički značajnije viša kod ječma iz 2000. godine u odnosu na ječam iz 2002. godine. U odnosu na maksimalno dozvoljenu koncentraciju (MDK) okratoksina A u žitaricama (5 µg/kg), najviše koncentracije OTA (medijan 25 µg/kg; interval pouzdanosti 20,0-25,0 µg/kg) utvrđene su u ječmu iz okolice Slavnskoga Broda, iz 2000. godine, potom u ječmu iz istog područja prikupljenom 2002. godine (medijan 20 µg/kg; interval pouzdanosti 10,0-20,0 µg/kg; p < 0,001). U uzorcima ječma iz okolice Osijeka, prosječna koncentracija OTA u uzorcima iz 2000. godine iznosila je 12,5 µg/kg (medijan 12,5 µg/kg; interval pouzdanosti 10,0-20,0 µg/kg), dok u uzorcima iz 2002. godine, kao i u uzorcima iz okolice Nove Gradiške, niti u jednom uzorku, neovisno o godini žetve, nije utvrđen OTA (Tablica 1 i 2).

Vlaga u uzorcima određivana je korištenjem međunarodno prihvaćene metode prema AOAC (sušenje na 105° C tijekom 4 h). Utvrđen je postotak vlage unutar dozvoljenih 14% u svim uzorcima studija, bez obzira na dužinu pohrane (Tablica 1).

Tablica 1. Okratoksin A (medijan, 95% CI) u uzorcima ječma s različitih lokacija prema godinama žetve (µg/kg)

Table 1. Ochratoxin A (median, 95% CI) in barely samples from different geographic locations according to years (µg/kg)

Godina Year	2000.			2002.			p-vrijednost p-value
	No	Vlaga (%) Humidity (%)	Okratoksin A Ochratoxin A	No	Vlaga (%)	Okratoksin A Ochratoxin A	
Slavonski Brod	20	10.7	25 (20.0 - 25.0)	20	10.7	20 (10.0 - 20.0)	<0.001
Osijek	20	11.2	12.5 (10.0 - 20.0)	20	10.4	0	<0.001
Nova Gradiška	20	11.4	ND	20	10.7	ND	*
Maksimalna dopuštena količina (MDK) okratoksina u žitaricama 5 je µg/kg Maximum allowed quantity of ochratoxin in cereals 5 is µg/kg							

ND – ispod granice detekcije, 95%

ND – below detection value, 95%

CI – 95% confidence interval,

CI – 95% confidence interval,

\* – nije statistički značajno

\* – not statistically significant

Tablica 2. Okratoksin A (medijan, Interkvartilni rang) u uzorcima ječma s različitih lokacija prema godinama žetve ( $\mu\text{g}/\text{kg}$ )

Table 2. Ochratoxin A (median, interquartile range) in barley samples from different geographic locations according to years ( $\mu\text{g}/\text{kg}$ )

2000. godina / year					
Podrijetlo uzoraka Sample origin	No	Okratoksin A Ochratoxin A	Statistička analiza <sup>a</sup> Statistical analysis		
			Slavonski Brod	Osijek	Nova Gradiška
Slavonski Brod	20	25.00 (20.00 - 25.00)		U = 40.50 p < 0.001	U = 0.00 p < 0.001
Osijek	20	12.50 (10.00 - 20.00)			U = 0.00 p < 0.001
Nova Gradiška	20	0.00 (0.00 - 0.00)			
2002. godina/ year					
Podrijetlo uzoraka Sample origin	No	Okratoksin A Ochratoxin A	Statistička analiza <sup>a</sup> statistical analysis		
			Slavonski Brod	Osijek	Nova Gradiška
Slavonski Brod	20	20.00 (10.00 - 20.00)		U = 12.00 p < 0.001	U = 0.00 p < 0.001
Osijek	20	0.00 (0.00 - 0.00)			U = 170.00 p = 0.75
Nova Gradiška	20	0.00 (0.00 - 0.00)			
<sup>a</sup> Mann Whitney U-Test					

