

Untersuchung zum Nachweis und zum Vorkommen von Mykotoxinen in Futtermitteln für Pferde

KRISTINA LIESENER



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 2012

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 2012

© 2012 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

Aus dem Institut für Tierärztliche Nahrungsmittelkunde
Professur für Milchwissenschaften
der Justus-Liebig-Universität Gießen

Betreuer: Prof. Dr. Dr. habil. E. Usleber

**Untersuchung zum Nachweis und zum Vorkommen
von Mykotoxinen in Futtermitteln für Pferde**

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

eingereicht von

Kristina Liesener
Tierärztin aus Hamburg

Gießen 2012

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

Dekan: Prof. Dr. Dr. h.c. M. Kramer

Gutachter/in: Prof. Dr. Dr. habil. E. Usleber
Prof. Dr. K. Fey

Tag der Disputation: 22.06.2012

Meiner Mutter

INHALTSVERZEICHNIS

1	EINLEITUNG	1
2	SCHRIFTTUM	3
2.1	Allgemeines zu Risiken durch Mängel in der hygienischen Qualität, insbesondere zu der Bedeutung von Mykotoxinen, von Futtermitteln für Pferde	3
2.2	Fusarientoxine	5
2.2.1	Zearalenon	5
2.2.1.1	Physikalisch-chemische Eigenschaften	5
2.2.1.2	Biologische Eigenschaften	6
2.2.1.2.1	Allgemeines zu Wirkungsweise, Toxizität und Metabolismus	6
2.2.1.2.2	Wirkung bei Equiden	9
2.2.2	Trichothecene (Deoxynivalenol, T-2 Toxin und HT-2 Toxin)	11
2.2.2.1	Physikalisch-chemische Eigenschaften	11
2.2.2.2	Biologische Eigenschaften	14
2.2.2.2.1	Deoxynivalenol	14
2.2.2.2.1.1	Allgemeines zu Wirkungsweise, Toxizität und Metabolismus	14
2.2.2.2.1.2	Wirkung bei Equiden	16
2.2.2.2.2	T-2 Toxin und HT-2 Toxin	17
2.2.2.2.2.1	Allgemeines zu Wirkungsweise, Toxizität und Metabolismus	17
2.2.2.2.2.2	Wirkung bei Equiden	20
2.2.3	Fumonisine	20
2.2.3.1	Physikalisch-chemische Eigenschaften	20
2.2.3.2	Biologische Eigenschaften	22
2.2.3.2.1	Allgemeines zu Wirkungsweise, Toxizität und Metabolismus	22
2.2.3.2.2	Wirkung bei Equiden	23
2.2.4	Vorkommen von Fusarientoxinen in Futtermitteln	26
2.3	Ochratoxin A	30
2.3.1	Physikalisch-chemische Eigenschaften	30

2.3.2	Biologische Eigenschaften	31
2.3.2.1	Allgemeines zu Wirkungsweise, Toxizität und Metabolismus	31
2.3.2.2	Wirkung bei Equiden	35
2.3.3	Vorkommen	35
2.4	Ergotalkaloide	37
2.4.1	Physikalisch-chemische Eigenschaften	37
2.4.2	Biologische Eigenschaften	39
2.4.2.1	Allgemeines zu Wirkungsweise, Toxizität und Metabolismus	39
2.4.2.2	Wirkung bei Equiden	40
2.4.3	Vorkommen	43
2.5	Nachweisverfahren	45
2.6	Gesetzliche Grundlagen und Höchstmengenregelungen für Mykotoxine in Futtermitteln für Pferde	47
3	EIGENE UNTERSUCHUNGEN	50
3.1	Materialien und Geräte	50
3.1.1	Geräte und Instrumente	50
3.1.2	Chemikalien und Biochemika	51
3.1.3	Puffer und Lösungen	52
3.1.4	Mykotoxine	52
3.1.5	Immunreagenzien	53
3.1.6	Geräte und Software zur Durchführung und Auswertung der Enzymimmuntests	58
3.1.7	Probenmaterial	58
3.2	Methodik	59
3.2.1	Nachweis von T-2 Toxin und HT-2 Toxin	59
3.2.1.1	Probenextraktion	60
3.2.1.2	Testdurchführung	60
3.2.1.2.1	Testdurchführung T-2 Toxin	61

3.2.1.2.2	Testdurchführung T-2 Toxin/HT-2 Toxin	62
3.2.2	Nachweis von Deoxynivalenol	62
3.2.2.1	Probenextraktion	62
3.2.2.2	Testdurchführung	63
3.2.3	Nachweis von Zearalenon	64
3.2.3.1	Probenextraktion	64
3.2.3.2	Testdurchführung	64
3.2.4	Nachweis von Fumonisin B ₁	65
3.2.4.1	Probenextraktion	65
3.2.4.2	Testdurchführung	65
3.2.5	Nachweis von Ergotalkaloiden	66
3.2.5.1	Probenextraktion	66
3.2.5.2	Testdurchführung	67
3.2.6	Nachweis von Ochratoxin A	67
3.2.6.1	Probenextraktion	67
3.2.6.2	Testdurchführung	68
3.2.7	Validierung der verwendeten Testsysteme	69
3.2.8	Auswertungskriterien und Statistik	70
3.3	Ergebnisse	71
3.3.1	Untersuchungsverfahren	71
3.3.1.1	Auswertung der EIA-Standardkurven	71
3.3.1.2	Spezifität der Enzymimmuntests	79
3.3.1.3	Wiederfindungsraten	79
3.3.2	Ergebnisse der Untersuchung von kommerziell hergestelltem Pferdefutter auf T-2 Toxin, T-2 Toxin/HT-2 Toxin, DON, Zearalenon, FB ₁ , Ergotalkaloide und OTA	81
3.3.2.1	T-2 Toxin und HT-2 Toxin	83
3.3.2.2	Deoxynivalenol	84
3.3.2.3	Zearalenon	84
3.3.2.4	Fumonisin B ₁	85
3.3.2.5	Ergotalkaloide	86
3.3.2.6	Ochratoxin A	87

3.3.2.7	Korrelation zwischen verschiedenen Mykotoxinen in kommerziell hergestelltem Pferdefutter	88
3.3.2.8	Einfluss der Inhaltsstoffe Weizen, Gerste, Hafer und Mais sowie des Futtertyps auf die Mykotoxinbelastung von kommerziell hergestelltem Pferdefutter	90
4.	DISKUSSION	93
5.	ZUSAMMENFASSUNG	110
6.	SUMMARY	112
7.	LITERATURVERZEICHNIS	114
7.1	Zitierte Rechtsvorschriften	136
	ANHANG	139
	DANKSAGUNG	147
	ERKLÄRUNG ZUR DISSERTATION	148

VERZEICHNIS DER VERWENDETEN ABKÜRZUNGEN

A.	Arteria
AE	Aktivester
ALT	Alanin-Aminotransferase
AST	Aspartat-Aminotransferase
ATA	Alimentäre toxische Aleukämie
a_w	Activity of Water (Wasseraktivität)
$B/B_0 \times 100$	Relative prozentuale Extinktion
BE	Base Excess
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DOM-1	Deepoxydeoxynivalenol
DON	Deoxynivalenol
EFSA	European Food Safety Authority
EIA	Enzyme Immunoassay
ELEM	Equine Leukoenzephalomalazie
ELISA	Enzyme Linked Immunosorbent Assay
FAO	Food and Agriculture Organization of the United Nations
FB ₁	Fumonisin B ₁
FN	Fédération Equestre Nationale (Deutsche Reiterliche Vereinigung)
γ -GT	Gamma-Glutamyltransferase
GEA	Gesamt-Ergotalkaloide
GOT	Glutamatoxalazetat-Transaminase; andere Bezeichnung für AST
HRP	Horseradish Peroxidase (Meerrettichperoxidase)
HS	Hemisuccinat
IARC	International Agency for Research on Cancer
Ig	Immunglobulin
IL	Interleukin
i.v.	intravenös
JECFA	Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives
KG	Körpergewicht
LD ₅₀	Mittlere Letale Dosis
LFGB	Lebensmittel- und Futtermittelgesetzbuch
LOAEL	Low Observed Adverse Effect Level

MW	Mittelwert
n	Stichprobenumfang
NF _{κB}	Nuclear Factor “kappa light chain enhancer” of activated B-cells; Transkriptionsfaktor
NOAEL	No Observed Adverse Effect Level
NWG	Nachweisgrenze
OTA	Ochratoxin A
p. a.	pro analysi (zur Analyse)
PBS	Phosphate Buffered Saline (Natriumphosphatpuffer)
pH	Pondus Hydrogenii, negativ dekadischer Logarithmus der Wasserstoffionenkonzentration
PMTDI	Provisional Maximum Tolerable Daily Intake
Pos.	Positiv
PPE	Porcine Pulmonary Edema
ppm	parts per million
Q	Quartil
R	Regressionskoeffizient
r	Korrelationskoeffizient
RNA	Ribonukleinsäure
s	Standardabweichung
SCF	Scientific Committee on Food
SCOOP	Scientific cooperation
TM	Trockenmasse
TMB	Tetramethylbenzidin
TNF-α	Tumornekrosefaktor-Alpha
U/min	Umdrehungen pro Minute
v/v	Volume per Volume
WHO	World Health Organisation
X _{max}	Maximum
X _{min}	Minimum
ZEA	Zearalenon
ZR	Zuckerrüben
5-HT Rezeptor	5-Hydroxytryptamin-Rezeptor; Serotonin-Rezeptor

1 EINLEITUNG

Landwirtschaftliche Produkte sind während Wachstum, Ernte, Transport und Lagerung stets der Gefahr eines Befalls mit Schimmelpilzen ausgesetzt. Vor allem bedingt durch klimatische Gegebenheiten wie z. B. hohe Feuchtigkeit kann es nach der Pilzbesiedelung der Pflanze zur Produktion toxischer Sekundärmetabolite, sogenannter Mykotoxine, kommen. Mykotoxine können nach ihrer Aufnahme in den menschlichen oder tierischen Organismus zu erheblichen gesundheitlichen Störungen führen.

Publizierte Untersuchungen zur Mykotoxinbelastung von kommerziell hergestellten Futtermitteln für Pferde gibt es wenige, und diese beziehen sich hauptsächlich auf das Vorkommen von Fumonisin im Pferdefutter. Insgesamt ist, bis auf Studien zur Wirkung von Fumonisin (ROSS et al., 1991; MARASAS et al., 1988), wenig über die Wirkungsweise von Mykotoxinen bei Pferden bekannt. Diese Tatsache überrascht, da das Pferd als monogastrische Spezies im Allgemeinen als empfindlich gegenüber einer Mykotoxinintoxikation gilt (EFSA, 2004c).

Nach Angaben der DEUTSCHEN REITERLICHEN VEREINIGUNG, FN (2010) leben ca. eine Million Pferde und Ponies in Deutschland. Damit hat sich die Pferdepopulation in den vergangenen 40 Jahren etwa vervierfacht. Besondere Bedeutung hat das Pferd heutzutage als Sport- und Freizeitpartner des Menschen. Nur ein geringer Anteil der Pferdepopulation wird ausschließlich zur Schlachtung gehalten. Neben der Vermarktung von Pferdefleisch existiert in Deutschland ein zunehmendes Interesse an der kommerziellen Nutzung von Stutenmilch. Aus diesen Gründen ist die Mykotoxinbelastung des Pferdefutters und somit ein mögliches carry-over des Toxins in Fleisch oder Milch auch im Hinblick auf die menschliche Gesundheit von Bedeutung.

Die Mykotoxinbelastung von kommerziell hergestelltem Pferdefutter ist, neben oder gerade durch die Gefahr der Mykotoxine, für die Gesundheit von Pferd und Mensch auch aus ökonomischer Sicht von Bedeutung. Zur Fütterung der ca. eine Million Pferde und Ponies werden in Deutschland jährlich rund 1,6 Millionen Tonnen Futtergetreide benötigt (DEUTSCHE REITERLICHE VEREINIGUNG, FN, 2010). Das Getreide wird von verschiedenen Herstellern hauptsächlich in Form von Mischfutter (z. B. Müsli oder Pellets) als Sackware abgepackt und an den Endverbraucher verkauft. Unter der Annahme, dass ein

Pferd täglich rund 1-5 kg dieses Futters aufnimmt, stellt das Pferdefutter einen bedeutenden Wirtschaftszweig der deutschen Futtermittelindustrie dar.

Während für Getreideerzeugnisse zur menschlichen Ernährung zahlreiche Daten zur Mykotoxinbelastung vorliegen, wurden für kommerziell erhältliches Pferdefutter bisher keinerlei Daten publiziert. Dies wäre auch im Hinblick auf die Kontrolle der Warenströme bei Getreide wichtig. Hier ist vor allem an das Risiko einer Verwertung von Mühlenabfallprodukten oder sonstiger Getreidematerialien mit höherem Mykotoxinbelastungsrisiko als Pferdefutter zu denken.

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, einen Überblick über die Mykotoxinbelastung des in Deutschland kommerziell erhältlichen Pferdefutters zu erlangen. Das Futter wurde auf die Mykotoxine Zearalenon, Deoxynivalenol, T-2 Toxin, HT-2 Toxin, Fumonisin B₁, Ochratoxin A und Ergotalkaloide untersucht. Infolge dieser Daten sollte eine Abschätzung des Gesundheitsrisikos für Pferde vorgenommen werden; zudem sollten im Hinblick auf das mögliche carry-over in Milch und Fleisch mögliche Risiken identifiziert werden.

2 **SCHRIFTTUM**

2.1 **Allgemeines zu Risiken durch Mängel in der hygienischen Qualität, insbesondere zu der Bedeutung von Mykotoxinen, von Futtermitteln für Pferde**

Die bedarfsgerechte Versorgung des Pferdes mit Energie und Nährstoffen steht im Vordergrund einer wissenschaftlich fundierten Fütterungspraxis. Die Verträglichkeit des Futters hängt jedoch von vielen Faktoren ab, nicht zuletzt auch von der hygienischen Qualität. Vor allem in der Fütterung tragender Stuten und Fohlen verdient dieser Parameter besondere Berücksichtigung (KAMPHUES, 1996).

Feldstudien und Untersuchungen von Pferdefutterproben zeigten das relativ häufige Vorkommen von Mängeln in der hygienischen Qualität an Grund- und Kraftfuttermitteln sowie an der Einstreu. Vor allem Milben und Schimmelpilze stellten ein häufiges Problem dar. Seltener wurden auch Hefen oder Bakterien nachgewiesen. Die mangelnde hygienische Qualität des Futters wird sowohl makroskopisch (Geruch, Farbe, Feuchtigkeit), als auch mittels aufwendigerer Analysemethoden (z. B. Mykotoxine) bestimmt. Die Risiken durch Mängel im Hygienestatus des Futters können nach den möglichen Mechanismen, die der Schadwirkung zugrunde liegen, folgendermaßen unterteilt werden: direkte Infektion des Organismus (Pilzsporen, Bakterien), direkte Toxinresorption (Mykotoxine, Bakterientoxine) und indirekte bzw. sekundäre Effekte wie reduzierte Futteraufnahme, Allgemeinerkrankungen (z. B. Kolik) oder Allergisierung (KAMPHUES, 1996).

Vergiftungserscheinungen durch Schimmelpilze sind bei Pferden schon seit über zwei Jahrhunderten bekannt. Als Ursache für die Intoxikationen werden verschimmelttes Brot, Stroh, Heu, Hafer und anderes Getreide genannt. Besonders verschimmelttes Pressstroh und Matratzenstreu riefen häufig Vergiftungen hervor (KLUWE, 2006).

Neben der direkten schädigenden Wirkung der Schimmelpilze stellen deren Toxine ein weltweites Problem dar. So sind mit Mykotoxinen kontaminierte Futtermittel in der Lage sowohl die Gesundheit der Pferde, als auch, gelangen diese in die Lebensmittelkette, die Gesundheit von Menschen nachteilig zu beeinflussen (KELLER, 2007).

Tabelle 1 stellt einige wichtige Mykotoxine und deren Hauptwirkungen beim Pferd dar.

Tabelle 1: Wichtige Mykotoxine und deren Hauptwirkungen beim Pferd

Mykotoxin	Erkrankung bzw. Symptome	Referenz
Zearalenon	Hyperöstrogenismus	GIMENO und QUINTANILLA (1983)
Deoxynivalenol	Reduzierte Futteraufnahme	RAYMOND et al. (2003)
T-2 Toxin/HT-2 Toxin	Hypersalivation, ZNS-Störungen, Hautveränderungen	UENO (1972) GREENWAY und PULS (1976)
Fumonisin B ₁	Equine Leukoenzephalomalazie	ROSS et al. (1991)
Ochratoxin A	Nephropathien	KROGH und ELLING (1977)
Ergotalkaloide	Reproduktionsstörungen „Fescue Toxicosis“	RYAN et al. (2001) FAYRER-HOSKEN et al. (2008)

Entscheidende Einflussgrößen auf die mikrobielle Belastung und damit auch auf die Mykotoxinbelastung sind die Bedingungen während der Futtermittelgewinnung und -lagerung, insbesondere der Grad der Reinigung, der Feuchtegehalt, die Substratverfügbarkeit, die Lagerungsdauer sowie allgemeine Hygienemaßnahmen im Umgang mit Futtermitteln. So ist die Optimierung der Bedingungen während der Gewinnung und Lagerung von Futtermitteln und Einstreu schon in der Pferdeaufzucht eine wichtige Voraussetzung für eine ungestörte Entwicklung und langfristige Gesunderhaltung der Tiere (KAMPHUES, 1996).

Um die Gesundheit der Pferde und darüber hinaus die des Menschen zu schützen, sind regelmäßige Kontrollen des Futters in Bezug auf die Mykotoxinbelastung wichtig. Die in dieser Arbeit behandelten Mykotoxine waren in den letzten Jahren Gegenstand ausführlicher Bewertungen mehrerer internationaler Gremien (Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives, JECFA, Wissenschaftlicher Lebensmittelausschuss, SCF bzw. European Food Safety Authority, EFSA) und verschiedener Dissertationen (z. B.

SEIDLER, 2007; SCHLICHTERLE, 1996). Um einen detaillierten Überblick über Toxizität, Metabolismus, Vorkommen und Nachweis dieser Toxine zu erhalten, sei auf oben genannte Arbeiten verwiesen.

Im Folgenden werden daher vor allem grundsätzliche Eigenschaften dieser Mykotoxine sowie deren spezielle Wirkungsweisen beim Pferd berücksichtigt.

