

UNTERSUCHUNGEN ZUM NACHWEIS UND ZUM VORKOMMEN VON MYKOTOXINEN UND HEMMSTOFFEN IN STUTENMILCH

MICHAEL SIXT



INAUGURAL-DISSERTATION zur Erlangung des Grades eines **Dr. med. vet.**
beim Fachbereich Veterinärmedizin der Justus-Liebig-Universität Gießen



édition scientifique
VVB LAUFERSWEILER VERLAG

Das Werk ist in allen seinen Teilen urheberrechtlich geschützt.

Jede Verwertung ist ohne schriftliche Zustimmung des Autors oder des Verlages unzulässig. Das gilt insbesondere für Vervielfältigungen, Übersetzungen, Mikroverfilmungen und die Einspeicherung in und Verarbeitung durch elektronische Systeme.

1. Auflage 2011

All rights reserved. No part of this publication may be reproduced, stored in a retrieval system, or transmitted, in any form or by any means, electronic, mechanical, photocopying, recording, or otherwise, without the prior written permission of the Author or the Publishers.

1st Edition 2011

© 2011 by VVB LAUFERSWEILER VERLAG, Giessen
Printed in Germany



édition scientifique
VVB LAUFERSWEILER VERLAG

STAUFENBERGRING 15, D-35396 GIESSEN
Tel: 0641-5599888 Fax: 0641-5599890
email: redaktion@doktorverlag.de

www.doktorverlag.de

Deckblatt : Tannenberger Stutenmilch, Dr. Paschke, Schwieberdingen

Aus dem Institut für Tierärztliche Nahrungsmittelkunde
Professur für Milchwissenschaften
der Justus-Liebig-Universität Gießen
Betreuer: Prof. Dr. Dr. habil. E. Usleber

Untersuchungen zum Nachweis und zum Vorkommen von Mykotoxinen und Hemmstoffen in Stutenmilch

INAUGURAL-DISSERTATION
zur Erlangung des Grades eines
Dr. med. vet.
beim Fachbereich Veterinärmedizin
der Justus-Liebig-Universität Gießen

eingereicht von

MICHAEL SIXT
Tierarzt aus Köln

Gießen 2011

Mit Genehmigung des Fachbereichs Veterinärmedizin
der Justus-Liebig-Universität Gießen

Dekan: Prof. Dr. M. Kramer

Gutachter: Prof. Dr. Dr. habil. E. Usleber

PD Dr. R. Hospes

Tag der Disputation: 20.04.2011

Meiner Familie

INHALTSVERZEICHNIS

Inhaltsverzeichnis	I
Tabellenverzeichnis	VI
Abbildungsverzeichnis	VIII
Abkürzungsverzeichnis	IX
1. EINLEITUNG UND FRAGESTELLUNG	1
2. SCHRIFTTUM	3
2.1 Stutenmilch als Lebensmittel	3
2.1.1 Allgemeines	3
2.1.2 Gewinnung von Stutenmilch in Deutschland	4
2.1.3 Inhaltstoffe der Stutenmilch	6
2.1.4 Vermarktung.....	8
2.2 Mykotoxine	9
2.2.1 Allgemeines	9
2.2.2 Charakterisierung der in dieser Arbeit untersuchten Mykotoxine.....	10
2.2.2.1 Aspergillen Toxine – Aflatoxine	11
2.2.2.1.1 Physikalisch-chemische Eigenschaften	11
2.2.2.1.2 Bildung und Vorkommen.....	12
2.2.2.1.3 Toxizität und Risikobewertung	13
2.2.2.1.4 Metabolismus nach oraler Aufnahme	15
2.2.2.1.5 Rechtliche Regelungen zu Aflatoxinen	16
2.2.2.2 Penicillien Toxine – Ochratoxin A (OTA).....	19

2.2.2.2.1	Physikalisch-chemische Eigenschaften	19
2.2.2.2.2	Bildung und Vorkommen	20
2.2.2.2.3	Toxizität und Risikobewertung	22
2.2.2.2.4	Metabolismus nach oraler Aufnahme	23
2.2.2.2.5	Rechtliche Regelungen zu Ochratoxin A.....	25
2.2.2.3	Fusarien-Toxine – T-2 / Deoxynivalenol / Zearalenon.....	26
2.2.2.3.1	Physikalisch-chemische Eigenschaften	26
2.2.2.3.1.1	Charakterisierung von T-2 Toxin	26
2.2.2.3.1.2	Charakterisierung von Deoxynivalenol	28
2.2.2.3.1.3	Charakterisierung von Zearalenon.....	29
2.2.2.3.2	Bildung und Vorkommen.....	31
2.2.2.3.3	Toxizität und Risikobewertung	32
2.2.2.3.3.1	T-2 Toxin	32
2.2.2.3.3.2	DON.....	33
2.2.2.3.3.3	ZEA.....	35
2.2.2.3.4	Metabolismus nach oraler Aufnahme	37
2.2.2.3.4.1	T-2 Toxin	37
2.2.2.3.4.2	DON.....	38
2.2.2.3.4.3	ZEA.....	39
2.2.2.3.5	Rechtliche Regelungen zu Fusarientoxinen	40
2.3	Nachweis von Antiinfektiva in der Stutenmilch	42
2.4	Analytische Besonderheiten bei der Untersuchung von Stutenmilch	43

3	MATERIAL UND METHODEN	44
3.1	Materialien und Geräte	44
3.1.1	Chemikalien und Biochemika	44
3.1.2	Mykotoxine	45
3.1.3	Immunreagenzien.....	45
3.1.4	Puffer und Lösungen	46
3.1.5	Geräte und Hilfsmittel	47
3.1.6	Enzymimmuntests	47
3.1.7	Hochdruckflüssigkeitschromatographie	48
3.1.8	Probenmaterial.....	48
3.2	Methoden zum Nachweis von Mykotoxinen und Hemmstoffen	50
3.2.1	Enzymimmuntest für Aflatoxin M ₁	50
3.2.2	Enzymimmuntest für Ochratoxin A.....	51
3.2.2.1	Probenvorbereitung	51
3.2.2.2	EIA.....	51
3.2.3	Enzymimmuntest für T-2 Toxin.....	52
3.2.3.1	Probenvorbereitung	52
3.2.3.2	EIA.....	53
3.2.3.2.1	EIA zum Nachweis von T-2/HT-2-Toxin unter Verwendung polyklonaler Antikörper	53
3.2.3.2.2	EIA zum Nachweis von T-2-Toxin unter Verwendung monoklonaler Antikörper	54
3.2.4	Enzymimmuntest für ZEA	55
3.2.4.1	Probenvorbereitung	55
3.2.4.2	Enzymimmuntest	55
3.2.5	HPLC-Analyse für DON und DOM ₁	56

3.2.5.1	Probenvorbereitung	56
3.2.5.2	HPLC-Analysebedingungen	57
3.2.6	HPLC für ZEA.....	57
3.2.6.1	Probenvorbereitung	57
3.2.6.2	HPLC-Analysebedingungen	58
3.2.7	Mikrobiologischer Nachweis von Antiinfektiva (Hemmstoffe).....	58
3.2.7.1	Brillantschwarz-Reduktionstest.....	59
3.2.7.2	Beta-Star	60
3.2.7.3	Ampicillin-EIA	60
4.	ERGEBNISSE	62
4.1	Aflatoxin M₁	62
4.2	Ochratoxin A.....	63
4.3	T-2 Toxin	64
4.4	DON.....	67
4.5	ZEA	70
4.6	Nachweis von Antiinfektiva	75
5.	DISKUSSION.....	76
5.1	Vorkommen von Mykotoxinen in Stutenmilch.....	78
5.2	Vorkommen von Hemmstoffen in Stutenmilch	81
5.3	Abschätzung der Mykotoxinaufnahme durch Stutenmilch in Relation zur tolerierbaren Tagesaufnahme	81
5.4	Schlussfolgerungen	84

6.	ZUSAMMENFASSUNG	85
7.	SUMMARY	87
8.	LITERATURVERZEICHNIS.....	89
	DANKSAGUNG	112
	ERKLÄRUNG	113

TABELLENVERZEICHNIS

Tab. 1:	Anforderungen monatlicher Stichprobenkontrollen an Vorzugsmilch von Stuten gemäß der Anlage 9 der Tierischen Lebensmittel-Hygieneverordnung	5
Tab. 2:	Übersicht über die Zusammensetzung der Milch verschiedener Spezies (nach MALACARNE et al., 2002).....	6
Tab. 3:	Zusammensetzung der Molkeproteine bei den verschiedenen Spezies (nach MALACARNE et al., 2002).....	7
Tab. 4:	Chemisch-physikalische Charakteristiken von Aflatoxin M ₁	11
Tab. 5:	Aflatoxin B ₁ -Grenzwerte in Futtermitteln nach FuttMV (Stand 22.07.10)	17
Tab. 6:	Chemisch-physikalische Charakteristika von OTA	19
Tab. 7:	Richtwerte zu Mykotoxinbelastungen in Futtermitteln (aus EG 576/2006)	25
Tab. 8:	Chemisch-physikalische Charakteristika von T-2 Toxin	27
Tab. 9:	Chemisch-Physikalische Charakteristika von DON.....	28
Tab. 10:	Auflistung der Seitenketten von DON und einiger anderer Vertreter der Typ B-Trichothecene.....	29
Tab. 11:	Chemisch-physikalische Eigenschaften von ZEA	29
Tab. 12:	Seitenketten von ZEA und einiger Analoga.....	29
Tab. 13:	Richtwerte zu Mykotoxinbelastung in Futtermitteln.....	41
Tab. 14:	Verwendete Antiseren, Toxin-HRP-Konjugate und Toxin-Standards zum enzymimmunologischen Nachweis von OTA.....	52
Tab. 15:	Verwendete Antiseren, Toxin-HRP-Konjugate und Toxin-Standards des polyklonalen EIA zum Nachweis von T-2/HT-2.....	53
Tab. 16:	Verwendete Antiseren, Toxin-HRP-Konjugate und Toxin-Standards des monoklonalen EIA zum Nachweis von T-2.....	54
Tab. 17:	Verwendete Antiseren, Toxin-HRP-Konjugate und Toxin-Standards zum enzymimmunologischen Nachweis von ZEA	55
Tab 18:	Verwendete Antiseren, HRP-Konjugate und Antibiotika-Standards zum enzymimmunologischen Nachweis von Ampicillin.....	61
Tab 19:	Übersicht über die Ergebnisse des Aflatoxin M ₁ -EIAs für künstlich mit Aflatoxin M ₁ kontaminierten Stutenmilchproben	63
Tab. 20:	Wiederfindung von künstlich mit Ochratoxin A kontaminierten Proben	64

Tab. 21:	Vergleichende Darstellung der Ergebnisse des Enzymimmuntests für T-2/ HT-2 (polyklonale Antikörper) bzw. T-2 Toxin (monoklonale Antikörper)	66
Tab. 22:	Wiederfindung von T-2-Toxin in künstlich kontaminierten Stuten- milchproben.....	67
Tab. 23:	Ergebnisse für vier Stutenmilchproben mit positiven Befunden für DON und DOM ₁	67
Tab. 24:	Übersicht über die künstlich mit DON kontaminierten Proben	70
Tab. 25:	Relative Kreuzreaktionen verschiedener ZEA-Analoga im EIA unter Verwendung von ZEA-Antiserum	71
Tab. 26:	Wiederfindung von ZEA in künstlich kontaminierten Stutenmilchproben.....	72
Tab. 27:	Vergleich von Untersuchungen mittels HPLC und EIA	72
Tab. 28:	Modellberechnung eines „worst case-Szenarios“ zur Abschätzung der maximalen Mykotoxinaufnahme durch Stutenmilch in Relation zur tolerierbaren Tagesaufnahme (TDI), bei einem täglichen Verzehr von 0,25 Litern und einem Körpergewicht von 75 kg	83

ABBILDUNGSVERZEICHNIS

Abb. 1:	Strukturformeln einiger Aflatoxine	12
Abb. 2:	Chemische Struktur von Ochratoxin A	20
Abb. 3:	Metabolisierung des Mykotoxins Ochratoxin A <i>in vivo</i>	24
Abb. 4:	Strukturformel von T-2 Toxin und HT-2 Toxin.....	26
Abb. 5:	Strukturformel des Typ B-Trichothecengerüsts	28
Abb. 6:	Grundgerüst von ZEA	30
Abb. 7:	De-epoxidation von DON zu DOM ₁ , dem Hauptmetaboliten in Milch laktierender Kühe	33
Abb. 8:	Chemische Strukturen von Zearalenon und seinen Derivaten	36
Abb. 9:	Mögliche Stoffwechselwege des T-2 Toxins	37
Abb. 10:	Übersicht der Standorte der in die Untersuchung einbezogenen Betriebe	49
Abb. 11:	Charakteristische Standardkurve des kompetitiven EIA zum Nachweis von Aflatoxin M ₁	62
Abb. 12:	Charakteristische Standardkurve des kompetitiven EIA zum Nachweis von Ochratoxin A	63
Abb. 13:	Charakteristische Standardkurve des kompetitiven EIA zum Nachweis von T-2/HT-2-Toxin.....	65
Abb. 14:	HPLC-UV-Chromatogramm einer DON/DOM ₁ -Standardmischung	68
Abb. 15:	HPLC-UV-Chromatogramm einer natürlich kontaminierten Stuten- milchprobe.....	68
Abb. 16:	HPLC-UV-Chromatogramm einer künstlich mit DON und DOM ₁ kontaminierten Stutenmilchprobe (2,5 ng/ml)	69
Abb. 17:	HPLC-UV-Chromatogramm einer für DON und DOM ₁ negativen (<0,5 ng/ml) Stutenmilchprobe	69
Abb. 18:	Messwerte des Enzymimmuntests für ZEA in Stutenmilch, chronologische Sortierung nach Probennummern.....	70
Abb. 19:	Charakteristische Standardkurve des kompetitiven EIA zum Nachweis von Zearalenon	71
Abb. 20:	Chromatogramm einer ZEA-Standardlösung.....	73
Abb. 21:	Chromatogramm einer künstlich mit ZEA und Analoga kontaminierten Stutenmilch	73
Abb. 22:	Chromatogramm einer ZEA-freien Stutenmilch.....	74

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

%	Prozent
§	Paragraph
°C	Grad Celsius
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
α	Alpha
β	Beta
λ	Lamda
Abb.	Abbildung
AE	Aktivester
Afla	Aflatoxin
AFR ₀	Aflatoxicol
Ampi	Ampicillin
Aqua dest.	Aqua destillata, destilliertes Wasser
ATA	Alimentäre Toxische Aleukie
B/B ₀ x100	relative prozentuale Extinktion
BEN	Balkan Endemic Nephropathy
BRT	Brillantschwarz-Reduktionstest
bzw.	beziehungsweise
c	Anzahl der Probeneinheiten einer Stichprobe, deren Werte über m oder zwischen m und M liegen
COX	Cyclooxygenase
d	day, Tag
DAD	Diodenarraydetektor
DHFF	Dihydrofuranofurane
DON	Deoxynivalenol
DOM ₁	De-epoxy-Deoxynivalenol
E. coli	Escherichia coli
EFSA	European Food Safety Authority, Europäische Behörde für Lebensmittelsicherheit
EG	Europäische Gemeinschaft
EIA	Enzyme Immunoassay, Enzymimmuntest

et al.	et alii, und Mitarbeiter
EU	Europäische Union
FAO	Food and Agriculture Organisation of the United Nations, Welternährungsorganisation
FuttMV	Futtermittelverordnung
g	Gramm
h	hora, Stunde
H ₂ O ₂	Wasserstoffperoxid
HPLC	High Performance Liquid Chromatography Hochleistungsflüssigchromatographie
HRP	Horseradish Peroxidase, Meerrettichperoxidase
HS	Hemisuccinat
HSD	Hydroxysteroiddehydrogenase
HT-2	HT-2-Toxin
IAC	Immunitätsaffinitätssäule
IARC	International Agency for Research on Cancer, Internationale Agentur für Krebsforschung
Ig	Immunglobulin
IL	Interleukin
JECFA	Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives
JLU	Justus-Liebig-Universität
k.A.	keine Angabe
kg	Kilogramm
KGW	Kilogramm Körpergewicht
LD ₅₀	mittlere letale Dosis
m	Schwellenwert
M	Grenzwert
max.	maximal
MeOH	Methanol
mg	Milligramm
ml	Milliliter
MPN	Mycotoxic Porcine Nephropathy
n	Anzahl der Probeneinheiten einer Stichprobe; Anzahl der untersuchten Proben

ng	Nanogramm
n.b.	nicht bestimmt
Nr.	Nummer
OTA	Ochratoxin A
p.a.	pro analysi, Reinheitsgrad für Chemikalien
PBS	phosphate buffered saline, Natriumphosphatpuffer
pH	Pondus Hydrogenii, negativ dekadischer Logarithmus der Wasserstoffionenkonzentration in Mol pro Liter
PUFA	Polyunsaturated fatty acid, mehrfach ungesättigte Fettsäuren
S.	Seite
SCF	Scientific Committee on Food
SCAN	Scientific Committee on Animal Nutrition
TDI	Tolerable Daily Intake, tolerierbare tägliche Aufnahme
TNF	Tumornekrosefaktor
TWI	Tolerable Weekly Intake, tolerierbare wöchentliche Aufnahme
T-2	T-2-Toxin
Tab.	Tabelle
UDPGT	Uridin-diphosphat-glucuronyl-transferase
VK	Variationskoeffizient
VO	Verordnung
v/v	Volumen per Volumen
WHO	World Health Organisation, Weltgesundheitsorganisation
z.B.	zum Beispiel
ZEA	Zearalenon

1. EINLEITUNG UND FRAGESTELLUNG

Im Vergleich zur Kuhmilch stellt Stutenmilch in Deutschland unter ökonomischen Gesichtspunkten eine fast vernachlässigbare Größe dar. Dennoch ist die lebensmittelhygienische Beschäftigung mit diesem Lebensmittel in mehrfacher Hinsicht von Interesse.

Beispielsweise unterscheidet sich die Gewinnung und Vermarktung von Stutenmilch deutlich von der Milch von Wiederkäuern. So wird Stutenmilch fast ausschließlich als Rohmilch und damit als Vorzugsmilch vermarktet, was mit besonderen rechtlichen Rahmenbedingungen verbunden ist. Aus lebensmittelhygienischer Sicht war Stutenmilch *de facto* nicht spezifisch geregelt. Erst in jüngster Zeit sind im Zuge der Neuregelung des europäischen Lebensmittelrechts spezifische mikrobiologische Kriterien für die Vermarktung von Stutenmilch als Vorzugsmilch (Rohmilch) festgelegt worden.

Noch unbefriedigender ist die Situation bei der Kontrolle von Rückständen und Kontaminanten in Stutenmilch zu sehen. Obwohl Untersuchungen auf derartige unerwünschte Substanzen eigentlich vorgeschrieben wären, fehlen bisher sogar die erforderlichen validierten Untersuchungsmethoden. Monitoring-Untersuchungen zur Schadstoffbelastung (Rückstände, Kontaminanten) von Stutenmilch wurden bisher nicht publiziert, auch was das möglich carry-over von Kontaminanten aus Futtermitteln in die Milch betrifft sind so gut wie keine spezifischen Daten verfügbar. Dies liegt auch daran, dass Stutenmilch analytisch einige Besonderheiten aufweist. Einfache Screeningtests, wie sie für zahlreiche Analyten bei Kuhmilch etabliert wurden, können aufgrund der abweichenden Zusammensetzung der Stutenmilch oft nicht direkt angewendet werden. Zudem sind für das Pferd als Monogastrier andere Resorptions- und Metabolisierungsschritte bei Kontaminanten möglich, auch bei der Ausscheidungsdauer von Tierarzneimitteln in die Milch sind Unterschiede zum Wiederkäuer möglich.

Ziel der Arbeit war es daher, in einer ersten Monitoringstudie Daten zur Belastung von Stutenmilch in Deutschland mit Mykotoxinen sowie zu Rückständen antimikrobiell wirksamer Substanzen (Hemmstoffe) zu ermitteln. Dazu wurde Stutenmilch aus verschiedenen Regionen Deutschlands auf die Mykotoxine Aflatoxin M₁ (AFM₁), Deoxynivalenol (DON), Ochratoxin A (OTA), T-2/HT-2 Toxin und Zearalenon (ZEA)

untersucht, wobei Enzymimmuntests und HPLC-Verfahren eingesetzt wurden. Zur Untersuchung auf Hemmstoffe wurde ein neuartiger mikrobiologischer Hemmstofftest sowie ein Enzymimmuntest für Penicilline eingesetzt. Alle Verfahren wurden zunächst bezüglich ihrer Anwendbarkeit geprüft, modifiziert und validiert, insbesondere war die Erarbeitung geeigneter Probenvorbereitungsverfahren erforderlich.

2. SCHRIFTTUM

2.1 Stutenmilch als Lebensmittel

2.1.1 Allgemeines

Stutenmilch dient bereits seit Jahrhunderten den Menschen Zentralasiens als Grundnahrungsmittel. Traditionell wird dort durch Fermentation von Stutenmilch der sogenannte Kumys produziert und dient nicht nur den nomadisierenden Reitvölkern als Nahrungsmittel (MALACARNE et al., 2002).

In historischen Berichten findet Stutenmilch bzw. Kumys immer wieder Erwähnung, wobei es sich größtenteils um mystische Betrachtungsweisen oder vorwissenschaftliche Naturbetrachtungen handelt.

Als Heilmittel haben Stutenmilch und Kumys vor circa 150 Jahren Eingang in die Medizin Zentralasiens gefunden. Wissenschaftlich gesicherte Belege hierzu existieren jedoch nicht. So gab es in der Sowjetunion 1962 bis zu 50 sogenannte Kumyssanatorien mit bis zu 11.000 Patientenplätzen, für deren Versorgung 3500 Stuten sorgten (STORCH, 1985). In den 80er Jahren gab es allein in Kasachstan zehn Kumys-Heilstätten. Man therapierte dort Magen- und Darmerkrankungen, Blutarmut, Erschöpfungszustände, Lungentuberkulose sowie chronische Leber- und Hautentzündungen (STORCH, 1985; ZOEGE VON MANTEUFFEL, 1990). Im Jahre 1976 wurden in staatlich-genossenschaftlichen Farmen bis zu 100.000 Tonnen Kumys produziert, mit steigender Tendenz (STORCH, 1985).

Noch heute ist der Verzehr von Kumys in weiten Teilen Osteuropas und im asiatischen Raum stark verbreitet, allerdings wird Kumys heute meist industriell hergestellt (MALACARNE et al., 2002).

In Deutschland ist die Verwendung von Stutenmilch als Lebensmittel wenig verbreitet, sie gewinnt in letzter Zeit jedoch an Bedeutung. Seit den 60er Jahren wird Stutenmilch auch in Deutschland bei Neurodermitis und Magen-Darm-Erkrankungen sowie bei Menschen mit Kuhmilchallergie eingesetzt (MALACARNE et al., 2002). So berichten BUSINCO et al. (2000), dass Kinder mit Kuhmilchallergie im Hauttest (skin prick test) weniger starke Reaktionen nach Provokation mit Stutenmilch zeigten.

2.1.2 Gewinnung von Stutenmilch in Deutschland

Nach Angaben des Bundesverbands deutscher Stutenmilcherzeuger (BVDS) gibt es circa 25 aktive Stutenmilchproduzenten in Deutschland. Die meisten Betriebe erzeugen jedoch lediglich im Nebenerwerb mit fünf bis 15 Stuten Milch, da die Erzeugung von Stutenmilch sehr aufwändig und der Absatz begrenzt ist.

Die Stuten werden meist ab der dritten bis sechsten Woche nach dem Fohlen zwei bis dreimal täglich gemolken. Die Fohlen werden in dieser Zeit separiert. Danach steht die Milch wieder dem Fohlen zur Verfügung. Eine vollständige Trennung von Stute und Fohlen, wie es beim Rind üblich ist, ist nicht möglich, da die Stute sonst permanent alle zwei Stunden gemolken werden müsste, ansonsten würde der Milchfluss innerhalb weniger Tage versiegen. In Deutschland werden zur Stutenmilchgewinnung hauptsächlich Haflinger, Kaltblüter oder Russische Lastenpferde eingesetzt, teilweise aber auch andere Warmblutpferde.

Der Melkvorgang bei der Stute ist deutlich komplizierter als bei der Kuh. Stuten besitzen nur zwei sehr kurze Zitzen und ein relativ kleines Euter, das circa zwei bis drei Liter Milch enthält. Gemolken werden die Stuten daher meist mit speziellen Eimermelkanlagen (STORCH, 1969), nur wenige Erzeuger melken mit der Hand. Viele Erzeuger besitzen einen erhöhten Melkstand, in den eine Stute nach der anderen geführt wird und dort auch während des Melkens ihre Kraftfutterportion erhält.

Die Milchleistung der Stute variiert je nach Rasse und wird in der Literatur mit 2000-3500 kg pro Laktation angegeben (LEGEL, 1993). Diese Werte wurden von den in die eigenen Untersuchungen einbezogenen Erzeugern bestätigt.

Nach dem Melken wird die Milch in der Regel lediglich filtriert, abgepackt und bei -18 °C bis -30 °C schockgefroren. Daher ist eine einwandfreie Hygiene während der Gewinnung und Verarbeitung essentiell. Da Stutenmilch nicht wärmebehandelt wird und auch kein anderes Verfahren zur Keimabtötung eingesetzt wird, unterliegt sie den Vorschriften bezüglich Vorzugsmilch (Tierische Lebensmittelhygiene-Verordnung Anlage 9). Explizite Erwähnung im Kontext der Vorzugsmilch findet die Stutenmilch jedoch erst seit 2007 mit der Durchführungsverordnung zum Lebensmittelhygienerecht. Aufgrund dieser Vorschriften muss die Stutenmilch in Hinsicht auf Gewinnung, Behandlung und Beschaffenheit zusätzliche

Anforderungen gegenüber herkömmlicher Rohmilch (die einer Wärmebehandlung unterzogen wird) erfüllen.

So sind die Tiere z.B. monatlich von einem Tierarzt klinisch zu untersuchen. Monatlich müssen zytologische Untersuchungen von Einzelgemelken durchgeführt werden, bei Stutenmilch muss ab einem Gehalt an somatischen Zellen von 10.000 pro ml (Rind : 250.000/ml) eine bakteriologische Untersuchung von Hälftengemelksproben erfolgen. Für die Verarbeitung gelten ebenfalls strengere Richtlinien. In Tabelle 1 ist eine Übersicht zu den weiteren Anforderungen an Vorzugsmilch aufgeführt.

Tabelle 1: Anforderungen monatlicher Stichprobenkontrollen an Vorzugsmilch von Stuten gemäß der Anlage 9 der Tierischen Lebensmittel-Hygieneverordnung

Parameter	Grenzwerte		Probennahmeplan	
	m	M	n	c
Keimzahl/ml bei +30°C	20.000	50.000	5	2
Enterobacteriaceae/ml bei +30°C	10	100	5	2
Koagulase-positive Staphylokokken/ml	10	100	5	2
Salmonellen in 25 ml	0	0	5	0

Pathogene Mikroorganismen oder deren Toxine dürfen in der Milch nicht in Mengen vorhanden sein, die die Gesundheit des Verbrauchers beeinträchtigen können.

Hämolisierende Streptokokken dürfen bei einer monatlich durchzuführenden Kontrolle in 1 ml Milch nicht nachweisbar sein.

Bei der sensorischen Kontrolle der Milch dürfen keine Abweichungen erkennbar sein.

m=Schwellenwert; M=Höchstwert; n=Anzahl der Probe; c=Anzahl der Proben zwischen m und M

An dieser Stelle sei darauf hingewiesen, dass Eselsmilch von dieser Verordnung nicht miterfasst wird. Insbesondere in Italien wird derzeit die Vermarktung von Eselsmilch als Lebensmittel geprüft (POLIDORI et al, 2009).

Wie bei der Erzeugung von Rohmilch anderer Tierarten muss auch der Eutergesundheit bei zur Milchgewinnung verwendeten Stuten besondere Beachtung geschenkt werden (SCHÜPPEL & KNY, 2001), auch wenn bei der Stute im Vergleich zum Rind Mastitis keine so große Rolle spielt (BOSTEDT, 1994). Die Erhöhung der Zellzahl ist auch hier ein

deutliches Anzeichen für das Vorliegen einer Euterinfektion, wobei für die Stutenmilch (Bestandsmilch) keine Grenzwerte existieren. KNY (1998) stellte bei den von ihm untersuchten Stutenmilchproben in 80% der Proben Zellgehalte < 50.000 pro Milliliter fest. Die Keimgehalte lagen bei 90% der Proben bei < 30.000 Keime pro Milliliter.

2.1.3 Inhaltstoffe der Stutenmilch

Im Vergleich zu Muttermilch oder Kuhmilch enthält Stutenmilch einen geringen Energie- und Fettgehalt. Der Laktosegehalt, der Gesamtprotein-, Nicht-Protein-Stickstoff- (NPN-) sowie der Mineralstoffgehalt sind dem der Muttermilch ähnlich. Tabelle 2 fasst die durchschnittliche Zusammensetzung der Stutenmilch zusammen.

Im Vergleich zwischen Kuhmilch und Stutenmilch zeigt sich ein Casein-Molkeproteinverhältnis der Stutenmilch von nahezu 1:1 (Muttermilch 1:2) im Gegensatz zur Kuhmilch mit 4:1. Dies führt dazu, dass sowohl Stuten- als auch humane Milch bei Ansäuerung weich und feinflockig ausfällt. Nach Ansicht von SCHUBERT (1999) belastet dies den Magen weniger und trägt zu einer besseren Verträglichkeit bei, da so ein schnellerer Transport in den Dünndarm erfolgt.

Tabelle 2: Übersicht über die Zusammensetzung der Milch verschiedener Spezies (nach MALACARNE et al., 2002)

	Stutenmilch	Muttermilch	Kuhmilch
Fett (g/kg^{-1})	12,1	36,4	36,1
Protein (g/kg^{-1})	21,4	14,2	32,5
Molkeproteine (g/kg^{-1})	8,3	7,6	5,7
Casein (g/kg^{-1})	10,7	3,7	25,1
NPN x 6,38 (g/kg^{-1})	2,4	2,9	1,7
Lactose (g/kg^{-1})	63,7	67,0	48,8
Gesamtenergie (kcal/kg^{-1})	480	677	674

Stutenmilch enthält einen großen Anteil an Molkeproteinen und neben α -lactalbumin auch relativ viel β -lactoglobulin (Tabelle 3).

Sowohl Stuten- als auch humane Milch enthalten ein antimikrobielles Abwehrsystem bestehend aus Lysozym und Lactoferrin. In Kuhmilch basiert die antimikrobielle Aktivität fast ausschließlich auf den Immunglobulinen, die allerdings in hohen Konzentrationen nur im Kolostrum enthalten sind.

Tabelle 3: Zusammensetzung der Molkeproteine bei den verschiedenen Spezies (nach MALACARNE et al., 2002)

	Stutenmilch	Muttermilch	Kuhmilch
β -lactoglobulin (%)	30,8	nicht vorhanden	20,1
α -lactalbumin (%)	28,6	42,4	53,6
Immunglobuline (%)	19,8	18,2	11,7
Serumalbumin (%)	4,5	7,6	6,2
Lactoferrin (%)	9,9	30,3	8,4
Lysozym (%)	6,6	1,7	Spuren

Hinsichtlich des Fettsäuremusters zeichnet sich die Stutenmilch durch einen hohen Anteil (55%) an mehrfach ungesättigten, essentiellen Fettsäuren (PUFA) wie z.B. Linol-, Linolen- und Arachidonsäure (STORCH, 1985) aus.

Stutenmilch weist verschiedenen Untersuchungen zufolge meist einen niedrigen Gehalt an Mikroorganismen auf, in der Regel beträgt die Gesamtkeimzahl weniger als 10.000 Keime je ml (ZOEGER VON MANTEUFFEL, 1989). Stutenmilch enthält in hohen Konzentrationen antimikrobiell wirksame Proteine, insbesondere das Lysozym. Der Lysozymgehalt liegt bei 80 mg/100ml (Humanmilch 50mg/100ml; Kuhmilch 13 mg/100ml) (DOREAU & BOULOT, 1989). Lysozym ist ein wichtiger humoraler Faktor des unspezifischen Abwehrsystems und besitzt die Fähigkeit, Bakterienzellwände aufzulösen (HATZIPANAGIOTOU, 1998). Somit wirkt es bakterizid, vornehmlich gegen gramnegative Keime wie *E.coli*. SCHUBERT (1999) leitet daran ab, dass dadurch die Vermehrung von Bifidusbakterien im Darm gefördert wird. Der Gehalt an Vitamin A (0,08 mg/100ml) und Vitamin C (13 mg/100ml) der Stutenmilch ist relativ hoch, der Vitamin C-Gehalt ist sogar dem von frischen Obst und Gemüse vergleichbar. Des Weiteren enthält Stutenmilch hohe Gehalte an Immunproteinen wie z.B. IgA, das nur zu einem geringen Anteil resorbiert wird. Seine möglichen Wirkungen auf die Schutzmechanismen der Darmmukosa sind noch nicht geklärt.