## Rasprava

Kao što je i očekivano, najviše koncentracije OTA nađene su u uzorcima ječma iz Slavnskoga Broda, i to u uzorcima obje žetve (2000. i 2002. godine). U obje žetve srednja koncentracija OTA je nekoliko puta premašivala MDK od  $5 \mu\text{g}/\text{kg}$  OTA za žitarice, a prosječna koncentracija OTA premašivala je MDK također i u ječmu iz Osijeka iz 2000. godine. Zanimljivo, uzorci ječma prikupljeni u Osijeku 2002. godine i oni iz obje žetve u Novoj Gradišci nisu imali mjerljivu koncentraciju OTA.

Statistički značajno više koncentracije OTA zabilježene su u ječmu iz 2000. godine, u odnosu na 2002. godinu tumačili smo činjenicom da je 2000. godina obilovala oborinama, a što je u kombinaciji s relativno visokim temperaturama, mehaničkim oštećenjem zrna, oštećenjem zrna parazitima i insektima, te deficitom minerala tijekom rasta i dozrijevanja, moglo stvoriti povoljnije uvjete za razvoj mikotoksina.<sup>1,2,4,7,21,38-45</sup> Neki autori čak su ustvrdili da klimatske prilike u južnoj Europi pogoduju obilnijem razvoju gljivica iz roda *Aspergillus* u

odnosu na gljivice iz roda *Penicillium*, što bi po njima moglo, pogotovo uzimajući u obzir nazočnost gljivice koja se posebno pripisuje nastanku OTA (*Aspergillus ochraceus*), dovesti do veće razine OTA u odnosu na druge europske regije.<sup>17</sup>

Nalaz kontaminacije ječma OTA-om konzistentan je rezultatima prethodnog istraživanja prisutnosti OTA u pšenici i kukuruзу iz okolice Slavnskoga Broda, u odnosu na druga područja Hrvatske, provedenom 1999. i 2000. godine. Ta studija utvrdila je srednju OTA koncentraciju od  $40 \mu\text{g}/\text{kg}$  u pšenici, te  $20 \mu\text{g}/\text{kg}$  u kukuruзу. Visoka koncentracija OTA u pšenici može se pripisati tome što je pšenica češće od ostalih žitarica zaražena plijesnima koje stvaraju OTA, neovisno o godini.<sup>21,46</sup> Valja napomenuti da uzorci s područja Slavnskoga Broda (u prošlom i ovom istraživanju) nisu prikupljeni točno u endemskim selima, što ukazuje na ukupnu visoku kontaminaciju žitarica s toga područja OTA-om. Ovo razmatranje podržala je i spoznaja o povišenoj koncentraciji OTA (medijan  $8 \mu\text{g}/\text{kg}$ ) u pšenici iz Osijeka iz žetve iz 2000. godine, dok istovremeno OTA praktički nije utvrđen u kukuruзу s tog područja iste godine žetve

(2000. godine). Pri tome, područje Osijeka nije endemsko za pojavu BEN, no (neobjašnjivo) se nalaze sporadični slučajevi bolesti, a i radi se o području s relativno visokom učestalošću oboljelih od bolesti bubrega, posebno onih s kroničnom bubrenom insuficijencijom.<sup>21</sup>

Međutim, treba priznati da hipoteza o OTA kao etiološkom uzročniku BEN pati od brojnih „nedostataka“. Plijesan u hrani s posljedičnim razvojem mikotoksina, poznato je, pojavljuje se u cijelom svijetu (npr. aflatoksin u kontaminiranim namirnicama i kasniji razvoj primarnoga karcinoma jetre u nekim afričkim zemljama),<sup>1,2,4,5,13,47</sup> dok se BEN isključivo javlja u uskom zemljopisnom području balkanskoga poluotoka,<sup>14,21,22,25,26,40,46</sup> uz tek recentne studije o bolesti „sličnoj“ BEN u Tunisu.<sup>8,30-32</sup> Osim toga, studije serumskih koncentracija OTA, pri čemu su u pravilu nađene više koncentracije kod ljudi s endemskoga područja, same po sebi nisu siguran „dokaz“ hipotezi o povezanosti OTA s pojavom BEN.<sup>5,33,34,47</sup>