2.2 Fusarientoxine

2.2.1 Zearalenon

2.2.1.1 Physikalisch-chemische Eigenschaften

Zearalenon (6-(10-Hydroxy-6-oxo-trans-undecenyl)- β -Resorcylsäurelaktone) gehört zu den nichtsteroidalen Mykotoxinen der Stoffgruppe der phenolischen Makrolide. Die Strukturformeln von Zearalenon und einiger seiner Analoga sind in Abbildung 1 dargestellt. Zearalenon weist eine nur sehr geringe Löslichkeit in Wasser (0,002g/100ml) auf, während es in Aceton, Acetonitril, Methanol, Ethanol und wässrigen Alkalien gut löslich ist (KUIPER-GOODMAN et al., 1987). Tabelle 2 stellt ausgewählte physikalisch-chemische Eigenschaften von Zearalenon dar.

Tabelle 2: Ausgewählte physikalisch-chemische Eigenschaften von Zearalenon
(Angaben nach URRY et al., 1966; SYDENHAM et al., 1996)

Summenformel	$C_{18}H_{22}O_5$
Chemisch-wissenschaftlicher Name	6-(10-Hydroxy-6-oxo-trans-undecenyl)- β -Resorcylsäurelaktone
Synonym	F-2 Toxin
Molekulargewicht	318,37
Max. Absorption in Methanol	236 nm, 274 nm, 316 nm
Schmelzpunkt	164 °C – 165 °C

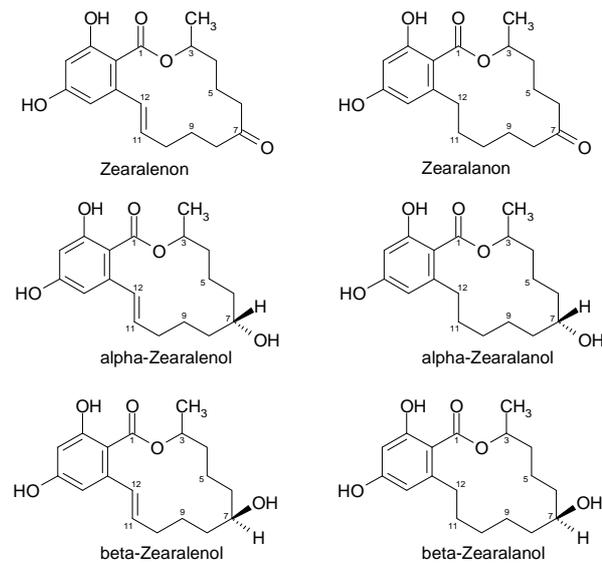


Abbildung 1: Strukturformeln von Zearalenon sowie die einiger Analoga

2.2.1.2 Biologische Eigenschaften

2.2.1.2.1 Allgemeines zu Wirkungsweise, Toxizität und Metabolismus

Zearalenon und seine Strukturanaloga (Abbildung 1) sind Mykotoxine mit ausgeprägter östrogenartiger Wirkung. Trotz ihrer nichtsteroidalen Struktur sind sie in der Lage, an den Östrogenrezeptor zu binden und Symptome eines Hyperöstrogenismus hervorzurufen. Hierbei sind deutliche tierartliche Unterschiede festzustellen. So zeigen sich beim Schwein, welches als empfindlichste Spezies gilt, schon ab einer Gabe von ca. 200 µg/kg Zearalenon (ZÖLLNER et al., 2002) klinische Symptome, wohingegen beim Vogel, als unempfindlichste Spezies, bei Zearalenongaben von 50 mg/kg keine negativen Erscheinungen beobachtet werden konnten (KUIPER-GOODMANN et al., 1987). Die akute Toxizität von Zearalenon ist mit einer $LD_{50} > 4000$ mg/kg oral allerdings nur gering (EFSA, 2004b).

Im Vergleich zu 17-β-Östradiol besitzt Zearalenon nur ca. 1-10% der Bindungsaffinität zum Östrogenrezeptor, welcher sich u. a. im Uterus, in der Mamma, der Leber und dem Hypothalamus befindet (BIEHL et al., 1993). Die Bindungsaffinitäten der

Zearalenonmetabolite am cytosolischen Östrogenrezeptor des Rattenuterus stellten sich in absteigender Reihe wie folgt dar: α -Zearalanol, α -Zearalenol, β -Zearalanol, Zearalenon, β -Zearalenol (KUIPER-GOODMANN et al., 1987; EFSA, 2004b).

Nach Aufnahme des Toxins wird es in der Milz, der Niere, dem Uterus, der Dünndarmmukosa (OLSEN et al., 1987), vor allem aber in der Leber durch Reduktion in seine Hauptmetabolite α -Zearalenol und β -Zearalenol umgewandelt. Des Weiteren wird Zearalenon, ebenso wie seine Metabolite an Glucuronsäure konjugiert und über den Urin oder die Faeces ausgeschieden. Neben den glucuronidierten Formen wird auch freies Zearalenon ausgeschieden (MIROCHA et al., 1981). Glucuronidiertes Zearalenon kann bereits 30 Minuten nach oraler Aufnahme im Plasma nachgewiesen werden (KUIPER-GOODMANN et al., 1987). Die Vorkommenshäufigkeit der Zearalenonmetabolite ist tierartlich stark variabel. So dominierten bei Urinuntersuchungen beim Schwein Zearalenon (63%) und α -Zearalenol (32%), wohingegen β -Zearalenol mit 5% nur in sehr geringen Mengen vorkam. Im Rinderurin konnte als vorherrschender Metabolit β -Zearalenol, im Rattenurin vor allem freies Zearalenon und im Kaninchenurin vor allem konjugiertes Zearalenon nachgewiesen werden. Untersuchungen des Kotes der entsprechenden Tiere zeigten das gleiche Verteilungsmuster der Metabolite (MIROCHA et al., 1981). Im Unterschied zu obiger Untersuchung konnten MEYER et al. (2000), bei Untersuchungen der Galle einen relativ hohen Anteil von β -Zearalenol (33%) bei Zuchtsauen nachweisen (α -Zearalenol 38,5% und Zearalenon 28,6%). Bei Untersuchungen an Hirschen, Ziegen, Schafen, Rindern und Pferden wurden als weitere Reduktionsprodukte α -Zearalanol (Zeranol) und β -Zearalanol (Taleranol) nachgewiesen, wobei monogastrische Tiere höhere Werte dieser Metabolite aufwiesen als Wiederkäuer. Neben der Ausscheidung über die Nieren spielt auch der enterohepatische Kreislauf eine wichtige Rolle. Von Bedeutung ist, dass die Metabolite in den enterohepatischen Kreislauf eingeschleust und deshalb auch nur verzögert aus dem Organismus ausgeschieden werden. So konnte die Plasmaeliminationshalbwertszeit beim Schwein nach operativer Unterbrechung der enterohepatischen Rezirkulation von 86,6 Stunden auf 3,34 Stunden verkürzt werden (BIEHL et al., 1993). Dass sich der Metabolismus des Zearalenons nicht nur auf die Leber und den Darm beschränkt, zeigten ZÖLLNER et al. (2002) durch Nachweis von nichtglucuronidiertem Zeranol und α -Zearalenol zusammen mit Spuren von Taleranol und Zearalenon in Muskelgewebe beim Schwein.

Das Schwein stellt derzeit, neben Ratte und Maus das am häufigsten untersuchte Tier dar. Hier kommt es nach Zearalenonintoxikation zu Veränderungen des Genitaltraktes wie Rötung und Schwellung der Vulva, Vaginalprolaps, Vergrößerung des Uterus, pathologische Funktionsgebilde auf den Ovarien und damit einhergehende Fruchtbarkeitsstörungen (LEITNER et al., 2001; MEYER et al., 2000; KUIPER-GOODMANN et al., 1987). Geringe Symptome an äußeren Geschlechtsorganen (Rötung der Vulva) wurden nach einer Fütterung von 1 mg/kg Futter Zearalenon über 10 Tage von LEITNER et al. (2001) festgestellt. Lektin histochemische Untersuchungen zeigten bereits Veränderungen an Uterus, Eileiter und Mamma bei Futterkonzentrationen ab 50 µg/kg Futter (LEITNER et al., 2001). BAUER et al. (1987) zeigten, dass fünf Tage nach Ende der Zearalenonaufnahme die klinischen Symptome wieder abklingen.

Neben den oben beschriebenen Veränderungen an den Geschlechtsorganen führt die Aufnahme von Zearalenon als Östrogenrezeptoragonist zusätzlich zu einer anabolen Wirkung. Aufgrund dieser Eigenschaft wird das Zearalenonanalogon α -Zearalenol (Synonyme: Zeranol oder Ralgo) in einigen Ländern auch gezielt als Leistungsförderer in der Mast eingesetzt. In dieser Hinsicht ist α -Zearalenol das potenteste Zearalenonanalogon. Innerhalb Europas ist die Fütterung jedoch seit 1985 verboten (ZÖLLNER et al., 2002).

Eine eindeutig teratogene Wirkung konnte in einer Zweigenerationenstudie an Ratten nicht nachgewiesen werden. Es zeigte sich zwar neben erhöhter Resorptionsraten und Abnahme der lebensfähigen Nachkommen eine Veränderung der skelettalen Strukturen, diese seien aber auf die verzögerte fetale Entwicklung durch die östrogene Wirkung des Zearalenons zurückzuführen und kein Indiz für echte Missbildungen (BECCI et al., 1982a). Auch in anderen Studien konnte diese mangelhafte Ossifikation nachgewiesen werden (KUIPER-GOODMANN et al., 1987).

Durch die östrogene Wirkung kommt es zu Gewichtszunahmen der Schilddrüse, der Hypophyse und der Nebenniere (BECCI et al., 1982a). In Bezug auf die kanzerogene Wirkung von Zearalenon gibt es unterschiedliche Studien. So stellten BECCI et al. (1982b) in einer Langzeitstudie an Ratten keine Kanzerogenität fest. In Langzeitstudien an Mäusen wurden jedoch hepatozelluläre Adenome und Hypophysenadenome nachgewiesen, wobei hier sehr hohe Konzentrationen von 8-9 mg/kg/Tag verabreicht wurden. Es wird darüber

diskutiert, ob es sich hierbei auch um die Konsequenz zu hoher „Östrogenwerte“ handelt (EFSA, 2004b).

Des Weiteren verursacht Zearalenon Veränderungen im Blutbild der Ratte. So kommt es nach Gaben ab 1,5 mg/kg Zearalenon zu einem Anstieg des Hämatokrits, einem Abfall der Thrombozytenkonzentration und damit einhergehender Blutungsneigung. Konzentrationen von 3 mg/kg führen zu einem Anstieg der Zellen des weißen Blutbildes und einer Erhöhung der Leberwerte (Bilirubin, ALT, AST), was auf eine Lebertoxizität von Zearalenon hindeutet (MAAROUFI et al., 1996).

In zahlreichen Studien wurde ein mögliches carry-over von Zearalenon in essbares Gewebe bzw. Organe untersucht. ZÖLLNER et al. (2002) zeigten eine Anreicherung von Zearalenon und einiger seiner Metaboliten in der Rückenmuskulatur des Schweines. Des Weiteren wurde Zearalenon bzw. seine Metaboliten auch im Fettgewebe und in Milchproben von Schafen und Schweinen nachgewiesen (KUIPER-GOODMANN et al., 1987). Insgesamt weist Zearalenon aber eine geringe Gewebedisposition auf und wurde nur in geringen Mengen in Milchproben und Eiern nachgewiesen (EFSA, 2004b). Im Rahmen des SCOOP-Projektes „Fusarientoxine“ (2003) wurden in Konsummilch Konzentrationen von 1,2-5,5 µg/l nachgewiesen (EFSA, 2004b).

2.2.1.2.2 Wirkung bei Equiden

Zum Metabolismus und klinischer Symptomatik von Zearalenon beim Pferd gibt es bislang wenige Untersuchungen. Unter Beachtung oben aufgeführter Speziesunterschiede ist es schwierig, die Daten der Untersuchungen an anderen Tieren direkt auf das Pferd zu übertragen.

GIMENO und QUINTANILLA (1983) beschreiben den Ausbruch einer Zearalenontoxikose bei Pferden durch Konzentrationen im Futter von ca. 2,6 mg/kg. Die Pferde zeigten neben einer Futterverweigerung Ödeme der Vulva bis hin zu einem Vaginalprolaps, eine Zunahme der Uterusgröße und innere Blutungen.

JUHÁSZ et al. (2001) konnten nach Zearalenongaben von 7 mg pro Traberstute über 10 Tage keine Veränderungen der Zykluslänge, der Länge der Gelbkörper- oder Follikelphase, keinen Einfluss auf die Progesteronplasmakonzentration oder die Follikelaktivität (Größe und Anzahl der Follikel) und kein vermehrtes uterines Ödem feststellen.

Nach Fütterung mit 1 mg/kg Zearalenon in Kombination mit 12 mg/kg DON (3 kg Futterhafer/Tag) über fünf Rossezyklen an Haflingerstuten zeigten die Tiere eine Tendenz, in der zweiten Zyklushälfte Follikel in erhöhter Zahl anzubilden. Dies führte allerdings nicht zu einer gesteigerten Rate an Doppelovulationen. Auch hier wurde keine Veränderung in der Plasmaprogesteron-, α -östradiol-oder LH Konzentration festgestellt. Als einzige Veränderung zeigte sich eine Steigerung hämorrhagischer Gelbkörper bzw. Follikel, was aber mit der, auch von MAAROUFI et al. (1996) beschriebenen, erhöhten Blutungsneigung unter Östrogen/Zearaleneinfluss in Zusammenhang zu bringen ist (AURICH et al., 2006). Als Folge dieser Untersuchung schlussfolgern die Autoren, dass Pferde zu den eher weniger empfindlichen Spezies zählen.

Untersuchungen equiner Urinproben aus Italien (n=11) und Nord-Ost Europa (n=27) zeigen das relativ häufige Vorkommen von Zearalenonintoxikationen bei Pferden. Von den mittels ELISA untersuchten Proben waren 37 positiv (Nachweisgrenze: 0,05 ng/ml) und zeigten Konzentrationen von 0,15 ng/ml – 197,4 ng/ml, wobei der Mittelwert der italienischen Proben bei 3 ng/ml und der Mittelwert der Proben aus Nord-Ost Europa bei 44 ng/ml lag (MINERVINI et al., 2010). Des Weiteren wiesen MINERVINI et al. (2010) eine Schädigung der Spermachromatinstruktur bei Hengsten nach und belegten somit einen *in vitro* genotoxischen Effekt von Zearalenon. Die Stärke der Schädigung war abhängig von dem jeweiligen Metaboliten. So führte Zearalenon schon ab einer Konzentration von 0,025 nM zu einer Veränderung der Spermachromatinstruktur. Danach folgten α -Zearalenol, β -Zearalenol, α -Zearalanol, β -Zearalanol und Zearalanol in absteigender Reihenfolge. MINERVINI et al. (2006) zeigten, dass Zearalenonkonzentrationen ab 10^{-3} μ M bei equinen Granulosazellen *in vitro* zu einem Anstieg der Zellproliferation führen. Dieser Effekt konnte bei gleichen Konzentrationen von α -Zearalenol und β -Zearalenol nicht beobachtet werden. Höhere Dosen von Zearalenon und seinen Metaboliten zeigten hier einen Trend zur Down-Regulation der Proliferationsindices. In der DNA-Analyse zeigte sich ein Trend dahin, dass alle Metabolite die Zelle in der G₀/G₁ Phase halten und

somit, wie auch von TIEMANN et al. (2003) beschrieben, zum Zelltod führen. α -Zearalenol zeigte sich hierbei als das potenteste Toxin.

2.2.2 Trichothecene (Deoxynivalenol, T-2 Toxin und HT-2 Toxin)

2.2.2.1 Physikalisch-chemische Eigenschaften

Deoxynivalenol (DON), T-2 Toxin und HT-2 Toxin gehören zur Gruppe der Trichothecene. Charakteristisch für Toxine dieser Gruppe ist das trizyklische Grundgerüst der Moleküle. Als weiteres Charakteristikum dient neben dem für die Toxizität verantwortlichen Epoxidring an C-12 und C-13 eine Doppelbindung an C-9 und C-10 (UENO, 1983). Die Trichothecene werden aufgrund des Vorkommens eines makrozyklischen Ringes an C-4 und C-15 in „makrozyklische Trichothecene“ und „nicht makrozyklische Trichothecene“ eingeteilt (ISHII, 1983). Die in dieser Arbeit behandelten Toxine gehören der Gruppe der „nicht makrozyklischen Trichothecene“ an. Die chemische Struktur der Trichothecene variiert sowohl in Position und Anzahl der Hydroxylgruppen, als auch in Position und Anzahl der über Esterbindungen verknüpften Seitenketten. Die von Fusarien gebildeten Toxine, welche Gegenstand dieser Arbeit sind, stellen relativ einfache Alkohole mit kurzkettigen Estern dar (DESJARDINS, 1993). Aufgrund ihrer chemischen Struktur werden die „nicht makrozyklischen Trichothecene“ wiederum in zwei Gruppen eingeteilt (UENO, 1983). Gegenstand dieser Arbeit sind Toxine aus den Gruppen A und B. Während Toxine der Gruppe A (z. B. T-2 Toxin und HT-2 Toxin) an C-8 unterschiedliche Substituenten haben, weisen alle Typ-B-Trichothecene (z. B. DON) an C-8 eine Ketogruppe auf. Die OH-Gruppe an C-3 verleiht DON eine gute Löslichkeit in polaren Lösungsmitteln wie Wasser, Methanol und Ethanol. DON ist in Wasser, Säuren und organischen Lösungsmitteln weitestgehend stabil und bis zu einer Temperatur von 120 °C hitzestabil (SHEPHERD und GILBERT, 1988).

T-2 Toxin ist in organischen Lösungsmitteln, wie Ethylalkohol, Ethylacetat, Chloroform und Dimethylsulfoxid gut löslich. In Wasser weist es eine deutlich schlechtere Löslichkeit auf. In Methanol und Chloroform ist das Toxin über einige Tage stabil (YAGEN und BIALER, 1993).

WIDESTRAND und PETTERSSON (2001) zeigten, dass sowohl DON als auch T-2 Toxin und HT-2 Toxin in Acetonitril 24 Monate bei 25 °C stabil blieben und Acetonitril somit das geeignetste Lösungsmittel zur Lagerung dieser Toxine ist.

In den Abbildungen 2 und 3 sind die Strukturformeln von DON, T-2 Toxin und HT-2 Toxin dargestellt. Die Tabellen 3, 4 und 5 zeigen ausgewählte physikalisch-chemische Eigenschaften von DON, T-2 Toxin und HT-2 Toxin.