Lactoferrin ist ein Eisen-Transportprotein und ebenfalls in hohen Konzentrationen enthalten. Durch seine Eisenbindungskapazität hindert es pathogene Mikroorganismen an deren Eisenversorgung und wirkt somit auch antimikrobiell. Es wird von proteolytischen Enzymen nur wenig angegriffen und entfaltet seine Wirkung somit im gesamten Darm.

2.1.4 Vermarktung

Stutenmilch wird in Deutschland fast ausschließlich als Rohmilch und daher unter den Regelungen der Vorzugsmilch vermarktet. Der größte Teil der produzierten Stutenmilch wird nach der Gewinnung filtriert, in 250 ml Verpackungen schockgefroren und direkt an den Verbraucher abgegeben. Dabei werden Preise von circa zehn Euro pro Liter erzielt. Teilweise wird durch Gefriertrocknung Milchtrockenpulver hergestellt. Kumys oder andere fermentierte Stutenmilcherzeugnisse werden in Europa nur selten produziert. Eine weitere Verwendung findet Stutenmilch in der Kosmetikindustrie, eine Reihe unterschiedlicher Pflegeprodukte, wie z.B. Stutenmilchseife, -haarshampoo, -kurbad, -tagescreme und -nachtscreme werden aus Stutenmilch hergestellt.

2.2 Mykotoxine

2.2.1 Allgemeines

Unter dem Begriff Mykotoxine werden die von Schimmelpilzen gebildeten sekundären Stoffwechselprodukte zusammengefasst, die für Mensch und Tier toxische Wirkungen haben (FINK-GREMMELS, 1994). Mykotoxine sind in der Natur weit verbreitet und vor allem in pflanzlichen Lebensmitteln, teilweise aber auch in Lebensmitteln tierischen Ursprungs wie z.B. in Milch zu finden.

Im Gegensatz zu Metaboliten des Primärstoffwechsels sind Mykotoxine nicht bei allen Schimmelpilzen zu finden, sie werden meist nur in Abhängigkeit von bestimmten Temperatur- und Feuchtigkeitsbedingungen oder reichlichem Nährstoffangebot, bzw. nur in bestimmten Phasen des Lebenszyklus gebildet. Oft entsteht dabei nicht nur eine Substanz, sondern eine Vielzahl von verwandten Verbindungen.

Je nach Art des Mykotoxins stehen bezüglich seiner Schadwirkungen genotoxische, kanzerogene, nephrotoxische, pseudo-östrogene, immunsuppressive und allgemein zytotoxische Wirkungen im Vordergrund.

Mykotoxine sind häufig weitgehend hitzestabil und werden daher bei der Nahrungsmittel- und Futterherstellung in der Regel nicht zerstört.

Bekannt sind heute ungefähr 300 Mykotoxine, von denen circa 20 in gesundheitsrelevanten Mengen und Häufigkeiten in Lebensmitteln gefunden werden (STEYN, 1995).

Mit der Entdeckung der Aflatoxine in den 60er Jahren, nachdem 1961 Tausende von Truthähnen in England verstorben waren (Turkey X-Diseases), begann die Entwicklung der modernen Mykotoxinforschung (RICHARD, 2007).

Sehr spekulativ werden heute hinter vielen historischen Katastrophen der Menschheit Mykotoxine als Auslöser vermutet. Beispielsweise soll die letzte der Ägyptischen Plagen (Tod der Erstgeborenen) durch Mykotoxine ausgelöst worden sein. Das aus dem Mittelalter bekannte Antonius-Feuer ist auf eine Vergiftung mit Ergotalkaloiden zurückzuführen (RICHARD, 2007). Die nach dem Zweiten Weltkrieg in Asien aufgetretene Alimentäre Leukämie wird mit einer T-2 Toxin Vergiftung in Verbindung gebracht (STEYN, 1995).

2.2.2 Charakterisierung der in dieser Arbeit untersuchten Mykotoxine

Im Kontext dieser Arbeit sollen nur einige ausgewählte Aspekte der jeweiligen Mykotoxine besprochen werden. Für vertiefende Betrachtungen sei auf Übersichtsarbeiten, wie die der EFSA und der JECFA verwiesen (CANADY et al., 2001; EFSA, 2004a; EFSA, 2004b; EFSA, 2004c; EFSA, 2004d; EFSA, 2006; WHO, 2000).

2.2.2.1 Aspergillen Toxine – Aflatoxine

2.2.2.1.1 Physikalisch-chemische Eigenschaften

Aflatoxine sind Difuranocumarine mit einem heterocyclischen Grundgerüst aus fünf Ringen. Die am häufigsten vorkommenden Aflatoxine sind die Dihydrofuranofurane (DHFF) B₁, G₁ sowie (als B₁-Metabolit) M₁ (MÜCKE & LEMMEN, 2004).

Die DHFF-Verbindungen (B₁, G₁, M₁ sowie die reduzierte Form Aflatoxicol(AFR₀)) weisen eine 8,9-Vinylether-Doppelbindung auf, die in der Säugerzelle durch mikrosomale Enzyme auch zu einem kanzerogenen Epoxid metabolisiert werden kann. Dieser Vorgang findet bevorzugt in der Leber statt (STEIMER, 1989).

Aflatoxin M₁ wurde als Hauptmetabolit von Aflatoxin B₁ in der Milch laktierender Kühe und Schafe nachgewiesen (HOLZAPFEL et al., 1966).

In Tabelle 4 sind einige chemisch-physikalische Charakteristiken von Aflatoxin M₁ aufgeführt (Angaben nach IARC, 2002). Die Strukturformeln einiger Aflatoxine sind in Abbildung 1 dargestellt.

Tabelle 4: Chemisch-physikalische Charakteristiken von Aflatoxin M₁

Summenformel:	C ₁₇ H ₁₂ O ₇
Chemisch-wissenschaftlicher Name:	(6aR,9aR)-2,3,6a,9a-Tetrahydro-9a-hydroxy-4-methoxycyclopenta[c]furo[3',2':4,5]furo[2,3-h][l]benzopyran-1,11-dione (9CI)
Synonyme:	4-Hydroxyaflatoxin B ₁ ; (6aR-cis)-2,3,6a,9a-tetrahydro-9a-hydroxy-4-methoxycyclopenta[c]furo[3',2':4,5] furo[2,3-h][l]benzopyran-1,11-dione
Molekulargewicht:	328,3
Max. Absorption in Ethanol:	226 (265/357) nm
Schmelzpunkt:	299 °C

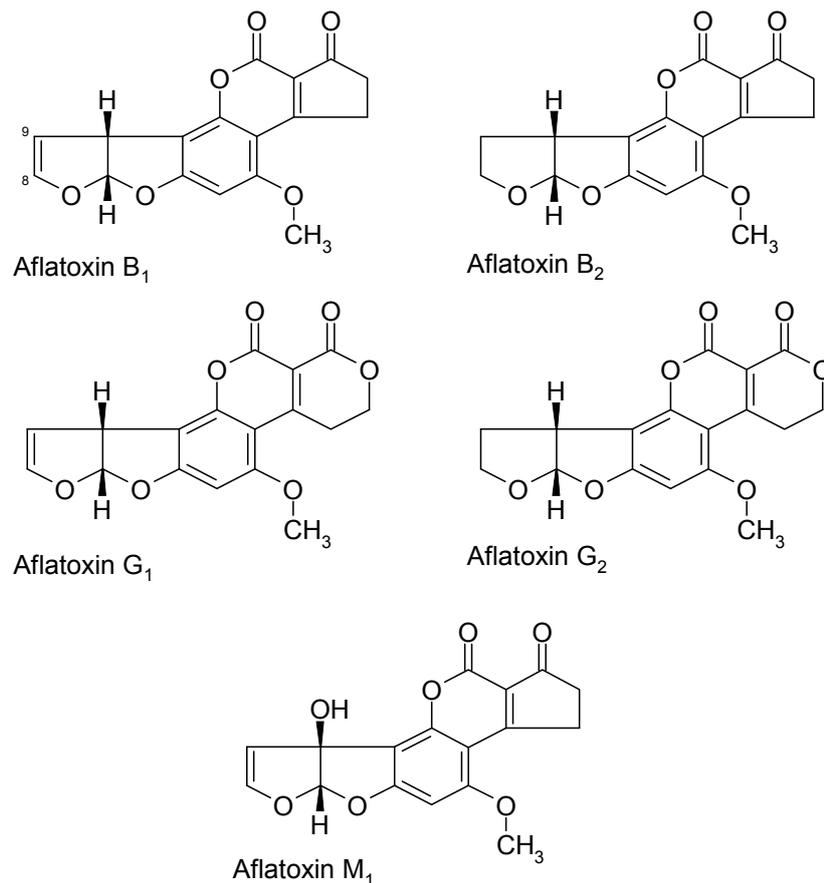


Abbildung 1: Strukturformeln einiger Aflatoxine

2.2.2.1.2 Bildung und Vorkommen

Aflatoxine sind sekundäre Stoffwechselprodukte von *Aspergillus flavus*, *A. parasiticus* und in seltenen Fällen auch *A. nomius*. *A. parasiticus* ist an ein Wachstum im Erdreich adaptiert, während *A. flavus* eher auf den oberirdischen Pflanzenteilen (Stengel, Blüten) wächst. Sie werden sowohl auf dem Feld als auch bei unsachgemäßer Lagerung (Temperatur, hohe Feuchtigkeit) produziert (PRANDINI et al., 2009). Die Toxinproduktion erfolgt im Temperaturoptimum von 20 bis 30 °C.

Bekannt sind über 20 verschiedene Toxine des Aflatoxin-Typs, doch treten als Kontaminanten von pflanzlichen Lebensmitteln vor allem Aflatoxin B₁, B₂, G₁, und G₂ auf. In Bezug auf Vorkommen und Toxizität spielt das Aflatoxin B₁ die wichtigste Rolle (WOGAN, 1966; IARC, 1993). Als Folgeprodukt einer Entgiftungsreaktion bzw. Hydroxylierungsreaktion entsteht Aflatoxin M₁, das bei laktierenden Säugern einschließlich dem Menschen in die Milch gelangt, wenn diese mit Aflatoxin B₁ kontaminierte Nahrungs- bzw. Futtermittel zu

sich genommen haben (RICHARD, 2007). Studien bei laktierenden Stuten liegen jedoch, mit Ausnahme der Untersuchungen von BLÜTHGEN, 2007, nicht vor.

Aflatoxine (B, G) werden meist nur in Erzeugnissen aus tropischen oder subtropischen Regionen nachgewiesen, wie z.B. in Erdnüssen, Kokosnusskernen, Palmkernen, Baumwollsaat, Babassusamen, und deren Erzeugnissen, sowie in Mais (Übersicht siehe EFSA, 2004d). Darüber hinaus gibt es jedoch auch Berichte über hohe Aflatoxin-Belastungen von Mais aus der Po-Ebene in Italien. Hohe Temperaturen, Trockenheit und starker Befall mit Schädlingen führen hier zu einem verstärkten Auftreten von *A. flavus* mit damit verbundener Toxinbelastung im Mais (EFSA, 2004d). Dies zeigt das prinzipiell mögliche Vorkommen von Aflatoxinen in europäischen Erzeugnissen, auch wenn die Belastung hauptsächlich in importiertem Material nachgewiesen wurde. Neuere Studien aus der Türkei zeigten in 95 % von 40 Futterproben Gehalte von 0,15 bis 32 (Median 6,81 \pm 0,81) μ g/kg Aflatoxin B₁ (AKSOY et al., 2009). Nur zwei Proben enthielten ausschließlich Aflatoxin B₁, 23 Proben enthielten daneben noch Gehalte an T-2 und ZEA. 14 Proben enthielten 2 verschiedene Mykotoxine. Eine häufige Kombination war Aflatoxin B₁ und ZEA.

Bei den Futtermitteln weisen Kokosnusspresskuchen, Erdnusspresskuchen, Sonnenblumenpresskuchen und Maiskleber die stärkste Belastung mit Aflatoxinen auf (BLÜTHGEN & UBBEN, 2000).

2.2.2.1.3 Toxizität und Risikobewertung

Aflatoxine, vor allem B₁, G₁ und M₁ sowie die reduzierte Form Aflatoxicol (AFR₀), sind akut toxisch, immunsuppressiv, mutagen, teratogen und kanzerogen (PERAICA, 1999). Hauptzielorgan für die Toxizität und die Kanzerogenität ist die Leber (PRANDINI et al., 2009). Daher wurde Aflatoxin B₁ von der International Agency for Research on Cancer (IARC) in Gruppe 1, als potenziell krebserregend beim Menschen eingestuft. Aflatoxin M₁ wurde aufgrund seiner, bei gleicher Toxizität, geringeren Kanzerogenität in Gruppe 2B als möglicherweise krebserregend eingestuft (IARC, 1993).

Aflatoxine binden über eine Epoxid-Intermediärform an die RNA und DNA und verhindern so die Transcription. Darüber hinaus reduzieren sie die IgG- und IgA-, nicht aber die IgM-Plasmaspiegel und vermindern die Komplementaktivität (Pier, 1992).

Bezüglich der klinischen Symptome einer Aflatoxinvergiftung sind eine Vielzahl von Symptomen bei unterschiedlichen Tierarten beschrieben (HINTZ, 1990). Eine akute Aflatoxikose äußert sich in akutem Leberversagen mit Koagulopathie, Haemorrhagie und verlängerten Gerinnungszeiten. Die Leber zeigt pathologische Veränderungen mit zentrallobulären Nekrosen und Einblutungen. Der Tod tritt meist innerhalb von Stunden oder wenigen Tagen ein (PIER, 1992).

Daneben werden Anorexie, Ikterus, Depression, Gewichtsverlust, Gastrointestinale Affektionen, Haemorrhagien, Ascites und Lungenödem beobachtet (EFSA, 2004d).

Es existieren tierartspezifische Unterschiede in der Empfindlichkeit für Aflatoxine, was durch unterschiedlich hohe Raten der Epoxidierung und der Aktivität von Phase II Metabolismus erklärt wird (MIROCHA & CHRISTENSEN, 1974).

Aufgrund der Spaltung des Toxins durch die Pansenflora, weist der Wiederkäuer eine große Toleranz gegenüber Aflatoxinen auf (FINK-GREMMELS, 2008; EFSA, 2004d). Klinische Erscheinungen treten erst ab einer Dosis von 1,5 - 2,23 mg/kg Futter auf. Kleine Wiederkäuer benötigen sogar Konzentrationen >50 mg/kg Futter um Erscheinungen zu zeigen (EFSA, 2004d).

Aflatoxine führen beim Pferd zu Verfettung, Nekrose und Fibrose der Leber, Nierenschädigungen, hämorrhagische Enteritis und myocardialer Degeneration (ANGSUBHAKORN et al., 1981; Keller et al., 2007). Möglicherweise ist bei den von ANGSUBHAKORN et al. (1981) beschriebenen Fällen auch eine Mitbeteiligung von Fumonisin zu berücksichtigen (GELDERBLOM et al., 1988), da Mais regelmäßig hohe Fumonisinwerte aufweist. Bei experimentell ausgelösten Aflatoxinvergiftungen des Pferdes wurden erhöhte Körpertemperatur, gesteigerte Puls- und Atemfrequenz, blutiger Kot und fokale Leberschädigungen als Symptome beschrieben (BORTELL et al., 1983). VESONDER et al., 1991 beschreibt ebenfalls mehrere lokale Leberläsion bei der pathologischen Untersuchung von Pferden, die an natürlich mit Aflatoxinen kontaminierten Futter verstorben sind.

Chronische Aufnahme nicht akut toxischer Mengen führt zu geringeren Tageszunahmen, geringerer Milchmenge, kleinerer Legeleistung sowie zu erhöhter Infektanfälligkeit (EFSA, 2004d).

Das Auftreten von Aflatoxin M_1 stellt ein abgeschwächtes Echo auf eine Kontamination des Futtermittels mit Aflatoxin B_1 dar. Dabei ist eine direkte Abhängigkeit der Aflatoxinbelastung der Milch mit der Fütterungspraxis zu beobachten (STEIMER, 1989).

Neuere Untersuchungen aus der Türkei berichten über eine hohe Belastung von Butter mit M_1 von zehn ng/kg bis zu 7000ng/kg, sowie eine Belastung von Käse bis 4100 ng/kg (TEKINSEN & UCAR, 2006). Aktuelle Testmethoden sind in der Lage Aflatoxin M_1 mit einer Nachweisgrenze von einigen wenigen pg/ml nachzuweisen (WANG et al., 2009). Eine von der Europäischen Lebensmittelsicherheitsbehörde veröffentlichte Zusammenstellung von Untersuchungsergebnissen zeigte, dass lediglich 0,06 % von insgesamt 11831 untersuchten Milchproben aus verschiedenen Ländern der Europäischen Union Aflatoxin M_1 oberhalb des Grenzwertes von 0,05 $\mu\text{g}/\text{kg}$ enthielten (EFSA, 2004d).

2.2.2.1.4 Metabolismus nach oraler Aufnahme

Nach oraler Aufnahme kann Aflatoxin B_1 in der Leber unterschiedlichen Metabolisierungsvorgängen unterzogen werden. So entstehen Metaboliten wie die Aflatoxine M_1 , M_2 , M_4 , P_1 oder Q_1 , sowie glucuronidierte Metaboliten der Verbindungen.

Aflatoxin M_1 entsteht aus einer Hydroxilierung von B_1 durch mikrosomale Leberenzyme, wobei nur 1-2 % der aufgenommenen B_1 Menge als M_1 in der Milch in Erscheinung treten (EFSA, 2004d). Ein großer Teil wird über die Nieren ausgeschieden. Die Metabolisierung ist ein Weg der Entgiftung von B_1 und spielt bei der Aktivierung zum eigentlichen Karzinogen keine Rolle. M_2 entsteht analog durch Hydroxilierung von B_2 , M_4 ist ebenfalls ein Hydroxy-Metabolit des B_1 . Neben M_1 unterliegen auch M_2 und M_4 einem carry-over in Milch, jedoch in weitaus geringerem Maße, so dass sie für die öffentliche Gesundheit nicht signifikant sind (EFSA, 2004d). Die carry-over Rate unterliegt sehr stark einzeltierspezifischen Schwankungen und kann von 0,3 % bis zu 6,2 % betragen (EFSA, 2004d).

Nach PRANDINI et al., 2009 ist das carry-over am Beginn der Laktation 3,3 - 3,5 fach höher als im Verlauf der Laktation. Euterinfektionen sind ebenfalls ursächlich für ein gesteigertes carry-over. Zum carry-over beim Pferd konnte BLÜTHGEN, 2007 in orientierenden Untersuchungen an zwei Pferden zeigen, dass der Übergang von Aflatoxin M₁ wahrscheinlich bei weniger als 0,05 % der oral aufgenommenen Aflatoxin B₁-Menge liegt und damit deutlich niedriger als bei der Kuh sein dürfte. Systematische Untersuchungen von Stutenmilch wurden jedoch bisher nicht publiziert.

2.2.2.1.5 Rechtliche Regelungen zu Aflatoxinen

Die EU legte mit der Richtlinie 2003/100 EG Höchstwerte für den Gehalt an Aflatoxin B₁ in Futtermittel fest, die durch die Futtermittelverordnung in Deutschland umgesetzt wurden (siehe Tabelle 5). Dadurch wurden für manche Futtermittelausgangsstoffe, wie z.B. Erdnüsse, Kokosnuskerne, Palmkerne, Baumwollsaat und Maiskörner Grenzwerte von 20 µg/kg festgelegt und die bis dato mögliche Nutzung von höher kontaminierten (bis 200 µg/kg) Futtermitteln durch Verschneiden mit geringer kontaminierten Ausgangsstoffen endgültig ausgeschlossen. Futtermittel, die an laktierende Tiere verfüttert werden, unterliegen niedrigeren Grenzwerten von 5 µg/kg.

Eine Überprüfung durch das Scientific Committee on Animal Nutrition (SCAN) im Jahre 2003 befand die Grenzwerte für ausreichend um die Gesundheit von Mensch und Tier zu schützen (EUROPÄISCHE KOMMISSION, 2003). In Tabelle 5 sind die Aflatoxin B₁-Grenzwerte für Futtermittel aufgeführt.

Tabelle 5: Aflatoxin B₁-Grenzwerte in Futtermitteln nach der Futtermittelverordnung (FuttMV) (Stand 22.07.10)

Futtermittel	Höchstgehalt Aflatoxin B ₁ in mg/kg gemäß FuttMV
Einzelfuttermittel	0,02
Alleinfuttermittel für Rinder, Schafe und Ziegen, ausgenommen : -Milchvieh	0,02
-Kälber und Lämmer	0,005
Alleinfuttermittel für Schweine und Geflügel (ausgenommen Jungtiere)	0,01
Andere Alleinfuttermittel	0,02
Ergänzungsfuttermittel für Rinder, Schafe und Ziegen (ausgenommen Ergänzungsfuttermittel für Milchvieh, Kälber und Lämmer)	0,02
Ergänzungsfuttermittel für Schweine und Geflügel (ausgenommen Jungtiere)	0,02
Andere Ergänzungsfuttermittel	0,005

Bezüglich Aflatoxin M₁ in Milch gilt in der EU der weltweit niedrigste Grenzwert von 0,05 µg/kg Milch (VO EG 1881/2006), dies ist gleichzeitig einer der niedrigsten Grenzwerte im Bereich der Rückstandsanalytik überhaupt. Dieser Wert wurde auch von einigen anderen nicht-EU Staaten übernommen. Im Gegensatz dazu gilt in den USA sowie in einigen Ländern Asiens und Lateinamerikas ein zehnfach höherer Grenzwert für Aflatoxin M₁ von 0,5 µg/kg Milch, der auch in dem Codex Alimentarius (Codex Alimentarius, 2001) verankert ist. Diese Werte beziehen sich grundsätzlich auf Milch und Milcherzeugnisse.

Für Säuglingsnahrungsmittel wurde in der EU ein noch niedrigerer Grenzwert festgelegt. Säuglingsnahrung darf gemäß VO EG 1881/2006 lediglich 0,025 µg/kg Aflatoxin M₁ enthalten.

VAN EIJKEREN et al. (2006) konnte zeigen, dass die Einhaltung der Höchstgehalte von Aflatoxin B₁ im Futtermittel von 5 µg/kg⁻¹ für die Einhaltung der Höchstgehalt an Aflatoxin

M₁ in der Milch von 0,05 µg/kg⁻¹ ausreichend ist. Andere Studien konnten zeigen, dass eine Aufnahme von <40 µg/Tier und Tag Aflatoxin B₁ zu Konzentrationen unter 0,5 µg/kg Aflatoxin M₁ in der Milch führt (PRANDINI et al., 2009). Eine tolerierbare Tagesaufnahme für Aflatoxin M₁ wurde aufgrund der genotoxischen und kanzerogenen Wirkung nicht festgelegt.

2.2.2.2 Penicillien Toxine – Ochratoxin A (OTA)

2.2.2.2.1 Physikalisch-chemische Eigenschaften

OTA ist ein Dihydroisocoumarin-Derivat, das über seine 7-Carboxylgruppe mittels einer α -Amidbindung an die Aminosäure L-Phenylalanin gebunden ist (RINGOT et al., 2006). Aufgrund einer phenolischen Hydroxylgruppe im Dihydroisocoumarinring sowie der Carboxylgruppe des Phenylalanins, ist es eine schwache Säure (PETZINGER & ZIEGLER, 2000).

Reines OTA ist eine farblose kristalline Substanz und ist in polaren organischen Lösungsmitteln (Chloroform, Ethanol, Methanol, Dimethylsulfoxid) oder in wässriger Bicarbonatlösung leicht, in Wasser dagegen schlecht löslich (RINGOT et al., 2006).

In neutralen Lösungen ist das Toxin hitzestabil, in alkalischen Lösungen wird es unter Hitzeeinfluss hydrolysiert (STOCK, 2004).

Saure sowie enzymatische Hydrolyse (durch Carboxypeptidase A) führen zur Spaltung des OTA in Ochratoxin alpha, dem Isocoumarin-Anteil des Toxins, und Phenylalanin (PFOHLESZKOWICZ & MANDERVILLE, 2007). OTA weist am C5 ein Chloratom als Substituenten auf, was für eine „natürliche Verbindung“ relativ ungewöhnlich ist (MIROCHA & CHRISTENSEN, 1974). Weitere Arbeiten führten zu der Entdeckung der weniger toxischen und selteneren Analoga Ochratoxin B und Ochratoxin C, dem dechlorierten Derivat bzw. Ethylester-Derivat von OTA (BAYMANN & BAKER, 2006). In Tabelle 6 sind einige chemisch-physikalische Eigenschaften von OTA aufgeführt (nach RINGOT et al., 2006). Abbildung 2 zeigt die chemische Struktur von Ochratoxin A.

Tabelle 6: Chemisch-physikalische Charakteristika von OTA

Summenformel:	$C_{20}H_{18}O_6NCl$
Chemisch-wissenschaftlicher Name:	L-phenylalanine-N-[(5-chloro-3,4-dihydro-8-hydroxy-3-methyl-1-oxo-1H-2-benzopyran-7-yl)carbonyl]-(R)-isocoumarin
Molekulargewicht:	403,82
Max. Absorption in Ethanol:	333 nm
Schmelzpunkt:	168-173 °C

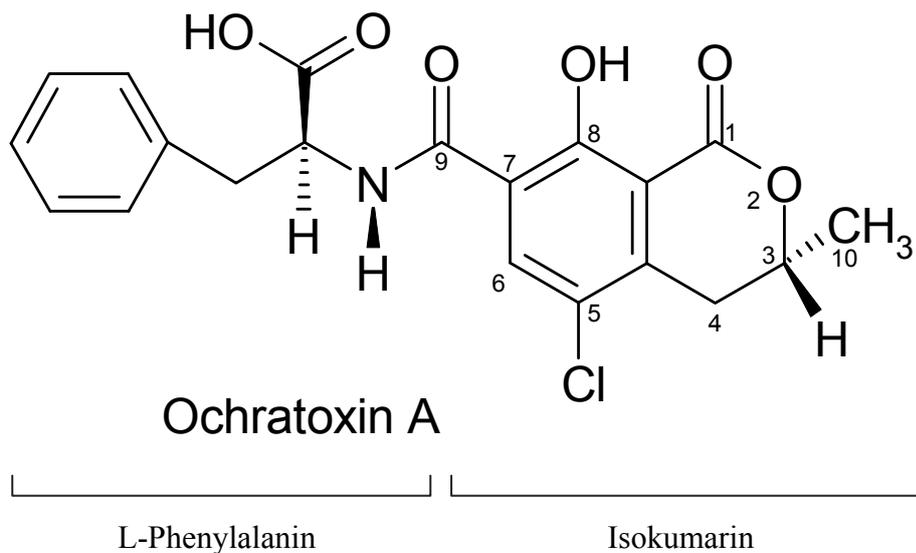


Abbildung 2: Chemische Struktur von Ochratoxin A

2.2.2.2.2 Bildung und Vorkommen

Ochratoxine sind eine Gruppe strukturverwandter Mykotoxine, die von Spezies der Pilzgattungen *Penicillium* und *Aspergillus* produziert werden. Die zuerst entdeckte Verbindung dieser Gruppe wurde aus einer Kultur von *Aspergillus ochraceus* isoliert, daher wurde sie Ochratoxin A genannt (MIROCHA & CHRISTENSEN, 1974).

Ochratoxine werden typischerweise, jedoch nicht ausschließlich, von Lagerpilzen der Gattung *Penicillium* gebildet und sind weltweit in Ernteprodukten wie Mais, Hafer, Gerste, Weizen, Roggen, Reis und Sojabohnen zu finden. Sie werden jedoch am häufigsten in den gemäßigten Klimaten der Mais-, Gerste- und Weizenanbaugebiete der nördlichen Hemisphäre nachgewiesen (Kuiper-Goodman und Scott, 1989; IARC, 1993). Auch beim Verderb von Lebensmitteln im Haushalt können diese Toxine entstehen. Das häufigste Ochratoxin ist dabei das Ochratoxin A. Es entsteht in wärmeren Regionen, hauptsächlich durch *Aspergillus ochraceus* auf Erdnüssen und Sojabohnen. In unseren gemäßigten Breiten mit Temperaturen unter 30 °C ist *Penicillium verrucosum* der wichtigste Produzent von Ochratoxin A. Aber auch *A. niger*, *A. sulphureus*, *A. carbonarius*, *Neopetromyces muricatus* und *Petromyces alliaceus* können Ochratoxine produzieren (EFSA, 2004c).

Eine Auswertung von Untersuchungsdaten in der Europäischen Union zeigte, dass lediglich 4% von 1500 untersuchten Proben (Weizen, Gerste, Hafer und Mais; teilweise auch für Lebensmittel) eine Kontamination mit OTA von mehr als 1 µg/kg aufwiesen (EUROPÄISCHE KOMMISSION, 2002a). Das heißt, dass die Kontamination von Getreide mit OTA zwar weit verbreitet ist, aber normalerweise auf einem sehr niedrigen Konzentrationsniveau.

Einige ältere Untersuchungen, z.B. aus Österreich, Bulgarien, Polen und der Tschechischen Republik fanden dagegen deutlich höhere Belastungen von Getreideproben mit OTA, mit Gehalten bis zu 1000 µg/kg (EFSA, 2004c). Neben Getreide wurde OTA in zahlreichen anderen pflanzlichen Lebens- und Futtermitteln nachgewiesen, beispielweise in Palmkernen, Reiskleie, getrockneten Erbsen, Bohnen und Sonnenblumenkernen (EFSA, 2004c).

In Litauen wurde OTA (>10 µg/kg) in 92 % bzw. 93 % von Alleinfuttermitteln für Schweine (n=25) bzw. Geflügel (n=27) mit Höchstkonzentrationen von 68 µg/kg nachgewiesen (GARALEVICIENE et al., 2002). Eine Studie an in Rumänien geschlachteten Schweinen konnte in 98 % der Blutproben OTA zwischen 0,05 und 13,4 ng/ml (85 % < 5 ng/kg) nachweisen, was für eine deutliche Belastung des Futters mit OTA spricht (CURTUI et al., 2001).

Darüber hinaus wird in der Literatur häufiger von OTA-Belastung in Milch stillender Mütter bis zu 0,182 ng/ml berichtet (GAREIS et al., 1988; SKAUG et al., 2001; Übersicht siehe EFSA, 2004c). Hier konnten der Genuss von Getreide, Fleisch (Leberpastete) sowie Nüssen als Eintragsquelle identifiziert werden (SCOTT, 2005). Auch wird Ochratoxin A immer wieder im Serum gesunder und an Nierenleiden erkrankter Menschen nachgewiesen, was für eine permanente Belastung des Menschen mit Ochratoxin A spricht (BREITHOLTZ-EMANUELSSON et al., 1994; MÄRTLBAUER et al., 2010).

2.2.2.2.3 Toxizität und Risikobewertung

Ochratoxin A ist der wichtigste Vertreter der Ochratoxine. Es wirkt nephrotoxisch, immunsuppressiv, kanzerogen und teratogen bei allen bisher getesteten Spezies (FAO/WHO, 2001; IARC, 1993).

Seine Nephrotoxizität ist gut dokumentiert und vor allem beim Schwein nachgewiesen, bei dem es die sogenannte „Mycotoxic Porcine Nephropathy“ (MPN) auslöst, die mit einer Degeneration der proximalen Nieren-Tubuli sowie einer Atrophie des tubulären Epithels, interstitieller Fibrose in der Nierenrinde und hyalinisierten Glomeruli einhergeht (PFOHL-LESZKOWICZ & MANDERVILLE, 2007).

Beim Menschen wird es aufgrund der hierzu sehr ähnlichen morphologischen und funktionalen Schädigungen mit der „Balkan Endemic Nephropathy“ (BEN) in Verbindung gebracht (IARC, 1993).

Die Aufnahme von OTA führt bei Versuchstieren zur Entwicklung von Nieren- und Lebertumoren (FAO/WHO, 2001) und Menschen mit BEN zeigen eine erhöhte Häufigkeit von Tumoren der harnableitenden Wege, woraufhin die International Agency of Research on Cancer (IARC) das Mykotoxin OTA im Jahre 1993 in die Gruppe 2B, als eine für den Menschen möglicherweise krebserzeugende Substanz eingestuft hat (IARC, 1993). Aber auch das Immunsystem und die Leber sind anfällig für OTA-induzierte Apoptose, was zu einer Verkleinerung der aktiven Immunorgane, wie Thymus, Milz und Lymphknoten, sowie einer verminderten Immunantwort, führt (AL-ANATI & PETZINGER, 2006). Störungen des Blutbildes sind ebenfalls zu beobachten. So kann eine Erhöhung der Leukozyten- und Neutrophilenzahl sowie apoptotische Phagozyten und verminderte Lymphozyten beobachtet werden (LEA et al., 1989; BOORMANN et al., 1984).

Darüber hinaus blockiert es die Phenylalanin-tRNA und blockiert so die Translation. Dies führt zu reduzierten IgG- und IgM-Plasmaspiegeln und verminderten Antikörpertitern (Pier, 1992). Außerdem führt OTA zu einem Anstieg der apoptosefördernden Cytokinen TNF- α und IL-6, was wiederum Organverkleinerung und Zellabbau begünstigt (AL-ANATI & PETZINGER, 2006).

Die orale LD₅₀ liegt beim Schwein bei 1 mg/kg KGW und bei Geflügel bei 3,3 mg/kg KGW (EFSA, 2004c).