Sumirajući dugogodišnja istraživanja provedena s ciljem nalaženja etiološkog uzročnika BEN-e još uvijek smo, nažalost, suočeni s više pitanja nego odgovora i nekoliko hipoteza. Prva govori o virusnoj etiologiji baziranoj na izolaciji corona virusa iz tkiva bubrega uzetog biopsijom ili intraoperativno kod osoba oboljelih od BEN-a.<sup>48</sup> Druga zastupa stajalište o genetskoj predispoziciji i nađenim određenim genskim markerima kod oboljelih osoba i njihovih zdravih rođaka.<sup>49</sup> Govori se i o ležištima ugljena koja kontaminiraju izvorišta vode policikličkim aromatskim ugljikovodicima.<sup>50</sup> Ipak, osim moguće uloge aristololijske kiseline, izloženošću biljci *Aristolochia clematitis*, koja raste uz polja žitarica (što je po prvi put opisano još 1969. godine i više puta nakon toga evaluirano), i koja se teoretski može naći u brašnu i namirnicama namijenjenih ljudima,<sup>51-53</sup> ostaje nam i dalje moguća povezanost BEN-a i mikotoksina.<sup>21-26,54,55</sup>

Štoviše, nakon evaluacije moguće povezanosti OTA i BEN-e, većina autora smatra da ne može sa sigurnošću potvrditi njihovu jednoznačnu i nedvosmislenu uzročno-posljedičnu vezu, te kao moguće etiološke uzročnike spominju druge mikotoksine poput citrinina, fumonizina B<sub>1</sub> i B<sub>2</sub>, zearelonu i aflatoksina B<sub>1</sub> i G<sub>1</sub>,<sup>22-24,54,55</sup> te predlažu daljnja istraživanja u tom smislu.

Naša istraživanja (ovo i prethodno), podupiru moguću ulogu mikotoksina u nastanku BEN-a. Naime, neovisno o tome što se radi o istraživanjima provedenim prije 10, odnosno 8 godina, kod sve tri istraživane žitarice (pšenice, kukuruza, te ječma) nedvojbeno je objektivno utvrđena značajna kontami-

nacija OTA na području Slavenskog Broda, koja je višestruko veća od rezultata dobivenih s bilo kojega drugoga istraživana područja, a jednako tako bila je višestruko viša od MDK za žitarice. Kako smo, pri tome, našli da se koncentracije OTA (a zasigurno i ostalih mikotoksina) mogu na istom području značajno razlikovati od žetve do žetve (2000. godina, npr. u odnosu na 2002.), ovisno o „lokalnim uvjetima“ poput količine vlage, temperature i čitavom nizu poznatih i nepoznatih čimbenika, to svakako možemo preporučiti daljnja istraživanja koja će obuhvatiti i druge mikotoksine, a za što su sada stvorene zakonske i logističke (analitičke) pretpostavke u Republici Hrvatskoj, usklađene s regulativom Europske unije.<sup>56,57</sup>