Tabelle 3 Ausgewählte physikalisch-chemische Eigenschaften von Deoxynivalenol (Angaben nach SYDENHAM et al., 1996)

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

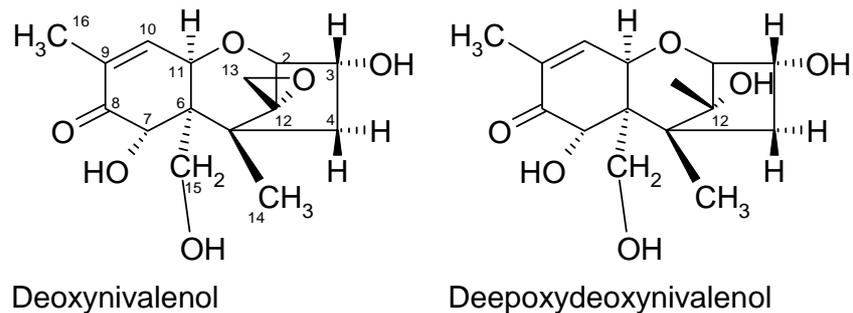


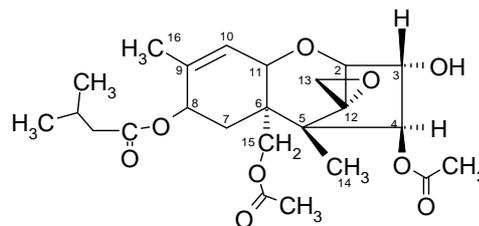
Abbildung 2: Strukturformel von Deoxynivalenol sowie die seiner deepoxylierten Form

Tabelle 4: Ausgewählte physikalisch-chemische Eigenschaften von T-2 Toxin
(Angaben nach SYDENHAM et al., 1996)

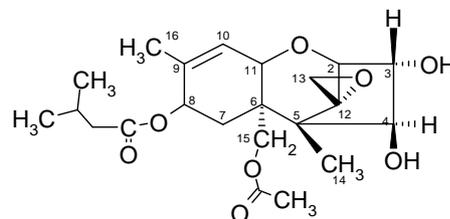
Summenformel	$C_{24}H_{34}O_9$
Chemisch-wissenschaftlicher Name	4 β ,15-Diacetoxy-3 α -hydroxy-8 α -(3-methylbutyryloxy)-12,13-epoxytrichothec-9-ene
Molekulargewicht	466,53
Schmelzpunkt	146 °C – 149 °C

Tabelle 5: Ausgewählte physikalisch-chemische Eigenschaften von HT-2 Toxin
(Angaben nach SYDENHAM et al., 1996)

Summenformel	$C_{22}H_{32}O_8$
Chemisch-wissenschaftlicher Name	15-Acetoxy-3 α ,4 β -dihydroxy-8 α -(3-methylbutyryloxy)-12,13-epoxytrichothec-9-ene
Molekulargewicht	424,29



T-2 Toxin



HT-2 Toxin

Abbildung 3: Strukturformeln des T-2 Toxins und des HT-2 Toxins

2.2.2.2 Biologische Eigenschaften

2.2.2.2.1 Deoxynivalenol

2.2.2.2.1.1 Allgemeines zu Wirkungsweise, Toxizität und Metabolismus

Eine Aufnahme von DON führt in Abhängigkeit von der aufgenommenen Dosis zu einer reduzierten Futtermittelaufnahme, einer Verschlechterung der Futtermittelvewertung und einem damit einhergehenden Gewichtsverlust. Höhere Dosen führen zu einer vollständigen Futtermittelveigerung und dem für eine DON-Intoxikation typischen Krankheitsbild des Erbrechens. Darüber hinaus verursacht DON in hohen Dosen eine Immunsuppression und führt in seltenen Fällen auch zum Tod (EFSA, 2004a; BAUER et al., 1995). Bei der toxischen Wirkung von DON wurden große tierartliche Unterschiede festgestellt. Das Schwein stellt derzeit die empfindlichste Spezies dar (EFSA, 2004a).

Der toxische Effekt von DON beruht vor allem auf dem Vorhandensein der Epoxidgruppe an C-12,13 und der Doppelbindung an C-9,10 (EFSA, 2004a). DON bindet an die 60 S-Untereinheit der Ribosomen eukaryonter Zellen und führt über eine Störung der Peptidyltransferase zur Hemmung der Proteinbiosynthese. Die Öffnung des Epoxydringes (Deepoxylation, Deepoxydeoxynivalenon, DOM-1, Abbildung 2, Kapitel 2.2.2.1) führt zu einem Verlust der Toxizität (SWANSON et al., 1988; ERIKSEN et al., 2003; KOLLARCZIK et al., 1994; MIROCHA und CHRISTENSEN, 1974).

Durch seine Interaktion mit dem peripheren Serotonin-3 Rezeptor beeinflusst DON direkt die Magenentleerung, was zu dem unter DON-Aufnahme beschriebenen Erbrechen führen kann (FIORAMONTI et al., 1993). Des Weiteren steigt nach DON-Aufnahme die Tryptophankonzentration im Gehirn an, was eine Zunahme der Serotoninkonzentration zur Folge hat (RAYMOND et al., 2003). Da Serotonin u. a. eine Rolle in der Appetitregulierung spielt, kann diese Erhöhung ebenfalls zu einer Reduktion der Futtermittelaufnahme führen.

Darüber hinaus führt DON in niedrigen Dosen über einen Anstieg verschiedener Transkriptionsfaktoren (z. B. NF- κ B (OUYANG et al., 1996)) zu einem Anstieg proinflammatorischer Zytokine, wie z. B. TNF α und Il-6 (EFSA, 2004a), die wiederum für

eine Erhöhung der IgA und IgE verantwortlich sind (PESTKA und ZHOU, 2002; PESTKA und DONG, 1994). Der Anstieg des IgA führt bei Mäusen zu Erkrankungen, die der humanen IgA-Nephropathie gleichen (PESTKA und ZOUH, 2002).

In hohen Konzentrationen kommt es nach Aufnahme von DON, bedingt durch die Apoptose von Leukozyten in Organen, wie dem Thymus, der Milz, der Leber und dem Knochenmark, zu einer Immunsuppression (EFSA, 2004a). Des Weiteren konnten RIZZO et al. (1992) eine dosisabhängige (ab 200 µg/ml) hämolytische Aktivität von DON an Rattenerythrozyten nachweisen.

DON wird relativ schnell metabolisiert. So kann DON bereits 15-30 Minuten nach oraler Verabreichung im Plasma nachgewiesen werden und ist nach 24 Stunden fast vollständig aus dem Körper eliminiert (PRELUSKY et al., 1988). Durch den schnellen Metabolismus ist das carry-over in essbare Gewebe, Milch und Eier gering (EFSA, 2004a). Im Körper wird DON zu DON-Glukoronid oder zu Deepoxy-DON umgewandelt und hauptsächlich über den Urin und nur zu einem geringen (3-5%) Teil über die Galle ausgeschieden (BAUER et al., 1995; PRELUSKY et al., 1988). Wird die acetylierte Form von DON über das Futter aufgenommen, so wird diese im Körper vollständig zu DON deacetyliert (ERIKSEN et al., 2002). Für die Deepoxylation und damit die Reduzierung der Toxizität ist die Mikroflora des Darms bzw. des Pansens verantwortlich. CÔTÉ et al. (1986) konnten die Deepoxylation von DON zu DOM-1 durch die Pansenflora bei Kühen nachweisen und zeigten den Übergang von DOM-1 in die Milch. LAUBER et al. (2000) zeigten, dass die Fähigkeit der Darmflora von Schweinen DON zu DOM-1 umzuwandeln von Faktoren wie der Toxinmenge (hohe DON Konzentrationen verursachten einen Anstieg der deepoxylationfähigen Mikroorganismen), der Darreichungsform des Futters und des Fütterungsregimes abhängt.

Kanzerogene oder mutagene Eigenschaften konnten für DON nicht nachgewiesen werden (EFSA, 2004a).

2.2.2.2.1.2 Wirkung bei Equiden

Über die klinischen Wirkungen bzw. den Metabolismus von DON bei Pferden ist bisher wenig bekannt.

SWANSON et al. (1988) untersuchten die Fähigkeit der intestinalen Mikroflora verschiedener Tiere, Trichothecene zu deepoxylieren. Während die Mikroorganismen des Schweine-, Ratten- und Rinderdarmes fast vollständig in der Lage waren Diacetoscirpenol zu deepoxylieren, fehlte diese Eigenschaft der Mikroflora des Pferdedarms.

JOHNSON et al. (1997) konnten nach einem Fütterungsversuch mit Verabreichung von 36-44 µg DON/g Gerste an fünf Pferde (pro Pferd 2x täglich 1,36 kg der kontaminierten Gerste über 40 Tage) keine Veränderungen des Verhaltens, der Futteraufnahme, des weißen und roten Blutbildes oder sonstiger Leber- oder Nierenparameter bzw. der IgG oder IgA Werte feststellen. Die Autoren schlussfolgerten daraus, dass Pferde zu den weniger empfindlichen Spezies gehören.

RAYMOND et al. (2003) hingegen stellten nach Fütterung von kontaminiertem Weizen und Mais eine Reduzierung der Futteraufnahme fest. Im Gegensatz zu JOHNSON et al. (1997) wurde hier ein Gemisch aus 15 µg/g DON, 0,8 µg/g 15-Acetyldeoxynivalenol, 9,7 µg/g Fusaric acid (FA) und 2 µg/g Zearalenon (2,8 kg des Futters zusammen mit 5 kg Heu) über 21 Tage an neun adulte, untrainierte Stuten gefüttert. Bis auf einen Anstieg der Gamma-Glutamyltransferase (γ -GT) in den ersten zwei Wochen, welcher am 21. Tag nicht mehr zu beobachten war, konnten auch hier keine Veränderungen der Immunglobuline oder anderer Blutparameter festgestellt werden. In einer Studie an trainierten Pferden wurde von RAYMOND et al. (2005) (11 µg/g DON, 0,8 µg/g ZEA, 0,7 µg/g 15-Acetyldeoxynivalenol über 21 Tage, 3,5 kg/Tag zusammen mit 5 kg Heu) ebenfalls eine Reduktion der Futteraufnahme sowie ein Gewichtsverlust festgestellt. Die Kondition der Pferde (Erschöpfungszustand, Herzfrequenz, Serumlaktat u. a.) wurde standardisiert auf einem Laufband gemessen und zeigte unter der DON-Fütterung keine Veränderung. Ebenso zeigten sich auch in dieser Studie keinerlei Veränderungen des Blutbildes oder der Immunglobuline. Der von RAYMOND et al. (2003) beobachtete Anstieg der γ -GT konnte hier nicht nachgewiesen werden, was auf die Zunahme der Leberaktivität bei trainierten Pferden zurückgeführt wurde. Dass RAYMOND et al. (2005), im Gegensatz zu

JOHNSON et al. (1997) eine Reduzierung der Futteraufnahme feststellen konnten, führten die Autoren auf den synergistischen Effekt der in dieser Studie gefütterten Mykotoxine zurück.

2.2.2.2.2 T-2 Toxin und HT-2 Toxin

2.2.2.2.2.1 Allgemeines zu Wirkungsweise, Toxizität und Metabolismus

Aufgrund ihres gemeinsamen Vorkommens auf Pflanzen sowie der Tatsache, dass T-2 Toxin im Organismus zu HT-2 Toxin metabolisiert wird, werden die Wirkungen und der Metabolismus dieser Toxine gemeinsam beschrieben. Von der JECFA wurde ein gemeinsamer PMTDI von 60 ng/kg/Tag für T-2 und HT-2 vorgeschlagen und somit ebenfalls keine Trennung dieser Toxine vorgenommen.

T-2 Toxin und HT-2 Toxin zählen zu den toxischsten Vertretern innerhalb der Gruppe der Trichothecene (VISCONTI et al., 2005; ROCHA et al., 2005). Mit einer LD₅₀ (Ratte) von 3,8 mg/kg KG bei oraler Aufnahme besitzt das T-2 Toxin eine sehr hohe akute Toxizität (MIROCHA und CHRISTENSEN, 1974).

Schon im 19. Jahrhundert wurden in Russland bei Menschen die Symptome einer T-2 Toxin-Intoxikation in Form der sogenannten ATA (alimentäre toxische Aleukämie) beschrieben. Hier zeigten sich die für dieses Toxin typischen Symptome in Form einer nekrotischen Angina einhergehend mit Fieber, Leukopenie, Hämorrhagien sowie einer Auszehrung des Knochenmarkes. Häufig endete diese Krankheit tödlich. Bei Untersuchungen des Getreides wurden damals die Fusarienspezies *F. sporotrichioides* und *F. poae* isoliert (UENO, 1983). In zahlreichen Versuchen konnten die oben genannten Symptome nach Verabreichung von T-2 Toxin erneut ausgelöst werden. Es zeigt sich nach Aufnahme des Toxins eine dosisabhängige Symptomatik, welche mit unspezifischen Symptomen wie Abgeschlagenheit, Futterverweigerung und Gewichtsverlust beginnt und in höheren Dosen zu Erbrechen, Diarrhoe, rektalen Blutungen, nekrotischen Veränderungen der Mund-, Magen- und Darmschleimhaut, pathologischer Degeneration der Zellen des Knochenmarkes, der Lymphknoten und des Intestinums sowie zu einer

Störung der ovariellen Funktion und der embryonalen bzw. fetalen Entwicklung führen kann (MIROCHA und CHRISTENSEN, 1974; MANN et al., 1982; DOI et al., 2008).

Auf zellulärer Ebene führt das T-2 Toxin, ebenso wie DON, durch Interaktion mit der 60 S-Untereinheit der Ribosomen und Hemmung der Peptidyltransferase zu einer nicht kompetitiven Hemmung der Proteinbiosynthese. Im Gegensatz zu DON, welches eher die Elongations- und Terminationsphase hemmt, führt T-2 Toxin zu einer Hemmung der Initiationsphase der Proteinsynthese. Die Stärke der Proteinsynthesehemmung des T-2 Toxins und seiner Metabolite stellt sich in absteigender Reihenfolge wie folgt dar: T-2>HT-2>T2 Triol>T-2 Tetraol. Bei Mäusen konnte die Proteinsynthesehemmung nach intraperitonealer Verabreichung ab einer Konzentration von 0,75 mg/kg im Knochenmark, in der Milz und im Thymus beobachtet werden (ROCHA et al., 2005; SCF, 2001). Über die Hemmung der Proteinsynthese führt T-2 Toxin auch zu einer Hemmung der DNA und RNA-Synthese (YAGEN und BIALER, 1993). Daneben kommt es durch das T-2 Toxin zu Defekten an der Zellmembran. So zeigten RIZZO et al. (1992) bei Untersuchungen zu der hämolytischen Aktivität von DON und T-2 Toxin, dass beide Toxine eine ähnlich starke hämolytische Aktivität besitzen, obwohl T-2 Toxin eine erheblich höhere Toxizität an eukaryonten Zellen aufweist. Die Autoren vermuteten daher, dass die Zelle auf verschiedene Weise von den Toxinen geschädigt wird. Zum einen passiert das Toxin die Zellwand und führt u. a. zu einer Störung der Proteinbiosynthese, zum anderen führt es durch Interaktion mit der Zellmembran zu Störungen derselben. Darüber hinaus führen die Toxine über die Bildung freier Radikale zu einer Phospholipidperoxidation und somit auch zu einer Störung der Zellmembran. Da das T-2 Toxin aufgrund seiner chemischen Struktur lipophiler als DON ist, wird es schneller in die Zelle aufgenommen, was seine erhöhte Toxizität gegenüber eukaryonten Zellen erklären würde. Da die Erythrozyten jedoch keinen Zellkern besitzen, spielt dieser Weg der Zytotoxizität hier keine Rolle und so zeigt sich durch die Membranschädigung beider Toxine eine ähnlich starke Hämolyse. Dass die Bildung freier Radikale eine erhebliche Rolle bei der Schädigung der Zellmembran spielt wurde dadurch bestätigt, dass durch Zugabe von sogenannten Radikalfängern, wie Tocopherol oder Ascorbinsäure die hämolytische Aktivität beider Toxine reduziert werden konnte.

Des Weiteren führt das T-2 Toxin in verschiedenen Geweben über unterschiedliche Wege zur Apoptose der Zellen. Besonders empfindlich sind die Organe mit einem hohen Anteil

proliferativen Gewebes, wie z. B. hämatopoetisches oder lymphoides Gewebe und Gewebe des Gastrointestinaltraktes. Da das Toxin die Plazenta passiert, kommt es auch in dem proliferativen Embryonal- bzw. Fetalgewebe zur Einleitung der Apoptose. Besonders betroffen ist hierbei das fetale lymphatische, skelettale und hepatische Gewebe (DOI et al., 2008; YAGEN und BIALER, 1993; DOI et al., 2006).

Aufgrund des raschen Metabolismus von T-2 Toxin wird die Rückstandsproblematik in essbaren Geweben als gering angesehen (BAUER, 1995; SCF, 2001). Je nach Literaturstelle werden Serumhalbwertszeiten in den ersten 30 Minuten nach intravenöser Verabreichung des Toxins von 5,3 bzw. 13,8 Minuten angegeben (BAUER, 1995). Das Toxin wird über Deacetylation, Hydroxylation, Konjugation an Glucuronsäure und Deepoxylation zu seinen Metaboliten umgewandelt. Als erster Schritt gilt die Bildung von HT-2 durch Hydrolasen und die Deacetylation der C-4 Acetylgruppe. HT-2 kann dann weiter über T-2 Triol zu T-2 Tetraol metabolisiert werden. Die Abspaltung der Acetylgruppen gilt als erste Entgiftungsreaktion des Körpers. So liegen die LD₅₀ Werte von HT-2, T-2 Triol und T-2 Tetraol im Gegensatz zum T-2 um ein 1,5, 6,0 bzw. 6,8-faches niedriger (BAUER, 1995). PORCHER et al. (1988) sprechen von einer 10-fach geringeren Toxizität des T-2 Tetraol im Gegensatz zum T-2 Toxin. T-2 Toxin und HT-2 Toxin können des Weiteren über Deacetylation und Hydroxylation zu 3'-hydroxy HT-2, 3'-hydroxy T-2, Neosolaniol u. a. metabolisiert werden. Während die Prozesse der Deacetylation, Hydroxylation und Konjugation an Glucuronsäure überwiegend in Geweben wie der Leber und der Darmwand stattfinden, ist für die Deepoxylation die anaerobe Mikroflora des Intestinaltraktes verantwortlich (PORCHER et al., 1988; BAUER et al., 1995; SCF, 2001). Siehe hierzu auch Kapitel 2.2.2.2.1. Die Ausscheidung der Metabolite erfolgt sowohl über den Urin als auch über den Kot (BAUER, 1995).

Obwohl T-2 Toxin in einzelnen Studien zu Leber- und Lungenadenomen führte und eine Hyperkeratose und Hyperplasie der Ösophagus- und Magenschleimhaut nachgewiesen wurde, werden Toxine von *F. sporothrichioides* von der IARC als nicht kanzerogen eingestuft.