2.2.2.2.4 Metabolismus nach oraler Aufnahme

Die Resorption von OTA beginnt bei den meisten monogastrischen Spezies bereits im Magen (PFOHL-LESZKOWICZ & MANDERVILLE, 2007). Beim Wiederkäuer wird OTA dagegen bereits durch die Pansenmikroflora mittels Hydrolyse in Phenylalanin und Ochratoxin alpha gespalten, das nicht mehr toxisch ist (SHREEVE et al., 1979; BASCARÁN et al., 2007). Dadurch ist das gesunde Rind in der Lage, bis zu zwölf mg OTA pro kg Futter zu inaktivieren, wobei die Protozoen bei dieser Reaktion die Hauptrolle einnehmen. Diese reagieren jedoch sehr empfindlich auf abrupte Veränderung der Futterzusammensetzung, wodurch evtl. erklärt werden könnte, warum gelegentlich geringe Konzentrationen von OTA in der Milch nachgewiesen werden (FINK-GREMMELS, 2008).

Diese Detoxifikationsreaktion findet bei monogastrischen Spezies mittels Carboxypeptidase oder Chymotrypsin erst im Darm statt (PITOUT, 1969).

OTA bindet nach der Resorption an Serumalbumin (SCOTT, 2005) und zirkuliert je nach Spezies unterschiedlich lange im Kreislauf, da die Proteinbindungsaffinität unterschiedlich stark ausgeprägt ist. Es reichert sich im Blut, in der Leber und der Niere an und unterliegt einem enterohepatischen Kreislauf. Beim Menschen besitzt es eine Serumhalbwertszeit von 35,5 Tagen (STUDER-ROHER et al., 2000), beim Schwein 72-120 h (GALTIER et al., 1981). Bezüglich ausführlicher Details zur Serumhalbwertszeit siehe PETZINGER & ZIEGLER, 2000.

Die Hauptmetabolisierung findet in Niere und Leber statt. Hier wird OTA zu 4R-OH OTA bzw. 4S-OH OTA und 10-OH OTA metabolisiert (STÖRMER et al., 1983). Die Vorgänge der Biotransformation sind nicht genau bekannt und werden kontrovers diskutiert (RINGOT et al., 2006). Hauptwege der Ausscheidung stellen die biliäre Exkretion und die tubuläre Sekretion dar. Eine glomeruläre Filtration ist aufgrund der hohen Serumbindungsaffinität stark begrenzt (PFOHL-LESZKOWICZ & MANDERVILLE, 2007). Nicht zu vergessen ist ebenfalls die Ausscheidung über die Milch bei monogastrischen Spezies inklusive des Menschen (SKAUG et al., 2001). In deutscher Kuhmilch konnte kein OTA nachgewiesen

werden (VALENTA & GOLL, 1996), was mit der direkten Spaltung des OTA im Pansen erklärbar ist. In Norwegen und Schweden wurden Konzentrationen zwischen zehn und 58 ng/l OTA in Kuhmilch nachgewiesen (BREITHOLTZ-EMANUELSSON et al., 1993; SKAUG, 1999). Lediglich experimentell konnte auch ein carry-over in das Ei nachgewiesen werden, jedoch nur nach Verabreichung sehr hoher Toxinmengen (Übersicht siehe EFSA, 2004c). Abbildung 3 zeigt eine Übersicht über die bekannten Metabolisierungswege des OTA.

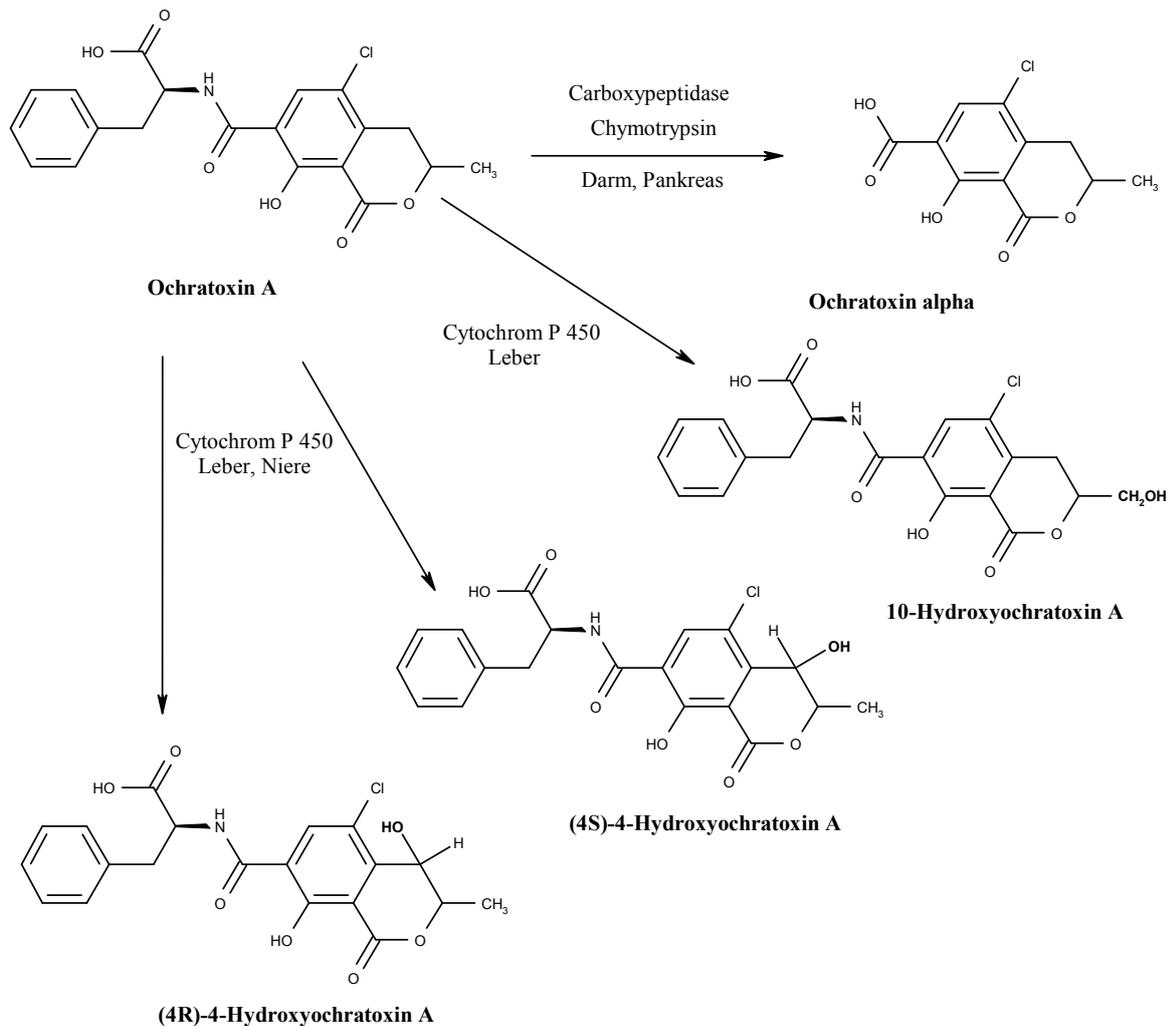


Abbildung 3: Metabolisierung des Mykotoxins Ochratoxin A *in vivo* (nach STOCK, 2004)

2.2.2.2.5 Rechtliche Regelungen zu Ochratoxin A

In der EU existieren keine einheitlichen Grenzwerte für Ochratoxin A in Futtermitteln. Weltweit haben nur acht Staaten (Canada, Estland, Israel, Litauen, Slowenien, Schweden, Serbien und Montenegro) nationale Regelungen für Ochratoxin A in Futtermitteln, so hat z.B. Schweden Höchstmengen von 200 µg/kg OTA für Geflügel- und 100 µg/kg OTA für Schweinealleinfuttermittel erlassen (EFSA, 2004).

Die EU-Kommission hat lediglich eine „Empfehlung“ für die Gehalte von Mykotoxinen in Futtermitteln ausgesprochen (EG 576/2006). Tabelle 7 zeigt eine Übersicht über die Richtwerte zu Mykotoxinbelastungen in Futtermitteln.

Tabelle 7: Richtwerte zu Mykotoxinbelastungen in Futtermitteln (aus EG 576/2006)

Mykotoxin	Zur Fütterung bestimmte Erzeugnisse	Richtwert mg/kg
OTA	Futtermittelausgangserzeugnisse	
	- Getreide und Getreideerzeugnisse	0,25
	- Ergänzungs- und Alleinfuttermittel für Schweine	0,05
	- Ergänzungs- und Alleinfuttermittel für Geflügel	0,1

Der TWI (tolerable weekly intake) für Ochratoxin A beim Menschen wurde von der EFSA auf 120 ng/kg Körpergewicht pro Woche festgelegt (EFSA, 2006).

2.2.2.3 Fusarien-Toxine – T-2 / Deoxynivalenol / Zearalenon

2.2.2.3.1 Physikalisch-chemische Eigenschaften

Fusarien können eine hohe Zahl von toxischen Metaboliten bilden. In dieser Arbeit werden lediglich die Trichothecenen sowie das Zearalenon thematisiert.

Die von Fusarien gebildeten Trichothecenen-Mykotoxine sind durch ihr trizyklisches Grundgerüst mit einer für die Toxizität verantwortlichen Epoxygruppe an C-12 und C-13 und einer Doppelbindung zwischen C-9 und C-10 charakterisiert (MIROCHA & CHRISTENSEN, 1974). Inzwischen sind mehr als 60 unterschiedliche, natürlich vorkommende Trichothecene bekannt. Sie unterscheiden sich sowohl in der Position und der Anzahl der Hydroxylgruppen als auch in der Position und Anzahl der über Esterbindungen verknüpften Seitenketten. Alle von Fusarien gebildeten Trichothecene stellen relativ einfache Alkohole mit kurzkettigen Estern dar (ISHII, 1983). Eingeteilt werden die nicht makrozyklischen Trichothecene in Typ A- und Typ B-Trichothecene, je nach ihrer Substitution an C-8. Die Typ A-Trichothecene (z.B. T-2 Toxin) besitzen unterschiedliche Substituenten an C-8, während die Typ B-Trichothecene (z.B. DON) an C-8 immer eine Ketogruppe besitzen. Beispiele für B-Trichothecene sind in Tabelle 10 gezeigt. Allgemein bleibt festzuhalten, dass Typ A-Trichothecene toxischer sind als Typ B-Trichothecene (PLACINTA et al., 1999).

Zearalenon wird aufgrund seiner sehr geringen akuten Toxizität von einigen Forschern nicht als Mykotoxin bezeichnet. Die ausgeprägte östrogenartige Wirkung von ZEA und einigen strukturverwandten Verbindungen kann jedoch durchaus zu Erkrankungen führen, womit der Begriff Toxin gerechtfertigt werden kann.

2.2.2.3.1.1 Charakterisierung von T-2 Toxin

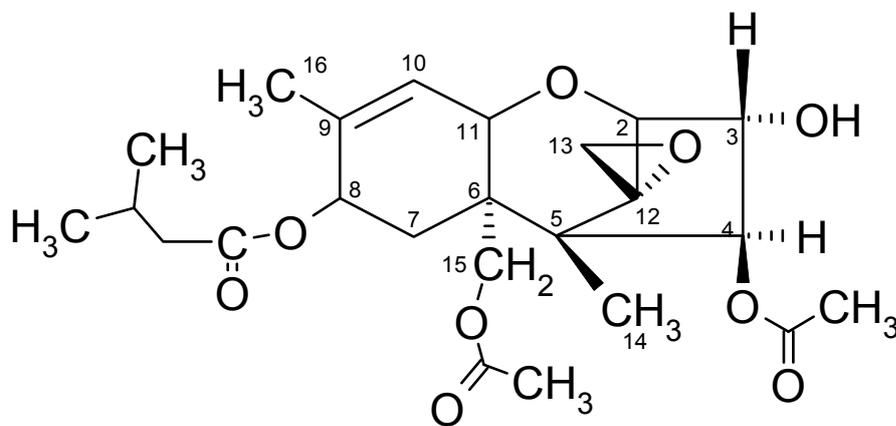
T-2-Toxin und das strukturverwandte HT-2 Toxin gehören zu den Typ-A-Trichothecenen. Beide sind im Vergleich zu DON relativ unpolar und daher gut in Aceton, Acetonitril, Chloroform, Diethylether, Ethanol und Methanol löslich, jedoch schlecht wasserlöslich.

In Tabelle 8 sind einige chemisch-physikalische Eigenschaften von T-2 Toxin aufgeführt (Angaben nach IARC, 1993).

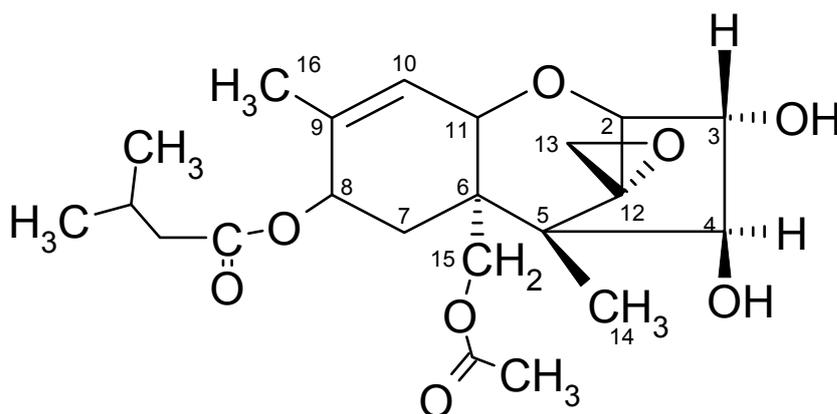
Tabelle 8: Chemisch-physikalische Charakteristika von T-2 Toxin

Summenformel:	$C_{24}H_{34}O_9$
Chemisch-wissenschaftlicher Name:	Trichothec-9-ene-3,4,8,15-tetrol,12,13-epoxy,4,15-diacetate 8-(3-methylbutanoate)
Synonyme:	Fusariotoxin T2 Insariotoxin
Molekulargewicht:	466,5
Schmelzpunkt:	151-152 °C

In Abbildung 4 ist die Strukturformel von T-2 und HT-2 Toxin gezeigt.



T-2 Toxin



HT-2 Toxin

Abbildung 4: Strukturformel von T-2 Toxin und HT-2 Toxin

2.2.2.3.1.2 Charakterisierung von Deoxynivalenol

Aufgrund dreier OH-Gruppen besitzt Deoxynivalenol (DON) eine gute Löslichkeit in polaren Lösungsmitteln wie Wasser, Methanol und Ethanol (CANADY et al., 2001). Es ist weitgehend stabil in Wasser, Säuren und organischen Lösungsmitteln (SHEPHERD und GILBERT, 1988), hitzestabil bis 120 °C und sehr stabil gegen nucleophile Angriffe (CANADY et al., 2001). Auskristallisiert bildet es feine Nadeln. In Tabelle 9 sind einige chemisch-physikalische Eigenschaften von DON aufgeführt (Angaben nach SYDENHAM et al., 1996).

Tabelle 9: Chemisch-Physikalische Charakteristika von DON

Summenformel:	$C_{15}H_{20}O_6$
Chemisch-wissenschaftlicher Name:	3 α ,7 α ,15-Trihydroxy-12,13-epoxytrichothec-9-en-8-on
Synonyme:	Vomitoxin Rd-Toxin
Molekulargewicht:	296,32
Max. Absorption in Ethanol:	219 nm
Schmelzpunkt:	150 °C – 153 °C

In Abbildung 5 ist die Strukturformel des Typ B-Trichothecengrundgerüsts gezeigt (Seitenketten siehe Tabelle 10).

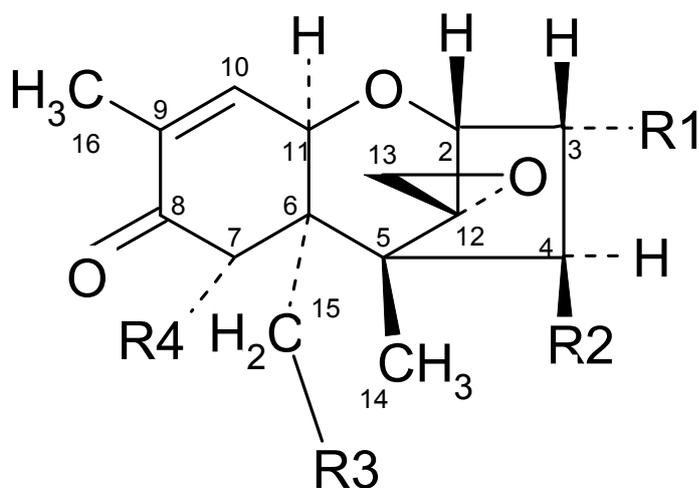


Abbildung 5: Strukturformel des Typ B-Trichothecengerüsts

Tabelle 10: Auflistung der Seitenketten von DON und einiger anderer Vertreter der Typ B-Trichothecene (vergleiche Abbildung 5)

Toxin	Seitenkette			
	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄
Deoxynivalenol	OH	H	OH	OH
3-Acetyldeoxynivalenol	OCOCH ₃	H	OH	OH
15-Acetyldeoxynivalenol	OH	H	OCOCH ₃	OH
3,15-Diacetyldeoxynivalenol	OCOCH ₃	H	OCOCH ₃	OH
Nivalenol	OH	OH	OH	OH
Fusarenon X	OH	OCOCH ₃	OH	OH

2.2.2.3.1.3 Charakterisierung von Zearalenon

ZEA (6-(10-Hydroxy-6-oxo-transundecenyl)- β -Resorcylsäurelaktone) zählt zu den nichtsteroidalen Mykotoxinen der Stoffgruppe der phenolischen Makrolide (Abbildung 6, Tabelle 12). In Wasser weist es eine geringe Löslichkeit auf, in Aceton, Acetonitril, Alkoholen, Chloroform und wässrigen Alkalien löst es sich gut (KUIPER-GOODMAN et al., 1987).

In Tabelle 11 sind einige chemisch-physikalische Eigenschaften von ZEA aufgeführt (Angaben nach URRY et al., 1966; SYDENHAM et al., 1996):

Tabelle 11: Chemisch-physikalische Charakteristika von ZEA

Summenformel:	C ₁₈ H ₂₂ O ₅
Chemisch-wissenschaftlicher Name:	6-[(10 S)-10-hydroxy-6-oxo-trans-1-undecenyl]- β -Resorcylsäurelaktone
Synonym:	F-2 Toxin
Molekulargewicht :	318,37
Max.Absorption Methanol:	236 nm, 274 nm, 316 nm
Schmelzpunkt :	164 °C – 165 °C

Abbildung 6 zeigt das Grundgerüst von ZEA (Seitenketten von ZEA und einigen Analoga in Tabelle 12)

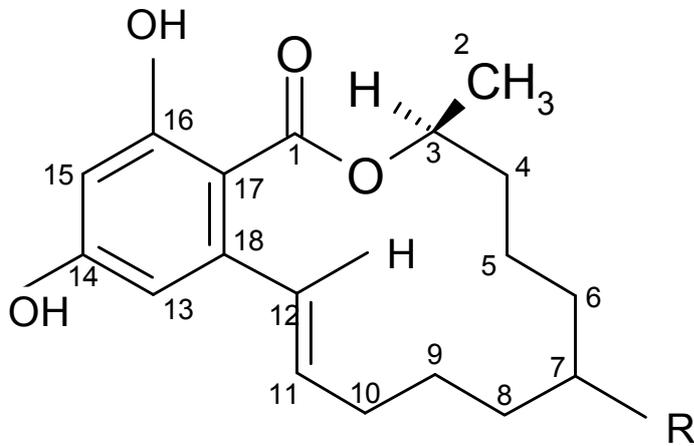


Abbildung 6: Grundgerüst von ZEA (Numerierung des Ringsystems nach IUPAC-Nomenklatur wie von METZLER, 2010 beschrieben)

Tabelle 12: Seitenketten von ZEA und einiger Analoga (vergleiche Abbildung 6)

Toxin	Seitenkette R	C ₁₁ -C ₁₂ - Bindung
Zearalenon	=O	CH=CH
α -Zearalenol	OH	CH=CH
	H	
β -Zearalenol	H	CH=CH
	OH	
Zearalanon	=O	CH ₂ -CH ₂
α -Zearalanol	OH	CH ₂ -CH ₂
	H	
β -Zearalanol	H	CH ₂ -CH ₂
	OH	

2.2.2.3.2 Bildung und Vorkommen

Fusarientoxine treten häufig als Mischkontamination auf. So treten DON und ZEA regelmäßig zusammen (ZINEDINE et al, 2007) und in weiteren Kombinationen mit Nivalenol und Fumonisin auf (PLACINTA et al., 1999; RICHARD, 2007). Hauptproduzenten für DON und ZEA sind vor allem *F. graminearum* und *F. culmorum*, die weltweit insbesondere bei Getreide vorkommen (Richard, 2007). Begünstigt wird der Befall durch feuchtes Wetter in der Wachstumsphase, aber auch durch enge Mais-Getreidefruchtfolgen, pfluglose Bodenbearbeitung und übermäßige Stickstoffversorgung sowie eine unsachgemäße zu feuchte Einlagerung (über 14% Restfeuchte) (DÄNICKE & VALENTA, 1999). Bei sachgerechter Lagerung schreitet die Fusarientoxinproduktion im Lager nicht weiter voran (RICHARD, 2007). Aufgrund des weltweiten ubiquitären Vorkommens von *Fusarium graminearum* und *F. culmorum* ist eine Belastung von Getreide durch DON und ZEA in vielen Ländern festgestellt worden (TANAKA et al., 1988; CANADY et al., 2001). Unter den Fusarientoxinen tritt DON am häufigsten auf. In Übersichtsarbeiten (siehe EFSA, 2004a) wird von Belastungen in Getreide und Mais von wenigen µg/kg bis hin zu 30 mg/kg DON berichtet, wobei die höchsten Werte in Maiscobbs aus Polen gefunden wurden (PLACINTA et al., 1999). In anderen Studien wurde Corn cob mix- und Maissilage als mit DON und ZEA hochbelastete Futtermittel gefunden. Fast 60 % der 195 Proben beinhalteten mehr als 300 µg/kg DON, 9,2 % bzw. 2,6 % mehr als 2000 µg/kg bzw. 5000 µg/kg (OLDENBURG & HÖPPNER, 2003). Obwohl bisher nur geringe Belastungen von Stroh mit DON nachgewiesen werden konnten (EFSA, 2004a), wurden in schwedischen und niederländischen Strohproben Belastungen bis zu 6600 µg/kg DON und 92 – 2840 µg/kg ZEA nachgewiesen (EFSA, 2004a; EFSA, 2004b). Da sowohl Schweine als auch Pferde beachtliche Mengen Stroh zu sich nehmen, stellt es eine bisher unbeachtete, aber nicht zu vernachlässigende Eintragsquelle dar, die weiter untersucht werden sollte (CALONI et al., 2009).

ZEA scheint ebenfalls in nicht unbedeutendem Maße in Gras, Heu und Stroh vorzukommen, die höchsten ZEA-Gehalte werden aber regelmäßig in Mais gefunden. Meist ist Mais mit DON und ZEA kontaminiert, während in Weizen häufig hohe DON und keine bzw. geringe ZEA Belastung nachweisbar ist (EFSA, 2004b). AKSOY et al., 2009 konnte T-2 in 65 % (33,9 ± 5,8 µg/kg) und ZEA in 87,5 % (175,3 ± 43,0 µg/kg) von 40 Futterproben aus der Türkei nachweisen. Dabei zeigten T-2 und ZEA häufig eine Coexistenz.

2.2.2.3.3 Toxizität und Risikobewertung

2.2.2.3.3.1 T-2 Toxin

T-2 Toxin wird unter anderem für das Auftreten der Alimentären Toxischen Aleukie (ATA) während und nach dem Zweiten Weltkrieg verantwortlich gemacht, eine Erkrankung. Die durch schwere gastrointestinale Symptome sowie durch Leukopenie gekennzeichnet ist (RICHARD, 2007).

Ein Haupteffekt des T-2 Toxins ist die Hemmung der Proteinbiosynthese, gefolgt von einer Störung der DNA- und RNA-Synthese. Es beeinflusst damit sich teilende Zellen von Darmepithelien, Haut, Lymph- und Blutzellen (RICHARD, 2007).

Beim Menschen zeigt sich eine Trichothecenentoxicose immer mit Veränderungen im Blutbild und führt vor allem zu Thrombozytopenie und Leukopenie und damit verbunden zu Koagulationsstörungen und verminderter Abwehrlage bis hin zur Sepsis (PARENT-MASSIN, 2004). Bei Tieren löst es einen Abfall der zirkulierenden Blutzellen häufig verbunden mit Knochenmarkstörungen aus (PARENT-MASSIN, 2004). Auch vermindert es den IgM- und IgA-Plasmaspiegel und häufig auch die Antikörpertiter (Pier, 1992).

Hämatopoetische Vorläuferzellen sind der Hauptangriffspunkt der Trichothecenen. DON ist am wenigsten myelotoxisch, T-2 am stärksten (PARENT-MASSIN, 2004). Die toxischen Effekte sind tierartspezifisch, so werden beim Pferd zentralnervöse Ausfälle und pathologische Veränderungen des Gehirns sowie Hepatitis und Nephritis nach Aufnahme von T-2 beobachtet (GABAL et al., 1986).

Beim Pferd, Schwein, Hase, Hund, Ratte und Maus werden durch unterschiedlich hohe Dosen T-2-Toxin alle Erythrozyten lysiert, Erythrozyten von Wiederkäuern dagegen scheinen keine Reaktion auf T-2 Toxin zu zeigen. Als Grund wird der geringe Gehalt an Phosphatidylcholin in der Membran der Erythrozyten vermutet (DELOACH et al., 1989).

Bei Sauen löst T-2 Toxin Infertilität aus und kann, wenn im letzten Trimester der Gravidität verfüttert, innerhalb von 48 Stunden zum Abort führen (PLACINTA et al., 1999). In einer Fütterungsstudie konnte gezeigt werden, dass die Gabe von 7 mg T-2 Toxin/Tag über 40 Tage hinweg zu keiner Störung der Ovarfunktion und der Fertilität beim Pferd führt (JUHÁSZ et

al., 1997). Jedoch wurden bei drei von sechs Pferden Läsionen der Maulschleimhaut beobachtet.

Im Tierversuch konnte gezeigt werden, dass die Inhalation von Trichothecenenoxinen 40-mal toxischer war als die orale Gabe (SMORAGIEWICZ et al., 1993).

2.2.2.3.3.2 DON

Die toxische Wirkung von DON ist auf zellulärer Ebene durch die Hemmung der Proteinbiosynthese begründet. DON bindet an die Ribosomen während der Elongations- und Terminationsphase (UENO et al., 1983). Angriffspunkt ist die 60 S-Untereinheit der eukariotischen Ribosomen, an die DON bindet und mit der Peptidyltransferase interferiert, was zu Störungen der Proteinbiosynthese führt (EFSA, 2004a). Diese Wirkung entfaltet DON jedoch nur mit einer intakten Doppelbindung zwischen C-9 und C-10 sowie bei Vorhandensein einer Epoxidgruppe an C-12, C-13 (EHRlich & DAIGLE, 1987). Eine Öffnung des 12,13-Epoxidringes (=Deepoxydeoxynivalenol, DOM₁, Abbildung 7) stellt eine fast vollständige Entgiftung von DON dar (ROTTER & PRELUSKY, 1996).

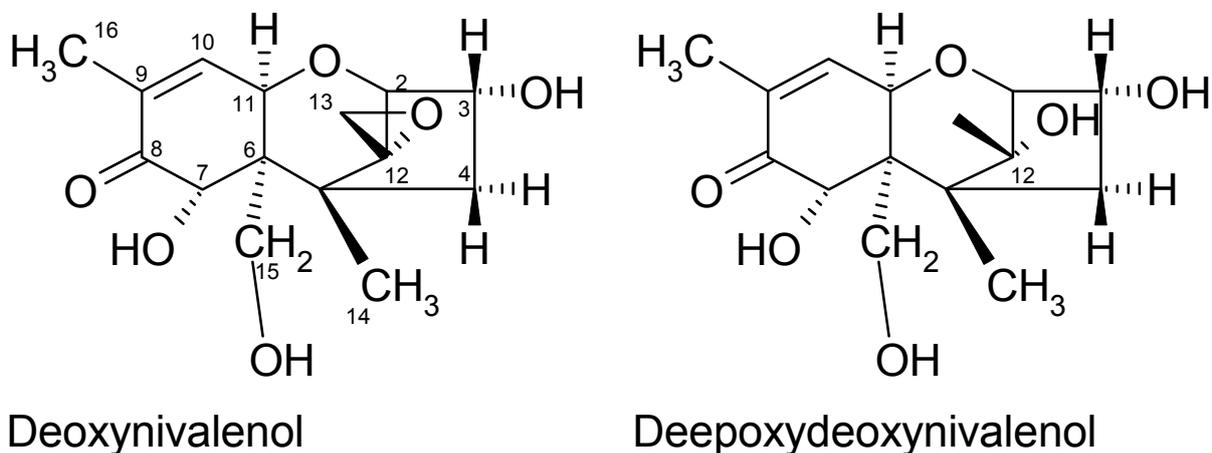


Abbildung 7: De-epoxidation von DON zu DOM₁, dem Hauptmetaboliten in Milch laktierender Kühe

Bei allen Trichothecenen zeichnet sich der toxische Effekt vor allem durch chronische immuntoxische Wirkungen aus. Reduzierte Futteraufnahme, hauptsächlich bei Jungtieren beobachtet, ist eines der Leitsymptome einer chronischen Aufnahme.

Exposition mit DON führt weiterhin zu Reflux, Erbrechen und verminderten Tageszunahmen. Bei Aufnahme hoher Dosen wird das Erbrechen scheinbar durch Interaktion von DON mit Serotonin- und Dopaminrezeptoren ausgelöst (EFSA, 2004a). Daneben treten Störungen des hämatologischen Systems, mit Depression der Lymphozytensynthese und Aktivität (BEREK et al., 2001), auf.

Am empfindlichsten reagiert dabei das Schwein auf Kontamination mit DON (PRELUSKY et al., 1994), gefolgt von Mäusen (FORSELL et al., 1986; IVERSON et al., 1995) und Pferden (RAYMOND et al., 2003; JOHNSON et al., 1997). Relativ unempfindlich scheinen Geflügel (VALENTA et al., 2005) und Rinder (COTE, 1986, CHARMLEY et al., 1993) zu sein. JOHNSON et al. (1997) konnte nach Verfütterung von mit 36 - 44 mg/kg DON (entspricht 11 mg pro Tier/Tag) belastetem Hafer pro Tag über 40 Tage hinweg an Pferde keinen Effekt auf die Futteraufnahme und diverse Blutparameter nachweisen. Dies führte zu der Annahme, dass das Pferd ähnlich wie der Wiederkäuer sehr unempfindlich gegenüber DON ist. Beachtlich ist, dass das Pferd im Gegensatz zu anderen monogastrischen Tierarten auf hohe DON-Konzentrationen nicht mit Futterverweigerung reagiert (OSWEILER, 2001). RAYMOND et al. (2005) konnte beim Pferd trotz Aufnahme von 11 mg/kg DON und 0,8 mg/kg ZEA keine Veränderung der Kondition (beurteilt anhand der Rekonvaleszenzzeit nach Belastung, der Herzfrequenz, einiger Blutparameter, sowie der Serumlactatkonzentration) beobachten.

Die betroffenen Organsysteme sind je nach Tierart unterschiedlich. Die Schädigungen zeigen sich eher in unspezifischen Veränderungen der Organe ohne einheitliches Bild des gewebeschädigenden Potentials von DON. So konnten bei Mäusen erst bei hoher DON-Exposition über 100 mg/kg KGW histopathologische Veränderungen nachgewiesen werden (FORSELL et al., 1986; FORSELL et al., 1987). Die genauen Mechanismen der toxischen Wirkung von DON sind bisher noch nicht geklärt. Es wird aber vermutet, dass DON unter anderem auf den Tumornekrosefaktor α und Interleukin 6 wirkt und dadurch weitere Effekte, wie z.B. einen Anstieg von COX-2 hervorruft (PESTKA & ZHOU, 2002). Wobei niedrige Expositionen zu einem Anstieg entzündungsfördernder Cytokinen führen und hohe Belastungen zu Apoptose der Leukozyten führen (PESTKA et al., 1994).

2.2.2.3.3.3 ZEA

Zearalenon sowie seine Metaboliten (siehe Abbildung 8) wirken im Organismus ähnlich wie die körpereigenen Östrogene, es handelt sich um nichtsteroidale östrogenähnliche Verbindungen (BAUER et al., 1987). Die Bindungsaffinität zum Östrogenrezeptor weist tierartspezifische Unterschiede auf. Auch zwischen der Aktivität von ZEA und seinen Strukturanaloga bestehen Unterschiede. Dies könnte daran liegen, dass beispielsweise α -Zearalenol eine größere Affinität zum Östrogenrezeptor aufweist als β -Zearalenol und diese zwei Metaboliten in tierartlich unterschiedlichen Verhältnissen metabolisiert werden (ZINEDINE et al., 2007).