### Literatura

1. De Koe WJ. Regulations of the European Union for Mycotoxins. Arh Hig Rada Toksikol 1999;50:37-46.
2. Bhat RV, Miler JD. Mycotoxins and food supply, FNA, (<http://www.fao.org/docrep/U3550t/u3550t0e.htm>), Pristup 10. 10. 2008.
3. Fung F, Clark RF. Health effects of mycotoxins: a toxicological overview. J Toxicol Clin Toxicol 2004; 42:217-34.
4. Boorman GA. NTP Technical Report on Toxicology and Carcinogenesis of ochratoxin A (CAS NO. 303-47-9), ([http://ntp.niehs.nih.gov/ntp/htdocs/LT\\_rpts/tr358.pdf](http://ntp.niehs.nih.gov/ntp/htdocs/LT_rpts/tr358.pdf)), Pristup 15.10.2008.
5. Department of Health, 1997 Annual Report of the Committees on Toxicity, Mutagenicity, Carcinogenicity of Chemicals in Food, Consumer Products and the Environment, (<http://cot.food.gov.uk/pdfs/cotcomcoc1997.pdf>), Pristup 20. 02. 2009.
6. Moss MO. Mycotoxin review - 1. Aspergillus and Penicillium. Mycologist 2002;16:116-9.
7. Clark HA, Snedeker SM. Ochratoxin A: its cancer risk and potential for exposure. J Toxicol Environ Health part B 2006;9:265-96.
8. Hassen W, Abid-Essafi S, Achour A, Guezzah N, Zakhama, Ellouz F, et al. Karyomegaly of tubular kidney cells in human chronic interstitial nephropathy in Tunisia: respective role of Ochratoxin A and possible predisposition. Hum Exp Toxicol 2004;23: 339-46.
9. Lebrun S, Golka K, Schultze H, Follman W. Glutathione S-transferase polymorphisms and ochratoxin A toxicity in primary human urothelial cells. Toxicology 2006;224:81-90.
10. Al-Anati L, Petzinger E. Immunotoxic activity of ochratoxin A. J Vet Pharmacol Ther 2006;29:79-90.
11. Krogh P. Role of ochratoxin A in disease causation. Food Chem Toxicol 1992;30:213-24.
12. Krogh P, Gyrd-Hansen N, Hald B, Larsen S, Nielsen JP, Smith M, et al. Renal enzyme activities in experimental ochratoxin A-induced porcine nephropathy: diagnostic potential of phosphoenolpyruvate