2.2.2.2.2 Wirkung bei Equiden

Berichte zur Wirkung des T-2 Toxins beim Pferd sind selten. UENO (1972) beschreibt die sogenannte „bean-hulls poisoning“ bei Pferden. So kam es nach Fütterung von Bohnenhülsen in Japan zu klinischen Symptomen in Form von ZNS-Störungen wie klonische Muskelkontraktionen, Exzitationen, Tachykardie und verminderten Lid-, Pupillen- und Hautreflexen. Bei der pathologischen Untersuchung wurden degenerative Veränderungen an Nervenzellen des Cortex, an Tubuliephitelzellen der Niere und an Myokardzellen gefunden. Darüber hinaus zeigten sich Hämorrhagien in den Meningen. Bei der Untersuchung der Bohnenhülsen wurde in 60% der Proben *F. sporothrichioides* nachgewiesen (ASQUITH, 1991).

GREENWAY und PULS (1976) beschrieben zwei Krankheitsfälle bei Pferden nach Fütterung mit T-2 Toxin kontaminierter Gerste (25 mg/kg). Die betroffenen Pferde zeigten ein reduziertes Allgemeinbefinden, Fieber und Hypersalivation.

In einer Studie mit sechs Traberstuten konnten nach Fütterung von 7 mg T-2 Toxin/Tag über 32-40 Tage (Fütterung bis zum siebten Tag des vierten Zyklus der Stuten) keine Veränderung des Allgemeinbefindens (bei drei Stuten zeigten sich jedoch Hautveränderungen im Mundbereich), keine Beeinflussung der Zykluslänge, der Follikel- oder Gelbkörperphase sowie keine Änderung der Plasmaprogesteronwerte festgestellt werden. Bei fünf Stuten wurde nach der Fütterung eine Uteruspülung durchgeführt. Bei drei dieser Stuten konnte ein normal entwickelter Embryo entnommen werden, so dass die Autoren schlussfolgern, dass bei einer Fütterung von T-2 Toxin in oben beschriebener Konzentration keine Beeinflussung der ovariellen Aktivität, Fertilisation bzw. des oviduktalen Transportes bei Stuten stattfindet (JUHÁSZ et al., 1997).

2.2.3 Fumonisine

2.2.3.1 Physikalisch-chemische Eigenschaften

Die Fumonisine sind eine Gruppe strukturverwandter Verbindungen, welche eine starke strukturelle Ähnlichkeit mit den Sphingosinen aufweisen. Bisher sind sieben verschiedene

Fumonisinanaloga (B₁, B₂, B₃, B₄, A₁, A₂, C₁) bekannt, wobei die Fumonisine B₁, B₂ und B₃ die am häufigsten nachgewiesenen sind (BACON und NELSON, 1994; MARASAS, 1995). Fumonisin B₁ (FB₁) ist ein Diester aus zwei Propan-1,2,3-Tricarboxylsäureestern und eines 2-Amino-12,16-Dimethyl-3,5,10,14,15-Penta-Hydroxycosan-Grundgerüsts. Die beiden 1,2,3-Tricarboxypropan-Seitenketten sind an C-14 und C-15 mit dem aus 20 C-Atomen bestehenden Grundgerüst verestert. Fumonisin B₂ (FB₂) ist das C-10 Deoxyanalogon von FB₁ (Abbildung 4). Die Fumonisine A₁ und A₂ sind die N-acetyl Derivate der Fumonisine B₁ bzw. B₂ (JECFA 47, 2001; MARASAS, 1995).

Da es sich bei den Fumonisinen um polare Verbindungen handelt, sind sie in polaren Lösungsmitteln, wie Wasser, Acetonitril-Wasser oder Methanol gut löslich und in organischen Flüssigkeiten schlecht bis gar nicht löslich. Darüber hinaus ist FB₁ sehr hitzestabil. So reduziert sich die FB₁-Konzentration nach 30-minütigem Kochen und einer Trockenphase von 24 Stunden bei 60 °C nicht. Erst nach Erhitzen auf Temperaturen von 190 °C konnte die FB₁ Konzentration um 60% gemindert werden. Nach Erhitzen auf 220 °C wurde kein FB₁ mehr nachgewiesen (SCOTT, 1993).

In der Abbildung 4 sind die Strukturformeln der Fumonisine B₁, B₂ und B₃ dargestellt. Tabelle 6 zeigt ausgewählte physikalisch-chemische Eigenschaften von FB₁.

Tabelle 6: Ausgewählte physikalisch-chemische Eigenschaften von Fumonisin B₁
(Angaben nach SYDENHAM et al., 1996)

Summenformel	C ₃₄ H ₅₉ NO ₁₅
Chemisch-wissenschaftlicher Name	1,1'-[14,15-(2-amino-3,5,10-trihydroxy-12,16-dimethylcosandiyl)]di-(2,3-dihydrogen propane-1,2,3-tricarboxylate)
Molekulargewicht	721,84

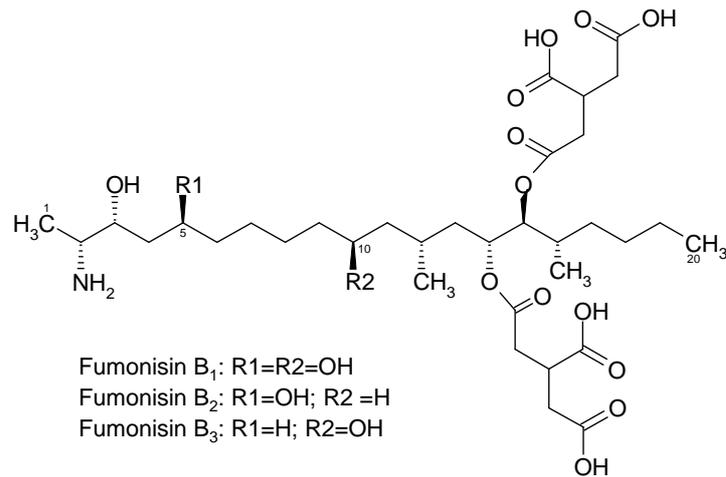


Abbildung 4: Strukturformeln der Fumonisine B₁, B₂ und B₃

2.2.3.2 Biologische Eigenschaften

2.2.3.2.1 Allgemeines zu Wirkungsweise, Toxizität und Metabolismus

Aufgrund der erhöhten Vorkommenshäufigkeit von FB₁ im Gegensatz zu seinen Analoga FB₂ und FB₃ und dem ähnlichen toxischen Profil dieser Toxine wird im Folgenden vor allem auf die biologischen Eigenschaften von FB₁ eingegangen.

FB₁ besitzt eine sehr speziesspezifische Wirkungsweise. So führt eine FB₁-Intoxikation beim Pferd zu einer Leukoenzephalomalazie (Equine Leukoenzephalomalazie; ELEM), beim Schwein v. a. zu Lungenödemen (Porcine Pulmonary Edema; PPE) und bei Nagern zu Leber- bzw. Nierenkarzinomen. Darüber hinaus wird FB₁ beim Menschen als Tumorpromotor mit für die Entstehung von Ösophaguskarzinomen in Verbindung gebracht und aus diesem Grund von der IARC in die Gruppe 2B „Possible carcinogenic for humans“ eingeordnet (EFSA, 2005b; CALONI und CORTINOVIS, 2009). Ein Beweis für die genotoxische Wirkung von FB₁ konnte bisher nicht erbracht werden. Des Weiteren führt eine Aufnahme von FB₁ bei den meisten Spezies zu erheblichen Nieren- und Leberschäden (EFSA, 2005b).

Auch bei der Empfindlichkeit der verschiedenen Spezies in Bezug auf die toxische Wirkung von FB₁ wurden tierartliche Unterschiede festgestellt. Das Pferd gilt neben dem

Schwein als die sensibelste Spezies, während Wiederkäuer und Geflügel weniger empfindlich sind (EFSA, 2005b).

Aufgrund ihrer strukturellen Ähnlichkeit zu Sphingosin, Sphinganin und anderen komplexeren Sphingolipiden führen die Fumonisine zu einer Störung im Stoffwechsel der Sphingolipide. FB₁ blockiert über die Hemmung der Sphingosin (Sphinganin) N-acetyltransferase die Synthese von komplexeren Sphingolipiden, was zu einer Zunahme freier Sphinganine und Sphingosine und zu einer Abnahme komplexer Sphingolipide führt. Da Sphingolipide an verschiedenen Aspekten der Zellregulation beteiligt sind, führt diese Störung zu einer Beeinträchtigung des Zellwachstums und der Zelldifferenzierung sowie zu zellulärem oxidativem Stress, Nekrose und Apoptose. Der Anstieg der Sphinganin- und Sphingosinkonzentration kann im Serum, im Urin, in der Zerebrospinalflüssigkeit und in verschiedenen Organen, wie Leber, Niere oder Myokard gemessen werden und gilt als sensibler Indikator einer Fumonisinaufnahme. So steigen die Sphinganin/Sphingosinwerte im Serum an, bevor ein Anstieg der Leberenzyme messbar ist. Dieser Anstieg ist dosisabhängig und auch bei klinisch unauffälligen Tieren zu beobachten (WANG et al, 1992; Smith et al., 2002; EFSA, 2005b).

Die Bioverfügbarkeit von FB₁ nach oraler Aufnahme beträgt ca. 5% und ist für FB₂ noch geringer. Nach Absorption des Toxins wird es rasch ausgeschieden. Studien an Ratten zeigten eine Eliminationshalbwertszeit für die renale Elimination von 40 Minuten nach intravenöser Verabreichung des Toxins. Des Weiteren wird FB₁ glucuronidiert, über die Galle ausgeschieden und unterliegt der enterohepatischen Rezirkulation, was zu einer Verzögerung der terminalen Ausscheidung führen kann. Durch die rasche Ausscheidung wird das carry over in essbare Gewebe als gering angesehen (EFSA, 2005b).

2.2.3.2.2 Wirkung bei Equiden

Die ELEM äußert sich klinisch durch neurologische Störungen wie Paresen, Ataxien, Abgeschlagenheit, Übererregbarkeit und Blindheit. Des Weiteren zeigen die erkrankten Pferde zielloses Kreiswandern in ihrer Box, sie pressen den Kopf gegen die Wand oder werden „kopfscheu“ (ROSS et al., 1991; WILSON et al., 1992). FORMAN et al. (2004) zeigten, dass eine geringgradige Hinterhandataxie, verzögerte Stellreflexe der Vorhand

oder eine Abnahme des Zungentonus einige Tage vor den eigentlichen, schweren Symptomen auftreten.

In der Sektion verendeter oder euthanasierter Pferde wurden eine Kolliquationsnekrose der weißen Substanz, perivaskuläre Hämorrhagien verschiedener Größe sowie Ödeme des Gehirns festgestellt (WILSON et al., 1990; ROSS et al., 1993; MARASAS et al., 1988). Die Kolliquationsnekrose setzt mit Ödemen der weißen Substanz ein, während die graue Substanz in allen Krankheitsstadien unverändert bleibt (DAHME und SCHMAHL, 1999).

Das hepatotoxische Syndrom tritt, im Gegensatz zu der ELEM, weniger häufig auf oder überschneidet sich mit deren Symptomen. Klinische Symptome sind reduzierte Futteraufnahme, Abgeschlagenheit, Ödeme des Kopfes und Ikterus. Darüber hinaus zeigt sich ein Anstieg der Leberenzyme (ALT, AST/GOT, γ -GT) und des Gesamtbilirubins. Die Leber weist in der Sektion eine feste Konsistenz mit gelblicher Farbe, eine Größenreduktion und eine Zerstörung der Lobulierung auf. Außerdem treten zentrolubuläre Nekrosen, periportale Fibrosen und diffuse Proliferationen von Bindegewebe sowie Hämorrhagien auf (ROSS et al., 1993; CALONI und CORTINOVIS, 2009).

ROSS et al. (1991) führten eine retrospektive Futteranalyse bei klinischen Fällen von ELEM durch. Die Autoren geben an, dass FumonisinKonzentrationen von > 10 mg/kg Futter ELEM auslösen und zum Tode führen können. Im Futter nicht erkrankter Pferde wurden keine FumonisinKonzentrationen oberhalb eines Wertes von 8 mg/kg Futter gefunden.

WILSON et al. (1992) konnten in einer Fütterungsstudie an Ponies jedoch nachweisen, dass Fumonisingehalte von 8 mg FB₁/kg Futter (und 2,56 mg FB₂/kg) über 122 Tage (Futter entsprechend 0,8% der Körpergewichtes (=0,065 mg/kg KG/Tag)) gefolgt von einem Fütterungsintervall mit Fumonisingehalten von 8 mg FB₁/kg Futter (und 2,56 mg FB₂/kg) über 58 Tage (Futter entsprechend 1,6% des Körpergewichtes (=0,13 mg/kg KG/Tag)) zum Auftreten klinischer Symptome und pathologischer Befunde von ELEM führen.

Von der EFSA (2005b) und der JECFA 47 (2001) wird beschrieben, dass FB_1 -Konzentrationen von >10 mg/kg Futter (entsprechend $0,2$ mg/kg KG/Tag) zu einem erhöhten Risiko führen, an einer ELEM zu erkranken, während bei FB_1 -Konzentrationen von <6 mg/kg Futter (entsprechend $0,12$ mg/kg KG/Tag) kein erhöhtes Risiko gegeben ist. Als NOAEL in Bezug auf das Auftreten klinischer Symptome beim Pferd gilt eine Dosis von $0,01$ mg FB_1 /kg KG i.v. über 28 Tage (FOREMAN et al., 2004; SMITH et al., 2002). FOREMAN et al. (2004) wiesen klinische Veränderungen ab einer Konzentration von $0,05$ mg FB_1 /kg KG i.v. nach. Die minimale orale FB_1 -Konzentration zum Auslösen einer ELEM ist unbekannt (JECFA 47, 2001). Ausgehend von einer oralen Bioverfügbarkeit von 5% würde die äquivalente orale Dosis und somit das orale LOAEL $0,2-1,0$ mg/kg KG/Tag betragen (EFSA, 2005b). Unter Beachtung oben beschriebener Studien zeigt sich jedoch, dass auch geringere Konzentrationen ($0,065$ mg/kg KG/Tag) zu klinischen Symptomen führen.

Wie bei Schweinen führt eine FB_1 -Intoxikation auch beim Pferd zu kardiovaskulären Dysfunktionen, welche in Zusammenhang mit den klinischen Symptomen zu beobachten sind. Diese äußern sich in der Abnahme der Herzfrequenz, des Auswurfvolumens, der rechtsventrikulären Kontraktilität, des Druckes in der A. coccygea sowie dem venösen pH-Wert und dem Base excess (BE), wohingegen der systemische Gefäßwiderstand zunimmt. Veränderungen des Troponin-I-Wertes werden nicht beobachtet, was darauf schließen lässt, dass es zu keinem direkten Myokardschaden durch FB_1 kommt (SMITH et al., 2002).

Der genaue Pathomechanismus des FB_1 und der Sphingolipide ist unbekannt. So kann auch keine eindeutige Antwort auf die verschiedenen Krankheitsbilder der unterschiedlichen Spezies gegeben werden. Ein möglicher Zusammenhang zwischen der kardiovaskulären Dysregulation und dem Krankheitsbild der ELEM könnte die Wirkung des Sphingosin als „second Messenger“ sein. Sphingosin hemmt den L-Typ Kalziumkanal am Myokard des Kaninchens, was zu einer Abnahme der Herzkontraktilität führt. Pferde haben eine Autoregulation des zerebralen Blutflusses, um einem Druckanstieg beim Senken des Kopfes entgegenzuwirken. L-Typ Kalziumkanäle spielen in der Regulation des Gefäßtonus zerebraler Arteriolen eine wichtige Rolle. Sollten diese Kanäle durch Sphingosin gehemmt werden, so würde das zu einem erheblichen Anstieg des Blutdruckes im Kopf führen, was möglicherweise zu den bei der ELEM beobachteten Ödemen führt (SMITH et al., 2002).

2.2.4 Vorkommen von Fusarientoxinen in Futtermitteln

Entsprechend ihres Namens werden die Fusarientoxine von verschiedenen Fusarienspezies gebildet. Die Hauptproduzenten von Zearalenon und DON sind *F. graminearum* und *F. culmorum* (JIMÉNEZ et al., 1996; EFSA, 2004a), während T-2 Toxin und HT-2 Toxin vor allem von den Fusarienspezies *F. sporotrichioides* und *F. poae* gebildet werden (BAUER, 1995; SCF, 2001). Die Spezies *F. verticillioides* (früher *F. moniliforme*) und *F. proliferatum* sind dagegen die am häufigsten vorkommenden Fumonisinbildner (ROSS et al., 1990; SCOTT, 1993; JECFA 47, 2001). Häufig kommen die Fumonisine B₁, B₂ und B₃ gemeinsam vor, wobei die FB₁-Konzentration die seiner Analoga i. d. R. deutlich übersteigt (CALONI und CORTINOVIS, 2009). Einige der Fusarienspezies besitzen darüber hinaus die Fähigkeit Metabolite der Toxine zu bilden. So produziert z. B. *F. semitectum* neben Zearalenon auch α -Zearalenol und 8'-hydroxyzearalenon (KUIPER-GOODMANN et al., 1987). *F. roseum* besitzt die Fähigkeit durch Acetylierungsvorgänge und Deacetylierungsprozesse unter anderem 3-Acetyldeoxynivalenon zu DON umzuwandeln (YOSHIKAWA und MOROOKA, 1975). Einige der wichtigsten Fusarienspezies mit den von ihnen gebildeten Mykotoxinen sind in Tabelle 7 zusammengestellt.