ZEA weist aufgrund der Rezeptorbindung anabole Effekte auf, da der ZEA-Östrogenrezeptor-Komplex die DNA zur Bildung von m-RNA und r-RNA anregt und so die Proteinbiosynthese aktiviert wird (KUIPER-GOODMANN et al., 1987). So kann erklärt werden, warum in Studien mit ZEA kontaminiertem Futter gefütterte Schweine eine deutlich größere Gewichtszunahme im Vergleich zu den Kontrolltieren aufweisen (ZÖLLNER et al., 2002). Daher wird es in einigen Ländern gezielt als Leistungsförderer eingesetzt (KUIPER-GOODMANN et al., 1987). Beim Schwein zeigt sich jedoch auch der sogenannte Hyperöstrogenismus.

Am empfindlichsten reagieren Ferkel und Sauen auf ZEA (KUIPER-GOODMANN et al., 1987). Es kommt zu verringerter Fruchtbarkeit und erhöhter Häufigkeit von Totgeburten. Ferkel zeigen deutliche Schwellungen der Vulva und des Gesäuges sowie Bewegungsstörungen (BAUER et al., 1987; RICHARD, 2007).

Bei Pferden resultierte aus einer zehntägige Verfütterung von sieben mg ZEA / Tag keine feststellbaren Effekte auf die Ovarien oder den Zyklus, jedoch wurden auch hier Reizungen der Mundschleimhaut beobachtet (JUHÁSZ et al., 2001). *In vitro* Versuche an Granulosazellen des Pferdes lassen vermuten, dass ZEA Follikelatresie auslösen kann (MINERVINI et al., 2006).

GIMENO et al., (1983) berichtet von einer wahrscheinlich durch ZEA hervorgerufenen Vergiftung von Pferden nach Aufnahme natürlich kontaminiertem Futters (2,6 mg/kg ZEA). Als wesentliche Symptome wurden verminderte Futteraufnahme, ödematös vergrößerte Vulva, Vaginalprolaps, übergroßer Uterus und innere Blutungen beschrieben. Inwieweit hier

jedoch eine Co-Kontamination mit anderen Mykotoxinen für einen Teil der Symptomatik verantwortlich war, beispielsweise DON für die Reduktion der Futteraufnahme, wurde nicht geklärt.

Rinder benötigen deutlich höhere ZEA-Konzentrationen (12 - 14 mg/kg KGW), um klinische Erscheinungen zu zeigen (KUIPER-GOODMAN et al. 1987). Es wurden reduzierte Fertilität, sinkende Milchmenge und Hyperöstrogenismus beobachtet (MINERVINI et al., 2008).

Weitgehend unempfindlich gegenüber ZEA scheint Geflügel zu sein. Selbst bei hohen Dosen von 50 mg/kg KGW konnten keine hormonellen oder andere negative Wirkungen beobachtet werden (KUIPER-GODMAN et al., 1987).

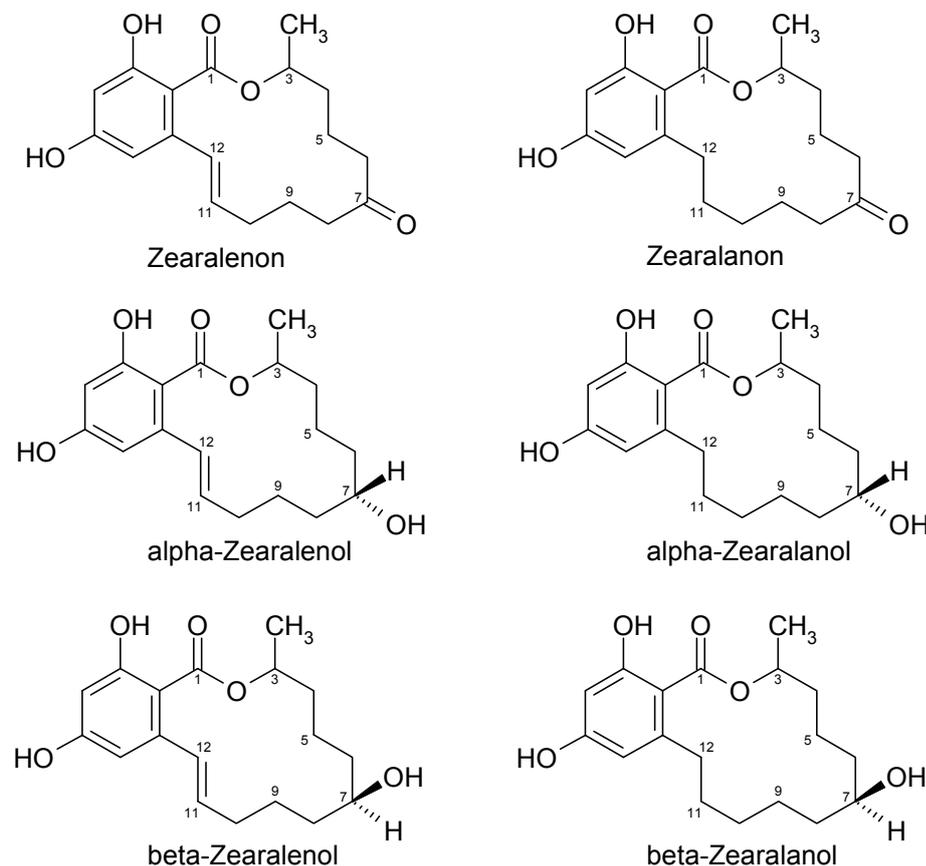


Abbildung 8: Chemische Strukturen von Zearalenon und seinen Derivaten

2.2.2.3.4 Metabolismus nach oraler Aufnahme

2.2.2.3.4.1 T-2 Toxin

Der Hauptweg der Metabolisierung von T-2 führt über die Leber und die Ausscheidung über die Galle (DOHNAL et al., 2008). Es existieren quantitative und qualitative tierartspezifische Unterschiede in der mikrosomalen Metabolisierung von T-2 in der Leber (IARC, 1993). Vor allem ist ein deutlicher Unterschied zwischen Wiederkäuern und Monogastriern zu sehen, da die Pansenmikroflora bereits deutliche Metabolisierungsvorgänge durchführt (DOHNAL et al., 2008). Beim Menschen wird T-2 hauptsächlich zu HT-2 deacetyliert (IARC, 1993). Daneben gibt es noch Hydroxylierung, Glucuronidierung, Acetylierung und Deepoxylierung (DOHNAL et al., 2008). Hauptmetaboliten im Pansen sind HT-2, T-2 triol, deepoxy HT-2 und deepoxy T-2 triol (SWANSON et al., 1987). Abbildung 9 zeigt mögliche Stoffwechselwege des T-2 Toxins.

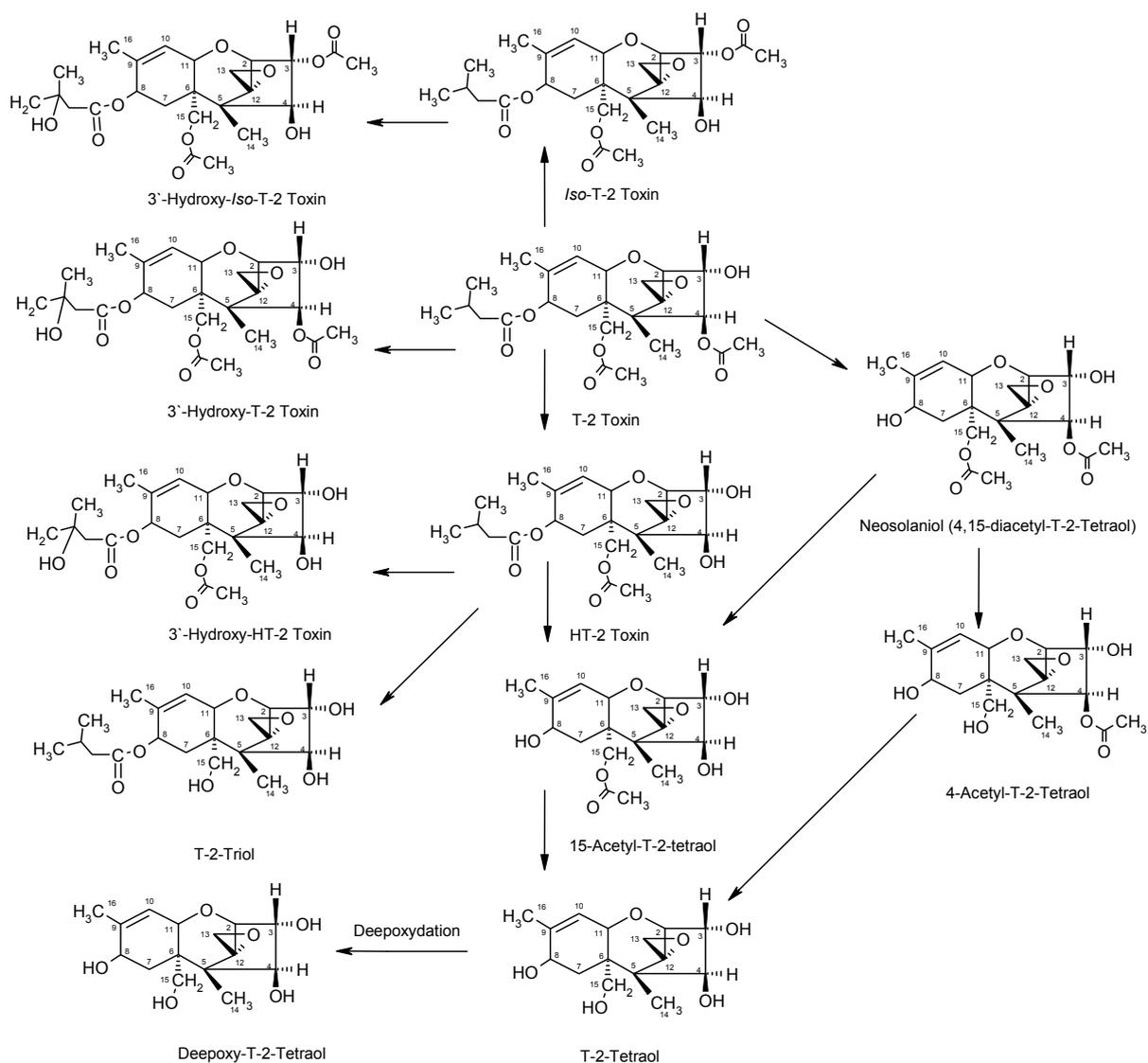


Abbildung 9: Mögliche Stoffwechselwege des T-2 Toxins (nach DOHNAL et al., 2008)

Das carry-over von T-2 Toxin in die Kuhmilch liegt bei 0,05 - 2 % (MÄRTLBAUER et al., 1991; YIANNIKOURIS & JOUANY, 2002). Auch in der Milch von Sauen wurde T-2 Toxin nachgewiesen, nachdem ihnen im letzten Viertel der Trächtigkeit Futter mit 24 mg T-2 Toxin pro Tag verfüttert wurde (VANYI et al., 1991).

2.2.2.3.4.2 DON

DON wird bei einigen Spezies sehr schnell deepoxydiert. Dies konnte bisher vor allem bei der Kuh und der Ratte gezeigt werden. Eine Übersicht hierzu findet sich in einer EFSA-Studie zur Wirkung von DON beim Haustier (EFSA, 2004a). Der Hauptmetabolit des DON ist das deepoxydierte DOM₁, welches im Vergleich zu DON eine deutlich niedrigere Toxizität aufweist. Die Deepoxydierung, die damit gleichzeitig eine Entgiftung darstellt, erfolgt hauptsächlich durch die Mikroorganismen im Darm und Pansen (FINK-GREMMELS, 2008). Die Tatsache, dass beim Menschen DOM₁ als Deepoxydierungsprodukt nicht nachweisbar ist, wirft die Frage auf, ob toxikologische Tiermodelle immer auf den Menschen übertragbar sind (WU et al., 2009).

DON und auch DOM₁ werden im Organismus durch die Leber weiter in die glucuronidierten Formen umgewandelt (COTE et al., 1986). Der Hauptausscheidungsweg für DON ist der Urin (FAO/WHO, 2001), sowohl als glucuronidiertes und nicht glucuronidiertes DOM₁ als auch als unverändertes DON.

Lediglich Spuren von DON und DOM₁ werden in die Kuhmilch und in Eier übertragen (zur Übersicht siehe EFSA, 2004a). So konnte COTE et al. (1986) nach Verfütterung von 66 mg/kg DON über fünf Tage an laktierende Kühe DOM₁ in Konzentrationen zwischen zwei und 26 µg/kg nachweisen. DON konnte nicht nachgewiesen werden. In Studien mit Belastungen von sechs bzw. zwölf mg/kg/Tag DON über 70 Tage hinweg konnten kein carry-over in die Milch nachgewiesen werden (CHARMLEY et al, 1993).

2.2.2.3.4.3 ZEA

ZEA wird nach oraler Aufnahme schnell absorbiert und ist bereits 30 min nach Aufnahme im Blut (an Globuline gebunden) nachweisbar. Die Absorbtiionsrate liegt bei 80 - 85 % (MINERVINI et al., 2008).

Es werden zwei Hauptmetabolisierungswege für ZEA vermutet. Zum einen die Hydroxylierung zu α -Zearalenol und β - Zearalenol durch 3 α - bzw. 3 β -hydroxysteroid dehydrogenase (HSD) und zum anderen eine Glucuronidierung von ZEA und seinen Metaboliten durch Uridin-diphosphat-glucuronyl-transferase (UDPGT) (ZINEDINE et al., 2007).

Die Leber ist das Hauptorgan der Steroidmetabolisierung, aber auch andere Gewebe wie die Niere, Hoden, Prostata, Hypothalamus, Ovarien und Darm haben eine HSD-Aktivität. ZEA wird über die Galle ausgeschieden und unterliegt einem tierartspezifischen enterohepatischen Kreislauf (D'MELLO et al., 1999). MALEKINEJAD et al., 2006 konnten beim Schwein zeigen, dass α - Zearalenol sowohl der hepatische als auch der extrahepatische (Granulosa Zellen) Hauptmetabolit von ZEA ist. Der Darm des Schweins weist darüber hinaus eine 30-fach stärkere Aktivität der Glucuronidierung gegenüber der Reduktion auf. Es scheint das ZEA zunächst glucuronidiert wird, bevor es zu Zearalenol reduziert wird. Aufgrund des ausgeprägten enterohepatischen Kreislaufes weisen ZEA und seine Metaboliten beim Schwein eine relativ lange Halbwertszeit auf.

Beim Rind hat sich gezeigt, dass die bovinen Hepatozyten und Granulosazellen hauptsächlich β - Zearalenol produzieren (MALEKINEJAD et al., 2006). Beim Wiederkäuer wird Zearalenon bereits im Pansen in α -Zearalenol und in geringerem Maße in β -Zearalenol gespalten (KIESSLING et al., 1984).

USLEBER et al. (1992) konnten zeigen, dass ZEA proportional zur verabreichten Menge im Kot auftrat. Glucuronidierte Metaboliten konnten nur im Urin nachgewiesen werden (USLEBER et al., 1992). Das Pferd scheidet ZEA als ZEA, α - Zearalenol und β - Zearalenol über Urin und Kot aus (MINERVINI et al., 2008).

Für ZEA wird aufgrund eines Fütterungsversuches, bei dem 25 mg/kg über sieben Tage (200 mg/Tag) verfüttert wurden und 1,4 mg/l Zearalenon und Derivate in der Milch gefunden

wurden, eine carry-over Rate von 0,7 % angenommen (MIROCHA et al., 1981). In einer anderen Studie wurden 545 mg/Tag über 21 Tage verfüttert und lediglich weniger als sechs µg/kg in der Milch nachgewiesen (PRELUSKY et al., 1990).

Spätere Fütterungsversuche konnten keine Belastung der Milch mit ZEA nachweisen, wobei bei einer unterstellten carry-over Rate von 0,7 % die enthaltenen ZEA Mengen immer unterhalb der Nachweisgrenze der verwendeten Tests lagen (USLEBER et al., 1992; SEELING et al., 2005).

Festzuhalten bleibt, dass bei einer täglichen Verfütterung von 75 - 1125 µg ZEA und einer Milchmenge von zehn bis 42 kg/Tag es bei der Kuh zu keiner nennenswerten Übertragung von ZEA und seinen Derivaten in die Milch kommt (SHREEVE et al., 1979).

2.2.2.3.5 Rechtliche Regelungen zu Fusarientoxinen

Für Trichothecenen gibt es in der EU keine Grenzwerte, lediglich Empfehlungen für Futtermittel (EG 576/2006). Einige Staaten haben nationale Regelungen erlassen, z.B. Deutschland, Österreich, Belgien, Schweden und die Niederlande (orientierende Werte zwischen 400 µg/kg für Schweinefuttermittel und 5000 µg/kg für Rinder- und Geflügelmastfuttermittel). Tabelle 13 zeigt die Richtwerte zu Mykotoxinbelastungen in Futtermitteln (aus Empfehlung EG 576/2006).

Tabelle 13: Richtwerte zu Mykotoxinbelastung in Futtermitteln (gemäß Empfehlung EG 576/2006(Stand 23.08.2006))

Myko toxin	Zur Fütterung bestimmte Erzeugnisse	Richtwert mg/kg
DON	Futtermittelausgangserzeugnisse	
	- Getreide und Getreideerzeugnisse außer Maisnebenprodukte	8
	- Maisnebenprodukte	12
	-Ergänzungs- und Alleinfuttermittel außer :	5
	- Ergänzungs- und Alleinfuttermittel für Schweine	0,9
	- Ergänzungs- und Alleinfuttermittel für Kälber (<4Monate), Lämmer und Ziegenlämmer	2
ZEA	Futtermittelausgangserzeugnisse	
	- Getreide und Getreideerzeugnisse außer Maisnebenprodukte	2
	- Maisnebenprodukte	3
	- Ergänzungs- und Mischfuttermittel für Ferkel und Jungsauen	0,1
	- Ergänzungs- und Mischfuttermittel für Sauen und Mastschweine	0,25
	- Ergänzungs- und Mischfuttermittel für Kälber, Milchkühe, Schafe (einschließlich Lämmer) und Ziegen (einschließlich Ziegenlämmer)	0,5

Für den Menschen liegt der TDI (tolerable daily intake) für DON bei ein $\mu\text{g}/\text{kg}$ Körpergewicht pro Tag (EFSA, 2004a).

Für T-2/HT-2 gilt ein durch das SCF festgelegter kombinierter TDI von $0,06 \mu\text{g}/\text{kg}$ KGW (EUROPÄISCHE KOMMISSION, 2002b).

Für ZEA liegt der TDI gemäß JECFA bei $0,5 \mu\text{g}/\text{kg}$ Körpergewicht pro Tag. Die SCF wählte einen höheren Sicherheitsfaktor und empfiehlt daher einen TDI von $0,2 \mu\text{g}/\text{kg}$ Körpergewicht pro Tag (WHO, 2000; EUROPÄISCHE KOMMISSION, 2000).

2.3 Nachweis von Antiinfektiva in der Stutenmilch

Die Untersuchung von Kuhmilch auf Rückstände von Antiinfektiva ist eine routinemäßig durchgeführte Methode und wird täglich tausendfach angewandt (KRESS et al., 2007).

Bezüglich der Rückstandsuntersuchung von Hemmstoffen in Stutenmilch sind in der Literatur dagegen keinerlei Untersuchungen zu finden. Jedoch ist durch die Erwähnung der Stutenmilch in der Durchführungsverordnung zum Lebensmittelrecht Stutenmilch als Vorzugsmilch zu behandeln, somit müsste diese Milch auch auf Rückstände von Antiinfektiva untersucht werden. Über eine routinemäßige Untersuchung der Stutenmilch ist bisher nichts bekannt. Diese Nichterfüllung des Lebensmittelrechts wird dadurch noch gesteigert, dass bisher keine Angaben zu Methoden zur Untersuchung der Rückstandsbelastung der Stutenmilch existieren. Ein wesentlicher Grund könnte in der interferierenden Wirkung von Lysozym oder anderen ordinären Proteinen in der Stutenmilch liegen.

Die Eignung von kommerziellen Schnelltestsystemen wurde bereits von SCHULZE, 2002 untersucht. Dabei zeigten sich sowohl der Beta Star als auch der SNAP-Test prinzipiell (Spezifität, Sensivität) geeignet, β -Laktam-Antibiotika in Stutenmilch nachzuweisen. Für den Nachweis von Hemmstoffen bzw. Antiinfektiva waren alle zu dieser Zeit erhältlichen kommerziellen mikrobiologischen Hemmstofftestsysteme, auch nach Verlängerung der Inkubationszeit, nicht geeignet. Dies wurde auf den hohen Lysozymgehalt und die dadurch bedingte Hemmung des Testkeimes zurückgeführt. In dieser Arbeit wurde die Milch vor dem Einsetzen in das Testsystem lediglich 10 Minuten bei 80°C erhitzt, was jedoch nicht zu einer Deaktivierung des Lysozyms führte.

In der vorliegenden Arbeit wurde ein neu entwickelter Hemmstofftest getestet, der laut Hersteller für die Testung von Stutenmilch geeignet ist.

2.4 Analytische Besonderheiten bei der Untersuchung von Stutenmilch

Lysozym ist in der Lage Bakterienzellwände aufzulösen und wirkt somit bakterizid. Vornehmlich wirkt es gegen *E.coli* und fördert die Bifidusbakterien im Darm. Der Gehalt an Lysozym wird zwischen 0,51 bis 0,79 mg/ml angegeben (JAUREGUI-ADELL, 1975; MIELKE, 1994).

Bereits fünf µg/ml Lysozym sind nach SUHREN und HEESCHEN, 1990 in der Lage falschpositive Ergebnisse im Hemmstofftest zu liefern.

Problematisch ist, dass Lysozym relativ hitzestabil ist (JAUREGUI-ADELL, 1975). Bei der Untersuchung von Stutenmilch mittels EIA erwies sich Lysozym als Auslöser falscher Ergebnisse. Aufgrund dessen musste die Stutenmilch vor dem Einsetzen in den EIA für 30 min bei 78 °C erhitzt werden. Dadurch wurde das Lysozym deaktiviert (JAUREGUI-ADELL, 1975).

3. MATERIAL UND METHODEN

3.1 Materialien und Geräte

3.1.1 Chemikalien und Biochemika

Acetonitril	(Merck KGaA, 1.14291)
Ampicillin	(Sigma Chemie GmbH, A-9518)
Casein-Natriumsalz	(Sigma Chemie GmbH, C-8654)
Dichlormethan	(Merck KGaA, 1.06050)
di-Natriumhydrogenphosphat	(Merck KGaA, 1.06586)
Gentamycin	(Sigma Chemie GmbH, G-3632)
β -Glucuronidase mit Sulfatase	(Sigma Chemie GmbH, G-7017)
Magermilchpulver	(Merck KGaA, 1.15363)
Methanol	(Merck KGaA, 1.06009)
Natriumcarbonat	(Merck KGaA, 1.06392)
Natriumchlorid	(Merck KGaA, 1.06404)
Natriumhydrogencarbonat	(Merck KGaA, 1.06329)
Natriumhydroxidplätzchen	(Merck KGaA, 1.06498)
Penase Konzentrat	(Difco, Sparks, USA, P.Nr. 234620)
Penicillin-G-Na	(Sigma Chemie GmbH, P-3032)
Salzsäure	(Riedel-de-Haen GmbH, 30721)
Schwefelsäure	(Merck KGaA, 1.00731)
Stickstoff	(Messer GmbH, 0335)
Trichloressigsäure (TCA)	(Merck KGaA, 1.00810)
Tween 20	(Sigma Chemie GmbH, P-1379)
Wasserstoffperoxid	(Merck KGaA, 1.07209)

Alle verwendeten Reagenzien entsprachen mindestens p.a.-Qualität.

3.1.2 Mykotoxine

Deoxynivalenol	(Sigma Aldrich GmbH, D-0156)
Deepoxydeoxynivalenol	(Biopure Corporation, 002033)
Ochratoxin A	(Sigma Aldrich GmbH, O-1877)
HT-2 Toxin	(Biopure Corporation, BRM 002036)
T-2 Toxin	(Biopure Corporation, BRM 002035)
Zearalenon	(Sigma Aldrich GmbH, Z-2125)
α -Zearalenol	(Sigma Aldrich GmbH, Z-0166)
β -Zearalenol	(Sigma Aldrich GmbH, Z-2000)
Zearalanon	(Sigma Aldrich GmbH, Z-0167)
α -Zearalanol	(Sigma Aldrich GmbH, Z-0292)
β -Zearalanol	(Sigma Aldrich GmbH, Z-0417)

3.1.3 Immunreagenzien

Aflatoxin M₁-EIA:

Testkit Ridascreen Aflatoxin M₁ 30/15 der Firma R-Biopharm (R-1111)

Ochratoxin-EIA:

Antikörper: polyklonal: Antiserum gegen OTA¹ (SCHNEIDER et al. 2001)
(IgG-Rohfraktion, mit 70 % gesättigter Ammoniumsulfatlösung gefällt)

Konjugat: Ochratoxin A-Meerrettichperoxidase (OA-HRP)

T-2-EIA:

Immunitätsaffinitätssäule : EASI-EXTRACT T-2 & HT-2 (R-BIOPHARM,
Product-Code: P43)

Antikörper: polyklonal: Antiserum gegen HT-2¹ (ESGIN et al., 1989)
(IgG-Rohfraktion, mit 70 % gesättigter Ammoniumsulfatlösung gefällt)

¹ Die hier aufgeführten Antikörper zur Durchführung direkter kompetitiver EIA wurden am Lehrstuhl für Hygiene und Technologie der Milch, Ludwig-Maximilians-Universität München entwickelt und für diese Arbeit freundlicherweise von Herrn Prof. Dr. E. Märtlbauer und Herrn Dr. R. Dietrich zur Verfügung gestellt.

Antikörper : monoklonal : Antiserum HT2 I 3E2¹ (HACK et al. 1989,
DIETRICH et al. 1995) (IgG-Rohfraktion, mit 70 % gesättigter
Ammoniumsulfatlösung gefällt)

Konjugat: polyklonal: T2-HS-HRP
monoklonal: HT2-HS-HRP

Zearalenon-EIA:

Antikörper: polyklonal: Antiserum gegen Zearalenon¹ (USLEBER et al. 1992,
SEIDLER, 2007) (IgG-Rohfraktion, mit gesättigter
Ammoniumsulfatlösung gefällt)

Konjugat: Zearalenon-Oxim-Aktivester-Meerrettichperoxidase-Konjugat
(ZEA-Oxim-AE-HRP)

Ampicillin-EIA:

Antikörper: Antiserum gegen Ampicillin (Pool 170 (15.-37. Woche) ungefällt)

Konjugat: Ampicillin-HRP vom 31.01.02

Beta Star-Rezeptortest (Chr. Hansen, Nienburg)

Brillantschwarz-Reduktionstest P ESL (AIM GmbH, München)

3.1.4 Puffer und Lösungen

0,05 mol/l Bicarbonatpuffer (pH 9,6)

Enzymsubstrat/Chromogenlösung:

Substratlösung für Meerrettichperoxidase: 0,2 mol/l Citratpuffer (pH 3,95) mit
Zusatz von 3,15 mmol/l H₂O₂

Chromogenlösung (Tetramethylbenzidinlösung: 1 mmol/l 3,3',5,5'-
Tetramethylbenzidinlösung in neun Teilen Methanol und einem Teil Aceton)

Gebrauchsfertig: 20 Teile Citratpuffer mit H₂O₂-Zusatz und ein Teil
Tetramethylbenzidinlösung

1 mol/l Schwefelsäure (H₂SO₄)

0,01 mol/l phosphatgepufferte Kochsalzlösung (PBS, pH 7,2: 0,01 mol/l Phosphatpuffer mit 0,12 mol/l Natriumchlorid)

1 % bzw. 2 % Casein/PBS (1 g bzw. 2 g Natrium-Caseinat in 100 ml PBS)

Waschlösung (0,15 mol/l Natriumchlorid-Lösung mit Zusatz von 0,025 % Tween 20)

3 mol/l Natronlauge

3.1.5 Geräte und Hilfsmittel

Erlenmeyerkolben in verschiedenen Größen

Eppendorfgefäß 2ml

(Eppendorf)

Heiz- und Ultraschallbad Sonorex Super 10 P

(Bandelin electronic GmbH)

Mikrotiterplattentaumelgerät Polymax 1040

(Heidolph GmbH)

Papierfaltenfilter

(Schleicher & Schuell, 5155506)

Pasteurpipette

(VWR 612-1702)

pH-Meter inoLab Level 1 mit Sen Tix HW Elektrode

(WTW GmbH)

Sartorius Waage Master Pro LA

(Sartorius AG)

Sartorius Waage Basic plus

(Sartorius AG)

Vakuum-Rotationsverdampfer

(Heidolph Laborota 4003)

Variable Pipetten 0,5-10 µl, 10-100 µl, 100-1000 µl

(Eppendorf Gerätebau GmbH)

Variable 12-Kanal-Pipette 10-100 µl, 30-300 µl

(Eppendorf Gerätebau GmbH)

Vortex Genie 2

(Scientific Industries Inc.)

Wasserbad

(Köttermann)

Whatman-Filter Nr. 4

(Whatman, Cat No. 1004 110)

Zentrifuge Sepatech Varifuge RF

(Heraeus-Christ GmbH)

Zentrifuge Multifuge 3 S-R

(Heraeus-Christ GmbH)

3.1.6 Enzymimmuntests

EIA-Auto-Reader Tecan Sunrise

(Tecan GmbH, Crailsheim)

ImmunoPlate MaxiSorp

(Nunc GmbH, 439454)

Photometer UV 1601

(Shimadzu Deutschland GmbH)

Software: RIDAWIN Version 1.38

(R-Biopharm AG, Darmstadt)

Die Auswertung der Analysenergebnisse erfolgte unter Verwendung einer Standard-Tabellenkalkulationssoftware (Microsoft Excel).

3.1.7 Hochdruckflüssigkeitschromatographie

Immunaффinitätssäule: DON PREP (R-Biopharm AG, P 50B)
Easy-Extract Zearalenone (R-Biopharm AG, RP 90)

Vorsäule: Licrospher RP 18 (5 µm) 4x4 mm (Merck KGaA, 1.50957)

Säule: Licrospher RP 18 (5µm) 125x4 mm (Merck KGaA, 1.50943)

Pumpenserie P 580 (DIONEX GmbH)

Probengeber Modell ASI 100/ ASI 100 T (DIONEX GmbH)

Photodiode PDA 100 Array detector (DIONEX GmbH)

Fluoreszenzdetektor RF 2000 (DIONEX GmbH)

Säulenthermostat STH 583 (DIONEX GmbH)

Fraktionkollektor 202 (Gilson SAS)

Fraktioncontroller 201-202 (Gilson SAS)

3.1.8 Probenmaterial

Untersucht wurden 53 Sammel-tankmilchproben aus zwölf verschiedenen Betrieben, die in dem Zeitraum von November 2007 bis Juli 2008 ermolken wurden. Die Betriebe stammen aus acht Bundesländern und lassen somit einen Rückschluss über die deutschlandweite Belastung mit Mykotoxinen zu.

Jeder Betrieb stellte dabei mindestens drei Proben von verschiedenen Produktionstagen. Die Proben wurden überwiegend während der Winterfütterung mit eingelagerten Futtermitteln (meist selbst erzeugtes Getreide und Heu bzw. Heulage) ermolken. Ein Teil der Proben stammt auch aus dem Sommer, wo die Stuten in Weidehaltung gehalten werden. Die Proben wurden nach dem Melken innerhalb weniger Stunden verpackt und tiefgefroren. Im Institut wurden sie bis zur Analyse bei -80 °C gelagert.

Abbildung 10 zeigt die Verteilung der in die Untersuchung einbezogenen produzierenden Betriebe.



Abbildung 10: Übersicht der Standorte der in die Untersuchung einbezogenen Betriebe

3.2 Methoden zum Nachweis von Mykotoxinen und Hemmstoffen

Die eigenen Untersuchungen wurden grundsätzlich mittels Enzymimmuntest-Verfahren (Enzyme Immunoassay, EIA) für DON gesamt sowie teilweise für ZEA mittels HPLC durchgeführt.

Die Rückstandsuntersuchung auf Hemmstoffe erfolgte mittels Brillant-Reduktions-Test, Rezeptortest und Enzymimmuntest.

3.2.1 Enzymimmuntest für Aflatoxin M₁

Zur Analyse von Aflatoxin M₁ wurde ein kommerzieller Testkit entsprechend Herstellerangaben benutzt. Auf ein Entfetten der Milch vor dem Einsetzen in das Testsystem konnte aufgrund des geringen Fettgehaltes von Stutenmilch verzichtet werden. Alle Milchproben wurden 30 Minuten bei 78 °C (Wasserbad) erhitzt und anschließend direkt untersucht.