- carboxynase and gamma-glutamyl transpeptidase activity. *J Toxicol Environ Health* 1988;23:1-14.
13. Hald B. Porcine nephropathy. *IARC Sci Publ* 1991;115:49-56.
  14. Čević S, Hrabar A, Šarić M. Epidemiology of Balkan-endemic nephropathy. *Food Chem Toxicol* 1992;30:183-8.
  15. Domijan AM, Peraica M. Ochratoxin A in wine. *Arhiv Hig Rada Toksikol* 2005;56:17-20.
  16. Flajs D, Domijan AM, Ivić D, Cvjetković B, Peraica M. ELISA and HPLC analysis of ochratoxin A in red wines of Croatia. *Food Control* 2009;20:590-2.
  17. Blesa J, Soriano JM, Molto JC, Manes J. Factors affecting the presence of ochratoxin A in wines. *Crit Rev Food Sci Nutr* 2006;46:473-8.
  18. Battilani P, Pietri A, Bertuzzi L, Languasco L, Giorni P, Kozakiewicz Z. Occurrence of ochratoxin A-producing fungi in grapes grown in Italy. *J Food Prot* 2003;66:633-6.
  19. Otteneder H, Majerus P. occurrence of ochratoxin A (OTA) in wines: influence of the type of wine and its geographical origin. *Food Addit Contam* 2000;17:793-8.
  20. Stefanaki I, Foufa E, Tsatsou-Dritsa A, Dais P. Ochratoxin A concentrations in Greek domestic wines and dried vine fruits. *Food Addit Contam* 2003;20:74-83.
  21. Puntarić D, Bošnjir J, Šmit Z, Škes I, Baklaić Ž. Ochratoxin A in corn and wheat: Geographical association with endemic nephropathy. *Croat Med J* 2001;42:175-80.
  22. Vrabcheva T, Usleber E, Dietrich R, Martlauber E. Co-occurrence of ochratoxin A and citrinin in cereals from Bulgarian villages with history of Balkan endemic nephropathy. *J Agric Food Chem* 2000;48:2483-8.
  23. Pfohl-Leszkowitz A, Petkova-Bocharova T, Chernozemsky IN, Castegnaro M. Balkan endemic nephropathy and associated urinary tract tumours: a review on aetiological causes and potential role of mycotoxins. *Food Addit Contam* 2002;19:282-302.
  24. Domijan AM, Peraica M, Zlender V, Cvjetković B, Jurjević Z, Topolovec-Pintarić S, et al. Seed-borne fungi and ochratoxin A contamination of dry beans (*Phaseolus vulgaris* L.) in the Republic of Croatia. *Food Chem Toxicol* 2005;43:427-32.
  25. Miletić-Medved M, Domijan A-M, Peraica M. Recent data on endemic nephropathy and related urothelial tumors in Croatia. *Wien Klin Wochenschr* 2005; 117:604-9.
  26. Šarić M, Peraica M, Radić B, Lučić A. Uloga mikotoksina u etiologiji endemske nefropatije. *Arh Hig Rada Toksikol* 1997;48:113-8.
  27. Pfohl-Leszkowicz A, Tozlovanu M, Manderwille R, Peraica M, Castegnaro M, Stefanović V. Ochratoxin A – An overview on toxicity and carcinogenicity in animals and humans. *Mol Nutr Food Res* 2007;51: 61-99.
  28. Pfohl-Leszkowicz A, Castegnaro M. Further arguments in favour of direct covalent binding of Ochratoxin A (OTA) after metabolic biotransformation. *Food Addite Contam* 2005;22(Suppl 1):75-87.
  29. Manderville RA. A case for the genotoxicity of ochratoxin A by bioactivation and covalent DNA adduction. *Chem Res Toxicol* 2005;18:1091-7.
  30. Maaroufi K, Achour A, Betbeder AM, Hammami, Ellouz F, Creppy EE, et al. Foodstuff and human blood contamination by the mycotoxin ochratoxin A: correlation with chronic interstitial nephropathy in Tunisia. *Arch Toxicol* 1995;69:552-8.
  31. Maaroufi K, Achour A, Hammani M, El May M, Betbeder AM, Ellouz F, et al. Ochratoxin A in human blood in relation to nephropathy in Tunisia. *Hum Exp Toxicol* 1995;14:609-14.
  32. Abid S, Hassen W, Achour A, Skhiri H, Maaroufi K, Ellouz, et al. Ochratoxin A and human chronic nephropathy in Tunisia: is the situation endemic? *Human Exp Toxicol* 2003;22:77-84.
  33. Domijan AM, Peraica M, Fuchs R, Lučić A, Radić B, Balija M, et al. Ochratoxin A in human blood of healthy population in Zagreb. *Arh Hig Rada Toksikol* 1999;50:263-71.
  34. Vrabcheva T, Petkova-Bocharova T, Grosso F, Nikolov I, Chernozemsky IN, Castegnaro M, et al. Analysis of ochratoxin A in foods consumed by inhabitants from an area with endemic nephropathy: a 1 month follow up study. *J Agric Food Chem* 2004;21:2404-10.
  35. Castegnaro M, Canadas D, Vrabcheva T, Petkova-Bocharova T, Chernozemsky IN, Pfohl-Leszkowitz A. Balkan endemic nephropathy: role of ochratoxin A through biomarkers. *Mol Nutr Food Res* 2006;50: 519-29.
  36. Balzer I, Bogdanić Č, Pepeljnjak S. Rapid thin layer chromatography method for determining aflatoxin B1, ochratoxin A, and zearalenone in corn. *Prehrambeno-tehnološko biotehnička revija* 1991;29:65-70.
  37. Howell MV, Taylor PW. Determination of aflatoxins, ochratoxin A, and zearalenone in mixed feeds, with detection by thin layer chromatography or high performance liquid chromatography. *J Assoc Anal Chem* 1981;64:1356-63.
  38. Ruhland M, Engelard G, Shafer W, Wallnofer PR. Transformation of the mycotoxin ochratoxin A in plants: 1. Isolation and identification of metabolites formed in cell suspension culture of wheat and maize. *Nat Toxins* 1996;4:254-60.
  39. Hald B, Christensen DH, Krogh GH P. Natural occurrence of the mycotoxin viomellin in barley and associated quinone-producing penicillia. *Appl Environ Microbiol* 1983;46:1311-7.
  40. Čvorišćec D, Čević S, Boršo G, Stavljenić-Rukavina A. Endemic nephropathy in Croatia. *Clin Chem Lab Med* 1998;36:271-7.
  41. Hussein HS, Brasel JM. Toxicity, metabolism, and impact of mycotoxins on humans and animals. *Toxicology* 2001;167:101-34.
  42. Pardo E, Marin S, Sanchis V, Ramos AJ. Prediction of fungal growth and ochratoxin A production by *Aspergillus ochraceus* on irradiated barley grain as influence by temperature and water activity. *Int J Food Microbiol* 2004;95:79-88.