Tabelle 7: Wichtige toxinbildende Fusarienspezies

Fusarienspezies	Toxin	Referenz
<i>F. graminearum</i>	ZEA, DON	ENGELHARDT et al. (1986) SYDENHAM et al. (1991) JIMÉNEZ et al. (1996) DESJARDINS et al. (1993) MIROCHA et al. (1994)
<i>F. culmorum</i>	ZEA, DON	JIMÉNEZ et al. (1996) DESJARDINS et al. (1993) MIROCHA et al. (1994)
<i>F. tricinctum</i>	ZEA, T-2, HT-2, DON	ENGELHARDT et al. (1986) ISHII (1983)
<i>F. crookwellense</i>	ZEA, DON	SYDENHAM et al. (1991) DESJARDINS et al. (1993)
<i>F. oxysporum</i>	ZEA, T-2	JIMÉNEZ et al. (1996) ISHII (1983)
<i>F. equiseti</i>	ZEA, T-2	PLACINTA et al. (1999) ISHII (1983)
<i>F. sambucinum</i>	DON	DESJARDINS et al. (1993)
<i>F. sporotrichioides</i>	T-2, HT-2	DESJARDINS et al. (1993) ISHII (1983)
<i>F. poae</i>	T-2, HT-2	DESJARDINS et al. (1993) ISHII (1983)
<i>F. accuminatum</i>	T-2, HT-2	VISCONTI et al. (2005) DOI et al. (2006)
<i>F. solani</i>	T-2, HT-2	UENO (1973)
<i>F. verticillioides</i>	Fumonisine	BACON und NELSON (1994) PLACINTA et al. (1999)
<i>F. proliferatum</i>	Fumonisine	ROSS et al. (1990) BACON und NELSON (1994)

Die Infektion von Getreide findet hauptsächlich während der Blütezeit auf dem Feld statt, kann aber auch unter entsprechenden äußeren Bedingungen während der Lagerung stattfinden (EFSA, 2004b). Das Ausmaß des Pilzbefalles ist vor allem von der Feuchtigkeit in dieser Periode abhängig. So ist die Dauer des Regens und die damit lang anhaltende

Feuchte für eine Infektion wichtiger als die Stärke einzelner Regenfälle (MIROCHA et al., 1994; EFSA, 2004a).

An der Pflanze führt ein Fusarienbefall bei Weizen und Gerste zu Weißährigkeit und bei Mais zu Kolbenfusariose (PLACINTA et al., 1999). Für die Zearalenon und DON produzierenden Fusarienspezies sind Mais und Weizen die hauptsächlichen Wirtspflanzen. Fumonisine werden vorrangig auf Mais (BACON und NELSON, 1994) und T-2 Toxin und HT-2 Toxin fast ausschließlich auf Hafer nachgewiesen (BAUER, 1995). Innerhalb Europas wurde vor allem für Hafer eine hohe Belastung von T-2 Toxin/HT-2 Toxin (>20%) festgestellt, während für Mais, Weizen und Roggen seltener T-2 Toxin/HT-2 Toxin-positive Befunde gemeldet wurden (JECFA, 2001).

Die Toxinproduktion ist von Faktoren wie der Feuchtigkeit, dem Ausmaß der Infektion, der Temperatur und der jeweiligen Pilzspezies abhängig (JIMÉNEZ et al., 1996). So zeigten JIMÉNEZ et al. (1996), dass *F. graminearum* bei einem a_w -Wert von 0,97 und einer Temperatur von 28 °C über 14 Tage, gefolgt von einem Temperaturabfall auf 12 °C, Zearalenonkonzentrationen von 5150 mg/kg und 7100 mg/kg auf Mais bildet. Von *F. culmorum* wurden die höchsten Zearalenonkonzentrationen hingegen bei Raumtemperatur, welche über den gesamten Bebrütungszeitraum unverändert blieb, gebildet. Die maximale Toxinproduktion wurde jeweils zwischen dem 15. und 30. Tag der Inkubation festgestellt. Bei Temperaturen von 37 °C konnte keine Toxinproduktion mehr nachgewiesen werden. BIRZELE et al. (2000) zeigten einen Anstieg der DON Konzentration während der Lagerung bei einer Temperatur von 20 °C und einer Luftfeuchtigkeit von 17% bzw. 20%.

Aufgrund des ubiquitären Vorkommens der Fusarienspezies stellen diese Pilze und ihre entsprechenden Toxine ein weltweites Problem dar (TANAKA et al., 1988; PLACINTA et al., 1999). Von besonderem Interesse ist, dass verschiedene Fusarienspezies die Fähigkeit besitzen mehrere Mykotoxine (Trichothecene, Fumonisine, Zearalenon) zu produzieren, und es so zu einer Co-Kontamination der Pflanze mit mehreren Toxinen kommen kann (PLACINTA et al., 1999).

Bei weltweiten Untersuchungen wurden alle oben beschriebenen Mykotoxine in Konzentrationen von wenigen µg/kg bis hin zu mehreren mg/kg nachgewiesen. So wurden

z. B. in japanischen Gersteproben Zearalenonkonzentrationen von bis zu 15 mg/kg, in polnischen Maiscob DON Werte von bis zu 927 mg/kg und in polnischen Gersteproben FB₁-Werte von 0,02-25,9 mg/kg und T-2 Toxin-Konzentrationen von bis zu 2,4 mg/kg nachgewiesen. Um einen detaillierten Überblick über die weltweite Fusarientoxinbelastung zu erhalten, sei auf die Arbeit von PLACINTA et al. (1999) und die EFSA-Journals (2004a, b und 2005b) verwiesen. Ein Großteil dieser Untersuchungen beschäftigte sich jedoch nur mit Getreide, welches zum menschlichen Verzehr vorgesehen war. Da davon ausgegangen werden kann, dass Getreide zur Herstellung von Tierfutter von schlechterer Qualität ist, spiegeln diese Daten lediglich den „besten Fall“ der Mykotoxinbelastung wider (EFSA, 2004a).

Bei Untersuchungen von 710 Getreide-, bzw. Schweinemischfutterproben konnten in 13,9% positive Zearalenonwerte gemessen werden, welche sich in einem Konzentrationsbereich von 1,0-1725,0 µg/kg (Mittelwert: 37,8 µg/kg) befanden (BAUER et al., 1987). RAFAI et al. (2000) untersuchten ungarisches Futtergetreide (Mais, Weizen, Gerste, Hafer, Triticale, Roggen, Kleie, Sojabohnen und Sonnenblumen) auf verschiedene Mykotoxine. Hier wurden folgende Konzentrationen (Mittelwerte) gemessen: T-2 Toxin (150 µg/kg in Roggen bis 292 µg/kg in Hafer); DON (150 µg/kg in Sonnenblumen bis 313 µg/kg in Roggen); Zearalenon (0,0 µg/kg in Sonnenblumen bis 309 µg/kg in Kleie). Diese Arbeit zeigt, dass auch Sojabohnen mit Mykotoxinen kontaminiert sein können. Darüber hinaus wird die Bedeutung der Kleie als Mykotoxineintragsquelle in Tierfutter deutlich. Die hohe Belastung von Kleie ist dadurch zu erklären, dass die Hyphen der Fusarien hauptsächlich im Perikarb und in der Aleuronschicht des Kornes wachsen und sich der Pilz und somit auch das Toxin an den äußeren Schichten des Kornes befinden (SCHOLLENBERGER et al., 2002). KELLER et al. (2007) wiesen bei der Untersuchung von 60 Pferdefutterproben FB₁-Konzentrationen von 0,01 µg/kg-7,49 µg/kg (Mittelwert: 1,59 µg/kg) nach. Bei Untersuchungen von 23 Futterhaferproben (Hafer mit Spelzen) für Pferde aus Argentinien wurden bei zwei Proben FB₁- Konzentrationen von 108 µg/kg und 105 µg/kg gemessen. Zearalenon und DON wurden nicht nachgewiesen (SACCHI et al., 2009).

2.3 Ochratoxin A

2.3.1 Physikalisch-chemische Eigenschaften

Die Entdeckung toxischer Stämme von *Aspergillus ochraceus* führte 1965 zur Isolierung und Charakterisierung der Ochratoxine A, B und C (VAN DER MERWE et al., 1965). Ochratoxin A (OTA) besteht aus einem Dihydroisocumarin-Anteil, der über eine α -Amidbindung an ein L- β -Phenylalanin-Molekül gebunden ist (Abbildung 5). An C-5 des Isocumarin-Ringes besitzt OTA ein Chlor-Atom, welches, neben der phenolischen OH-Gruppe, zu einer Steigerung der Toxizität führt. So ist Ochratoxin B (OTB), das dechloro Derivat von OTA, entsprechend weniger toxisch als OTA. Aufgrund der freien Carboxylgruppe des Phenylalanins ist OTA eine schwache Säure mit einem pK_a -Wert von 7,1 (PETZINGER und ZIEGLER, 2000). Der Ethylester OTC, der Methylester von OTA und die Ethyl- bzw. Methylester von OTB sowie 4*R*-hydroxy-OTA sind ebenfalls OTA verwandte Metabolite, welche von Pilzen gebildet werden (KUIPER-GOODMAN und SCOTT, 1989). Ochratoxin α und Ochratoxin β sind Hydrolyseprodukte von OTA und OTB, welche aufgrund des Fehlens des Phenylalanin-Restes keine Toxizität mehr besitzen. Die Amidbindung des OTA ist allerdings sehr stabil gegenüber hohen Temperaturen und Hydrolyse (PETZINGER und ZIEGLER, 2000). So wird die OTA-Konzentration bei normalen Koch-, Röst- oder Fermentationsprozessen nur gering bis mittelgradig vermindert. Extrudierungsprozesse mit einer Feuchte von 13,4% und Temperaturen von bis zu 196 °C minderten den OTA-Gehalt nur um ca. 31% (BULLERMAN und BIANCHINI, 2007).

In der Abbildung 5 ist die Strukturformel von OTA dargestellt. Tabelle 8 zeigt ausgewählte physikalisch-chemische Eigenschaften von OTA.

Tabelle 8: Ausgewählte physikalisch-chemische Eigenschaften von OTA (Angaben nach EFSA, 2004c; KUIPER-GOODMANN und SCOTT, 1989)

Summenformel	$C_{20}H_{18}ClNO_6$
Chemisch-wissenschaftlicher Name	(R)-N-[(5-chloro-3,4-dihydro-8-hydroxy-3-methyl-1-oxo-1H-2-benzopyran-7-yl) carbonyl]-L-Phenylalanin
Molekulargewicht	403,8
Max. Absorption in Ethanol	213 nm und 332 nm

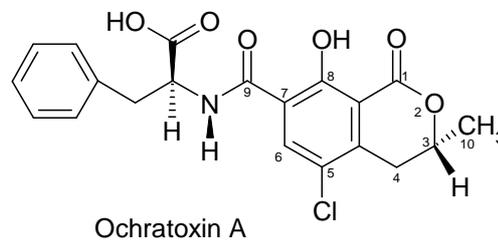


Abbildung 5: Strukturformel von Ochratoxin A

2.3.2 Biologische Eigenschaften

2.3.2.1 Allgemeines zu Wirkungsweise, Toxizität und Metabolismus

Bei OTA steht primär seine ausgeprägte Nephrotoxizität in Vordergrund. So führt OTA zu der mykotoxischen Nephropathie des Schweins und des Geflügels und wird darüber hinaus als Ursache für die Entstehung der „Balkan Endemic Nephropathy“, eine im Balkan verbreitete Nephropathie beim Menschen, in Verbindung gebracht (KROGH und ELLING, 1977; STEFANOVIĆ und POLENAKOVIĆ, 2009).

Das Schwein ist mit einer LD_{50} von ca. 1 mg OTA/kg KG die sensibelste Spezies. Ab OTA-Konzentrationen von 1 mg/kg Futter (40 μ g/kg KG/Tag) konnte eine progressive Nephropathie beobachtet werden. In Bezug auf die Veränderungen der Nierenwerte und der Nierenfunktion wurde ein LOEL von 8 μ g/kg KG/Tag nachgewiesen (EFSA, 2004c).

KROGH und ELLING (1977) konnten bei Schweinen einen signifikanten Anstieg von Blut-Harnstoff und Blut-Creatinin ab einer OTA-Konzentration von 4000 µg/kg Futter feststellen. Diese Veränderung ging mit einer Polydipsie der Tiere einher. Die Fähigkeit der Schweine, Harn zu konzentrieren, sank schon ab OTA-Gaben von 1000 µg/kg Futter. Darüber hinaus führte die OTA-Fütterung zu einer Abnahme der glomerulären Filtration und einer Proteinurie.

Pathologisch-anatomisch führt eine OTA-Intoxikation zu einer vergrößerten, hellen und oberflächlich gesprenkelten Niere. Die degenerativen Veränderungen betreffen hauptsächlich die proximalen Tubuli. Das Nierenmark bleibt weitgehend unverändert. Histopathologisch zeigen sich vor allem eine Atrophie der Epithelzellen und eine interstitielle Fibrose. Im fortgeschrittenen Stadium kommt es zu einer tubulären Atrophie, einer Verdickung der Basalmembran und hyalinen Veränderungen der Glomeruli (KROGH und ELLING, 1977).

Nach oraler Aufnahme erfolgt die enterale Absorption vor allem im proximalen Jejunum über transzelluläre, nicht ionische Diffusion (TRAULSEN, 2005). Im Blut wird OTA an Serumalbumin und andere Makromoleküle gebunden und verhindert so seine glomeruläre Filtration. OTA weist speziesspezifisch stark schwankende Halbwertszeiten auf. Beim Schwein konnten Serumhalbwertszeiten von 72-120 Stunden und beim Huhn Serumhalbwertszeiten von nur 3-4 Stunden nachgewiesen werden (GALTIER und ALVINERIE, 1981; EFSA, 2004c). Im Vergleich zwischen Schwein, Kaninchen und Huhn liegt die Plasmaclearance bei 1:10:100. Ein Grund hierfür könnte die verstärkte Bindungsaffinität von OTA an das Serumalbumin des Schweins, im Vergleich zu dem des Huhnes sein (GALTIER und ALVINERIE, 1981). Die langsame Plasmaclearance des Schweins führt bei regelmäßiger OTA Aufnahme nach ca. drei Wochen zu einer „steady-state“-Blutkonzentration (EFSA, 2004c).

Neben der Anreicherung des Toxins im Blut kommt es zu einer Akkumulation von OTA in den ausscheidenden Organen Niere und Leber. CURTUI et al. (2001) konnten bei der Untersuchung von rumänischen Schlachtschweinen folgendes Verteilungsmuster der OTA-Akkumulation in den Organen feststellen: Serum (100%) > Niere (26%) > Leber (8,5%) > Muskel (2,6%).

Da die glomeruläre Filtration von OTA aufgrund dessen Proteinbindung gering ist, erfolgt die renale Ausscheidung vor allem über tubuläre Sekretion. Hier spielen verschiedene Transportsysteme (z. B. der organische Anionen Transporter) an der basolateralen Membran eine wichtige Rolle. OTA gelangt aber nicht nur aus dem Blut über die basolaterale Membran in die Tubuluszelle, sondern auch über Reabsorption aus dem Tubuluslumen. Die Reabsorption des Toxins verzögert die Ausscheidung und erhöht die Gewebeakkumulation des Toxins (TRAULSEN, 2005; PETZINGER und ZIEGLER, 2000). Neben der renalen Elimination wird OTA auch über die Galle ausgeschieden bzw. vom Darm mittels enterohepatischem Kreislauf rückresorbiert, was ebenfalls zu einer verzögerten Toxinelimination führt.

Im Körper unterliegt OTA nur einer geringen Metabolisation. Die Hauptmetaboliten von OTA sind 4(OH)-OTA, welches in der Leber und der Niere über das Cytochrom P 450-System gebildet wird, und das nicht-toxische Ochratoxin- α , welches vor allem durch die Pansenflora der Wiederkäuer entsteht. Darüber hinaus wird Ochratoxin- α auch von der caecalen Flora von Ratten sowie im Duodenum, Ileum und Pankreas gebildet. Die Fähigkeit von Leber oder Niere, OTA zu Ochratoxin- α zu metabolisieren, ist hingegen gering (JECFA, 47, 2001; EFSA, 2004c).

Neben seinem akuten und chronischen nephrotoxischen Potential wirkt OTA kanzerogen bei Labornagern (EFSA, 2004c) und geringgradig genotoxisch auf Säugetierzellen (KUIPER-GOODMANN und SCOTT, 1989), so dass OTA von der IARC (1993) in die Gruppe 2B „Possible carcinogenic for humans“ eingestuft wurde.

Teratogene Effekte konnten bei Untersuchungen an Mäusen, Ratten, Hamstern und Hühnern nachgewiesen werden (KUIPER-GOODMANN und SCOTT, 1989).

Darüber hinaus führt OTA zu einer Störung des Immunsystems, was eine Reduktion der Organgröße von Thymus, Milz und Lymphknoten, eine verminderte Bildung von Antikörpern, Veränderungen in Zahl und Funktion der Immunzellen und eine Modulation der Zytokinproduktion zur Folge hat. Diese Veränderungen sind Folgen der Proteinsynthesehemmung von OTA, seiner Apoptoseeinleitung und seiner nekrotisierenden Wirkung (AL-ANATI und PETZINGER, 2006).

Aufgrund seines Phenylalanin-Restes scheint OTA auf molekularer Ebene jene Enzyme zu hemmen, deren eigentliches Substrat Phenylalanin ist. Von besonderer Bedeutung ist hier die Phenylalanin-tRNA-Synthetase. OTA hemmt kompetitiv die Aminoacylierung von Phenylalanin-tRNA, welches von der Phenylalanin-tRNA-Synthetase katalysiert wird. CREPPY et al. (1983) konnten die kompetitive Hemmung der Phenylalanin-tRNA-Synthetase durch Bindung von OTA an dieses Enzym nachweisen. So führt OTA posttranskriptional zu einer Hemmung der Proteinsynthese. Aufgrund der im Gegensatz zu OTA weitaus höheren Bindungsaffinität von Phenylalanin an die Phenylalanin-tRNA-Synthetase, führt OTA zu einer dosisabhängigen Hemmung. Durch die zusätzliche Gabe von Phenylalanin konnte eine Minderung des toxischen Effektes von OTA erzielt werden (CREPPY et al., 1983). Da OTA in weitaus größeren Mengen als Phenylalanin in der Zelle angereichert wird, kommt es trotz der geringeren Affinität zu oben beschriebener Hemmung. Die Abhängigkeit der Toxizität vom Phenylalanin-Rest konnten CREPPY et al. (1983) dadurch nachweisen, dass sowohl OTA als auch 4(OH)-OTA bei einer Konzentration von 90 μM zu einer Hemmung der Proteinsynthese führen und ein zytotoxisches Potential aufweisen. Im Gegensatz dazu ist Ochratoxin- α , welches keinen Phenylalanin-Rest besitzt, weder zytotoxisch noch führt es zu einer Hemmung der Proteinsynthese.

Im Gegensatz zu diesen Untersuchungen zeigten McMASTERS und VEDANI (1999), dass der Phenylalaninrest von OTA nicht äquivalent zu dem natürlich vorkommenden Phenylalanin an die Phenylalanin-tRNA-Synthetase bindet und die so entstandene Bindung nur sehr schwach ist. Die Autoren schließen daraus, dass weitere Wege für die Toxizität des OTA verantwortlich sein müssen.

Als Folgen einer OTA-Intoxikation konnten neben der Hemmung der Proteinsynthese und in Folge dessen die Hemmung der DNA-Synthese unter anderem eine Steigerung der Lipidperoxidation, eine Unterbrechung der oxidativen Phosphorylierung in den Mitochondrien, eine Hemmung der Gluconeogenese und die Einleitung von Apoptose nachgewiesen werden (PETZINGER und ZIEGLER, 2000).