Zunächst wurden die benötigten Kavitäten in den Halterahmen eingesetzt und jeweils 100 µl der Standardlösung und der unverdünnten, erhitzten Stutenmilchproben als Doppelbestimmung in die entsprechenden Kavitäten pipettiert, vorsichtig manuell gemischt und 30 Minuten bei Raumtemperatur (20-25°C) inkubiert. Die Kavitäten wurden durch Ausschlagen der Flüssigkeit geleert und die Restflüssigkeit durch mehrmaliges kräftiges Ausklopfen auf saugfähige Labortücher entfernt. Anschließend erfolgte ein zweimaliger Waschschrift mit jeweils 250 µl Waschpuffer. Danach wurde jeweils 100 µl / Kavität Enzymkonjugat-Lösung in die Kavitäten pipettiert, vorsichtig manuell gemischt und 15 Minuten bei Raumtemperatur unter leichter Bewegung inkubiert. Die Platte wurde erneut gewaschen und anschließend in jede Kavität je 100 µl Enzym-Chromogenlösung pipettiert. Nach 15 Minuten wurde die Farbentwicklung durch Zugabe von 100 µl / Kavität Stoppreagenz beendet. Die Extinktion wurde bei einer Wellenlänge von 450 nm gemessen, die quantitative Auswertung des Tests erfolgte unter Verwendung einer Software für kompetitive Enzymimmuntests (RIDAWIN). Hierbei wurde jeweils eine Standardkurve (Kubische Splinefunktion) erstellt und die Toxingehalte der Proben anhand dieser Kurve errechnet. Gleichzeitig ermittelte das Programm für jeden Test die Konzentration halbmaximaler Extinktion (50 % B/B₀ x 100), die als Maß für die Validität der Standardkurve verwendet wurde. Zusätzlich wurden für jeden

Meßwert die mittlere prozentuale Extinktion ($B/B_0 \times 100$) sowie der Variationskoeffizient für Replikate ermittelt.

3.2.2 Enzymimmuntest für Ochratoxin A

3.2.2.1 Probenvorbereitung

Zur Extraktion von OTA wurde die von CURTUI und GAREIS (2001) beschriebene Extraktionsmethode verwendet. Dazu wurden zunächst 0,8 ml unerhitzte Stutenmilch, 0,2 ml 15 %ige Trichoressigsäure (TCA) und 1 ml Dichlormethan in ein 2 ml Eppendorf Reaktionsgefäß pipettiert. Das Gemisch wurde für 30 Sekunden stark gemischt (Vortex) und anschließend fünf Minuten bei $\sim 3.000 \times g$ zentrifugiert. Die Dichlormethanphase wurde mithilfe einer Pasteurpipette in ein weiteres 2 ml Eppendorf Reaktionsgefäß überführt. Die wässrige Phase wurde erneut mit 0,5 ml Dichlormethan versetzt, zehn Sekunden gevortext und für eine Minute bei $3.000 \times g$ zentrifugiert. Die Dichlormethanphase wurde abpipettiert und dem ersten Extrakt zugegeben. Anschließend wurde das Dichlormethan im Wasserbad bei $40 \text{ }^\circ\text{C}$ unter Stickstoff abgeblasen. Der Rückstand wurde mit 0,8 ml $0,13 \text{ mol/l NaHCO}_3$ -Lösung aufgenommen, auf dem Vortex gemischt und anschließend zum vollständigen Lösen für zwei Minuten in ein Ultraschallwasserbad gegeben. Die so vorbereiteten Probenextrakte wurden in den EIA eingesetzt.

3.2.2.2 EIA

Mikrotiterplatten wurden mit gefällttem Antiserum gegen OTA ($100 \text{ } \mu\text{l/Kavität}$ in Bicarbonatpuffer, $\text{pH} = 9,6$) beschichtet und über Nacht bei Raumtemperatur inkubiert (eine Aufbewahrung nicht verbrauchter Platten erfolgte bis zu vier Wochen bei $4 \text{ }^\circ\text{C}$). Nach einem dreimaligen Waschschrift wurden je Kavität $50 \text{ } \mu\text{l}$ Standardlösung (sechs Toxinstandards von 1000 pg/ml bis 1 pg/ml , sowie Negativkontrolle in $0,13 \text{ mol/l NaHCO}_3$ -Lösung) und vorbereitete Probenextrakte im Vierfachansatz und $50 \text{ } \mu\text{l}$ Toxin-HRP-Konjugatlösung (in $1\% \text{ Tween}20/0,13 \text{ mol/l NaHCO}_3$) pipettiert. Die Probenextrakte wurden standardmäßig unverdünnt und 1:3 mit NaHCO_3 verdünnt in den Test eingesetzt. Die Platten wurden für zwei Stunden bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend erneut gewaschen. Anschließend wurden pro Kavität jeweils $100 \text{ } \mu\text{l}$ Enzymsubstrat-Chromogenlösung pipettiert und die

Farbreaktion nach zehn bis 20 Minuten mit je 100 μl /Kavität 1 mol/l Schwefelsäure gestoppt. Messung und Auswertung erfolgten wie für Aflatoxin M₁ beschrieben.

Die verwendeten Verdünnungen der Immunreagenzien sowie Toxinstandardkonzentrationen sind in Tabelle 14 illustriert.

Tabelle 14: Verwendete Antiseren, Toxin-HRP-Konjugate und Toxin-Standards zum enzymimmunologischen Nachweis von OTA

Antiserum (Verdünnungen)	Toxin-HRP-Konjugat (Verdünnung)	Toxinstandardlösungen
OTA-Antiserum 164 Pool (1:6000 in Bicarbonat-puffer)	OTA-HRP 1:150000 in 1%Tween20/0,13 mol/l NaHCO ₃	1000/250/62,5/15,6/3,9/ 0,98 pg/ml in NaHCO ₃

3.2.3 Enzymimmuntest für T-2 Toxin

3.2.3.1 Probenvorbereitung

Jeweils 25 ml Stutenmilch wurden in einen Erlenmeyerkolben mit 183 μl β -Glucuronidase Typ HP-2 (Sigma G-7017) versetzt und zwei Stunden in einem Schüttelwasserbad bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurden die Proben in Metallzentrifugenröhrchen überführt und bei 20 °C 15 Minuten mit 3000 x g zentrifugiert. Anschließend wurde die Probe durch einen Papierfilter (Whatman-Filter Nr. 4) gefiltert und der pH mittels 3 mol/l NaOH-Lösung auf Werte zwischen 6,8 und 7,2 eingestellt.

Die Immunaффinitätssäulen (Easy Extract-T-2-Säulen) wurden auf eine Vakuumkammer (Supelco) aufgesetzt, der in den Säulen enthaltene Puffer ablaufen gelassen und dann langsam 20 ml entfettete Stutenmilch auf die Säule aufgebracht. Die Säule wurde zweimal mit 10 ml Aqua dest. gewaschen und anschließend trocken gesaugt. Die Extraktion des T-2 aus der Säule erfolgte mit 2 ml Methanol. Das Methanol wurde im Wasserbad (60 °C) unter Stickstoff abgeblasen, der Rückstand in 100 μl Methanol und 900 μl PBS resuspendiert und der gereinigte Extrakt in den EIA eingesetzt.

3.2.3.2 EIA

3.2.3.2.1 EIA zum Nachweis von T-2/HT-2-Toxin unter Verwendung polyklonaler Antikörper

Mikrotiterplatten wurden mit Anti Kaninchen IgG (100 µl/Kavität in Bicarbonatpuffer, pH = 9,6) beschichtet und über Nacht bei Raumtemperatur inkubiert (eine Aufbewahrung nicht verbrauchter Platten erfolgte bis zu vier Wochen bei 4 °C). Freie Proteinbindungsstellen wurden mit 3 % Casein/PBS (200 µl/Kavität) 30 Minuten bei Raumtemperatur abgesättigt. Nach einem dreimaligen Waschschrift wurden in jede Kavität jeweils 100 µl HT-2 Antiserum pipettiert und für eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Nach einem weiteren Waschschrift wurden je Kavität 50 µl Standardlösung (sechs Toxinstandards von 5000 pg/ml bis 4,9 pg/ml, sowie Negativkontrolle in 10 % MeOH/PBS) bzw. Probenextrakt (jeweils im Vierfachansatz) und 50 µl/Kavität Toxin-HRP-Konjugatlösung (in 1% Casein-PBS) pipettiert. Routinemäßig wurden die extrahierten Stutenmilchproben unverdünnt sowie 1:3 und 1:9 verdünnt (in 10 % MeOH/PBS) in das Testsystem eingesetzt. Die Platten wurden für eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend erneut gewaschen. Anschließend wurden pro Kavität jeweils 100 µl Enzymsubstrat-Chromogenlösung pipettiert und die Farbreaktion nach zehn bis 15 Minuten mit je 100 µl 1 mol/l Schwefelsäure gestoppt. Die Messung und Auswertung erfolgte wie für Aflatoxin M₁ beschrieben.

Die verwendeten Verdünnungen der Immunreagenzien sowie Toxinstandardkonzentrationen sind in Tabelle 15 aufgeführt.

Tabelle 15: Verwendete Antiseren, Toxin-HRP-Konjugate und Toxin-Standards des polyklonalen EIA zum Nachweis von T-2/HT-2

Antiserum (Verdünnungen)	Toxin-HRP-Konjugat (Verdünnung)	Toxinstandardlösungen
HT-2 Kan.-Antiserum 1 Pool 10/4/06 (1:10000 in PBS) auf in mit Anti-Kan- IgG (10 µg/ml in Bicarbonatpuffer) beschichteten Platten	T2-HS-HRP 1:150000 in 1% Casein-PBS	5000/1250/312,5/78,1/19,5/4,9 pg/ml in NaHCO ₃

3.2.3.2.2 EIA zum Nachweis von T-2-Toxin unter Verwendung monoklonaler Antikörper

Mikrotiterplatten wurden mit Anti Maus IgG (100 µl/Kavität in Bicarbonatpuffer, pH = 9,6) beschichtet und über Nacht bei Raumtemperatur inkubiert (eine Aufbewahrung nicht verbrauchter Platten erfolgte bis zu vier Wochen bei 4 °C). Freie Proteinbindungsstellen wurden mit 3 % Casein/PBS (200 µl/Kavität) 30 min bei Raumtemperatur abgesättigt. Nach einem dreimaligen Waschschrift wurden in jede Kavität mit jeweils 100 µl HT-2 Antiserum pipettiert und für eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Nach einem weiteren Waschschrift wurden je Kavität 50 µl Standardlösung (sechs Toxinstandards von 5000 pg/ml bis 4,9 pg/ml, sowie Negativkontrolle in 10 % MeOH/PBS) bzw. Probenextrakt (jeweils im Vierfachansatz) und 50 µl/Kavität Toxin-HRP-Konjugatlösung (in 1% Casein-PBS) pipettiert. Routinemäßig wurden die extrahierten Stutenmilchproben unverdünnt sowie 1:3 und 1:9 verdünnt (in 10 % MeOH/PBS) in das Testsystem eingesetzt. Die Platten wurden für eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend erneut gewaschen. Anschließend wurden pro Kavität jeweils 100 µl Enzymsubstrat-Chromogenlösung pipettiert und die Farbreaktion nach zehn bis 15 Minuten mit je 100 µl 1 mol/l Schwefelsäure gestoppt. Die Messung und Auswertung erfolgte wie für Aflatoxin M₁ beschrieben.

Die verwendeten Verdünnungen der Immunreagenzien sowie Toxinstandardkonzentrationen sind in Tabelle 16 gezeigt.

Tabelle 16: Verwendete Antiseren, Toxin-HRP-Konjugate und Toxin-Standards des monoklonalen EIA

Antiserum (Verdünnungen)	Toxin-HRP-Konjugat (Verdünnung)	Toxinstandardlösungen
HT-2 I 3E2 Maus-Antiserum (15 ng/ml) auf in mit Anti-Maus-IgG (10 µg/ml in Bicarbonat-puffer) beschichteten Platten	HT2-HS-HRP 1:300000 in 1% Casein-PBS	2000/666,7/222,2/74,1/24,7/8,2 pg/ml in NaHCO ₃

3.2.4 Enzymimmuntest für ZEA

3.2.4.1 Probenvorbereitung

Die Stutenmilchproben wurden zunächst für 30 Minuten bei 78 °C erhitzt und wieder abgekühlt. Ein Aliquot von 2 ml wurde mit 24 µl β-Glucuronidase-Sulfatase versetzt und für zwei Stunden bei 37 °C inkubiert, abgekühlt und in den EIA eingesetzt.

3.2.4.2 Enzymimmuntest

Mikrotiterplatten wurden mit gefällttem Antiserum gegen ZEA (100 µl/Kavität in Bicarbonatpufferlösung, pH = 9,6) beschichtet und über Nacht bei Raumtemperatur inkubiert (eine Aufbewahrung nicht verbrauchter Platten erfolgte bis zu vier Wochen bei 4 °C). Freie Proteinbindungsstellen wurden mit 2 % Casein-PBS (200 µl/Kavität) 30 Minuten bei Raumtemperatur abgesättigt. Nach einem dreimaligen Waschschrift wurden in jede Kavität 50 µl Standardlösung (sechs Toxinstandards von 10000 pg/ml bis 10 pg/ml, sowie Negativkontrolle in PBS) sowie die vorbereiteten Stutenmilchproben (im Vierfachansatz) und 50 µl/Kavität Toxin-HRP-Konjugatlösung (in 1 % Casein-PBS) pipettiert. Standardmäßig wurden die Stutenmilchproben unverdünnt und 1:2 verdünnt (in 1 % Casein-PBS) in das Testsystem eingesetzt. Die Platten wurden für zwei Stunden bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend erneut gewaschen. Anschließend wurden pro Kavität jeweils 100 µl Enzymsubstrat/Chromogenlösung pipettiert und die Farbreaktion nach sieben bis neun Minuten mit je 100 µl 1 mol/l Schwefelsäure gestoppt. Die Messung und Auswertung erfolgte wie für Aflatoxin M₁ beschrieben.

Die verwendeten Verdünnungen der Immunreagenzien sowie Toxinstandardkonzentrationen sind in Tabelle 17 aufgeführt.

Tabelle 17: Verwendete Antiseren, Toxin-HRP-Konjugate und Toxin-Standards zum enzymimmunologischen Nachweis von ZEA

Antiserum (Verdünnungen)	Toxin-HRP-Konjugat (Verdünnung)	Toxinstandardlösungen
ZEA-Antiserum Kan.14 Pool (1:4000 in Bicarbonat-puffer)	ZEA-Oxim-HRP 1:150000 in PBS/1% Casein-PBS	10/2,5/0,625/0,156/0,039/ 0,0098 ng/ml in NaHCO ₃

3.2.5 HPLC-Analyse für DON und DOM₁

Die Durchführung der Probenvorbereitung und der HPLC-Analyse für DON entsprach der von CURTUI et al., 2005 beschriebenen Methode. Hierbei werden in der Probe enthaltene DON bzw. DOM₁ mittels spezifischer Immunaффinitätssäulen extrahiert, die Detektion erfolgt mittels UV-Detektion bei einer Wellenlänge von 218 nm.

3.2.5.1 Probenvorbereitung

Zur Probenextraktion wurden zunächst 25 ml Stutenmilch mit 25.000 U β -Glucuronidase/Sulfatase versetzt und für zwei Stunden bei 37 °C im Schüttelwasserbad inkubiert. Anschließend wurde die Probe in Metallzentrifugenröhrchen überführt, zentrifugiert (2000 x g, 15 min, 20 °C) und das Milchfett mit einer Pasteurpipette entfernt. Ein Teil (20 ml) der so behandelten Probe wurde über ein Papierfilter filtriert, das Filtrat in ein 50 ml Becherglas überführt und der pH-Wert mit NaOH (3 mol/l) auf $7 \pm 0,2$ eingestellt. Die so vorbereitete Probenlösung wurde vollständig mittels Immunaффinitätssäule entsprechend Herstellerangaben aufgereinigt. Dazu wurde die Milchprobe langsam (Flussrate maximal ein Tropfen/Sekunde) auf eine vorbereitete IAC-Säule gegeben. Anschließend wurde die Säule zweimal mit jeweils 10 ml Aqua dest. gewaschen (ein bis zwei Tropfen/Sekunde). Die Toxine wurden mit 2 ml Methanol eluiert, das Lösungsmittel bei 60 °C unter Stickstoff abgedampft, und der Rückstand mit 200 μ l Acetonitril/Wasser (10:90, v/v) aufgenommen. Für die HPLC-Analyse wurden 50 μ l des Extrakts (entsprechend 5 ml Milchprobe) in das System injiziert.

3.2.5.2 HPLC-Analysebedingungen

Stationäre Phase :	Trennsäule RP 18 125 mm x 4 mm (5 µm) mit Vorsäule RP 18 4 mm x 4 mm (5 µm)
Mobile Phase :	Acetonitril/Wasser (10:90; v/v)
Säulentemperatur :	25 °C
Flussgeschwindigkeit :	1,0 ml/Minute
Injektionsvolumen :	50 µl
Retentionszeit für DON :	3,6 – 4,5 Minuten
Retentionszeit für DOM ₁ :	6,5 – 7,5 Minuten
Detektion :	UV/DAD, Quantifizierung bei 218 nm

Eine Überprüfung der HPLC-Methode wurde unter Verwendung künstlich mit DON bzw. DOM-1 kontaminierten Probenmaterials durchgeführt.

3.2.6 HPLC für ZEA

Die HPLC-Methodik für ZEA wurde zur Untersuchung eines Teils der Proben eingesetzt, insbesondere zur Überprüfung der Befunde des EIA.

3.2.6.1 Probenvorbereitung

Zur Probenextraktion wurden zunächst ebenfalls 25 ml Stutenmilch mit 25.000 U β -Glucuronidase/Sulfatase versetzt und für zwei Stunden bei 37 °C im Schüttelwasserbad inkubiert. Anschließend wurde die Probe in Metallzentrifugenröhrchen überführt und mit Acetonitril versetzt (Endkonzentration Acetonitril 20 %). Der pH-Wert wurde mit NaOH-Lösung (3 mol/l) auf pH 10-11 eingestellt und der Ansatz zentrifugiert (2000 x g, 15 Minuten, 20 °C). Anschließend wurde das Milchfett mit einer Pasteurpipette entfernt. Ein Teil (20 ml) der so behandelten Probe wurde über ein Papierfilter filtriert, das Filtrat in ein 50 ml Becherglas überführt und der pH-Wert mit HCl (1 mol/l) auf $7 \pm 0,2$ eingestellt. Die weitere Aufbereitung mittels IAC-Säule erfolgte gemäß Herstellerangaben. Die Toxine wurden mittels Methanol eluiert, dieser bei 60°C unter Stickstoff abgedampft und der Rückstand mit 200 µl Methanol aufgenommen. Für die HPLC-Analyse wurden 50 µl des Extrakts (entsprechend 5 ml Milchprobe) in das System injiziert.

3.2.6.2 HPLC-Analysebedingungen

Bei Zearalenon erfolgt zusätzlich auch die Detektion der ZEA-Analoga (α -Zearalenon, β -Zearalenon, Zearalanol, α -Zearalanol, β -Zearalanol).

Stationäre Phase :	Trennsäule RP 18 125 mm x 4 mm (5 μ m) mit Vorsäule RP 18 4 mm x 4 mm (5 μ m)
Mobile Phase :	Methanol/Acetonitril/Wasser (40:20:40; v/v/v) (Fließmittel A, ZEA, Zearalanon, α -Zearalenol und α -Zearalanol) Acetonitril/Wasser (40:60; v/v) (Fließmittel B, β -Zearalenol und β -Zearalanol) beide Fließmittel pH 3 (85 % o-Phosphorsäure)
Säulentemperatur :	25 °C
Flussgeschwindigkeit :	1,0 ml/Minute
Detektion :	Fluoreszenz, λ_{ex} 274 nm, λ_{em} 446nm

Die Quantifizierung der Toxine erfolgte mittels externer Standards (Standardkurven mit sechs Konzentrationen, zwei Injektionen/Konzentration).

Eine Überprüfung der HPLC-Methode wurde durch Verwendung künstlich mit ZEA kontaminierten Probenmaterials durchgeführt.

3.2.7 Mikrobiologischer Nachweis von Antiinfektiva (Hemmstoffe)

Die Durchführung der Hemmstofftests erfolgte analog dem Vorgehen bei Kuhmilch. Im Institut stand ein integriertes Nachweissystem zur Identifizierung und Quantifizierung von Antiinfektiva in Kuhmilch zu Verfügung. Daher wurden die in dieser Arbeit gewonnen Stutenmilchproben auch auf das Vorhandensein von Antiinfektiva geprüft. Bezüglich der Details dieser Untersuchungsmethode sei auf KRESS et al. (2007) verwiesen.

Abweichend davon wurde die Stutenmilch vor dem Einsetzen in den Test bei 78 °C für 30 Minuten (Wasserbad) erhitzt, um störende Wirkungen des Lysozyms zu vermeiden.

3.2.7.1 Brillantschwarz-Reduktionstest

Die Untersuchung erfolgte mittels eines modifizierten kommerziellen Brillantschwarz-Reduktionstest (BRT-P, AIM GmbH, München). Die Verwendung der Testplatten erfolgte innerhalb der vom Hersteller angegebenen Haltbarkeitsfristen. Als Negativkontrolle wurde sowohl pasteurisierte Kuh- wie auch Stutenmilch in das Testsystem eingesetzt.

Zur Kontrolle des Testsystems wurden standardmäßig Positivkontrollen in Kuh- und Stutenmilch mitgeführt. Dazu wurde durch Mischen von Aqua dest. und PenG-Natrium eine Standardlösung mit einer Endkonzentration von 1mg/ml Penicillin G (PenG) hergestellt. Unter Verwendung von hemmstofffreier Kuh- bzw. Stutenmilch wurden mit dieser Stammlösung Positivkontrollen mit Penicillin G-Gehalten von 4ng/ml und 2 ng/ml hergestellt. Zur Überprüfung der Wirksamkeit der Penicillinase als Bestätigungsreaktion (KRESS et al., 2007) wurde jeweils 1 ml einer künstlich mit Penicillin G kontaminierten Probe (4 ng/ml) mit 20 µl Penicillinase („Penase“) versetzt, unter leichter Bewegung (Taumler) 30 min bei Raumtemperatur inkubiert und ebenfalls im BRT untersucht.

Schließlich wurde eine Überprüfung der Nachweisgrenze des BRT für die bei Stuten häufig eingesetzten Wirkstoffe Amoxicillin (4 ng/ml, 2 ng/ml, 1 ng/ml bzw. 0,5 ng/ml) bzw. Gentamycin (400 ng/ml, 200 ng/ml, 100 ng/ml, 50 ng/ml, 20 ng/ml bzw. 10 ng/ml) durchgeführt. Hierzu wurden Stutenmilchproben künstlich mit Amoxicillin bzw. Gentamycin kontaminiert, wie oben beschrieben erhitzt und im BRT untersucht.

Zur Testdurchführung wurde jeweils ein 100 µl Aliquot der vorher gut durchmischten Proben im Doppelansatz in den BRT pipettiert. Standardmäßig wurden die Proben unverdünnt und 1:3 eingebracht. Die Testplatte wurde unverzüglich mittels einer auf der Platte aufgebrachten Klebefolie verschlossen und für zweieinhalb Stunden ± 30 Minuten in einem vorgewärmten Wasserbad bei $64 \pm 1^\circ\text{C}$ inkubiert. Die Inkubationszeit richtete sich nach der Färbung der Negativkontrolle. Anschließend wurde die Klebefolie entfernt, das Probenmaterial entfernt und die Kavitäten vorsichtig mit Aqua dest. ausgespült. Die Auswertung erfolgte visuell und nach Messung der Extinktion mittels Auswertung einer Software. Zur Absicherung möglicher positiver Befunde standen ein Rezeptortest (Beta-Star, erfasst beta-Laktamantibiotika) und ein Enzymimmuntest (Ampicillin-EIA, gruppenspezifisch für Penicilline) zur Verfügung.

3.2.7.2 Beta-Star

Eine Stutenmilchprobe, die im BRT ein positives Ergebnis erbracht hatte, wurde gemäß den Herstellerangaben mittels eines Rezeptortests (Beta-Star Teststreifen) untersucht.

Dazu wurden 0,1 ml der Probe zur Reagenzlösung in ein Eppendorf-Gefäß pipettiert, gemischt und für drei Minuten in einem Wasserbad bei $47,5 \pm 0,5^\circ\text{C}$ inkubiert. Der Teststreifen wurde in die Lösung eingetaucht, zwei Minuten in der Probenlösung belassen und anschließend das Ergebnis abgelesen.

3.2.7.3 Ampicillin-EIA

Im BRT positive Stutenmilchproben wurden zur weiteren Untersuchung im Ampicillin-EIA getestet (STRASSER et al., 2003). Mikrotiterplatten wurden mit gefälltem Antiserum gegen Ampicillin (100 μl /Kavität in Bicarbonatpuffer, pH = 9,6) beschichtet und über Nacht bei Raumtemperatur inkubiert. Freie Proteinbindungsstellen wurden mit 2 % Casein/PBS (200 μl /Kavität) 30 min bei Raumtemperatur abgesättigt. Nach einem dreimaligen Waschschrift wurden Standardlösung (sechs Penicillinstandards von 100 ng/ml bis 0,032 ng/ml, sowie Negativkontrolle in 10 % Magermilch-Aqua dest.) und die vorbereiteten Stutenmilchproben, im Vierfachansatz und Ampicillin-HRP-Konjugat (in 1% Casein-PBS) (jeweils 50 μl /Kavität) pipettiert. Standardmäßig wurden die Stutenmilchprobe unverdünnt und 1:3 in das Testsystem eingesetzt. Analog dem BRT-Test wurde ein weiteres Aliquot von 1 ml Probe mit 20 μl Penase versetzt und 30 Minuten unter leichter Bewegung (Taumler) inkubiert und ebenfalls im EIA eingesetzt. Die Platten wurden für zwei Stunden bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend erneut gewaschen. Anschließend wurden pro Kavität jeweils 100 μl Enzymsubstrat-Chromogenlösung pipettiert und die Farbreaktion nach 14 Minuten mit je 100 μl 1 mol/l Schwefelsäure gestoppt. Die Messung und Auswertung erfolgte wie für Aflatoxin M₁ beschrieben. Die verwendeten Verdünnungen der Immunreagenzien sowie Penicillinstandard-Konzentrationen sind in Tabelle 18 aufgeführt.

Tabelle 18: Verwendete Antiseren, HRP-Konjugate und Antibiotika-Standards zum enzymimmunologischen Nachweis von Ampicillin

Antiserum (Verdünnungen)	HRP-Konjugat (Verdünnung)	Penicillinstandardlösungen
Ampicillin-Antiserum 170- Pool (15.-37. Woche) (1:1000 in Bicarbonat-puffer)	Ampi-C-HRP 1:1000 in 1% Casein-PBS	100/20/4/0,8/0,16/0,032 ng/ml in 10% Magermilch- Aqua dest.

4. ERGEBNISSE

4.1 Aflatoxin M₁

Die Untersuchung umfasste 53 Proben bei einer Nachweisgrenze des Testkits von fünf ng/kg. Die Proben ergaben alle Extinktionswerte von $> 80\%$ B/B₀ und wurden daher als negativ für Aflatoxin M₁ gewertet. Somit enthielten alle untersuchten Proben Aflatoxin M₁-Konzentrationen kleiner fünf ng/kg. Abbildung 11 zeigt eine typische Aflatoxin M₁-Standardkurve.

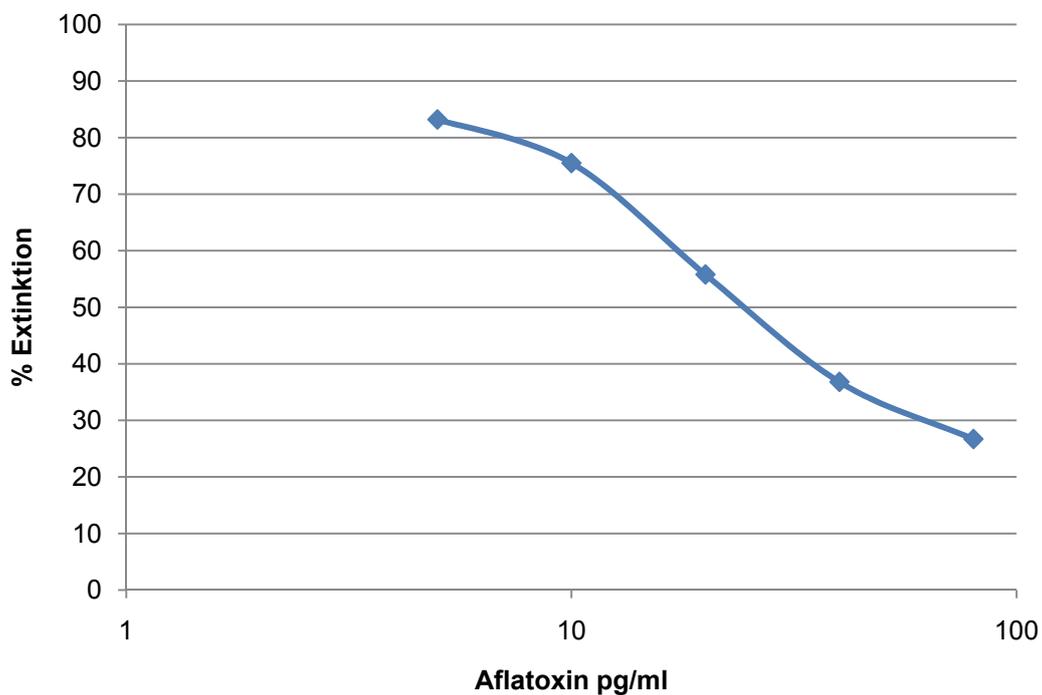


Abbildung 11: Charakteristische Standardkurve des kompetitiven EIA zum Nachweis von Aflatoxin M₁. Nach Auswertung von drei Standardkurven lag die mittlere 50%-Inhibitionsdosis bei $22,2 \pm 3,4$ pg/ml. Die Nachweisgrenze des Testsystems wurde als ein Drittel der 50%-Dosis festgelegt. Dieser Wert entsprach in der Regel der 70%-Inhibitionsdosis. Die Variationskoeffizienten ($n=2$) lagen in der Regel unter 10 %.

Zur Überprüfung des Testsystems wurde künstlich mit Aflatoxin M₁ kontaminierte Stutenmilch untersucht. Dabei ergaben sich Wiederfindungsraten zwischen 90 und 173 %. Eine Übersicht ist in Tabelle 19 ersichtlich.

Tabelle 19: Übersicht über die Ergebnisse des Aflatoxin M₁-EIAs für künstlich mit Aflatoxin M₁ kontaminierten Stutenmilchproben; VK = Variationskoeffizient

Probenanzahl (n)	Aflatoxinzusatz (pg/ml)	Wiederfindung (%)	
		Mittelwert (%)	VK (%)
1	15	90,5	-
2	10	133	6,7
2	6	132,6	30,4

4.2 Ochratoxin A

Für Ochratoxin A ergaben die Untersuchungen von 52 Stutenmilchproben alle Extinktionswerte größer 80 % B/B₀. Die Nachweisgrenze des Testsystems für OTA in Milch lag bei 15 ng/kg. Somit enthielten alle Proben weniger als 15 ng/kg Ochratoxin A. Abbildung 12 zeigt eine typische Standardkurve für OTA.

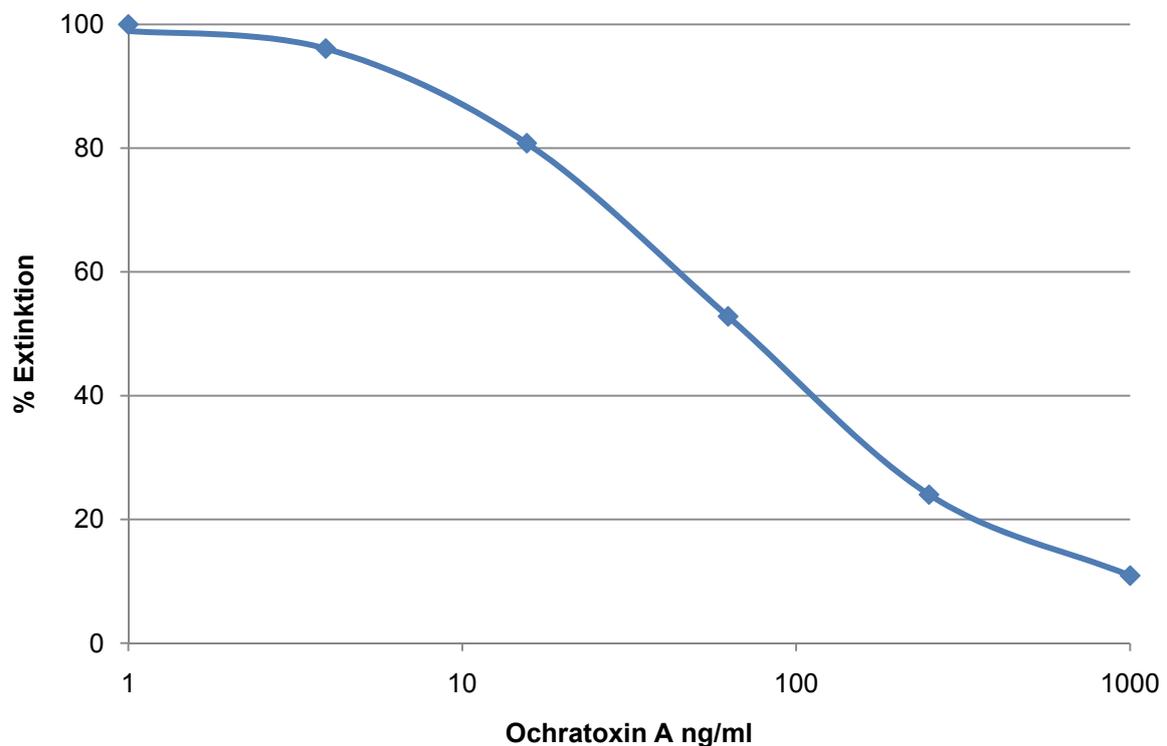


Abbildung 12: Charakteristische Standardkurve des kompetitiven EIA zum Nachweis von Ochratoxin A. Nach Auswertung von neun Standardkurven lag die mittlere 50%-Inhibitionsdosis bei $57,6 \pm 8,6$ pg/ml. Die Nachweisgrenze des Testsystems wurde als ein Drittel der 50%-Dosis festgelegt. Dieser Wert entsprach in der Regel der 70%-Inhibitionsdosis. Die Variationskoeffizienten (n=9) lagen in der Regel unter 10 %.