43. Pardo E, Sanchis V, Ramos AJ. Impact of relative humidity and temperature on visible fungal growth and OTA production of ochratoxicogenic *Aspergillus ochraceus* isolated on grapes. *Food Microbiol* 2005;22: 383-9.
44. Lindbald M, Johnsson P, Jonsson N, Lindqvist R, Olsen M. Predicting noncompliant levels of ochratoxin A in cereal grain from *Penicillium verrucosum* counts. *J Appl Microbiol* 2004;97:609-16.
45. Elmholt S. Ecology of the ochratoxin A producing *Penicillium verrucosum*: occurrence in field soil and grain with special attention to farming system and on-farm drying practices. *Biol Agric Hort* 2003;20: 311-37.
46. Čević S, Pleština M, Miletić-Medved M, Stavljenić A, Vukelić M. Epidemiological aspects of Balkan endemic nephropathy in typical focus in Yugoslavia. *IARC Sci Publ* 1991;115:5-10.
47. Tatu CA, Orem WH, Finkelman RB, Feder GL. The etiology of Balkan nephropathy: still more questions than answers. *Environ Health Perspect* 1998;106: 689-700.
48. Uzelac-Keserović B, Spasić P, Bojanić N, Dimitrijević J, Lako B, Lepšanović Z, et al. Isolation of a corona virus from kidney biopsies of endemic Balkan nephropathy patients. *Nephron* 1999;81:141-5.
49. Stefanović V. Balkan endemic nephropathy: a need for novel aetiological approaches. *QJM* 1998;91:457-63.
50. Feder GL, Radovanović Z, Finkelman RB. Relationship between weathered coal deposits and etiology of Balkan endemic nephropathy. *Kidney Int Suppl* 1991; 34:S9-11.
51. Ivić M. Etiologija endemske nefropatije. *Liječ Vjesn* 1969;91:1273-81.
52. Arlt VM, Ferluga D, Stiborova M, Pfohl-Leszkowitz A, Vukelić M, Čević S, et al. Is aristolochic acid a risk factor for Balkan nephropathy-associated urothelial cancer? *Int Cancer* 2002;101:500-2.
53. Hranjec T, Kovač A, Kos J, Mao W, Chen JJ, Grollman AP, et al. Endemic nephropathy: the case for chronic poisoning by aristolochia. *Croat Med J* 2005;46:116-25.
54. Knasmüller S, Cavin C, Chakraborty A, Darroudi F, Majer BJ, Huber WW, et al. Structurally related mycotoxins ochratoxin A, ochratoxin B, and citrinin differ in their genotoxic activities and in their mode of action in human-derived liver (HepG2) cells: implications for risk assessment. *Nutr Cancer* 2004;50: 190-7.
55. Long DT, Voice TC. Role of exposure analysis in solving the mystery of Balkan endemic nephropathy. *Croat Med J* 2007;48:300-11.
56. Republika Hrvatska. Pravilnik o toksinima, metalima, metaloidima i drugim štetnim tvarima koje se mogu nalaziti u hrani. *Narodne novine* 2008:154.
57. The Commission of the European communities, *Official Journal of the European Union*, 2006:364.