Die Probennahme zur Untersuchung des Tierfutters ist aufgrund der heterogenen Verteilung schwierig; im Futter bilden sich häufig sogenannte „hot spots“. Verschiedene Untersuchungen an Schweinen zeigten jedoch, dass die Untersuchung des Blutes aufgrund

der Akkumulation von OTA im Serum gute Rückschlüsse auf die Kontamination des Futters zulässt (HULT et al., 1980). Die Konzentrationen im Serum von Schlachtschweinen verschiedener Länder lagen im Bereich von 4,4-13,8 ng/ml (KUIPER-GOODMAN and SCOTT, 1989). HULT et al. (1980) zeigten bei Untersuchungen an Schweinen aus 279 schwedischen Herden, dass 16,8% der Blutproben über einer OTA-Konzentration von 2 ng/ml Blut (Nachweisgrenze) liegen. Darüber hinaus konnten diese Autoren nachweisen, dass die Probe eines Schweins ausreicht, um die Belastung der ganzen Herde bzw. die Kontamination des Futters einzuschätzen. Eine hohe Belastungssituation zeigte sich auch bei der Untersuchung rumänischer Schlachtschweine, bei der 98% der Proben positiv für OTA zu werten waren (Range: 0,05-13,4 ng/ml) (CURTUI et al., 2001). Aufgrund der hohen Plasmaclearance von OTA beim Geflügel und der geringen Resorptionsrate von OTA bei Wiederkäuern (Abbau zu Ochratoxin- α durch die Pansenflora) eignet sich oben beschriebene Untersuchung für diese Tierarten weniger (EFSA, 2004c).

2.3.2.2 Wirkung bei Equiden

Spezielle Untersuchungen oder Berichte zu der Wirkung bzw. dem Metabolismus von OTA beim Pferd sind selten. KROGH und ELLING (1977) beschreiben das Auftreten von Polydipsie/Polyurie nach Aufnahme von verschimmeltem Futter, insbesondere Stroh, bei Pferden. Auch BICKHARDT et al. (2003) beschreiben OTA als Ursache einer toxischen Nephropathie beim Pferd. In Bezug auf vorliegende Daten über die Wirkungsweise von OTA bei anderen Pflanzenfressern schlussfolgert die EFSA (2004c), dass OTA wahrscheinlich durch die Mikroflora des Caecums bzw. des Colons zu Ochratoxin- α metabolisiert wird, der Großteil der oral aufgenommenen OTA-Menge jedoch im proximalen Dünndarm absorbiert wird, bevor es zu einer Metabolisierung kommt. Pferde müssten somit weitaus empfindlicher gegenüber OTA sein als Wiederkäuer.

2.3.3 Vorkommen

OTA ist ein Mykotoxin, das von verschiedenen Schimmelpilzen der Gattungen *Aspergillus* und *Penicillium* gebildet wird. In den gemäßigten Klimazonen gilt *P. verrucosum* (neben

P. viridicatum) und in (sub)tropischen Regionen *A. ochraceus* als Hauptproduzent. Bei Untersuchungen von Futtermitteln wird OTA am häufigsten in Getreide (Roggen, Gerste, Mais und Weizen) und seltener in Erdnüssen oder Sojabohnen nachgewiesen. Die Toxinbildung erfolgt gewöhnlich während der Lagerung (EFSA, 2004c).

Das Wachstum der Pilze sowie die Produktion von OTA sind von verschiedenen äußeren Faktoren, vor allem aber von der Feuchtigkeit und der Temperatur abhängig. Während Feldschimmelpilze die Pflanzen bei einer Feuchtigkeit von mehr als 20% infizieren, werden sogenannte Lagerungspilze schon bei einem Feuchtegehalt von 13-18% gefunden (LILLEHOJ und ELLING, 1983). Studien zeigten jedoch, dass *P. verrucosum* bei einem Feuchtegehalt von 16% keine nachweisbaren Mengen von OTA auf Gerste oder Mais produziert. Bei einem Feuchtegehalt von 20,5% und einer Temperatur von 22 °C produzierte *P. verrucosum* dreimal höhere Werte OTA als bei einer Temperatur von 15 °C und gleicher Feuchte (KUIPER-GOODMAN und SCOTT, 1989). Der Einfluss der Temperatur auf die Toxinproduktion zeigt sich auch darin, dass *A. ochraceus* bei Temperaturen von 8-37 °C wächst, OTA jedoch nur bei Temperaturen von 12-37 °C, mit einem Optimum von 31-37 °C, bildet. *P. viridicatum* wächst bei Temperaturen von 0-31 °C, produziert jedoch nur bei 4-31 °C, mit einem Optimum von 16-24 °C, OTA. Der optimale a_w -Wert für die Toxinproduktion liegt für *A. ochraceus* bei 0,99 und für *P. viridicatum* bei 0,95-0,99 (LILLEHOJ und ELLING, 1983).

Eine Einschränkung der Toxinbildung erfordert somit eine angemessene Trocknung des Ernteguts vor und während der Lagerung, so dass die Entstehung von sogenannten „hot spots“ (Schimmelpilznester) vermieden wird. Die Verteilung von OTA in gelagertem Getreide ist sehr heterogen, was die Analyse und die Bewertung der aus der Nahrungsaufnahme resultierenden Toxinexposition der Tiere beeinträchtigt (EFSA 2004c). Siehe dazu auch Kapitel 2.3.2.1.

Bei Untersuchungen von 1500 Getreideproben (Weizen, Hafer, Roggen, Gerste, Mais) europäischer Herkunft enthielten nur 4% der untersuchten Proben mehr als 1 µg/kg OTA. Der Höchstwert von 27 µg/kg wurde in schwedischem Roggen nachgewiesen (EUROPEAN COMMISSION, SCOOP, 2002). SCUDAMORE et al. (1999) untersuchten 306 Proben Futtergetreide. Hier enthielten 15% der Proben OTA-Werte über 1 µg/kg. Der Höchstwert von 17,8 µg/kg konnte in englischer Gerste nachgewiesen werden. Bei dieser

Untersuchung zeigte sich eine signifikante Korrelation zwischen der OTA-Konzentration, dem Feuchtegehalt des Getreides, der Lagerungsdauer und der geographischen Lage. Untersuchungen von ungarischem Futter (Mais, Weizen, Gerste, Hafer, Triticale, Roggen, Kleie, Sojabohnen und Sonnenblumenkerne) auf verschiedene Mykotoxine zeigten für OTA-Werte (Mittelwerte) von 0 µg/kg in Kleie bis 350 µg/kg in Sojabohnen. Der Höchstwert von 1850 µg/kg wurde in Mais gemessen (RAFAI et al., 2000). BAUER und GAREIS (1991) konnten bei der Untersuchung von Getreide und Mischfutterproben in 13% der Proben, vor allem in Gerste, Hafer, Weizen und den Mischfutterproben, OTA nachweisen (Mittelwert: 10,3 µg/kg; Range: 0,1-206 µg/kg). Bei Untersuchungen von 50 Pferde-Mischfutterproben wurde bei 60% der Proben OTA in einem Konzentrationsbereich von 2-3,2 µg/kg nachgewiesen (GUERRA et al., 2005).

2.4 Ergotalkaloide

2.4.1 Physikalisch-chemische Eigenschaften

Die Gruppe der Ergotalkaloide umfasst bis heute über 40 verschiedene Toxine (EFSA, 2005a). Allen Ergotalkaloiden gemeinsam ist das tetracyclische, einen Indolring enthaltende Ergolin-Ringsystem der Lysergsäure (EFSA, 2005a). Vom Ergolin-Ringsystem ausgehend können die Ergotalkaloide in folgende Gruppen eingeteilt werden: Die Clavine (z. B. Fumigaclavin), die Lysergsäure, die Lysergsäureamid-Verbindungen (z. B. Ergometrin; im amerikanischen Sprachraum: Ergonovin) und die komplexer aufgebauten Ergopeptide (z. B. Ergotamin) (RICHARD, 2007).

Hinsichtlich der chemischen Struktur ist das Ergometrin eines der einfachsten Ergotalkaloide (Abbildung 6). Die Mehrzahl der in Getreide vorkommenden Ergotalkaloide gehört jedoch zu der Gruppe der Ergopeptide (Abbildung 7) (CURTUI et al., 2007).

Da die Lysergsäure in zwei isomeren Formen vorkommen kann, liegen auch die Ergotalkaloide in zwei Formen vor. Sie werden durch die Namensendungen -in bzw. -inin unterschieden. Grundsätzlich ist die Stabilität der Ergotalkaloide in der -in Form im schwach sauren Milieu am höchsten, während im wässrigen und insbesondere im

alkalischen Milieu eine rasche Umwandlung in die biologisch inaktivere -inin Form stattfindet (CURTUI et al., 2007; EFSA, 2005a).

In wässrigem Milieu sind Ergotalkaloide, wie z. B. Ergotamin, gegenüber Hitze relativ empfindlich. So konvertiert Ergotamin in wässriger Lösung zu Ergotaminin und kann in Bezug auf seine Konzentration bei 120 °C über 20 Minuten um 40% reduziert werden (SCHOCH und SCHLATTER, 1985).

Die meisten Ergotalkaloide sind in organischen Lösungsmitteln gut, in polaren Lösungsmitteln, wie z. B. Wasser, hingegen schlecht löslich (EFSA, 2005a).

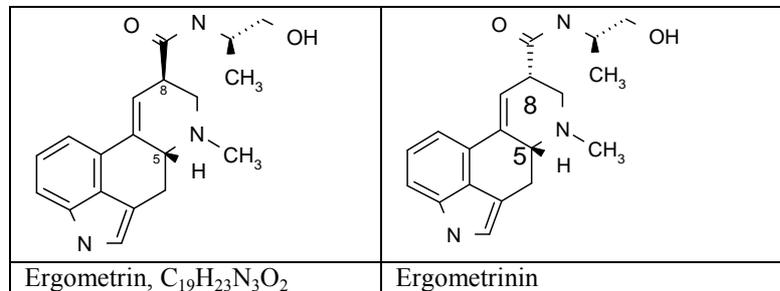
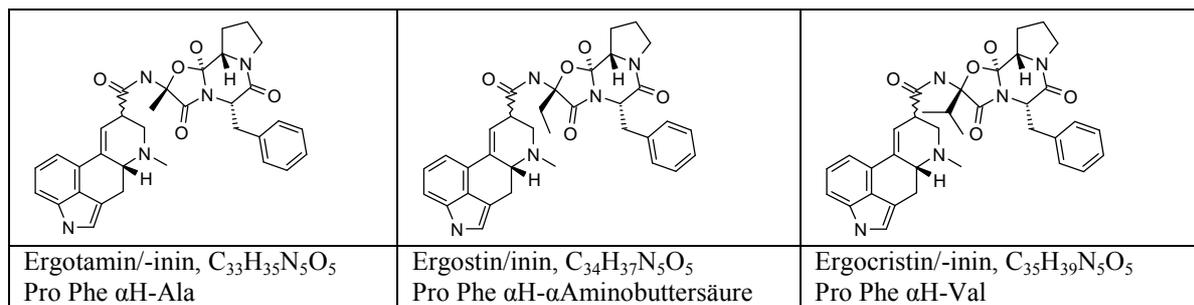
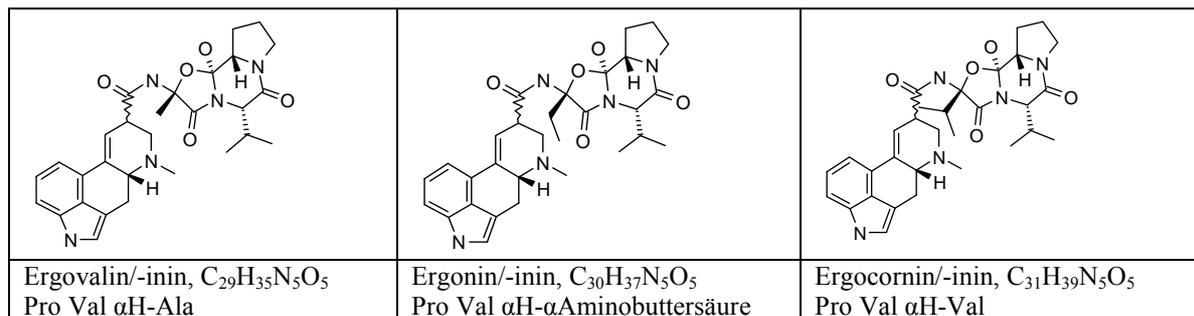


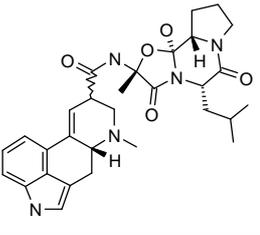
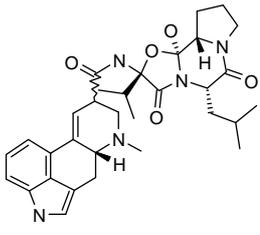
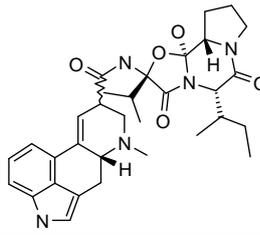
Abbildung 6: Strukturformel, sowie Summenformel des Lyserginsäureamids Ergometrin und seiner isomeren Form (CURTUI et al., 2007; ROTH et al., 1990)



Gruppe 1: Phenylalanin-Typ



Gruppe 2: Valin-Typ

		
Ergosin/-inin, C ₃₀ H ₃₇ N ₅ O ₅ Pro Leu αH-Ala	α-Ergocryptin/-inin, C ₃₂ H ₄₁ N ₅ O ₅ Pro Leu αH-Val	β-Ergocryptin/-inin Pro Ile αH-Val

Gruppe 3: Leucin-Typ

Abbildung 7: Strukturformeln und Summenformeln einiger Ergopeptide. Die Sortierung der Gruppen erfolgte nach der Aminosäurezusammensetzung der Tripeptid-Seitenkette (CURTUI et al., 2007)

2.4.2 Biologische Eigenschaften

2.4.2.1 Allgemeines zu Wirkungsweise, Toxizität und Metabolismus

Die Ergotalkaloidintoxikation gilt als eine der ältesten Mykotoxikosen. Bereits im Mittelalter wurden die Symptome als „Heiliges Feuer“ oder „St. Antonius Feuer“ beschrieben. In den großen Epidemien des 10.-18. Jahrhundert starben 20000-40000 Menschen an den Folgen einer Ergotalkaloidvergiftung. Grundsätzlich können zwei verschiedene Formen der Ergotalkaloidintoxikation unterschieden werden: die gangränöse Form mit brennenden Schmerzen durch Gangrän der Extremitäten und die konvulsive Form mit Halluzinationen, Delirien, Muskelspasmen und starken Konvulsionen (EFSA, 2005a; SCHIFF, 2006).

Während bei den Epidemien des Mittelalters der Gehalt an Mutterkörnern im Getreide bei über 30% lag, wird heute ab einem Mutterkornbesatz von 0,10-0,15% von unerwünschten Wirkungen beim Menschen ausgegangen (SCHOCH und SCHLATTER, 1985; BfR, 2004).

Die Wirkung der verschiedenen Ergotalkaloide beruht auf deren Eigenschaft als partieller Agonist oder Antagonist an α-adrenergen, dopaminergen und Serotoninrezeptoren. Haupteffekte sind Vasokonstriktionen, Uteruskonstriktionen, verminderte

Prolaktinsekretion mit einhergehender Agalactie sowie Erbrechen und Störungen der Thermoregulation (EFSA, 2005a; FAYRER-HOSKEN et al., 2008).

Die Symptome und der Angriffsort der Alkaloide sind von dem einzelnen Toxin, der Dosis, der Spezies, dem Gewebe, dem physiologischen und endokrinologischen Status des Individuums und der Verabreichung des Toxins abhängig. So führt Ergometrin vor allem zu einer starken Uteruskontraktion (5-HT₂-Rezeptor Agonist), während Ergotamin als 5-HT_{1B/1D}-Rezeptor Agonist in der Migränetherapie des Menschen Anwendung findet (SCHIFF, 2006; SAPER und SILBERSTEIN, 2006).

Bei einer akuten Intoxikation stehen oben beschriebene gangränöse oder konvulsive Symptome in Kombination mit Erbrechen, Diarrhoe, Aborten und kardiovaskulärem Kollaps bis hin zum Tod im Vordergrund. Im Gegensatz dazu äußern sich chronische Expositionen häufig in einer Reduktion des Gewichtes sowie einer verschlechterten Reproduktionslage und Agalactie bei weiblichen Tieren (EFSA, 2005a).

In Bezug auf den Metabolismus einzelner Ergotalkaloide konnten SETTIVARI et al. (2008) nach Inkubation von Rattenleberzellen mit Ergovalin eine Zunahme der Cytochrom P450 Protein-Expression und einen Abfall der Expression und Aktivität antioxidativer Enzyme nachweisen. Folglich kann es zu einer Zunahme von oxidativem Stress der Leberzellen nach Ergovalinaufnahme kommen. Auch die EFSA (2005a) berichtet von einem first pass Metabolismus in der Leber nach oraler Aufnahme von Ergotalkaloiden.

Das carry-over in essbare Gewebe und Milch ist gering (EFSA, 2005a). SCHUMANN et al. (2009) konnten nach Gabe von ergotalkaloidhaltigem Futter mit Konzentrationen von 504,9-619,4 µg/kg TM (entspricht ca. 16 µg/kg KG/Tag) an Milchkühe keine Rückstände in der Milch nachweisen.

2.4.2.2 Wirkung bei Equiden

Ergotalkaloidintoxikationen treten bei Pferden vor allem nach Aufnahme von Weidegräsern, wie Rohrschwingel (*Festuca arundinacea*) und Weidelgras (*Lolium perenne*), auf, welche mit den endophytisch lebenden *Neotyphodium spp.* infiziert sind

(FAYRER-HOSKEN et al., 2008; LEZICA et al., 2009). Hier stellt Ergovalin das am häufigsten nachgewiesene Ergotalkaloid dar, wobei darauf hingewiesen werden soll, dass nicht geklärt ist, ob ausschließlich Ergovalin zu den beim Pferd beobachteten Symptomen führt (FAYRER-HOSKEN et al., 2008). Im Gegensatz zu Rindern, die Ergovalinkonzentrationen von 1000-2000 µg/kg tolerieren, zeigen Stuten schon ab Konzentrationen von 50-100 µg/kg klinische Symptome (EFSA, 2005a).