Bei der Überprüfung des eingesetzten Tests mittels künstlich kontaminierten Proben zeigten sich Wiederfindungsraten zwischen 54 und 89 %. Der Variationskoeffizient betrug 13 %. In Tabelle 20 ist eine Übersicht über die künstlich kontaminierten Proben ersichtlich.

Tabelle 20: Wiederfindung von künstlich mit Ochratoxin A kontaminierten Proben; VK=Variationskoeffizient

Probenanzahl (n)	Ochratoxinzusatz (ng/ml)	Wiederfindung (%)	
		Mittelwert (%)	VK (%)
1	0,25	54,4	-
6	0,5	75,8	13

4.3 T-2 Toxin

Bezüglich einer Belastung mit T-2-Toxin wurden 24 Stutenmilchproben nach vorheriger Aufreinigung mittels IAC mit einem institutseigenen EIA untersucht. Die Nachweisgrenze des Testsystems lag bei circa 50 pg/ml. Da jedoch die Probenextrakte mittels IAC-Säulen um einen Faktor von 20 aufkonzentriert wurden, wurde eine rechnerische Nachweisgrenze für T-2 Toxin in Stutenmilch von 2,5 pg/ml erreicht. Abbildung 13 zeigt eine typische Standardkurve des enzymimmunologischen Verfahrens für T-2/HT-2 unter Verwendung polyklonaler Antikörper.

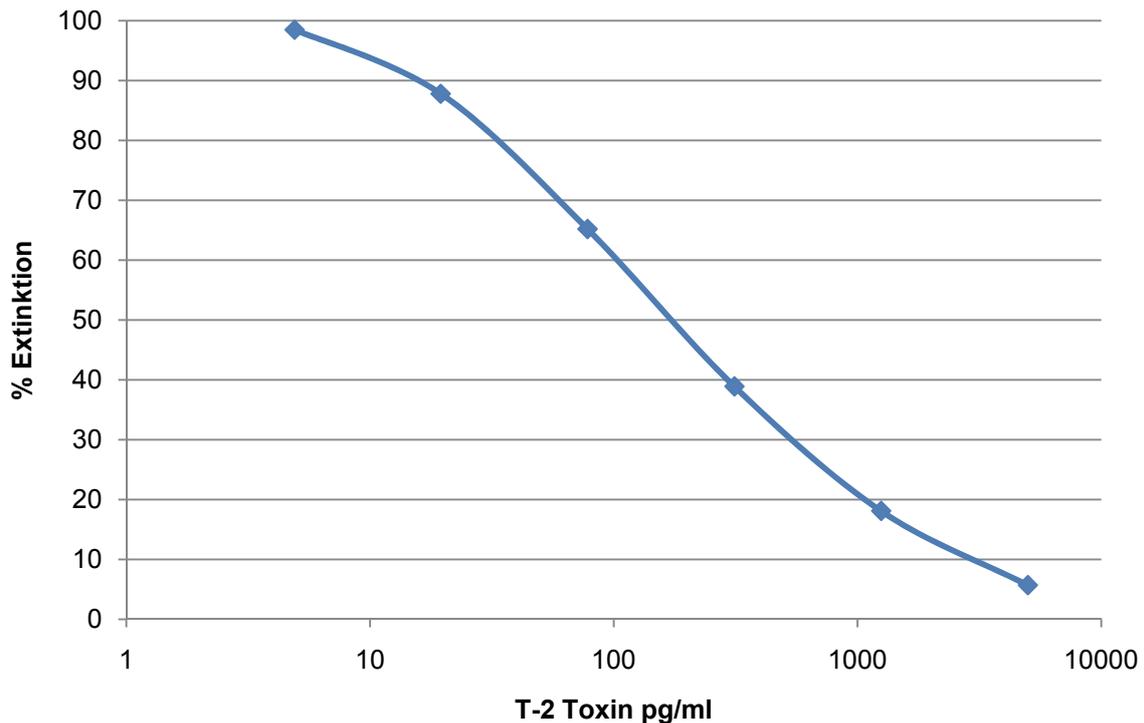


Abbildung 13: Charakteristische Standardkurve des kompetitiven EIA zum Nachweis von T-2/HT-2-Toxin unter Verwendung polyklonaler Antikörper gegen T-2. Nach Auswertung von sieben Standardkurven lag die mittlere 50%-Inhibitionsdosis bei $159,6 \pm 10,1$ pg/ml. Die Nachweisgrenze des Testsystems wurde als ein Drittel der 50%-Dosis festgelegt. Dieser Wert entsprach in der Regel der 70%-Inhibitionsdosis. Die Variationskoeffizienten ($n=7$) lagen in der Regel unter zehn %.

Die untersuchten Proben wiesen Belastungen mit T-2/HT-2 von durchschnittlich 7,4 pg/ml auf. Einige Proben, die im Testsystem unter Verwendung kreuzreagierender polyklonaler Antikörper für T-2 (relative Kreuzreaktion mit HT-2 circa 50 %) deutlich positive Messwerte im Bereich von 20 pg/ml aufwiesen, wurden in einem weiteren EIA unter Verwendung spezifischer monoklonaler Antikörper für T-2-Toxin (relative Kreuzreaktion mit HT-2 <10 %) untersucht.

In Tabelle 21 sind die Ergebnisse des Enzymimmuntests für T-2/HT-2 (polyklonale Antikörper) bzw. T-2 Toxin (monoklonale Antikörper) dargestellt. Hieraus wird deutlich, dass der „polyklonale“ Antikörper-EIA stets deutlich höhere Messwerte als das Testsystem unter Verwendung monoklonaler Antikörper lieferte. Dies ist unter der Annahme, dass T-2 Toxin wie bei anderen Spezies (SCF, 2001) zu HT-2 Toxin deacetyliert wird, als plausibel anzusehen. Die in den Testsystemen erhaltenen Messwerte sind somit vermutlich überwiegend auf HT-2 Toxin zurückzuführen.

Tabelle 21: Vergleichende Darstellung der Ergebnisse des Enzymimmuntests für T-2/HT-2 (polyklonale Antikörper) bzw. T-2 Toxin (monoklonale Antikörper)

Probennummer	Messwert (pg/ml) EIA-Testsystem unter Verwendung	
	Polyklonaler Antikörper*	Monoklonaler Antikörper**
1	9,7	n.b.
2	< 2,5	n.b.
8	5,1	n.b.
9	23,3	2,4
11	10,0	n.b.
12	2,3	n.b.
13	6,8	n.b.
16	5,5	n.b.
18	5,4	n.b.
21	5,3	n.b.
26	7,0	n.b.
29	23,0	5,0
31	1,6	n.b.
33	6,3	n.b.
35	2,8	n.b.
37	1,8	1,3
39	4,3	n.b.
42	3,5	n.b.
44	5,0	n.b.
47	6,6	n.b.
48	6,2	n.b.
51	20,5	5,7

* Relative Kreuzreaktion mit HT-2 Toxin circa 50 %; ** Relative Kreuzreaktion mit HT-2 Toxin < 10 %; n.b. : nicht bestimmt

Zur Überprüfung der Funktionsfähigkeit des verwendeten Analysensystems wurden künstlich mit T-2 Toxin kontaminierte Stutenmilchproben untersucht. Die Wiederfindungsraten lagen durchschnittlich nur bei 29,3 %, bei einem Variationskoeffizienten von 20 %. Bei der festgestellten niedrigen Wiederfindung ist allerdings darauf hinzuweisen, dass der Konzentrationsbereich im extremen Spurenbereich von zehn bis 100 pg/ml lag. Tabelle 22

zeigt eine Übersicht der Analysenergebnisse für künstlich mit T-2 Toxin kontaminierten Proben.

Tabelle 22: Wiederfindung von T-2-Toxin in künstlich kontaminierten Stutenmilchproben

Probenanzahl (n)	T-2-Zusatz (pg/ml)	Wiederfindung (%)	
		Mittelwert (%)	VK (%)
3	100	27,6	25
4	10	30,7	15

4.4 DON

Mittels HPLC wurden 25 Stutenmilchproben auf DON und DOM₁ untersucht. Da die zur Probenvorbereitung verwendeten IAC-Säulen neben DON auch den Hauptmetaboliten DOM₁ binden, konnte eine gleichzeitige Bestimmung beider Analyten durchgeführt werden. In 21 Proben wurden weder DON noch DOM₁ nachgewiesen (<0,5 ng/ml). Vier Proben von vier unterschiedlichen Produzenten wiesen schwach positive Befunde für DON (0,5-4 ng/ml) auf, in einer Probe wurde zudem DOM₁ nachgewiesen. Die Untersuchungen der positiven Proben wurden mehrfach wiederholt, teilweise nach erneuter Extraktion der Proben. Tabelle 23 zeigt eine Übersicht über die für DON und DOM₁ enthaltenen Ergebnisse in positiven Proben.

Tabelle 23: Ergebnisse der HPLC-Bestimmung von DON in vier Stutenmilchproben mit positiven Befunden für DON und/oder DOM₁

Probe :	DON (ng/ml)	DOM ₁ (ng/ml)
5	2,13	< 0,5
5 Wiederholung	2,66	0,80
5 Wiederholung*	4,05	1,25
16	1,96	< 0,5
16 Wiederholung*	3,58	
8 (3 Wiederholungen)	Spuren ¹	
45	Spuren ¹	

* erneute Extraktion; ¹ ~ 0,5 ng/ml

Die Nachweisgrenze der eingesetzten Methode lag bei circa 0,5 ng/ml, die Bestimmungsgrenzen bei circa ein ng/ml (CURTUI et al., 2005). Die Abbildungen 14 bis 17 zeigen ausgewählte HPLC-Chromatogramme für Extrakte aus Stutenmilch.

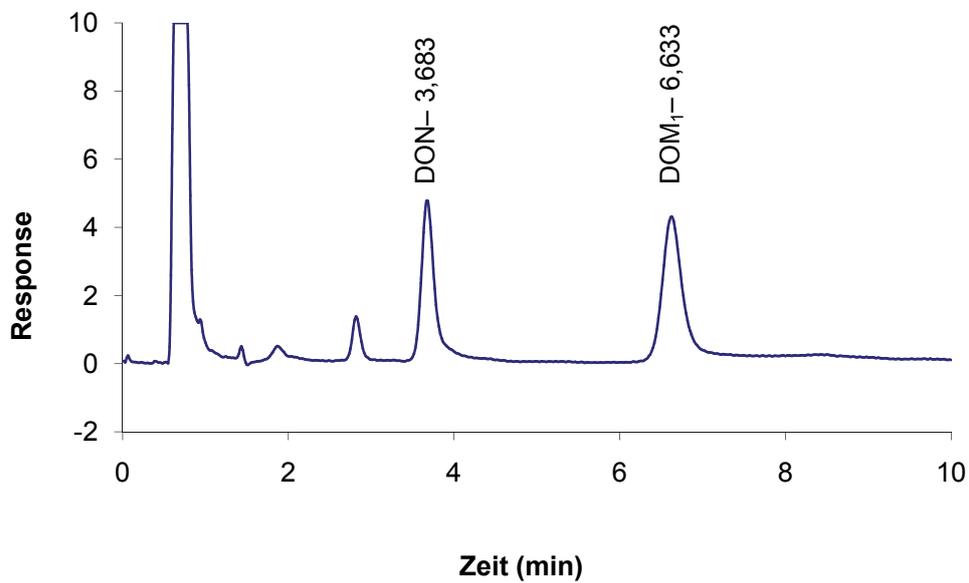


Abbildung 14: HPLC-UV-Chromatogramm einer DON/DOM₁-Standardmischung (2000 ng/ml).

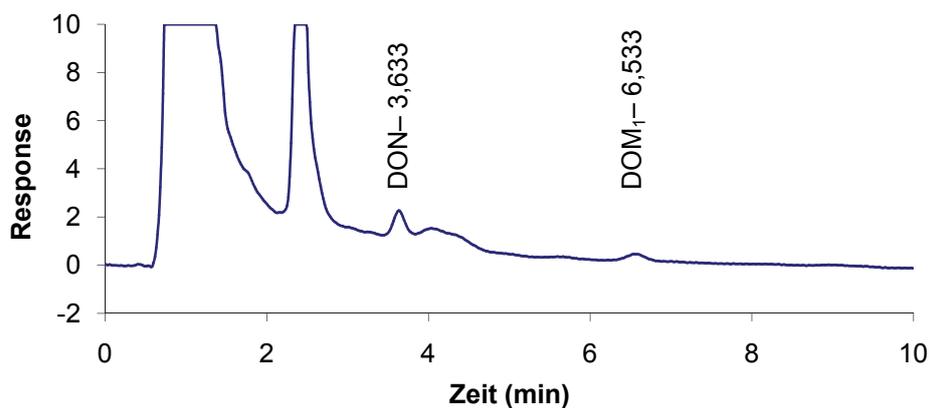


Abbildung 15: HPLC-UV-Chromatogramm einer natürlich kontaminierten Stutenmilchprobe. Die DON-Konzentration betrug vier ng/ml, die DOM₁-Konzentration 1,25 ng/ml.

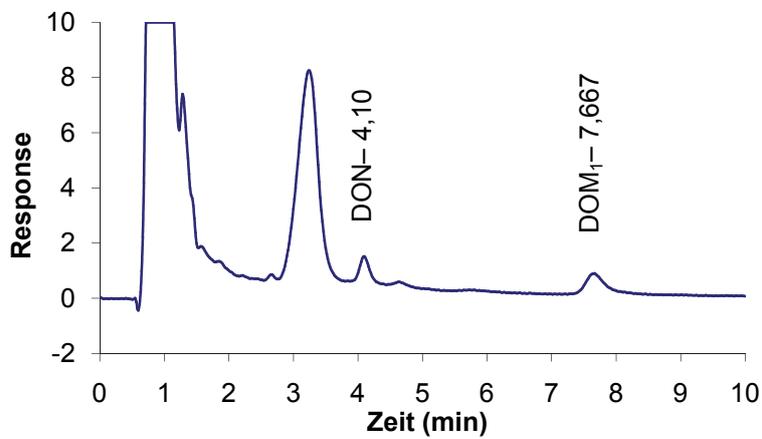


Abbildung 16: HPLC-UV-Chromatogramm einer künstlich mit DON und DOM₁ kontaminierten Stutenmilchprobe (2,5 ng/ml).

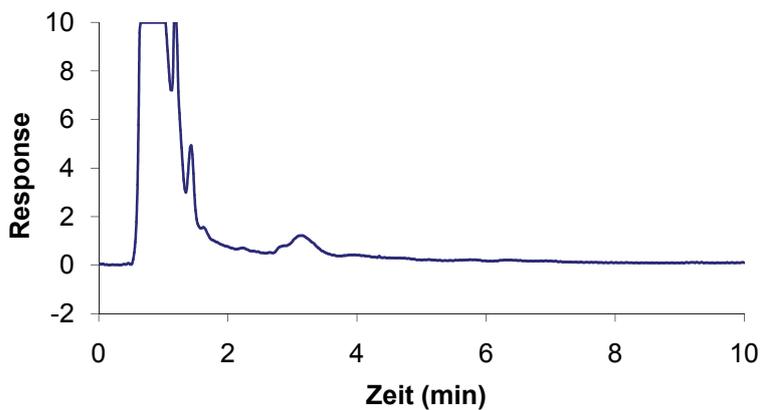


Abbildung 17: HPLC-UV-Chromatogramm einer für DON und DOM₁ negativen (<0,5 ng/ml) Stutenmilchprobe.

Die Kontrolle der Wiederfindung von DON und DOM₁ mit der verwendeten Testmethode mittels künstlich kontaminierten Proben führte zu Wiederfindungsraten von durchschnittlich 66 - 120 % DON bzw. 84 - 101 % DOM₁ (siehe Tabelle 24).

Tabelle 24: Übersicht über die künstlich mit DON kontaminierten Proben

Probe gespikt mit	Gefunden DON (ng/ml)	Wiederfindung (%)	Gefunden DOM ₁ (ng/ml)	Wiederfindung (%)
46 + 10 ng/ml	10,14	101,4	8,45	84,5
47 + 10 ng/ml	9,66	96,6	8,71	87,1
1 + 2,5 ng/ml	2,19	88,0	2,23	89
8 + 2,5 ng/ml	3,02	120,8	2,54	101,5
18 + 1 ng/ml	0,66	66	-	-

4.5 ZEA

Die Untersuchung von 51 Stutenmilchproben mittels EIA ergab für alle Proben schwach positive Ergebnisse, der Mittelwert lag bei 267 pg/ml Zearalenon. Die rechnerische Nachweisgrenze lag bei dieser Methode bei 110 ng/kg. Abbildung 18 zeigt die Verteilung der ZEA-Messwerte über den Untersuchungszeitraum. Maximalwerte lagen bei circa 350 pg/ml. Eine typische Standardkurve des EIA für ZEA ist in Abbildung 19 dargestellt.

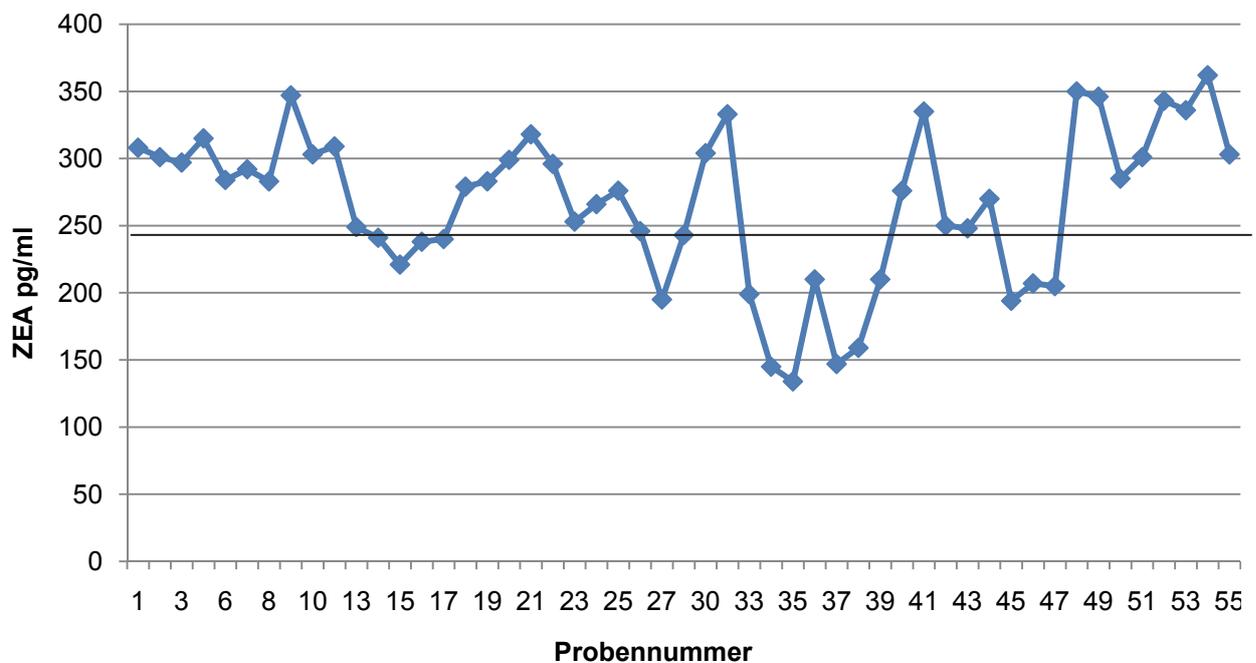


Abbildung 18: Messwerte des Enzymimmuntests für ZEA in Stutenmilch, chronologische Sortierung nach Probennummern (zur Orientierung ist der arithmetische Mittelwert der Messwerte (267 pg/ml) aufgetragen)

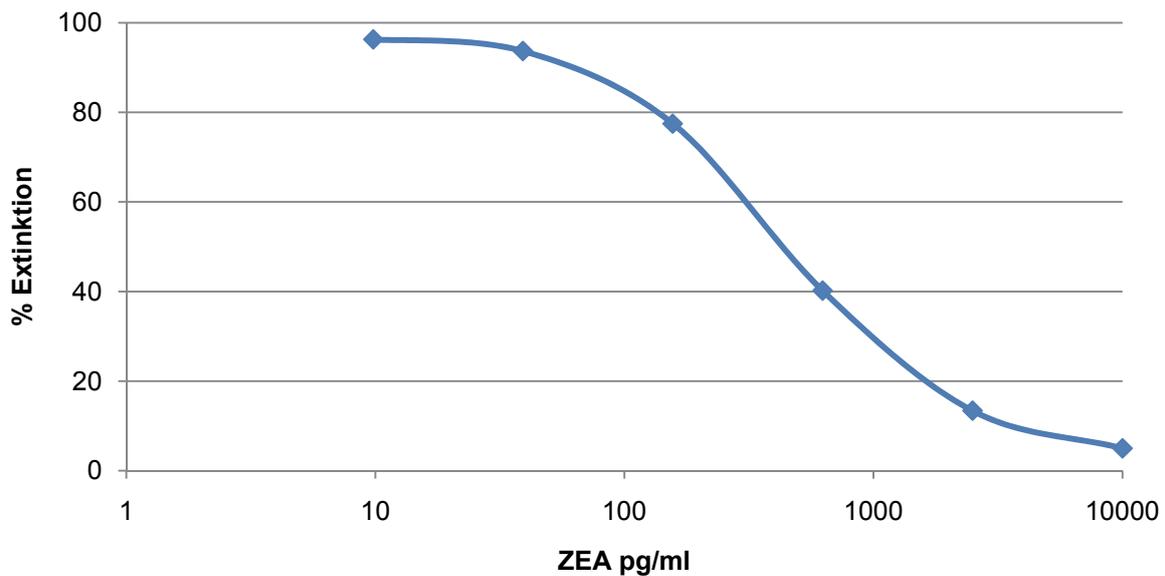


Abbildung 19: Charakteristische Standardkurve des kompetitiven EIA zum Nachweis von Zearalenon. Nach Auswertung von zwölf Standardkurven lag die mittlere 50%-Inhibitionsdosis bei $406,6 \pm 43,1$ pg/ml. Die Nachweisgrenze des Testsystems wurde als ein Drittel der 50%-Dosis festgelegt. Dieser Wert entsprach in der Regel der 70%-Inhibitionsdosis. Die Variationskoeffizienten ($n=12$) lagen in der Regel unter 10 %.

Aufgrund ausgeprägter Kreuzreaktionen des EIA werden mittels des EIA nicht nur ZEA, sondern auch alle Analoga (α -, β -Zearalenol, Zearalanon, α -, β -Zearalanol) erfasst (SEIDLER, 2007). Die entsprechenden Kreuzreaktionen sind in Tabelle 25 ersichtlich.

Tabelle 25: Relative Kreuzreaktionen verschiedener ZEA-Analoga im EIA unter Verwendung von ZEA-Antiserum (Pool Kaninchen 14)

Toxin	Relative Kreuzreaktion (%)
Zearalenon	100
alpha-Zearalenol	26,6
beta-Zearalenol	16,8
Zearalanon	40,9
alpha-Zearalanol	10,7
beta-Zearalanol	16,9

Durch die Vorbehandlung der Probe mit Glucuronidase/Sulfatase sollten auch konjugierte ZEA-Metaboliten erfassbar gemacht werden.

Die Überprüfung der Wiederfindung von künstlich kontaminierten Stutenmilchproben ergab zufrieden stellende Ergebnisse zwischen 64 und 117 % bei einem Variationskoeffizient von 14 % (siehe Tabelle 26).

Tabelle 26: Wiederfindung von ZEA in künstlich kontaminierten Stutenmilchproben

ZEA Zusatz (ng/ml)	n	Ø Wiederfindung (%)	Ø Variationskoeffizient (%)
1	11	97,4	14

Zur Überprüfung der Ergebnisse der verwendeten EIA-Methode wurden die Proben mit den höchsten Ergebnissen auch mittels HPLC untersucht. Hierbei ergaben sich bei einer Nachweisgrenze von 50 ng/kg keine Hinweise auf eine Kontamination der Stutenmilch mit ZEA.

Somit ist zu vermuten, dass die im EIA ermittelten Belastungen von ~300 pg/ml lediglich einen Matrixeffekt darstellen, d.h. falsch-positiv sind. Denkbar wäre aber auch die Anwesenheit von ZEA-Metaboliten, die mittels HPLC weniger empfindlich erfassbar sind. In Tabelle 27 sind für drei ausgewählte Proben vergleichend die Ergebnisse der Untersuchungen mittels HPLC und EIA dargestellt.

Tabelle 27: Vergleich von Untersuchungen mittels HPLC und EIA

Probe	HPLC (pg/ml)	EIA mit Glucuronidase (pg/ml)	EIA ohne Glucuronidase (pg/ml)
9	< 50	535,4	347
20	< 100	384,5	438,6
26	< 50	279	331,1

In den Abbildungen 20 bis 22 sind beispielhaft einige HPLC-Chromatogramme für Standardlösungen von ZEA und ZEA-Analoga (Abbildung 20), einer künstlich mit ZEA kontaminierten Stutenmilchprobe (Abbildung 21) sowie einer ZEA-negativen Stutenmilchprobe (Abbildung 22) dargestellt.

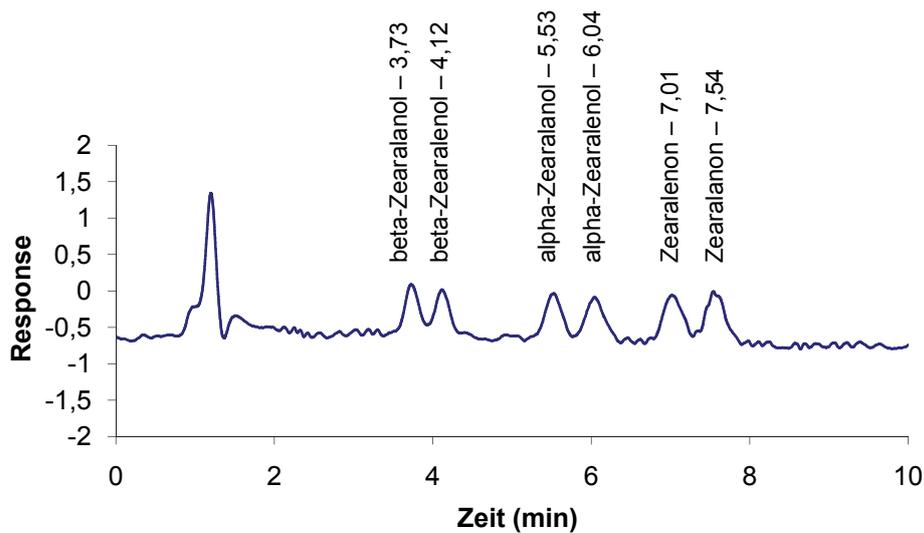


Abbildung 20: HPLC-UV-Chromatogramm einer ZEA-Standardlösung mit einer Konzentration von ZEA von 60,6 ng/ml

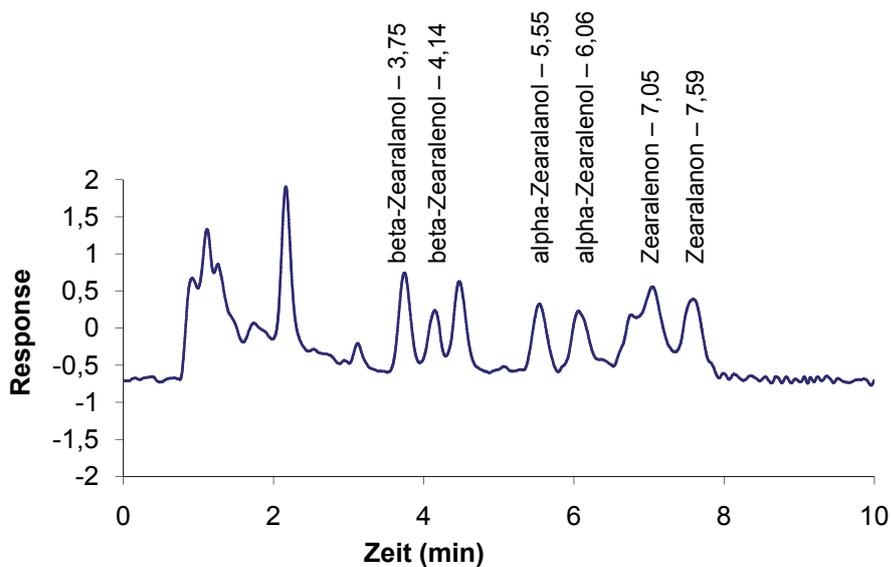


Abbildung 21: HPLC-UV-Chromatogramm einer künstlich mit ZEA und Analoga kontaminierten Stutenmilch. Die Konzentration von ZEA lag bei 160 ng/ml.

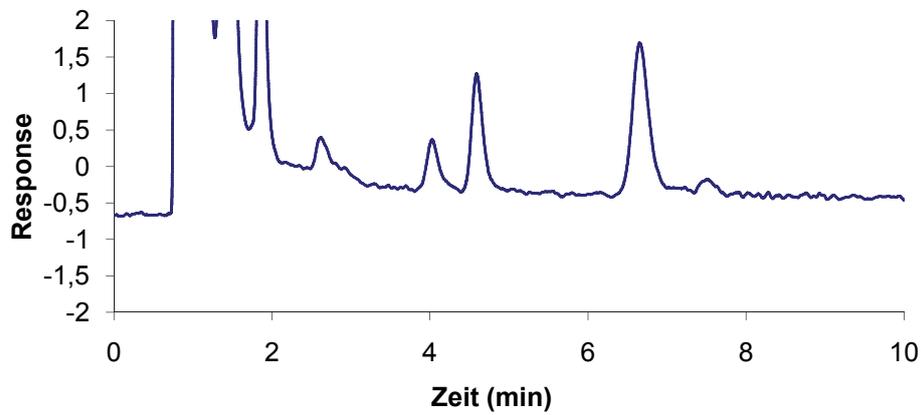


Abbildung 22: HPLC-UV-Chromatogramm einer ZEA-freien Stutenmilch. Aus früheren Untersuchungen (SEIDLER, 2007) ist bekannt, dass Milch Störsubstanzen enthält, die in HPLC-Systemen mit Fluoreszenzdetektion leicht als ZEA bzw. ZEA-Äquivalente interpretiert werden können. Durch Verschiebung der Retention des Störpeaks konnte nachgewiesen werden, dass es sich nicht um ZEA oder ein ZEA-Analoga handelt.

4.6 Nachweis von Antiinfektiva

Eine 30-minütige Erhitzung von Stutenmilch bei 78 °C erwies sich als ausreichend, um falsch-positive Befunde für Stutenmilch weitgehend zu eliminieren, auch wenn die Farbentwicklung (Farbumschlag von blau nach gelb-orange) der Stutenmilch-Negativkontrolle nicht ganz diejenige von hemmstofffreier Kuhmilch erreichte. Die Nachweisgrenzen des BRT wurden mittels künstlich kontaminierten Proben ermittelt und lagen für Penicillin und Amoxicillin bei circa zwei ng/ml, die Nachweisgrenze für Gentamycin lag bei zehn ng/ml.

Für 52 von 53 untersuchten Stutenmilchproben ergab sich nach Untersuchung im BRT-Test ein Hemmstoff-negatives Ergebnis, die als Kontrollen mituntersuchten künstlich kontaminierten Proben ergaben einen eindeutig positiven Farbumschlag. Lediglich eine Stutenmilchprobe lieferte im BRT ein schwach positives Ergebnis (ein bis zwei ng/ml Penicillin G-Äquivalente). Die beiden zur Kontrolle durchgeführten Testsysteme, ein Rezeptortest für Betalactamantibiotika (Beta-Star Test) sowie ein hochempfindlicher gruppenspezifischer EIA für Penicilline, lieferten jedoch negative Ergebnisse. Daher wurde der schwach positive Befund als falsch-positives Ergebnis des BRT gewertet.

5. DISKUSSION

Aus der Sicht des gesundheitlichen Verbraucherschutzes ist die Einhaltung von Regelungen bezüglich Rückständen und Kontaminanten für alle Lebensmittel gleichermaßen zu fordern. Allerdings stehen bei der Überwachung dieser Regelungen diejenigen Lebensmittel deutlich im Vordergrund, die aufgrund hoher täglicher Verzehrsmengen und aufgrund einer breiten Konsumentenschicht innerhalb der Bevölkerung als Grundnahrungsmittel für das öffentliche Gesundheitswesen von besonderer Wichtigkeit sind. Damit einhergehend fokussiert sich auch die wissenschaftliche Aktivität im Bereich von Milch und Milcherzeugnissen im Wesentlichen auf die Kuhmilch. Wie bei vielen „minoren“ Lebensmitteln ist demzufolge auch bei Stutenmilch der Stand der Bearbeitung lebensmittelhygienischer Fragestellungen bisher noch in vielen Aspekten als sehr unbefriedigend anzusehen. Stutenmilch wird in Deutschland zwar nur von relativ wenigen Verbrauchern konsumiert, bei diesen ist allerdings von einer relativ hohen – und damit relevanten – täglichen Verzehrsmenge auszugehen.

Vor diesem Hintergrund sollte in dieser Arbeit ein Beitrag zu zwei rückstandsanalytischen Gebieten geleistet werden, zum einen zur Frage einer möglichen Mykotoxinbelastung von Stutenmilch, zum anderen zur Frage des Vorkommens von Rückständen antimikrobiell wirksamer Substanzen. Da für beide Fragestellungen keine erprobten Untersuchungsverfahren zur Verfügung standen, musste hierzu jeweils eine Optimierung und Validierung der eingesetzten Verfahren vorangestellt werden.

Mykotoxine stellen ein weltweites gesundheitliches und wirtschaftliches Problem im Futtermittel- und Lebensmittelbereich dar. Um gesundheitlichen Beeinträchtigungen vorzubeugen, wurden für einige Mykotoxine Höchstmengen in Futter- und Lebensmitteln erlassen (VO EG 576/2006; VO EG 1881/2006; Richtlinie 2003/1000 EG). Daneben wurden von der EFSA und der JECFA Empfehlungen bezüglich der maximalen täglichen Aufnahme (Tolerable Daily Intake (TDI)) publiziert. Diese Bewertungen schließen grundsätzlich auch Milch und Milcherzeugnisse ein, jedoch beschränken sie sich aufgrund der Situation bei Kuhmilch ausschließlich auf Aflatoxin M₁.

Während jedoch das carry-over von Mykotoxinen in Kuhmilch gut untersucht ist, liegen zum Vorkommen von Mykotoxinen in Stutenmilch praktisch keine Daten vor. Da das Pferd als Monogastrier jedoch ein grundsätzlich anderes Verdauungssystem als der Wiederkäuer Rind

besitzt, ist eine direkte Übertragung der Erkenntnisse bezüglich carry-over von Schadstoffen nicht möglich. Da Stutenmilch im neuen Lebensmittelrecht explizit erwähnt wird, ist es erforderlich, analog die möglichen Gesundheitsrisiken für den Verbraucher zu identifizieren und gegebenenfalls zu bewerten. Nachdem carry-over-Studien relativ aufwendig durchzuführen sind und derzeit aufgrund der Kosten für die erforderlichen Mengen an Reintoxin auch kaum finanzierbar sind, wurde in dieser Arbeit eine Status quo-Untersuchung der auf dem Markt befindlichen Erzeugnisse durchgeführt. Damit konnte zumindest geprüft werden, inwieweit möglicherweise ein bisher unbekanntes Problem real existent ist und weiterer Prüfung bedarf. Nimmt man die bekannte Belastung von Futtermitteln für Pferde als Grundlage, so kann davon ausgegangen werden, dass praktisch alle Tiere täglich geringe Mengen einer ganzen Reihe von Mykotoxinen aufnehmen (LIESENER et al., 2010). Im Hinblick auf die Belastung von Futtermitteln und eines daraus resultierenden carry-over wurden für die eigenen Untersuchungen Mykotoxine aus verschiedenen „Gruppen“ ausgewählt, wobei sowohl „Aspergilltoxine“, „Penicillintoxine“ und „Fusarientoxine“ miteinbezogen wurden: Aflatoxin M₁, Ochratoxin A, Deoxynivalenol, T-2/HT-2 Toxin sowie Zearalenon.

Ganz ähnlich wie für Mykotoxine stellt sich die Situation bei den antimikrobiell wirksamen Substanzen dar. Trotz intensiver Recherchen konnte keine einzige wissenschaftliche Publikation zur Frage des Vorkommens von Antibiotikarückständen in Stutenmilch gefunden werden. Lediglich in einer Dissertationsarbeit (SCHULZE, 2002) wurde die Frage des Hemmstoffnachweises mittels mikrobiologischen Verfahren geprüft. Die Autorin stellt fest, dass für den Nachweis von Hemmstoffen bzw. Antiinfektiva in Stutenmilch alle kommerziellen Testsysteme und der konventionelle Blättchentest, vermutlich aufgrund der hohen Lysozymkonzentration und der dadurch bedingten Hemmung des Testkeims, vollständig ungeeignet waren. Lediglich zwei Rezeptortests, darunter der in der vorliegenden Arbeit eingesetzte beta-Star (mit dem allerdings nur betalaktam-Antibiotika nachweisbar sind), waren für den Einsatz bei Stutenmilch geeignet. Um jedoch den Anforderungen der EU-Verordnung 37/2010 gerecht zu werden, ist analog zur Situation in Kuhmilch zunächst die Verfügbarkeit praktikabler Screeningtests für Hemmstoffe Voraussetzung. Da das Spektrum der bei Pferden eingesetzten Antibiotika sowohl betalactam-Antibiotika als auch Aminoglycosid-Antibiotika umfasst, bietet sich hierbei der BRT besonders an.

Ein wesentliches Problem bei der Untersuchung von Stutenmilch mittels mikrobiologischer und enzymimmunologischer Verfahren liegt offensichtlich in dem hohen Gehalt an Lysozym, sowie möglicherweise an weiteren „inhibierenden“ Störsubstanzen. In orientierend durchgeführten Vorversuchen zeigte sich, dass Stutenmilch in Enzymimmuntest und im BRT stets zu positiven Messergebnissen führt, unabhängig von der Anwesenheit des jeweiligen Analyten (Daten nicht dargestellt). Diese Störeinflüsse konnten jedoch durch eine Erhitzung der Proben (78 °C, 30 min) weitestgehend eliminiert werden, ohne dass dies zu einem messbaren Verlust des spezifischen Analyten geführt hätte. Diese Beobachtung spricht für die Protein-Identität der Störsubstanz(en) in Stutenmilch, wobei hier dem Lysozym sicher besondere Bedeutung zukommt. Es wurde daher für alle Testsysteme grundsätzlich eine Erhitzung der Proben vor den weiteren, testspezifischen Untersuchungsgang vorangestellt.

5.1 Vorkommen von Mykotoxinen in Stutenmilch

In der vorliegenden Untersuchung ergaben sich unter Verwendung eines kommerziellen Enzymimmuntests keine Hinweise auf eine Belastung der Stutenmilch mit Aflatoxin M₁. Dies bestätigt den – hinsichtlich der methodischen Beschreibung jedoch als allenfalls orientierend anzusehenden – Bericht von BLÜTHGEN (2007). Dieser Autor fand in einem Fütterungsversuch bei zwei Stuten, die 50 µg Aflatoxin B₁ pro Tag erhielten, Aflatoxin M₁-Gehalte in der Milch von bis zu zehn ng/kg. Hieraus schloss der Autor auf eine carry-over Rate von 0,05%. Auch wenn in der Arbeit von BLÜTHGEN, 2007 wichtige Details (wie z.B. Angaben zur Durchführung der Versuche sowie zur Methodvalidierung) fehlen, kann in Verbindung mit den Ergebnissen der eigenen Untersuchungen die Schlussfolgerung gezogen werden, dass die in den beprobten Betrieben eingesetzten Futtermittel keine oder nur eine geringe Kontamination mit Aflatoxinen aufwiesen, oder dass Stuten Aflatoxin M₁ nicht in nennenswerten Mengen in die Milch ausscheiden.

Der Enzymimmuntest für Aflatoxin M₁ erbrachte gute Wiederfindungsraten für künstlich kontaminierte Stutenmilchproben und eignet sich somit für die Routineuntersuchung von Stutenmilch. Andere Studien konnten zeigen, dass der Test ebenfalls mit Schafmilch funktioniert und im Vergleich mit vier weiteren Testsystemen anderer Firmen gute Ergebnisse lieferte (RUBIO et al., 2009). Nach Angaben dieser Autoren wird in Spanien erwogen,

Schafmilch, die hauptsächlich zur Käseproduktion verwendet wird, routinemäßig auf Aflatoxin M₁ zu untersuchen (RUBIO et al., 2009). Eine stichprobenartige Untersuchung von Stutenmilch auf Aflatoxin M₁, beispielsweise mittels EIA, scheint bis zum Beweis einer „non-transmission“ vorsichtshalber angezeigt zu sein. Ergänzend könnten Futtermitteluntersuchungen (insbesondere Importfuttermittel) auf Aflatoxine in diesem Zusammenhang hilfreich sein.

Auch Ochratoxin A war in keiner der 53 untersuchten Stutenmilchproben nachweisbar. Dieser Befund ist insofern bemerkenswert, als in der Milch anderer Monogastrier (Ratte, Schwein) und auch beim Menschen immer wieder Gehalte an OTA festgestellt werden konnten (GAREIS et al., 1988; FAO/WHO, 2001; EFSA, 2006), und da eine Kontamination von Futtermitteln für Pferde durchaus nicht selten ist (LIESENER et al., 2010). Bei der Kuh und beim kleinen Wiederkäuer dagegen konnte gezeigt werden, dass die Pansenflora einen großen Teil des Toxins sofort metabolisiert und es daher kein carry-over in die Milch gibt. Studien zum carry-over von OTA in die Milch laktierender Stuten wurden bisher jedoch nicht publiziert.

Obwohl keine Fütterungsversuche bei Stuten mit OTA publiziert wurden, die einen Übergang dieses Toxins in die Milch ausschließen oder bestätigen würden, ergaben die eigenen Untersuchungen keine Hinweise auf eine relevante Belastung von Stutenmilch in Deutschland mit OTA.

DON war in der vorliegenden Studie das einzige Mykotoxin, das in messbaren, wenn auch geringen Gehalten in der Stutenmilch nachgewiesen werden konnte. Zwar wiesen nur zwei Proben DON in Konzentrationen über ein ng/ml, jedoch ist bereits die Tatsache, dass eher DON als der Metabolit DOM₁ nachgewiesen wurde, von Bedeutung. Betrachtet man vergleichend Untersuchungen zum carry-over von DON in die Milch beim Rind und der Stute, fällt auf, dass das Rind kein DON und nur DOM₁ und die Stute relativ viel DON und nur wenig DOM₁ in die Milch sezerniert.

Diese Tatsache lässt vermuten, dass beim Pferd DON anders (bzw. gar nicht) metabolisiert wird als beim Rind. Weitergehende Untersuchungen, insbesondere Fütterungsversuche wären für DON sehr sinnvoll, um die in dieser Arbeit ermittelten Befunde zu überprüfen.

Orientierende Versuche zum Nachweis von T-2/HT-2 Toxin in lediglich erhitzter und anschließend in Pufferlösung verdünnter Stutenmilch lieferten unbefriedigende Ergebnisse. Daher wurden die Proben einer immunaffinitätschromatographischen Extraktion unterzogen, womit gleichzeitig eine zehnfache Aufkonzentrierung der Toxine erreicht werden konnte. Damit war eine Bestimmung von T-2/HT-2 im extremen Spurenbereich (zwei bis zehn pg/ml) möglich. Obwohl die Toxine in diesem Konzentrationsbereich mit ausreichender Sicherheit nachweisbar waren, sollte in diesem Zusammenhang nicht vergessen werden, dass die Toxingehalte in Speisohafer typischerweise um einen Faktor von 1000 höher liegen.

Die in einigen Proben nachgewiesenen Gehalte um 20 pg/ml sind aus toxikologischer Sicht wohl vernachlässigbar. Interessant ist hier der Vergleich der Ergebnisse der beiden zum Nachweis von T-2 eingesetzten EIAs. Der primär zum Nachweis eingesetzte EIA unter Verwendung polyklonaler Antikörper erfasst mit recht guter Empfindlichkeit auch das strukturverwandte deacetylierte Analogon HT-2, das in einigen Spezies wahrscheinlich den Hauptmetabolit von T-2 darstellt. Die relativ niedrigeren Messwerte des EIA unter Verwendung monoklonaler Antikörper, der nur minimale Kreuzreaktionen mit HT-2 aufweist, deutet darauf hin, dass die positiven Befunde durch HT-2 bedingt sind. Eine weitere Klärung dieser Frage ist jedoch schwierig, da im relevanten Konzentrationsbereich keine anderen Untersuchungsverfahren einsetzbar sind.

Bei der Untersuchung von Stutenmilch auf Zearalenon (einschließlich kreuzreagierender ZEA-Derivate) ergaben sich für alle Proben schwach positive Messwerte, die sich jedoch qualitativ und quantitativ mittels HPLC (trotz niedrigerer Nachweisgrenze für ZEA) nicht bestätigen ließen. Die wahrscheinlichste Erklärung für diesen Befund ist wohl in unspezifischen Störungen des EIA durch Probenmatrix zu suchen. Unter diesem Blickwinkel wären die mittels EIA bestimmte ZEA-Gehalte unter ein ng/ml wohl pauschal als falsch-positiv zu werten. Andererseits könnte auch die Anwesenheit von im EIA kreuzreagierenden ZEA-Metaboliten zu diesem Befund beitragen, insbesondere wenn diese Metaboliten schwächere Fluoreszenzeigenschaften besitzen sollten als ZEA. Dann wäre ihre Nachweisbarkeit mittels HPLC nicht mehr gewährleistet, die EIA-Ergebnisse wären dann zwar im Hinblick auf ZEA immer noch falsch-positiv, nicht mehr jedoch im Hinblick auf ZEA-Metaboliten. Da die EIA-Werte mit durchschnittlich knapp 300 pg/ml sehr niedrig sind, würde eine Risikobewertung bei Verwendung dieses Wertes nicht wesentlich anders ausfallen

als bei rein negativen Ergebnissen, bei denen dann die halbe Nachweisgrenze des Testsystems (100 pg/ml) zur Berechnung verwendet werden würde.

5.2 Vorkommen von Hemmstoffen in Stutenmilch

In der vorliegenden Arbeit konnte erstmals ein kommerzielles mikrobiologisches Screeningverfahren erfolgreich für den Nachweis von Hemmstoffen in Stutenmilch adaptiert und in einer Routineuntersuchung etabliert werden. Die Nachweisgrenzen für die geprüften Antibiotika bewegen sich im Bereich der für Kuhmilch erreichten Werte (KRESS et al., 2007). Penicillin G, Amoxicillin und Gentamycin können im Bereich der Rückstandshöchstmenge nachgewiesen werden. In lediglich einer von 53 untersuchten Proben ergab sich aufgrund eines schwach-positiven Befundes (unterhalb des MRL) ein Verdacht auf Antibiotikarückstände, der jedoch nicht bestätigt werden konnte. Daher kann aus den Ergebnissen der eigenen Untersuchungen der Schluss gezogen werden, dass Rückstände von Antiinfektiva in Stutenmilch wohl keine große Rolle spielen. Es wäre jedoch sinnvoll, das Ausscheidungsverhalten der relevanten Wirkstoffe in Milch nach therapeutischer Applikation zu überprüfen, um hier sowohl den Stutenmilcherzeugern als auch den Überwachungsbehörden wichtige Daten für eine bessere Risikoabschätzung an die Hand zu geben.

5.3 Abschätzung der Mykotoxinaufnahme durch Stutenmilch in Relation zur tolerierbaren Tagesaufnahme

Stutenmilch wird in Deutschland nur von einem sehr geringen Anteil der Bevölkerung konsumiert. Bei der Gruppe der Stutenmilch-Konsumenten ist allerdings anzunehmen, dass sie prinzipiell der „Verzehrempfehlung“ vieler Vermarkter folgen, der zufolge täglich ein Viertelliter Stutenmilch getrunken werden sollte. Damit ist bei Stutenmilch die Gruppe der Konsumenten als Hochverzehrer einzustufen. Für eine Risikoabschätzung sollte daher sinnvollerweise ein täglicher Stutenmilchkonsum von 0,25 l zugrunde gelegt werden. Nachdem es sich bei der Gruppe der Stutenmilchkonsumenten primär um Erwachsene handelt, soll im folgenden mit einem Körpergewicht von 75 kg gerechnet werden.

Eine weitere Rechengröße für die Risikoabschätzung ist die tolerierbare Tagesaufnahme, TDI. TDI-Angaben liegen aus Risikobewertungen des Scientific Committee on Food (SCF), der Europäischen Kommission bzw. der EFSA für OTA (0,018 µg/kg KGW; EFSA, 2006), T-2/HT2 (0,06 µg/kg KGW; EUROPÄISCHE KOMMISSION, 2001), DON (1 µg/kg KGW; EUROPÄISCHE KOMMISSION, 1999) und ZEA (0,2 µg/kg KGW; EUROPÄISCHE KOMMISSION, 2000) vor. Für Aflatoxin M₁ wurde aufgrund seiner genotoxischen und kanzerogenen Wirkung kein TDI festgelegt. Aufgrund der erlaubten Höchstmengen von 0,05 µg/kg für Milch wird bei einem durchschnittlichen Verzehr von Milch und Milcherzeugnissen von einem kg pro Person und Tag *de facto* bei einem Körpergewicht von 75 kg eine Aflatoxinaufnahme von 0,67 ng/kg Körpergewicht und Tag toleriert. Bei Säuglingen (Höchstmenge Aflatoxin M₁ in Säuglingsnahrung 0,025 µg/kg werden je nach Körpergewicht sogar circa zwei bis fünf ng/kg Körpergewicht und Tag toleriert. Im folgenden soll als Berechnungsgrundlage ein hypothetischer TDI von einem ng/kg Körpergewicht und Tag angenommen werden.

Schließlich soll in einer Art „worst-case Szenario“ angenommen werden, dass die höchsten nachgewiesenen Gehalte für jedes Toxin (DON, T-2/HT-2, ZEA), beziehungsweise im Fall ausnahmslos negativer Befunde (Aflatoxin M₁, OTA), die Nachweisgrenze des jeweiligen Testsystems als Berechnungsgrundlage für die Toxingehalte gewählt werden.

Tabelle 28 zeigt eine Zusammenstellung der Ergebnisse dieser Berechnungsweise, wobei letztlich die entscheidende Größe der Ausschöpfungsgrad des TDI durch Stutenmilch ist. Hieraus wird deutlich, dass offensichtlich selbst in diesem „worst case“ keine als relevant anzusehende Ausschöpfung des TDI zu erwarten ist. Mit anderen Worten stellt Stutenmilch auch bei Hochverzehrern kein Risiko im Hinblick auf eine Aufnahme der hier untersuchten Toxine dar. Auch wenn die Extrapolation dieser Befunde auf die Gesamtsituation insoweit eingeschränkt werden muss, dass die Probennahme in einem zeitlich begrenzten Rahmen von rund einem Jahr erfolgte, ist die untersuchte Probenanzahl durchaus als repräsentativ für den gesamten Sektor der Stutenmilchproduktion zu sehen.

Tabelle 28: Modellberechnung eines „worst case-Szenarios“ zur Abschätzung der maximalen Mykotoxinaufnahme durch Stutenmilch in Relation zur tolerierbaren Tagesaufnahme (TDI), bei einem täglichen Verzehr von 0,25 Litern und einem Körpergewicht von 75 kg

Toxin	Maximaler Gehalt in Stutenmilch $\mu\text{g/Liter}$	Theoretische maximale Aufnahme, $\mu\text{g/kg KGW}$	TDI, $\mu\text{g/kg KGW}$	Theoretischer maximaler Ausschöpfungsgrad TDI, %
AFM1	<0,005*	<0,000017	– (0,001)	– (1,67)
OTA	<0,015*	<0,00005	0,018	<0,28
DON	4	0,013333	1,0	1,33
ZEA	0,35**	0,001167	0,2	0,58
T-2/HT-2	0,023	0,000077	0,06	0,13

* Nachweisgrenze des Testsystems, da Toxin in keiner Probe nachweisbar

** Toxingehalt wie mittels EIA bestimmt, keine Bestätigung durch HPLC-Analyse

Eine weitere Beurteilung der in dieser Arbeit festgestellten Befunde ist über die bisher festgelegten Höchstmengen möglich. Bezüglich Aflatoxin M₁ waren bei einer Nachweisgrenze von fünf ng/kg alle Proben negativ, d.h. um einen Faktor von mindestens fünf unter der niedrigsten Höchstmenge. Die niedrigsten Grenzwerte für OTA liegen gemäß VO 1881/2006 für Säuglingsnahrung auf Getreidebasis bei 0,5 $\mu\text{g/kg}$. Auch dieser Grenzwert wird durch die hier ermittelten Werte (nicht nachweisbar bei 0,015 $\mu\text{g/kg}$) deutlich unterschritten. Für DON und ZEA werden ebenfalls die niedrigsten Grenzwerte, wie sie für Säuglingsnahrung auf Getreidebasis festgelegt wurden (DON 100 $\mu\text{g/kg}$; ZEA 50 $\mu\text{g/kg}$), noch bei weitem unterschritten. Für T-2/HT-2 wurden bisher noch keine Grenzwerte festgelegt.

5.4 Schlussfolgerungen

Schlussfolgend zeigen die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit für den Untersuchungszeitraum 2007/2008, dass für in Deutschland kommerziell produzierter Stutenmilch im Hinblick auf eine Kontamination mit Mykotoxinen und auf Rückstände antimikrobiell wirksamer Substanzen keine Anhaltspunkte für eine relevante Kontamination vorliegen. Die in dieser Arbeit validierten Testsysteme erwiesen sich als geeignet für die Untersuchung von Stutenmilch und können in künftigen weitergehenden Untersuchungen Einsatz finden, soweit gesetzlich erforderlich auch im Rahmen routinemäßiger Kontrollen.

6. ZUSAMMENFASSUNG

Produktion, Vertrieb und Konsum von Stutenmilch spielt in Deutschland nur eine geringe Rolle. Der individuelle Verzehr kann jedoch recht hoch liegen (250 ml/Tag). Stutenmilch wird überwiegend über Direktvermarktung als tiefgefrorene Rohmilch vermarktet und unterliegt damit den Anforderungen an Vorzugsmilch. Darüber hinaus sind bezüglich Tierarzneimittelrückständen die Höchstmengen (VO 470/2009) sowie bezüglich der Mykotoxinen die Grenzwerte für Aflatoxin M₁ einzuhalten. Für Stutenmilch liegen bisher bezüglich Tierarzneimittelrückständen keine und bezüglich des möglichen Vorkommens von Mykotoxinen fast keine Daten vor. Eine einfache Übertragung der für Kuhmilch gewonnenen Erkenntnisse auf die Stutenmilch ist aufgrund des unterschiedlichen Verdauungssystems nicht möglich. Auch die für Kuhmilch etablierten Analysensysteme sind nicht ohne weiteres zur Untersuchung von Stutenmilch einsetzbar, da sich die Milchzusammensetzung sehr unterscheidet.

Daher wurde in der vorliegenden Arbeit zunächst ein modifiziertes Analysensystem für Hemmstoffe auf der Basis des Brillantschwarz-Reduktionstests etabliert. Zudem wurden Enzymimmuntests für folgende Mykotoxine zur Untersuchung von Stutenmilch etabliert: Aflatoxin M₁, Ochratoxin A, T-2/HT-2 Toxin und Zearalenon. Untersuchungen auf das Fusarientoxin Deoxynivalenol, sowie zusätzliche Untersuchungen auf Zearalenon erfolgten mittels HPLC. Mit diesem Verfahren wurden im Zeitraum 2007/2008 insgesamt 53 Tankmilch-Proben von zwölf Stutenmilchbetrieben aus acht Bundesländern untersucht. Die Proben können als repräsentativ für die deutsche Stutenmilchproduktion angesehen werden.

In keiner Probe wurden Hemmstoffe nachgewiesen (<4 µg/kg Penicillin G-Äquivalente). Ebenfalls nicht nachweisbar waren Aflatoxin M₁ (<10 ng/kg) und Ochratoxin A (<15 ng/kg). Im Enzymimmuntest für Zearalenon ergaben zahlreiche Proben schwach positive Ergebnisse (200-400 ng/kg), die jedoch mittels HPLC (Nachweisgrenze 50 ng/kg) nicht bestätigt werden konnten. Bei einer realistischen und aus Sicht des Verbraucherschutzes ausreichenden Nachweisgrenze von 500 ng/kg waren alle Proben negativ für Zearalenon. Im Enzymimmuntest für T-2/HT-2 Toxin waren nach immunaffinitätschromatographischer Aufkonzentrierung in der Mehrzahl der Proben Spuren dieser Toxine im Bereich zehn bis 20 ng/kg nachweisbar. Deoxynivalenol war in zwei Proben in geringen Konzentrationen (2000-4000 ng/kg) nachweisbar, zwei weitere Proben wiesen Spuren dieses Toxins im Bereich der

Nachweisgrenze (1000 ng/kg) auf. Deepoxynivalenol konnte nur in einer Probe in Spuren (circa 1000 ng/kg) nachgewiesen werden.

Aufgrund dieser Befunde scheint Stutenmilch auch bei regelmäßigem Konsum keine relevante Aufnahmequelle für Antibiotikarückstände bzw. für die untersuchten Mykotoxine zu sein.

7. SUMMARY

Production and distribution of mare's milk is of relatively minor importance in Germany. However, the individual daily consumption of persons preferring mare's milk may be very high (250 ml/day). In Germany, mare's milk is mainly sold as frozen raw milk via direct marketing channels. In contrast to milk from other species it is typically not heat treated, therefore specific regulations for certified raw milk apply here. Additionally, mare's milk has to comply with regulations concerning contaminants, in particular mycotoxins (aflatoxin M₁, AFM₁) and concerning veterinary drug residues, such as antibiotics (VO 470/2009). Surprisingly, no studies exist until present concerning the carry-over of veterinary drugs into mare's milk, and only one feeding study has been performed to estimate the carry-over of a mycotoxin (aflatoxin) from horse feed into milk. Simply conferring existing knowledge and carry-over data from cow's milk on mare's milk is not possible, because there are distinct differences between the digestive systems of both species. Additionally, analytical methods used to examine cow milk cannot be transferred to mare's milk without further investigations.

In the present thesis, a modified analytical method for inhibitor detection of veterinary drugs based on a BRT-inhibitor test was established. Additionally, enzyme immunoassay-based series of methods for several important mycotoxins, namely aflatoxin M₁, ochratoxin A, T-2/HT-2 toxin, and zearalenone was optimized and validated for mare's milk. Furthermore, deoxynivalenol/depoxydeoxynivalenol (DON/DOM1) and zearalenone were analyzed by HPLC. A total of 53 bulk milk samples of mare's milk from 12 different producers situated in eight federal states in Germany was analysed.

Antimicrobial compounds exceeding the cut-off (4 µg/kg Penicillin G-equivalents) were not detected in any of these samples. Likewise, all samples were free from detectable concentrations of aflatoxin M₁ (<10 ng/kg) and ochratoxin A (<15 ng/kg). The enzyme immunoassay for zearalenone yielded weakly positive results (200-400 ng/kg) in a number of samples. However, these positive results could not be confirmed when using HPLC, which has a detection limit of 50 ng/kg. Using a realistic detection limit (500 ng/kg) which is considered as sufficient for zearalenone from a consumer's protection point of view, all samples are negative for zearalenone. After purification and concentration of T-2/HT-2 toxin from mare's milk using immunoaffinity columns, traces (10-20 ng/kg) of these toxins were found in the majority of the mare's milk samples examined. Two samples were positive for

DON at a level of 2000-4000 ng/kg and two at a level of 1000 ng/kg. Traces (1000 ng/kg) of deepoxynivalenol could only be detected in one sample.

Since the analysed sample materials represent the majority of mare's milk producers in Germany, these results indicate that the analyzed mycotoxins and antibiotics do not represent a problem in mare's milk for humans even if consumed regularly.

8. LITERATURVERZEICHNIS

AKSOY, A., O. YAVUZ, Y. K. DAS, D. GUVENC, O. H. MUGLAI (2009):

Occurrence of Aflatoxin B₁, T-2 Toxin and Zearalenone in Compound Animal Feed

J. Anim. Vet. Adv. **8**, 403-407

AL-ANATI, L., E. PETZINGER (2006):

Immunotoxic activity of ochratoxin A

J. Vet. Pharmacol. Ther. **29**, 79-90

ANGSUBHAKORN, S., P. POOMVISES, K. ROMRUEN, P. M. NEWBERNE (1981):

Aflatoxicosis in horses

J. Am. Vet. Med. Assoc. **178**, 274-278

BASCARÁN, V., A. HERNÁNDEZ DE ROJAS, P. CHOUCINO, T. DELGADO (2007):

Analysis of Ochratoxin A in milk after direct immunoaffinity column clean-up by high-performance liquid chromatography with fluorescence detection

J. Chromatogr. A. **1167**, 95-101

BAUER, J., K. HEINRITZI, M. GAREIS, B. GEDEK (1987):

Veränderungen am Genitaltrakt des weiblichen Schweines nach Verfütterung praxisrelevanter Zearalenonmengen

Tierärztl. Prax. **15**, 33-36

BAYMAN, P., J. L. BAKER (2006):

Ochratoxins : A global perspective

Mycopathologia **162**, 215-223

BEREK, L., I. B. PETRI, A. MESTERHÁZY, J. TEREN, J. MOLNAR (2001):

Effects of mycotoxins on human immune functions in vitro

Toxicol. In Vitro. **15**, 25-30

BLÜTHGEN, A., E.-H. UBBEN (2000):

Zur Kontamination von Futtermitteln und Tankwagensammelmilch mit den Aflatoxinen B₁ und M₁ in Schleswig-Holstein – ein aktueller Überblick
Kieler Milchwissenschaftliche Forschungsberichte **52**, 335-354

BLÜTHGEN, A. (2007):

Übergang von Aflatoxin B₁ als Aflatoxin M₁ in die Milch laktierender Pflanzenfresser (außer Rindern) vor dem Hintergrund futtermittel- und lebensmittelrechtlicher Vorgaben – 1. Mitteilung : Laktierende Stuten
Tierärztl. Umsch. **62**, 403-409

BOORMAN, G. A., H. L. HONG, M. P. DIETER, H. T. HAYES, A. E. POHLAND, M. STACK, M. I. LUSTER (1984):

Myelotoxicity and Macrophage Alteration in Mice Exposed to Ochratoxin A
Toxicol. Appl. Pharmacol. **72**, 304-312

BORTELL, R., R. L. ASQUITH, G. T. EDDS, C. F. SIMPSON, W. W. ALLER (1983):

Acute experimentally induced aflatoxicosis in the weanling pony
Am. J. Vet. Res. **44**, 2110-2114

BOSTEDT, H. (1994):

Euterkrankheiten des Pferdes
In : WENDT, H., H. BOSTEDT, H. MIELKE, H.-W. FUCHS
Euter- und Gesäugekrankheiten
Gustav Fischer Verlag Jena, Stuttgart

BREITHOLTZ-EMANUELSSON, A., M. OLSEN, A. OSKARSSON, I. PALMINGER, K. HULT (1993):

Ochratoxin A in Cow's Milk and in Human Milk with Corresponding Human Blood Samples
J. AOAC Int. **76**, 842-846

BREITHOLTZ-EMANUELSSON, A., F. MINERVINI, K. HULT, A. VISCONTI (1994):

Ochratoxin A in Human Serum Samples Collected in Southern Italy from
Healthy Individuals and Individuals Suffering From Different Kidney Disorders
Nat. Toxins. **2**, 366-370

BUSINCO, L., P. G. GIAMPIETRO, P. LUCENTI, F. LUCARONI, C. PINI,
G. DI FELICE, P. IACOVACCI (2000):

Allergenicity of mare's milk in children with cow's milk allergy
J. Allergy Clin. Immunol. **105**, 1031-1034

CALONI, F., C. CORTINOVIS (2009):

Effects of furariotoxins in the equine species
Vet. J. **186**, 157-161

CANADY, R. A., R. D. COKER, S. K. EGAN, R. KRŠKA, T. KUIPER-GOODMAN, M.
OLSEN, J. PESTKA, S. RESNIK, J. SCHLATTER (2001):

Deoxynivalenol – First draft prepared by the Fifty-sixth meeting of the Joint
FAO/WHO Expert Committee on Food Additives (JECFA), FAO Food And
Nutrition Paper 74, FAO/WHO 2001

<http://www.inchem.org/documents/jecfa/jecmono/v47je01.htm> (Stand: 12.01.2011)

CHARMLEY, E., H. L. TRENHOLM, B. K. THOMPSON, D. VUDATHALA, J. W. G.
NICHOLSON, D. B. PRELUSKY, L. L. CHARMLEY (1993):

Influence of level of deoxynivalenol in the diet of dairy cows on feed intake,
milk production, and its composition
J. Dairy Sci. **76**, 3580-3587

CODEX ALIMENTARIUS (2001):

Report of the thirty-second Session of the Codex Committee on Food
Additives and Contaminants. Beijing, VR China

http://www.codexalimentarius.net/download/report/26/A101_12e.pdf
(Stand: 12.01.2011)

COTE, L. M., A. M. DAHLEM, T. YOSHIZAWA, S. P. SWANSON, W. B. BUCK
(1986):

Excretion of deoxynivalenol and its metabolite in milk, urine, and feces of
lactating dairy cows

J. Dairy Sci. **69**, 2416-2423

CURTUI, V. G., M. GAREIS (2001):

A simple HPLC method for the determination of the mycotoxins ochratoxin A
and B in blood serum of swine

Food Addit. Contam. **18**, 635-643

CURTUI, V. G., M. GAREIS, E. USLEBER, E. MÄRTLBAUER (2001):

Survey of Romanian slaughtered pigs for the occurrence of mycotoxins
ochratoxins A and B, and zearalenone

Food Addit. Contam. **18**, 730-738

CURTUI, V., C. SEIDLER, E. SCHNEIDER, E. USLEBER (2005):

Bestimmung von Deoxynivalenol und Deepoxy-Deoxynivalenol in Milch
Mycotox. Res. **21**, 40-42

DÄNICKE, S., H. VALENTA (1999):

Mykotoxine im Futter – Gefahr für landwirtschaftliche Nutztiere?