Die Hauptsymptome einer sogenannten „Fescue Toxicosis“ bei Stuten sind gekennzeichnet durch sinkende Aufnahmeraten, gesteigerte embryonale Verluste, Aborte, verlängerte Tragzeiten, Dystokien, eine ödematisierte Plazenta, vermehrtes Auftreten einer Retentio secundinarum, Agalactie, Steigerung der Neugeborenen-Mortalität und veränderte Hormonspiegel. So führt die Aufnahme von Ergotalkaloiden zu einem Abfall des Progesteron-, Relaxin- und Prolactinserumspiegels und zu einem Anstieg von 17-β Östradiol (RYAN et al., 2001; FAYRER-HOSKEN et al., 2008). Bei Hengsten wurden nach Aufnahme von mit *Neotyphodium spp.* infiziertem Gras keine negativen Auswirkungen auf die Spermienmotilität, -morphologie und -zahl nachgewiesen (FAYRER-HOSKEN et al., 2008).

Da die Hauptwirkungen bei Stuten durch die Eigenschaft der Ergotalkaloide als Dopamin-Agonisten hervorgerufen wird, führt eine Verabreichung von Dopamin-Antagonisten, wie Domperidon oder Fluphenazin, zu einer deutlichen Reduzierung oben beschriebener Symptome (RYAN et al., 2001; FAYRER-HOSKEN et al., 2008).

Im Gegensatz zu oben beschriebenen Studien führte die Fütterung von mit Endophyten infiziertem Gras über 10 Tage an Stuten in der Frühgravidität (65.-100. Trächtigkeitstag) weder zu einer Beeinträchtigung der Progesteron- und Prolactinserumkonzentrationen, noch zu einer negativen Beeinflussung der fetalen Entwicklung (YOUNGBLOOD et al., 2004).

VIVRETTE et al. (2001) führten einen Fütterungsversuch mit *Neotyphodium spp.* infiziertem Gras an sieben Pferden durch. Die Autoren stellten eine verzögerte Rekonvaleszenzzeit der Pferde (länger erhöhte Herzfrequenz, Atemfrequenz und Hauttemperatur, sowie gesteigerte Wasseraufnahme im Vergleich zur Kontrollgruppe) nach Belastung unter einem Reiter fest und führten diese Beobachtungen auf die

vasokonstriktiven Eigenschaften der Ergotalkaloide und den somit schlechteren Wärmeabtransport von den Muskeln über die Haut zurück.

Im Gegensatz dazu konnten WEBB et al. (2008) bei Verfütterung von Gras/Heu mit Ergotalkaloidkonzentrationen von $1995 \pm 241,5$ ng/g und standardisierten Belastungsbedingungen keine Veränderungen der Thermoregulation feststellen. Diese Autoren gehen daher von keinem negativen Effekt auf die Rekonvaleszenzzeit bei Pferden nach Belastung aus, räumen jedoch ein, dass, im Vergleich zu VIVRETTE et al (2001), die Belastungssituation zu gering gewesen sein könnte, um einen Effekt zu beobachten.

Einen Anstieg der rektal gemessenen Körpertemperatur, wie er bei Rindern nach Ergotalkaloidexposition zu beobachten ist, konnte bei Pferden nicht nachgewiesen werden (SCHULTZ et al., 2006; YOUNGBLOOD et al., 2004).

Einen konzentrationsabhängigen vasokonstriktiven Effekt an equinem arterio-venösem Gewebe durch die Ergotalkaloide Ergotamin und Ergonovin zeigten ABNEY et al. (1993) bei *in vitro* Versuchen. Die Autoren schlussfolgern aus diesen Ergebnissen, dass es durch die Gefäßverengungen und den dadurch entstehenden verminderten Blutfluss zu chronischen Huf- und Gliedmaßenstörungen kommen kann.

Nach intravenöser Verabreichung von $15 \mu\text{g/kg}$ KG Ergovalin an vier Wallache zeigten sich nach ca. einer halben Stunde bei allen Tieren die gleichen Symptome. Die Pferde wiesen kalte Ohren und Nüstern sowie Probleme beim Urinabsatz auf. Des Weiteren wurden eine starke Schweißbildung und ein deutlicher Erschöpfungszustand der Tiere beobachtet. Die Plasmaclearance betrug $0,020 \pm 0,0004$ L/min/kg und die Halbwertszeit $56,83 \pm 13,48$ Minuten. Die schnelle Abnahme der Toxinkonzentration im Blut deutet darauf hin, dass nach oraler Aufnahme der Alkaloide nur geringe Plasmakonzentrationen erreicht werden (BONY et al., 2001). Nach oraler Verabreichung wurden entsprechende Plasmakonzentrationen 12-24 Stunden nach Aufnahme nachgewiesen (FAYRER-HOSKEN et al., 2008).

SCHULTZ et al. (2006) zeigten, dass, nach oraler Gabe von $0,5$ mg/kg Futter Ergovalin und $0,3$ mg/kg Futter Lysergsäure, Ergovalin ausschließlich über den Kot und Lysergsäure sowohl über den Kot als auch über den Urin ausgeschieden wird. Da Ergovalin nur zu 40%

im Kot nachgewiesen werden konnte und die Konzentrationen der Lysergsäure 133-200% der Aufnahmekonzentration betragen, ist es wahrscheinlich, dass Ergovalin im Körper u. a. zu Lysergsäure metabolisiert wird.

2.4.3 Vorkommen

Die Gruppe der Ergotalkaloide wird vor allem von Pilzen der Familie der *Clavicipitaceae*, wie z. B. *C. purpura*, *C. paspali* und *C. fusiformis* gebildet. Darüber hinaus produzieren auch andere Mitglieder der *Clavicipitaceae*, wie *Neotyphodium spp.* und *Epichloe spp.*, bedeutende Mengen dieser Toxine. Während *C. purpura* vor allem auf Getreidearten vorkommt, infizieren *Neotyphodium spp.* vorwiegend Futtergräser, wie Rohrschwingel oder Deutsches Weidelgras. In den USA sind über 90% des Rohrschwingels mit *Neotyphodium spp.* befallen, was durch die Ergotalkaloidproduktion, vor allem von Ergovalin, zu hohen wirtschaftlichen Verlusten führt (EFSA, 2005a). Grundsätzlich können alle Arten der *Poaceae*-Familie (Süßgräser) von den *Clavicipitaceae* befallen werden. Die Anfälligkeit des Getreides stellt sich in absteigender Reihenfolge wie folgt dar: Hybrid-Roggen > Roggen > Triticale > Hartweizen, Mais > Weizen, Gerste > Hafer. Neben den kommerziell angebauten Getreidearten stellen Gräser das natürliche Reservoir der Pilze dar. Die höhere Empfindlichkeit von Roggen oder Triticale lässt sich dadurch erklären, dass es sich bei diesen Getreidearten um fremdbestäubende Pflanzen handelt, die, im Gegensatz zu den selbstbestäubenden Pflanzen, wie Weizen, Gerste oder Hafer, eine längere Blütezeit haben (SCHOCH und SCHLATTER, 1985; EFSA, 2005a).

Im Frühjahr bilden die Überwinterungsstadien der Pilze (Sklerotien, Mutterkörner) Ascosporen und infizieren die Narben der Wirtspflanze während der Blütezeit. Die Hyphen wachsen durch den Griffel in den Fruchtknoten der Pflanze und bilden dort ein Mycel aus, welches sogenannten Honigtau bildet. Durch den Honigtau angelockte Insekten führen wiederum, durch die Verbreitung der vom Pilz gebildeten Konidien, zu einer Infektion benachbarter Pflanzen (ROTH et al., 1990; SCHOCH und SCHLATTER, 1985). Das Mycel der *Clavicipitaceae* bildet darüber hinaus sogenannte Sklerotien, welche die Überwinterungsstadien bzw. Dauerformen der Pilze sind. Die Ergotalkaloide werden von den Sklerotien beherbergt und sind nur in diesem Stadium nachweisbar (SCHOCH und SCHLATTER, 1985). Die Sklerotien unterscheiden sich je nach Pilzstamm, Wirtspflanze

und geographischer Region in Form, Farbe und Alkaloidzusammensetzung. Sie können von einigen Millimetern bis zu über vier Zentimeter groß werden und eine weiße (*C. tripsaci*), braune (*C. glabra*), gelbliche (*C. hirtella*) oder violett-braune Farbe (*C. purpurea*) annehmen (EFSA, 2005a).

Im Gegensatz zu den anderen Pilzen der Familie der *Clavicipitaceae* leben *Neotyphodium* spp. mit der Pflanze in einer Symbiose. Sie schützen die Gräser vor Pflanzenschädlingen und sind ihr aus metabolischer Sicht vor allem in Dürreperioden von Nutzen (BONY et al., 2001; FAYRER-HOSKEN et al., 2008). Die Stärke des Befalls ist abhängig von den äußeren Bedingungen. Hohe Phosphat- oder NO_3^- -Gehalte im Boden führen, genauso wie eine längere Dürreperiode, zu einem Anstieg des *Neotyphodium*-Befalls von Rohrschwengel (FAYRER-HOSKEN et al., 2008). Amerikanische Studien zeigten einen durchschnittlichen Ergotalkaloidgehalt in Rohrschwengel von 488-2504 mg/kg TM im Frühjahr und 219-986 mg/kg TM im Sommer. Bei einer täglichen Aufnahme von 20-25 kg Futtergras pro Pferd führt dies zu einer erheblichen Toxinbelastung der Tiere (FAYRER-HOSKEN et al., 2008).

Auch in Deutschland wurde in den letzten 10 Jahren eine Zunahme der *C. purpurea*-Infektionen bei Roggen beobachtet, was zum einen auf den vermehrten Einsatz von Hybrid-Roggen und zum anderen auf eine Steigerung der Infektionen der Gräser als natürliches Reservoir zurückzuführen sein könnte (EFSA, 2005a; LAUBER et al., 2005). LAUBER et al. (2005) konnten bei Untersuchungen von Roggenmehlen und Roggenkörnern Median-Werte von 414 $\mu\text{g}/\text{kg}$ im Jahr 2003 und 220 $\mu\text{g}/\text{kg}$ im Jahr 2004 nachweisen. Generell wiesen ökologische Produkte geringere Ergotalkaloidkonzentrationen als konventionelle Produkte auf, was auch durch den Verzicht von Hybrid-Roggen in der ökologischen Landwirtschaft zu erklären wäre. Die höheren Alkaloidkonzentrationen im Jahre 2003 erklären sich durch das in diesem Jahr trocknere Wetter und die dadurch bedingte Bildung von kleineren Sklerotien. Aufgrund ihrer geringen Größe konnten sie beim Reinigungsprozess des Roggens schlechter aussortiert werden.

CURTUI et al. (2007) konnten folgende Ergotalkaloidgehalte (Mittelwerte) in Getreide und Getreideerzeugnissen aus dem deutschen Einzelhandel mit dem gruppenspezifischen „Generic Ergot Alkaloid“-EIA nachweisen: Roggen (Speisegetreide, Mehl): 223 $\mu\text{g}/\text{kg}$,

Weizen (Speisegetreide, Mehl): 23 µg/kg, Dinkel (Speisegetreide, Mehl): 31 µg/kg und Maisgrieß (Polenta): 10 µg/kg.

Bei Untersuchungen an norwegischen Wildgräsern wurden Ergotalkaloidkonzentrationen von 0,2-9300 µg/kg nachgewiesen, wobei hier Ergocristin das Ergotalkaloidspektrum dominierte (UHLIG et al., 2007).

Im Allgemeinen ist die Datenlage zu Ergotalkaloidkonzentrationen im Getreide, speziell in Futtermitteln, schlecht. Die Mehrzahl der Untersuchungen bezieht sich nicht auf die Toxinkonzentrationen, sondern auf den prozentualen Sklerotienanteil im Getreide bezogen auf das Getreidegewicht. Die Daten schwanken hier von 0,1-0,3% (in Ausnahmefällen bis über 1%) Sklerotien im Getreide (EFSA, 2005a). Durch Reinigungs- und Verarbeitungsschritte wird dieser Gehalt in der Regel zwar deutlich reduziert, aber Gehalte von einigen 100 µg/kg im fertigen Nahrungsmittel oder in Lebensmittelgetreide sind nicht auszuschließen (CURTUI et al., 2007).

Zur Prävention von Mutterkorneinträgen in das Futter eignen sich einfache Reinigungsschritte. So können durch Siebe oder Separatoren bis zu 82% der Sklerotien entfernt werden (EFSA, 2005a). Es sei jedoch darauf hingewiesen, dass diese Schritte die Sklerotien anhand ihrer Größe aussortieren und bei kleineren Formen oder beim Transport zerbrochener Sklerotien diese Trennung nur noch ungenügend vollzogen wird. Darüber hinaus werden Kleie und andere Müllereiprodukte für die Zubereitung von Tierfutter herangezogen, was zu einem erhöhten Ergotalkaloideintrag in das Futter führen könnte.

2.5 Nachweisverfahren

Für den Nachweis von Mykotoxinen existiert eine Vielzahl von biologischen und physikalisch-chemischen Verfahren, auf die hier nicht im Näheren eingegangen werden soll. Einen Überblick über diese Verfahren liefern z. B. die in den letzten Jahren von der EFSA publizierten Schriften zur Risikobewertung dieser Mykotoxine (EFSA, 2004a; EFSA, 2004b; EFSA, 2004c; EFSA, 2005a; EFSA, 2005b). Für Screeningzwecke wurden in den letzten Jahren darüber hinaus zahlreiche immunologische Verfahren entwickelt. Im Unterschied zu den physikalisch-chemischen Methoden sind diese schnell und einfach

durchzuführen und relativ kostengünstig bezüglich der erforderlichen apparativen Ausrüstung. Zeitraubende Reinigungs- und Extraktionsschritte werden nicht benötigt und es können große Probenzahlen in kurzer Zeit bewältigt werden, was in Routineuntersuchungen von großem Vorteil ist (MÄRTLBAUER et al., 1991; CHU, 1996). Die meisten Testsysteme sind als Enzymimmuntests konzipiert, radioimmunologische Verfahren zum Nachweis von Mykotoxinen werden kaum noch eingesetzt.

Die in der Lebensmittelhygiene eingesetzten, heterogenen immunologischen Verfahren erfordern eine Trennung von gebundenen und ungebundenen Reagenzien. Dies wird durch die Verwendung von Festkörperphasen, d.h. durch Bindung von Antigen oder Antikörper an Trägermaterialien wie Polystyrolplatten (Mikrotiterplatte), Polystyrolkugeln, Zellulose oder magnetische Polyacrylamid-Agarose in Kombination mit Waschschritten ermöglicht (OELLERICH, 1984). Diese mit Festphasen arbeitenden Verfahren werden nach ENGVALL und PERLMANN (1971) als „Enzyme-linked-immunosorbent-assay“ (ELISA) bezeichnet. In den letzten Jahren hat sich aufgrund der Vielfalt der entwickelten Testformate der Überbegriff EIA (enzyme immunoassay) für diese Methode durchgesetzt.

Mykotoxine sind niedermolekulare Substanzen (Molekulargewicht < 1000) und können dadurch nur im kompetitiven Testprinzip nachgewiesen werden. Das Prinzip besteht dabei in einer Konkurrenz von markiertem und freiem Antigen um eine begrenzte Anzahl von Antikörperbindungsstellen.

Beim **direkten kompetitiven EIA** sind die Antikörper direkt oder über Anti-Ig-Antikörper (Doppelantikörpertechnik) an ein Trägermaterial (Mikrotiterplatte) gebunden und dienen als Festphase. Freies und enzymmarkiertes Antigen konkurrieren um die freien Bindungsstellen der Antikörper. Nach ausreichender Inkubationszeit werden in einem Waschschriff die nicht gebundenen Reagenzien entfernt, bevor Substrat (Chromogen) zugegeben wird. Je mehr freies Antigen in der Probe vorhanden ist, umso weniger enzymmarkiertes Antigen kann an die Antikörper binden. Somit besteht ein umgekehrt proportionales Verhältnis zwischen dem Substratumsatz durch das enzymgebundene markierte Antigen und der Menge an freiem Antigen in der Probe.

Beim **indirekten kompetitiven EIA** wird Antigen-Protein-Konjugat auf ein Trägermaterial (Mikrotiterplatte) gebunden und dient als Festkörperphase. Die Probe wird mit spezifischen Antikörpern inkubiert, dabei konkurrieren die freien Antigene der Probe mit denen der Festkörperphase um die Antikörperbindungsstellen. Nach einem Waschschrift zum Entfernen ungebundener Reagenzien wird enzymmarkierter Antikörper (gegen die Immunglobuline der Tierart, von der die spezifischen Antikörper stammen) hinzugefügt; nach ausreichender Inkubation und einem weiteren Waschschrift wird Substrat (Chromogen) zugegeben. Der Substratumsatz durch das enzymgebundene Toxin-Konjugat ist wiederum umgekehrt proportional zur freien Antigenmenge in der Probe.

Zusätzlich zu diesen Methoden, die alle als Mikrotiterplatten- bzw. Röhrchentests konzipiert sind, wurden in den letzten Jahren Teststreifenverfahren für die Mykotoxinanalytik entwickelt (SCHNEIDER et al., 1992; SCHNEIDER et al., 1995). Hierbei dient eine Teststreifenmembran als Festphase für den EIA und die Farbintensität des Beschichtungspunktes wird visuell im Bezug auf eine Negativkontrolle beurteilt. Diese für eine qualitative bzw. semiquantitative Beurteilung geeignete Nachweismethode bietet die Möglichkeit der Vorselektion von Probenmaterial, wobei Toxingehalte positiver Proben anschließend mit aufwendigeren Verfahren quantifiziert werden können. Zusätzlich können durch Integration mehrerer Einzeltests auf einem Teststreifen mehrere Substanzen gleichzeitig nachgewiesen werden (SCHNEIDER et al., 1995).

2.6 Gesetzliche Grundlagen und Höchstmengenregelungen für Mykotoxine in Futtermitteln für Pferde

In Deutschland ist es gemäß § 17 des Lebensmittel- und Futtermittelgesetzbuches (LFGB, 2005) verboten, Futtermittel derart herzustellen, zu behandeln, in den Verkehr zu bringen oder zu verfüttern, dass sie bei bestimmungsgemäßer und sachgerechter Verfütterung geeignet sind, die Qualität der von Nutztieren gewonnenen Erzeugnisse zu beeinträchtigen, die Umwelt zu belasten oder die Gesundheit der Tiere und des Menschen zu schädigen.

Mykotoxine werden futtermittelrechtlich als unerwünschte Stoffe behandelt, die in oder auf Futtermitteln enthalten sind und die Gesundheit von Tieren, die Leistung von Nutztieren oder als Rückstände die Qualität der von Nutztieren gewonnenen Erzeugnisse, insbesondere im Hinblick auf ihre Unbedenklichkeit für die menschliche Gesundheit, nachteilig beeinflussen können. In der geltenden Futtermittelverordnung (Futtermittelverordnung, 2008) sind in Anlage 5 allerdings nur Höchstmengen für Aflatoxin B₁ und Mutterkorn (Mutterkorn, *Claviceps purpurea*, 1000 mg/kg) aufgeführt.