<http://www.verbraucherministerium.de/forschungsreport/rep2-99/futter.htm>

letzter Zugriff : 24.02.2002

DELOACH, J. R., M. I. C. GYONGYOSSY-ISSA, G. G. KHACHATOURIANS (1989):

Species-specific hemolysis of erythrocytes by T-2 Toxin

Toxicol. Appl. Pharmacol. **97**, 107-112

DIETRICH, R., E. SCHNEIDER, E. USLEBER, E. MÄRTLBAUER (1995):

Use of monoclonal antibodies for the analysis of mycotoxins

Nat. Toxins. **3**, 288-293

D`MELLO, J. P. F., C. M. PLACINTA, A. M. C. MACDONALD (1999):

Fusarium mycotoxins: A review of global implications for animal health, welfare and productivity

Anim. Feed Sci. Technol. **80**, 183-205

DOHNAL, V., A. JEZKOVA, D. JUN, K. KUCA (2008):

Metabolic pathways of T-2 Toxin

Curr. Drug Metab. **9**, 77-82

DOREAU, M., BOULOT, S. (1989):

Recent knowledge on mare milk production : A review

Livest. Prod. Sci. **22**, 213-235

EUROPÄISCHE KOMMISSION (1999):

Opinion of the Scientific Committee on Food on *Fusarium* toxins.

Part 1 : Deoxynivalenol (DON)

http://ec.europa.eu/food/fs/sc/scf/out44_en.pdf (Stand: 12.01.2011)

EUROPÄISCHE KOMMISSION (2000):

Opinion of the Scientific Committee on Food on *Fusarium* toxins.

Part 2 : Zearalenone (ZEA)

http://ec.europa.eu/food/fs/sc/scf/out65_en.pdf (Stand: 12.01.2011)

EUROPÄISCHE KOMMISSION (2001):

Opinion of the Scientific Committee on Food on *Fusarium* toxins.

Part 5 : T-2 Toxin and HT-2 Toxin

http://ec.europa.eu/food/fs/sc/scf/out88_en.pdf (Stand: 12.01.2011)

EUROPÄISCHE KOMMISSION (2002a):

Scoop task 3.2.7. Assessment of dietary intake of Ochratoxin A by the population of EU Member States

http://ec.europa.eu/food/fs/scoop/3.2.7_en.pdf (Stand: 12.01.2011)

EUROPÄISCHE KOMMISSION (2002b):

Opinion of the Scientific Committee on Food on *Fusarium* toxins. Part 6 :
Group evaluation of T-2 toxin, HT-2 toxin, nivalenol and deoxynivalenol
http://ec.europa.eu/food/fs/sc/scf/out123_en.pdf (Stand: 12.01.2011)

EUROPÄISCHE KOMMISSION (2003):

Opinion of the Scientific Committee on Animal Nutrition on Undesirable
Substances in Feed, 2003
http://ec.europa.eu/food/fs/sc/scan/out126_bis_en.pdf (Stand: 12.01.2011)

EUROPEAN FOOD SAFETY AUTHORITY, EFSA, (2004a):

Opinion of the scientific panel on contaminations in the food chain on a
request from the commission related to deoxynivalenol (DON) as undesirable
substance in animal feed
EFSA J **73**, 1-42
<http://www.efsa.europa.eu/en/scdocs/doc/73.pdf> (Stand: 12.01.2011)

EUROPEAN FOOD SAFETY AUTHORITY, EFSA, (2004b):

Opinion of the scientific panel on contaminations in the food chain on a
request from the commission related to zearalenone as undesirable
substance in animal feed
EFSA J **89**, 1-35
<http://www.efsa.europa.eu/en/scdocs/doc/89.pdf> (Stand: 12.01.2011)

EUROPEAN FOOD SAFETY AUTHORITY, EFSA (2004c):

Opinion of the scientific panel on contaminations in the food chain on a
request from the commission related to Ochratoxin A (OTA) as undesirable
substance in animal feed
EFSA J **101**, 1-36
<http://www.efsa.europa.eu/en/scdocs/doc/101.pdf> (Stand: 12.01.2011)

EUROPEAN FOOD SAFETY AUTHORITY, EFSA (2004d):

Opinion of the scientific panel on contaminations in the food chain on a request from the commission related to Aflatoxin B₁ as undesirable substance in animal feed

EFSA J **39**, 1-27

<http://www.efsa.europa.eu/en/scdocs/doc/39.pdf> (Stand: 12.01.2011)

EUROPEAN FOOD SAFETY AUTHORITY, EFSA (2006):

Opinion of the scientific panel on contaminations in the food chain on a request from the commission related to Ochratoxin A (OTA) as undesirable substance in food

EFSA J **365**, 1-56

<http://www.efsa.europa.eu/en/scdocs/doc/365.pdf> (Stand: 12.01.2011)

EHRlich, K. C., K. W. DAIGLE (1987):

Protein synthesis inhibition by 8-oxo-12,13epoxytrichothecenes

Biochim. Biophys. Acta. **923**, 206-213

ESGIN, S., E. MÄRTLBAUER, G. TERPLAN (1989):

Entwicklung und Anwendung eines enzymimmunologischen Verfahrens zum Nachweis von T-2 Toxin in Milch

Arch. Lebensmittelhyg. **40**, 109-112

FAO/WHO (2001):

Safety evaluation of certain mycotoxins in food. Prepared by the 56th Meeting of the Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives (JECFA). WHO Food Additives Series L : 46. Ochratoxin A. International Programme on Food Safety. World Health Organization, Geneva, 2001, 413-425

FINK-GREMMELS, J (1994):

Mykotoxine in der Ätiologie humaner Erkrankungen

Ernährungs-Umschau **41**, 226-229

FINK-GREMMELS, J. (2008):

Mycotoxins in cattle feed and carry-over to dairy milk : A review
Food Addit. Contam. **25**, 172-180

FORSELL, J. H., M. F. WITT, J.-H. TAI (1986):

Effects of 8-week exposure of the B6C3F1 mouse to dietary deoxynivalenol
(vomitoxin) and zearalenone
Food Chem. Toxicol. **24**, 213-219

FORSELL, J. H., R. JENSEN, J.-H. TAI, M. WITT, W. S: LIN, J. J. PESTKA (1987):

Comparison of acute toxicities of deoxynivalenol (vomitoxin) and
15-acetyldeoxynivalenol in the B6C3F1 mouse
Food Chem. Toxicol. **25**, 155-162

GABAL, M. A., Y. L. AWAD, M. B. MORCOS, A. M. BARAKAT, G. MALIK (1986):

Fusariotoxicoses of farm animals and mycotoxic leucoencephalomalacia of the
equine associated with the finding of trichothecenes in feedstuffs
Vet. Hum. Toxicol. **28**, 207-212

GALTIER, P., M. ALVINERIE (1981):

The pharmacokinetic profiles of ochratoxin A in pigs, rabbits and chickens
Food Cosmet. Toxicol. **19**, 735-738

GARALEVICIENE, D., H. PETTERSSON, M. AGNEDAL (2002):

Occurrence of trichothecenes, zearalenone and ochratoxin A in cereals and
mixed feed from central Lithuania
Mycotox. Res. **18**, 77-89

GAREIS, M; E. MÄRTLBAUER, J. BAUER, B. GEDEK (1988):

Determination of ochratoxin A in human milk.
Zeitschr. Lebensmittel-Unters. Forsch. **186**, 114-117

- GELDERBLOM, W.C.A., K. JASKIEWICZ, W.F.O. MARASAS, P.G. THIEL, R.M. HORAK, R. VLEGGAR, N.P.J KRIEK (1988):
Fumonisin – novel mycotoxins with cancer promoting activity produced by *Fusarium moniliforme*
Appl. Environ. Microbiol. **54**, 1806-1811
- GIMENO, A., J. A. QUINTANILLA (1983):
Analytical and mycological study of a natural outbreak of zearalenone mycotoxicosis in horses
In : *Proceeding of the International Symposium of Mycotoxins, Cairo, Egypt*, pp. 387-392
- HACK, R. E. MÄRTLBAUER, G. TERPLAN (1989):
A monoclonal antibodybased enzyme immunoassay for the detection of T-2 toxin at pictogram levels
Lett. Appl. Microbiol. **9**, 133-155
- HATZIPANAGIOTOU, A., E. RIELAND, H. ENBERGS (1998):
Zur Lysozymaktivität in der Milch von Fohlenstuten im Verlaufe der Laktation
Dtsch. Tierärztl. Wochenschr. **105**, 148-152
- HINTZ, H. F. (1990):
Molds, mycotoxins, and mycotoxicosis
Vet. Clin. North Am. Equine Pract. **6**, 419-431
- HOLZAPFEL, C. W., P. S. STEYN, I. F. PURCHASE (1966):
Isolation and structure of aflatoxins M1 and M2
Tetrahedron Lett. **25**, 2799-2803
- INTERNATIONAL AGENCY FOR RESEARCH ON CANCER (IARC) (1993):
IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans
Volume 56, Some naturally occurring substances : food items and constituents, heterocyclic aromatic amines and mycotoxins
<http://monographs.iarc.fr/ENG/Monographs/vol56/mono56.pdf> (Stand: 12.01.2011)

INTERNATIONAL AGENCY FOR RESEARCH ON CANCER (IARC) (2002):

IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans

Volume 82, Some Traditional Herbal Medicines, Some Mycotoxins, Naphthalene and Styrene

<http://monographs.iarc.fr/ENG/Monographs/vol82/index.php> (Stand: 12.01.2011)

ISHII, K. (1983):

Chemistry and bioproduction of non-macrocyclic trichothecenes

In : UENO, Y.: Trichothecenes, p.7-19

Elsevier, Amsterdam

IVERSON, F., C. ARMSTRONG, E. NERA, J. TRUELOVE, S. FERNIE, P. SCOTT,
R. STAPLEY, S. HAYWARD, S. GUNNER (1995):

Chronic feeding study of deoxynivalenol in B6C3F1 male and female mice
Teratog. Carcinog. Mutagen. **15**, 283-306

JOHNSON, P. J., S. W. CASTEEL, N. T. MESSER (1997):

Effect of feeding deoxynivalenol (vomitoxin)-contaminated barley to horses
J. Vet. Diagn. Invest. **9**, 219-221

JAUREGUI-ADELL, J. (1974):

Heat stability and Reactivation of Mare Milk Lysozyme

J. Dairy Sci. **58**, 835-838

JUHÁSZ, J., P. NAGY, G. HUSZENICZA, G. SZIGETI, J. REICZIGEL,
M. KULCSÁR (1997):

Long term exposure to T-2 Fusarium mycotoxin fails to alter luteal function,
follicular activity and embryo recovery in mare

Equine Vet. J. Suppl. **25**, 17-21

- JUHÁSZ, J., P. NAGY, M. KULCSÁR, G. SZIGETI, J. REICZIGEL,
G.HUSZENICZA (2001):
Effect of low-dose zearalenone exposure on luteal function, follicular activity
and uterine oedema in cycling mare
Acta. Vet. Hung. **49**, 211-222
- KELLER, K. M., B. D. QUEIROZ, L. A. M. KELLER, J. M. M. RIBEIRO, L. R.
CAVAGLIERI, M. L. GONZÁLEZ PEREYRA, A. M. DALCERO, C. A. R. ROSA
(2007):
The mycobiota and toxicity of Equine Feeds
Vet. Res. Commun. **31**, 1037-1045
- KIESSLING, K.-H., H. PETTERSSON, K. SANDHOLM, M. OLSEN (1984):
Metabolism of Aflatoxin, Ochratoxin, Zearalenon, and three Trichothecenes by
intact rumen fluid, rumen protozoa, and rumen bacteria
Appl. Environ. Microbiol. **47**, 1070-1073
- KING, R. R., R. E. MCQUEEN, D. LEVESQUE, R. GREENHALGH (1984):
Transformation of deoxynivalenol (vomitoxin) by rumen microorganisms
J. Agric. Food Chem. **32**, 1181-1183
- KNY, G. (1998):
Untersuchungen zur Qualität von frischer und gefriergetrockneter Stutenmilch
Diss. med. vet. Leipzig
- KRESS, C., C. SEIDLER, B. KERP, E. SCHNEIDER, E. USLEBER (2007):
Experience with an identification and quantification program for inhibitor-
positive milk samples
Anal. Chim. Acta. **586**, 275-279

KUIPER-GOODMAN, T., P. M. SCOTT, H. WATANABE (1987):

Risk Assessment of the mycotoxin zearalenone

Regul. Toxikol. Pharmacol. **7**, 253-306

LEA, T., K. STEIEN, F. STØRMER (1989):

Mechanism of ochratoxin A-induced immunosuppression

Mycopathologia **107**, 153-159

LEGEL, S. (Hrsg.) (1993):

Nutztiere der Tropen und Subtropen ; Bd. 3. Pferde, Esel, Schweine,

Elefanten, Geflügel, Bienen, Seidenspinner

Hirzel Verlag, Stuttgart

LIESENER, K., V. CURTUI, R. DIETRICH, E. MÄRTLBAUER, E. USLEBER (2010):

Mycotoxins in horse feed

Mycotox. Res. **26**, 23-30

MALACARNE, M., F. MARTUZZI, A. SUMMER, P. MARIANI (2002):

Protein and fat composition of mare's milk with reference to human and cow's milk

Int. Dairy J. **12**, 869-877

MALEKINEJAD, H., R. MAAS-BAKKER, J. FINK-GREMMELS (2006):

Species differences in the hepatic biotransformation of zearalenone

Vet. J. **172**, 96-102

MÄRTLBAUER, E., R. DIETRICH, G. TERPLAN (1991):

Erfahrungen bei der Anwendung von Immunoassays zum Nachweis von

Mykotoxinen in Lebensmitteln

Arch. Lebensmittelhyg. **42**, 3-6

MÄRTLBAUER, E., E. USLEBER, R. DIETRICH, E. SCHNEIDER (2009):

Ochratoxin A in human blood serum – retrospective long-term data

Mycotoxin. Res. **25**, 175-186

METZLER, M. (2010):

Proposal for a uniform designation of zearalenone and its metabolites
Mycotox. Res. Epub ; DOI 10.1007/s12550-010-0075-2

MIELKE, H. (1994):

Physiologie der Laktation
In : WENDT, H., H. BOSTEDT, H. MIELKE, H.-W. FUCHS
Euter- und Gesäugekrankheiten
Gustav Fischer Verlag Jena, Stuttgart

MINERVINI, F., A. GIANNOCCARO, F. FORNELLI, M. E. DELL'AQUILA,
P. MINOIA, A. VISCONTI (2006):

Influence of mycotoxin zearalenone and its derivatives (alpha and beta
zearalenol) on apoptosis and proliferation of cultured granulosa cells from
equine ovaries
Reprod. Biol. Endocrinol. **4**, 62-71

MINERVINI, F., M. E. DELL'AQUILA (2008):

Zearalenone and Reproductive Function in Farm Animals
Int. J. Mol. Sci. **9**, 2570-2584

MIROCHA, C. J., C. M. CHRISTENSEN (1974):

Fungus metabolites toxic to animals
Annu. Rev. Phytopathol. **12**, 303-330

MIROCHA, C. J., S. V. PATHRE, T. S. ROBISON (1981):

Comparative metabolism of zearalenone and transmission into bovine milk
Food Cosmet. Toxicol. **19**, 25-30

MÜCKE, W., C. LEMMEN (2004):

Schimmelpilze : Vorkommen, Gesundheitsgefahren, Schutzmaßnahmen
Ecomed MEDIZIN Verlag, Landsberg, 3.Auflage

OLDENBURG, E., F. HÖPPNER (2003):

Fusarium Mycotoxins in Forage Maize – Occurrence, Risk Assessment,
Minimization
Mycotox. Res. **19**, 43-46

OSWEILER, G. D. (2001):

Mycotoxins
Vet. Clin. North Am. Equine Pract. **17**, 547-566

PARENT-MASSIN, D. (2004):

Haematotoxicity of trichothecenes
Toxicol. Lett. **153**, 75-81

PERAICA, M., B. RADIC, A. LUCIC, M. PAVLOVIC (1999):

Toxic effects of mycotoxins in humans
Bulletin of the World Health Organisation. **77**, 754-766

PESTKA, J. J., D. YAN, L. E. KING (1994):

Flow cytometric analysis of the effects of in vitro exposure to vomitoxin
(Deoxynivalenol) on apoptosis in murine T, B and Ig A cells
Food Chem. Toxicol. **32**, 1125-1136

PESTKA, J. J., H. R. ZHOU (2002):

Effects of tumor necrosis factor type 1 and 2 receptor deficiencies on anorexia,
growth and IgA dysregulation in mice exposed to the trichothecene vomitoxin
Food Chem. Toxicol. **40**, 1623-1631

PETZINGER, E., K. ZIEGLER (2000):

Ochratoxin A from a toxicological perspective
J. Vet. Pharmacol. Ther. **23**, 91-98

PFOHL-LESZKOWICZ, A., R. A. MANDERVILLE (2007):

Ochratoxin A : An overview on toxicity and carcinogenicity in animals and humans

Mol. Nutr. Food Res. **51**, 61-99

PIER, A. C. (1992):

Major Biological Consequences of Aflatoxicosis in Animal Production

J. Anim. Sci. **70**, 3964-3967

PITOUT, M. J. (1969):

The hydrolysis of ochratoxin A by some proteolytic enzymes

Biochem. Pharmacol. **18**, 1829-1836

PLACINTA, C. M., J. P. F. D`MELLO, A. M. C. MACDONALD (1999):

A review of worldwide contamination of cereal grains and animal feed with

Fusarium mycotoxins

Anim. Feed Sci. Technol. **78**, 21-37

POLIDORI, P., D. BEGHELLI, P. MARIANI, S. VINCENZETTI (2009):

Donkey milk production : state of art

Ital. J. Anim. Sci. **8** (Suppl.2), 677-683

PRANDINI, A., G. TANSINI, S. SIGOLO, L. FILIPPI, M. LAPORTA, G. PIVA (2009):

On the occurrence of Aflatoxin M₁ in milk and dairy products

Food Chem. Toxicol **47**, 984-991

PRELUSKY D. B., P.M. SCOTT, H. L. TRENHOLM, G. A. LAWRENCE (1990):

Minimal transmission of zearalenone to milk of dairy cows

J. Environ Sci. Health B **25**, 87-103

PRELUSKY D. B., R. G. GERDES, K. L. UNDERHILL, B. A. ROTTER, P. Y. JUI, H.

L. TRENHOLM (1994):

Effects of low-level dietary deoxynivalenol on haematological and clinical parameters of the pig

Nat. Toxins. **2**, 97-104

RAYMOND, S. L., T. K. SMITH, H. V. L. N. SWAMY (2003):

Effects of feeding a blend of grains naturally contaminated with *Fusarium* mycotoxins on feed intake, serum chemistry, and hematology of horses, and the efficacy of a polymeric glucomannan mycotoxin absorbent

J. Anim. Sci. **81**, 2123-2130

RAYMOND, S. L., T. K. SMITH, H. V. L. N. SWAMY (2005):

Effects of feeding a blend of grains naturally contaminated with *Fusarium* mycotoxins on feed intake, metabolism, and indices of athletic performance of exercised horses

J. Anim. Sci. **83**, 1267-1273

RICHARD, J. L. (2007):

Some major mycotoxins and their mycotoxicoses – An overview :

Int. J. Food Microbiol. **119**, 3-10

RINGOT, D., A. CHANGO, Y.-J. SCHNEIDER, Y. LARONDELLE (2006):

Toxicokinetics and toxicodynamics of Ochratoxin A, an update

Chem. Biol. Interact. **159**, 18-46

ROTTER, B. A., D. B. PRELUSKY, J. J. PESTKA (1996):

Toxicology of deoxynivalenol (vomitoxin)

J. Toxicol. Environ. Health. **48**, 1-34

RUBIO, R., M.I. BERRUGA, M. ROMÁN, A. MOLINA (2009):

Evaluation of immunoenzymatic methods for the detection of aflatoxin M₁ in ewe's milk

Food Control **20**, 1049-1052

SCOTT, P. M. (2005):

Biomarkers of human exposure to Ochratoxin A
Food Addit. Contam., Supplement 1, 99-107

SCHNEIDER, E., E. USLEBER, R. DIETRICH, E. MÄRTLBAUER (2001):

Entwicklung eines hochempfindlichen Enzymimmuntests zum Nachweis von
Ochratoxin A
Mycotox. Res. **17**, 170-173

SCHUBERT, R. (1999):

Stutenmilch – Beeinflussung durch die Ernährung und ihre diätetische
Bedeutung (Vortrag anlässlich der Göttinger Pferdetage 1999 – Zucht und
Haltung von Sportpferden.)
FN-Verlag, Warendorf (ISBN 3-88542-342-1), 1999, 177-185

SCHULZE, S. R. (2002):

Zum Nachweis von Hemmstoffen und Antiinfektiva in Schaf-, Ziegen- und
Stutenmilch
Diss. med. vet. München

SCHÜPPEL, H., G. KNY (2001):

Lebensmittelrechtliche Anforderungen an die Gewinnung und Verarbeitung
von Stutenmilch
Tierärztl. Prax. **29**, 108-113

SEELING, K., S. DÄNICKE, K. H. UEBERSCHÄR, P. LEBZIEN,

G. FLACHOWSKY (2005):

On the effects of Fusarium toxin-contaminated wheat and the feed intake level
on the metabolism and carry-over of zearalenone in dairy cows
Food Addit. Contam. **22**, 847-855

SEIDLER, C. (2007):

Nachweis der Fusarientoxine Deoxynivalenol und Zearalenon in Lebensmitteln

Diss. med. vet. Giessen

[http://geb.uni-giessen.de/geb/volltexte/2007/4728/pdf/SeidlerCaroline-2007-](http://geb.uni-giessen.de/geb/volltexte/2007/4728/pdf/SeidlerCaroline-2007-04-25.pdf)

04-25.pdf (Stand: 12.01.2011)

SHEPHERD, M. J., J. GILBERT (1988):

Long-term storage stability of deoxynivalenol standard reference solutions

J. Agric. Food Chem. **36**, 305-308

SHREEVE, B. J., D. S. P. PATTERSON, B. A. ROBERTS (1979):

The carry-over of aflatoxin, Ochratoxin and zearalenone from naturally contaminated feed to tissues, urine and milk of dairy cows

Food Cosmet. Toxicol. **17**, 151-152

SKAUG, M. A. (1999):

Analysis of Norwegian milk and infant formulas for ochratoxin A

Food Addit. Contam. **16**, 75-78

SKAUG, M. A. (2001):

Presence of ochratoxin A in human milk in relation to dietary intake

Food Addit. Contam. **18**, 321-327

SMORAGIEWICZ, W., B. COSSETTE, A. BOUTARD, K. KRZYSTYNIAK (1993):

Trichothecene mycotoxins in the dust of ventilation systems in office buildings

Int. Arch. Occup. Environ. Health. **65**, 113-117

STEIMER, J. (1989):

Untersuchungen zur Beeinflussung der Ausscheidung von Aflatoxin M₁ durch polychlorierte Biphenyle beim laktierenden Rind mit Entwicklung eines

Enzymimmunologischen Nachweisverfahrens auf dieses Mykotoxin in Milch

Diss. med. vet. Berlin

STEYN, P. S. (1995):

Mycotoxins, general view, chemistry and structure

Toxicol. Lett. **82/83**, 843-851

STOCK, S. (2004):

Das Mykotoxin Ochratoxin A : Untersuchungen zu in-vitro Genotoxizität und Metabolismus

Diss. oec. troph. Giessen

STORCH, R. (1969):

Über das maschinelle Melken von Stuten

Milchwissenschaft. **24**, 145-146

STORCH, G. (1985):

Untersuchungen über einige Inhaltstoffe und Eigenschaften von Stutenmilch und Kумыß unter besonderer Berücksichtigung diätetischer Fragestellungen

Diss. med. vet. Gießen

STØRMER, F. C., O. STØREN, C. E. HANSEN, J. I. PEDERSEN, A. J. AASEN (1983):

Formation of (4R)- and (4S)-4-Hydroxyochratoxin A and

10-Hydroxyochratoxin A from Ochratoxin A by Rabbit Liver Microsomes

Appl. Environ. Microbiol. **45**, 1183-1187

STRASSER, A., E. USLEBER, E. SCHNEIDER, R. DIETRICH, C. BÜRK, E. MÄRTELBAUER (2003):

Improved enzyme immunoassay for group-specific determination of penicillins in milk

Food Agric. Immunol. **15**, 135-143

STUDER-ROHR, I., J. SCHLATTER, D. R. DIETRICH (2000):

Kinetic parameters and intraindividual fluctuations of Ochratoxin A plasma levels in humans

Arch. Toxicol. **74**, 499-510

SUHREN, G., W. HEESCHEN (1990):

Zum Nachweis von β -Lactam-Antibiotika in Milch mit Cite-Test,
Agardiffusionsverfahren und mikrobiellem Rezeptortest
Dmz. **111**, 784-788

SWANSON, S. P., J. NICOLETTI, H. D. Jr. ROOD, W. B. BUCK, L. M. COTE,
T. YOSHIZAWA (1987):

Metabolism of three trichothecene mycotoxins, T-2 toxin, diacetoxyscirpenol
and deoxynivalenol, by bovine rumen microorganisms
J. Chromatogr. **414**, 335-342

SYDENHAM, E. W., P. G. THIEL (1996):

Physicochemical Data for some selected fusarium toxins
J. AOAC Int. **79**, 1365-1379

TANAKA, T., A. HASEGAWA, S. YAMAMOTO, U.-S. LEE, Y. SUGIURA, Y. UENO
(1988):

Worldwide contamination of cereals by the fusarium mycotoxins nivalenol,
deoxynivalenol, and zearalenol. 1. Survey of 19 countries
J. Agric. Food Chem. **36**, 979-983

TEKINŞEN, K. K., G. UĞAR (2008):

Aflatoxin M1 levels in butter and cream cheese consumed in Turkey
Food Control. **19**, 27-30

UENO, Y., F. TASHIRO, T. KOBAYASHI (1983):

Species differences in zearalenone-reductase activity
Food Chem. Toxicol. **21**, 167-173

URRY, W. H., H. L. WEHRMEISTER, E. B. HODGE, P. H. HIDY (1966):

The structure of zearalenone :
Tetrahedron Lett. **27**, 3109-3114

USLEBER, E., V. RENZ, E. MÄRTLBAUER, G. TERPLAN (1992):

Studies on the application of enzyme immunoassays for the Fusarium mycotoxins Deoxynivalenol, 3-Acetyldeoxynivalenol, and zearalenone
J. Vet. Med. B **39**, 617-627

VALENTA, H., M. GOLL (1996):

Determination of ochratoxin A in regional samples of cow's milk from Germany
Food Addit. Contam. **13**, 669-676

VALENTA, H., S. DÄNICKE (2005):

Study on the transmission of deoxynivalenol and deepoxy-deoxynivalenol into eggs of laying hens using a high-performance liquid chromatography-ultraviolet method with clean-up by immunoaffinity columns
Mol. Nutr. Food Res. **49**, 779-785

VAN EIJKEREN, J. C. H., M. I. BAKKER, M. J. ZEILMAKER (2006):

A simple steady-state model for carry-over of aflatoxins from feed to cow's milk
Food Addit. Contam. **23**, 833-838

VÁNYI, A., R. GLÁVITS, E. GAJDÁCS, G. SÁNDOR, F. KOVÁCS (1991):

Changes induced in newborn piglets by the trichothecene toxin T-2
Acta. Vet. Hung. **39**, 29-37

VESONDER, R., J. HALIBURTON, R. STUBBLEFIELD, W. GILMORE,

S. PETERSON (1991):

Aspergillus flavus and Aflatoxins B₁, B₂, and M₁ in corn associated with equine death
Arch. Environ. Contam. Toxicol. **20**, 151-153

WANG, Y., J. DOSTÁLEK, W. KNOLL (2009):

Long range surface plasmon-enhanced fluorescence spectroscopy for the detection of aflatoxin M₁ in milk
Biosens. Bioelectron. **24**, 2264-2267

WHO, 2000:

Zearalenone. Safety evaluation of certain food additives and contaminants.
Prepared by the Fifty-Third meeting of the Joint FAO/WHO Expert Committee
on Food Additives (JECFA)
WHO Food Additives Series 44, World Health Organization, Geneva,
Switzerland, pp 393-482
<http://www.inchem.org/documents/jecfa/jecmono/v44jec14.htm> (Stand: 12.01.2011)

WOGAN, G. N. (1966):

Chemical nature and biological effects of the aflatoxins
Bacteriol. Rev. **30**, 460-470

WU, Q., V. DOHNAL, L. HUANG, K. KUČA, Z. YUAN (2009):

Metabolic pathways of trichothecenes
Drug Metab. Rev. 2009 – Epub ahead of print

YIANNIKOURIS, A., J.-P. JOUANY (2002):

Mycotoxins in feeds and their fate in animals: a review
Animal Res. **51**, 81-99

ZINEDINE, A., J.M. SORIANO, J.C. MOLTO, J. MANES (2007):

Review on the toxicity, occurrence, metabolism, detoxification, regulations and
intake of zearalenone : An oestrogenic mycotoxin
Food Chem. Toxicol. **45**, 1-18

ZOEGE VON MANTEUFEL, N. (1989):

Anwendungsmöglichkeiten einiger ausgewählter chemischer, physikalischer
und mikrobiologischer Untersuchungsmethoden aus dem Bereich der
Eutergesundheit des Rindes für die Untersuchung von Stutenmilch
Diss. med. vet. Hannover

ZOEGE VON MANTEUFEL, N. (1990):

Pferde an der Melkmaschine
St. Georg. **4**, 88-91

ZÖLLNER, P., J. JODLBAUER, M. KLEINOVA, H. KAHLBACHER, T. KUHN, W. HOCHSTEINER, W. LINDNER (2002):
Concentration levels of zearalenone and its metabolites in urine, muscle tissue, and liver samples of pigs fed with mycotoxin-contaminated oats
J. Agric. Food Chem. **50**, 2494-2501

DANKSAGUNG

An dieser Stelle möchte ich allen, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben, danken.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. Ewald Usleber für die Überlassung des Themas sowie sein unermüdliches Interesse, seine Geduld und seine permanente Unterstützung bei der vorliegenden Arbeit.

Herrn Dr. Valeriu Curtui danke ich ebenfalls für die Betreuung, die vielen Anregungen und das ausdauernde Engagement.

Mein Dank gilt ebenso allen Mitarbeitern der Professur für Milchwissenschaften der Justus-Liebig-Universität, insbesondere Frau Yvonne Ackermann, Frau Margit Kessler und Frau Renate Stumpf möchte ich für ihre fortwährende Hilfsbereitschaft und Unterstützung während der Anfertigung dieser Arbeit danken. Auch möchte ich Frau Christa Zeidler für die Hilfen in allen organisatorischen Angelegenheiten danken.

Weiterhin bedanke ich mich bei allen beteiligten Stutenmilchhaltern, die durch die Bereitstellung des Probenmaterials die Durchführung dieser Arbeit erst möglich gemacht haben.

Der Firma R-Biopharm danke ich für die Überlassung des Aflatoxintestkits sowie der T2-Immunitätsaffinitätssäulen. Der Firma AIM sei für die Überlassung der BRT-P-Platten gedankt.

Abschließend möchte ich meiner Familie, insbesondere meiner Frau, meiner Mutter und meinem Stiefvater sowie meinen Geschwistern und Freunden für ihre Geduld und Toleranz während dieser Zeit herzlich danken.

ERKLÄRUNG

Ich habe die vorgelegte Dissertation selbständig und ohne unerlaubte fremde Hilfe und nur mit den Hilfen angefertigt, die ich in der Dissertation angegeben habe. Alle Textstellen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten oder nicht veröffentlichten Schriften entnommen sind, und alle Angaben, die auf mündlichen Auskünften beruhen, sind als solche kenntlich gemacht. Bei den von mir durchgeführten und in der Dissertation erwähnten Untersuchungen habe ich die Grundsätze guter wissenschaftlicher Praxis, wie sie in der „Satzung der Justus-Liebig-Universität Gießen zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis“ niedergelegt sind, eingehalten.

Michael Sixt



edition scientifique
VVB LAUFERSWEILER VERLAG

VVB LAUFERSWEILER VERLAG
STAUFBENBERGRING 15
D-35396 GIESSEN

Tel: 0641-5599888 Fax: -5599890
redaktion@doktorverlag.de
www.doktorverlag.de

ISBN: 978-3-8359-5753-4



9 17 8 3 8 3 5 1 9 5 7 5 3 4