Für DON, Zearalenon, OTA und Fumonisine wurden von der EU-Kommission Richtwerte bezüglich der Maximalgehalte empfohlen (Europ. Komm. 2006/576/EG). Die Werte für Getreide und Getreideerzeugnisse wurden für die Tierarten mit der höchsten Toleranz festgelegt und sind daher als obere Richtwerte anzusehen. Grenzwerte für Pferde werden in der Empfehlung nur für Fumonisine vorgeschlagen (Tabelle 9).

Für T-2 Toxin/HT-2 Toxin existieren in Bezug auf Futtermittel derzeit keine gültigen Grenzwerte.

Nach Verordnung (EU) Nr. 1272/2009 zur öffentlichen Intervention gilt für Hart- und Weichweizen ein Grenzwert von 0,05% Mutterkornbesatz. Darüber hinaus wurde innerhalb der EU ein Grenzwert für Mutterkörner (*C. purpurea*) von 1000 mg/kg Futtermittel (entspricht 0,1%) für alle Futtermittel festgesetzt, die ungemahlene Getreide enthalten (Europ. Union 1999/29/EG).

Tabelle 9: Auszug aus der Empfehlung der Europäischen Kommission (2006/576/EG) betreffend das Vorhandensein von Mykotoxinen in zur Verfütterung an Tiere bestimmten Erzeugnissen

Mykotoxin	Zur Fütterung bestimmte Erzeugnisse	Richtwert in mg/kg (ppm) für ein Futtermittel mit einem Feuchtegehalt von 12%
DON	<u>Futtermittelausgangserzeugnisse:</u>	
	Getreide u. Getreideerzeugnisse außer Maisnebenprodukte	8
	Maisnebenprodukte	12
	<u>Ergänzungs- und Alleinfuttermittel außer:</u>	5
	für Schweine	0,9
	für Kälber (< 4 Monate), Lämmer u. Ziegenlämmer	2
Zearalenon	<u>Futtermittelausgangserzeugnisse:</u>	
	Getreide und Getreideerzeugnisse außer Maisnebenprodukte	2
	Maisnebenprodukte	3
	<u>Ergänzungs- und Mischfuttermittel:</u>	
	für Ferkel und Jungsauen	0,1
	für Sauen und Mastschweine	0,25
	für Kälber, Milchkühe, Schafe (inkl. Lämmer) u. Ziegen (inkl. Lämmer)	0,5
OTA	<u>Futtermittelausgangserzeugnisse:</u>	
	Getreide und Getreideerzeugnisse	0,25
	<u>Ergänzungs- und Alleinfuttermittel:</u>	
	für Schweine	0,05
	für Geflügel	0,1
FB ₁ + FB ₂	<u>Futtermittelausgangserzeugnisse:</u>	
	Mais u. Maiserzeugnisse	60
	<u>Ergänzungs- und Alleinfuttermittel:</u>	
	für Schweine, Pferde (Equidae) , Kaninchen u. Heimtiere	5
	für Fische	10
	für Geflügel, Kälber (<4 Mo), Lämmer u. Ziegenlämmer	20
	für Wiederkäuer (>4 Mo) u. Nerze	50

3 EIGENE UNTERSUCHUNGEN

3.1 Materialien und Geräte

3.1.1 Geräte und Instrumente

Bechergläser in verschiedenen Größen

Eppendorfröhrchen, self lock tubes, 2,0 ml (Eppendorf AG)

Erlenmeyerkolben in verschiedenen Größen

Glastrichter in verschiedenen Größen

Heiz- und Ultraschallbad Sonorex Super 10P (Bandelin electronic GmbH & Co. KG)

Laboratory Mill 3600 (Perten Instruments GmbH)

Magnetrührer mit Heizung RCT basic (IKA[®]-Werke GmbH & Co. KG)

Mehrstellenmagnetrührer (IKA[®]-Werke GmbH & Co. KG)

Mikrotiterplattentaumler, Polymax 1040 (Heidolph Instruments GmbH & Co KG)

Papierfilter: Ø 125 mm, Ø 90 mm (Schleicher & Schuell GmbH)

Pasteur-Pipetten, Glas (VWR International GmbH)

pH-Meter inoLab Level 1,

mit Sen Tix HW Elektrode (WTW GmbH)

Pipetten, Eppendorf Research[®] (Mehrkanal, variabel), 10-100µl, 30-300µl (Eppendorf AG)

Pipetten, Eppendorf Research[®] (variabel), 0,5-10 µl, 10-100 µl, 100-1000 µl (Eppendorf AG)

Reagenzgläser, Plastik und

Glas mit Schraubverschluss

Rundkolben

Trockenschrank (Mettler, Schwarbach)

Vakuum Rotationsverdampfer,

Laborota 4003 control (Heidolph Instruments GmbH & Co. KG)

Vortex-Genie[®] 2 (Scientific Industries, Inc.)

Waage, FKB (Kern & Sohn GmbH)

Waage, Sartorius BP 4100S (Sartorius AG Göttingen)

Zentrifuge, Eppendorf Centrifuge 5415 C	(Eppendorf AG)
Zentrifuge, Multifuge 3 S-R	(Heraeus)
Zentrifugenglas mit Rundboden	
Zerkleinerer, Speedy Pro Plus G VA2	(Krupps GmbH)

3.1.2 Chemikalien und Biochemika

Aceton	(Merck KGaA, 1.00013)
Acetonitril	(Merck KGaA, 1.15500)
Albumin bovine serum, min 99%	(Sigma-Aldrich Chemie GmbH, A0281-250 MG)
Casein sodium salt from bovine milk	(Sigma-Aldrich Chemie GmbH, C-8654)
Citronensäure-1-monohydrat	(Merck KGaA, 1.00244)
Dichlormethan	(Merck KGaA, 1.06050)
di-Natriumhydrogenphosphat, wasserfrei	(Merck KGaA, 1.06586)
Ethylacetat	(Merck KGaA, 1.09623)
Glycerin	(Merck KGaA, 1.04094)
Kaliumdihydrogenphosphat	(Merck KGaA, 1.04877)
Kaliumhydroxidplättchen	(Merck KGaA, 1.05021)
Methanol	(Merck KGaA, 1.06009)
Natriumcarbonat	(Merck KGaA, 1.06392)
Natriumchlorid	(Merck KGaA, 1.06404)
Natriumhydrogencarbonat	(Merck KGaA, 1.06329)
n-Heptan	(Merck KGaA, 1.04365)
Salzsäure	(Riedel-de Haën GmbH, 30721)
Schwefelsäure	(Merck KGaA, 1.00731)
3,3', 5,5'-Tetramethylbenzidin (TMB)	(Sigma-Aldrich Chemie GmbH, T-2885)
Tween 20	(Sigma-Aldrich Chemie GmbH, P-1379)
Wasserstoffperoxid	(Merck KGaA, 1.07209)

Alle verwendeten Reagenzien entsprachen mindestens p. a. Qualität.

3.1.3 Puffer und Lösungen

0,01 mol/l Phosphatpuffer mit Zusatz von 0,12 mol/l Natriumchlorid (PBS, pH 7,3)
3,72 mmol/l Phosphatpuffer mit Zusatz von 0,12 mol/l Natriumchlorid (PBS, pH 6,0)
5% Acetonitril-PBS-Lösung (5% Acetonitril in PBS pH 6,0)
5% Acetonitril-PBS-Lösung (5% Acetonitril in PBS pH 7,3)
60% Acetonitril-PBS-Lösung (60% Acetonitril in PBS pH 6,0)
84% Acetonitril-Aqua dest.-Lösung
0,05 mol/l Bicarbonatpuffer (pH 9,6)
2% BSA-Aqua dest.-Lösung
1%, 2% und 3% Casein-PBS-Lösung (1%, 2% und 3% Natriumcaseinat in PBS pH 7,3)
Enzymsubstrat-/Chromogenlösung:
Tetramethylbenzidinlösung: (1mmol 3,3', 5,5'-TMB in neun Teilen Methanol und einem Teil Aceton)
Citratpuffer: 0,2 mol/l Citratpuffer (pH 3,95) mit Zusatz von 3,15 mmol/l H₂O₂
Gebrauchsfertig: 20 Teile Citratpuffer und ein Teil TMB-Lösung
10% Methanol-PBS-Lösung (10% Methanol in PBS pH 7,3)
70% Methanol-Aqua dest.-Lösung
75% Methanol-Aqua dest.-Lösung
0,13 mol/l Natriumhydrogencarbonat
0,13 mol/l Natriumhydrogencarbonat mit Zusatz von 1% Tween 20
1 mol/l Salzsäure
1 mol/l Schwefelsäure
Waschlösung (0,15 mol/l Natriumchloridlösung mit Zusatz von 0,025% Tween 20)

3.1.4 Mykotoxine

Zearalenon	(Sigma Aldrich Chemie GmbH, Z-2125)
Deoxynivalenol	(Sigma Aldrich Chemie GmbH, D-0156)
T-2 Toxin	(Biopure BRM 002035)
Fumonisin B ₁ ¹	
Ochratoxin	(Sigma Aldrich Chemie GmbH, 01877)

Ergomix (GEA, Generic Ergot Alkaloid)

Ergocristin	(Sigma Aldrich Chemie GmbH, E-140)
Ergonovin	(Sigma Aldrich Chemie GmbH, E-6500)
Ergotamin Tartrat	(Fluka Chemika 45510)

Die Mykotoxine wurden grundsätzlich in verschiedenen Lösungsmitteln gelöst und folgende Stammlösungen hergestellt:

Zearalenon	16,7 µg/ml Acetonitril
Deoxynivalenol	28,45 µg/ml Methanol
T-2 Toxin	10 µg/ml Methanol
Fumonisin B ₁	500 µg/ml Methanol
Ochratoxin A	100 ng/ml Methanol
Ergomix	25 µg/ml Stabilisatorlösung (10 ml Ethylenglycol, 10 ml 1,2-Propiol, 0,1 g Weinsäure auf 100 ml mit Ethanol/A. dest auffüllen)

¹Dieser Toxinstandard wurde freundlicherweise von Herrn Prof. Dr. E. Märtlbauer, Lehrstuhl für Hygiene und Technologie der Milch, Ludwig-Maximilians-Universität München, für diese Arbeit zur Verfügung gestellt.

3.1.5 Immunreagenzien

Zearalenon-EIA:

- Antikörper: *polyklonal*: Zearalenon-Antiserum (Kaninchen 14, Pool 13-44, gefällt) (SEIDLER, 2007)
- Konjugat: Zearalenon-Oxim-Aktivester-Merettichperoxidase-Konjugat (ZEA-Oxim-AE-HRP) (SEIDLER, 2007)

Deoxynivalenol-EIA:

- Antikörper: Polyclonal Rabbit Anti-Mouse IgG (DAKO Z 0259)
monoklonal: DON-Antiserum
- Konjugat: Deoxynivalenol-Hemisuccinat-Aktivester-Merettichperoxidase-Konjugat, (DON-HS-AE-HRP) (SEIDLER, 2007)

T-2-Toxin EIA:

- Antikörper: Polyclonal Rabbit Anti-Mouse IgG (DAKO Z 0259)
monoklonal: HT-2 (I 3E2)-Antiserum
- Konjugat: HT-2-Hemisuccinat-Merettichperoxidase-Konjugat (HT-2-HS-HRP)
(HACK et al., 1989; DIETRICH et al., 1995)

T-2 Toxin und HT-2 Toxin-EIA:

- Antikörper: Anti-Kaninchen-IgG (Sigma Aldrich GmbH, R2004)
polyklonal: HT-2-Antiserum (Pool 10.04.2006)
- Konjugat: T-2-Hemisuccinat-Merettichperoxidase-Konjugat (T-2-HS-HRP)
(ESGIN et al., 1989)

Fumonisin B₁-EIA²:

- Antikörper: *polyklonal*: Fumonisin B₁-Antiserum (Pool 11.-20. Woche, gefällt)
- Konjugat: Fumonisin B₁-Merettichperoxidase-Konjugat (FB₁-HRP)
(USLEBER et al., 1994; USLEBER, 1997)

Ochratoxin-A-EIA:

- Antikörper: *polyklonal*: Ochratoxin-A-Antiserum (Pool 24.-46. Woche, gefällt)
- Konjugat: Ochratoxin-A-Merettichperoxidase-Konjugat (OTA-HRP)
(SCHNEIDER et al., 2001)

Ergotalkaloid (GEA)-EIA:

- Antikörper: *polyklonal*: Ergometrin-Antiserum (Kaninchen 29, Pool 3, gefällt)
- Konjugat: Ergometrin (Ergonovin)-Hemisuccinat-Merettichperoxidase-Konjugat (Ergonovin-HS-HRP) (CURTUI et al., 2007)

²Der hier aufgeführte Antikörper und das Konjugat wurden am Lehrstuhl für Hygiene und Technologie der Milch, Ludwig-Maximilians-Universität München entwickelt und freundlicherweise von Herrn Prof. Dr. E. Märtlbauer und Herrn Dr. R. Dietrich für diese Arbeit zur Verfügung gestellt.

Die von den jeweiligen Autoren angegebenen relativen Kreuzreaktionen mit strukturverwandten Mykotoxinen sind in den Tabellen 10 bis 15 zusammengestellt.

Tabelle 10: Relative Kreuzreaktionen des ZEA-Antikörpers mit strukturverwandten Analoga (SEIDLER, 2007)

Toxin	Zearalenon-EIA Kreuzreaktion (%)
Zearalenon	100
α -Zearalenol	88
β -Zearalenol	44
Zearalanon	60
α -Zearalanol	53
β -Zearalanol	25

Tabelle 11: Relative Kreuzreaktionen des DON-Antikörpers mit anderen Typ-B-Trichothecenen (SEIDLER, 2007)

Toxin	Deoxynivalenol-EIA Kreuzreaktion (%)
Deoxynivalenol	100
Deepoxy-Deoxynivalenol	2,6
3-Acetyldeoxynivalenol	630
15-Acetyldeoxynivalenol	65
Fusarenon X	0,24
Nivalenol	2,2

Tabelle 12: Relative Kreuzreaktionen des monoklonalen bzw. polyklonalen HT-2 Toxin-Antikörpers mit strukturverwandten Analoga (HACK et al., 1989; DIETRICH et al., 1995; ESGIN et al., 1989)

Toxin	Kreuzreaktion (%)	
	T-2 Toxin EIA	T-2 Toxin/HT-2 Toxin EIA
T-2 Toxin	100	100
HT-2 Toxin	<1	47

Tabelle 13: Relative Kreuzreaktionen des FB₁-Antikörpers mit strukturverwandten Analoga (USLEBER, 1997)

Toxin	Fumonisin B ₁ -EIA Kreuzreaktion (%)
Fumonisin B ₁	100
Fumonisin B ₂	100
Fumonisin B ₃	40

Tabelle 14: Relative Kreuzreaktionen des Ochratoxin A-Antikörpers mit strukturverwandten Analoga (SCHNEIDER et al., 2001)

Toxin	Ochratoxin A-EIA Kreuzreaktion (%)
Ochratoxin A	100
Ochratoxin B	2

Der in dieser Studie verwendete GEA-EIA ist aufgrund der Alkaloidzusammensetzung des Toxinstandards (Ergometrin, Ergotamin, Ergocristin, im Verhältnis 1:10:14) in Verbindung mit den Immunreagenzien für Ergometrin in der Lage, nachweislich 14 verschiedene Ergotalkaloide zu erfassen (Ergometrin, Ergotamin, Ergocristin, α -Ergocryptin, β -Ergocryptin, Ergocornin, Ergosin sowie die sieben korrespondierenden –inin-Isomere) (CURTUI et al., 2007). Darüber hinaus konnten CURTUI et al. (2007) anhand der experimentell ermittelten Kreuzreaktivitäten auf die wahrscheinliche Kreuzreaktivität von weiteren Ergotalkaloiden (Ergostin, -inin; Ergovalin, -inin; Ergonin, -inin) schließen, deren Toxinstandards nicht zur Verfügung standen.

Das Testsystem unter Verwendung von Ergometrin-Antikörpern hat grundsätzlich das Potential für einen gruppenspezifischen Nachweis von Ergotalkaloiden. Die höhere Empfindlichkeit für Ergometrin würde jedoch stets zu einer deutlichen quantitativen Unterschätzung des tatsächlichen Toxingehaltes führen, wenn Ergometrin für die Standardkurve verwendet würde. Daher wurde für den Toxinstandard eine Mischung mehrerer Toxine entwickelt (Ergometrin, Ergotamin, Ergocristin, 1:10:14), wodurch eine Standardkurve generiert wurde, die das typische Alkaloidmuster im Probenmaterial „abbildet“ (CURTUI et al., 2007).

Tabelle 15: Relative Kreuzreaktionen des polyklonalen Antiserums gegen Ergometrin in Relation zur chemischen Struktur von Ergotalkaloiden im kompetitiven direkten EIA unter Verwendung von Antikörpern gegen Ergometrin. Werte in Normalschrift beruhen auf experimenteller Bestimmung. Werte in Kursivschrift für weitere Alkaloide (Standards nicht verfügbar) wurden aufgrund der Ergebnisse der experimentellen Bestimmungen geschätzt (CURTUI et al., 2007)

Toxin	Relative Kreuzreaktion
Ergometrin / -inin	100% / 1,28%
Ergotamin / -inin	7,0% / 1,0%
<i>Ergostin / -inin</i>	<i>2-7% / 0,05-1%</i>
Ergocristin / -inin	2,7% / 0,05%
<i>Ergovalin / -inin</i>	<i>>2,1% / >0,14%</i>
<i>Ergonin / -inin</i>	<i>>2,1% / >0,14%</i>
Ergocornin / -inin	2,1% / 0,14%
Ergosin / -inin	1,0% / 0,17%
A-Ergocryptin / -inin	0,7% / 0,01%
B-Ergocryptin / -inin	2,9% / 0,03%

3.1.6 Geräte und Software zur Durchführung und Auswertung der Enzymimmuntests

ELISA-Auto-Reader Tecan Sunrise	(Tecan GmbH Crailsheim)
ImmunoPlate MaxiSorb	(Nunc GmbH, 429454)
Photometer UV 1601	(Shimadzu Deutschland GmbH)
Software: RIDAWIN Version 1,38	(R-Biopharm AG Darmstadt)

3.1.7 Probenmaterial

Im Zeitraum von Juli 2007 bis Juli 2008 wurden 62 kommerziell hergestellte Pferdefutterproben von 22 verschiedenen Herstellern gekauft. Bei dem Probenmaterial

handelte es sich um Mischfuttermittel (Mash/Müsli, n = 39; Pellets, n = 12) sowie um Einzelfuttermittel (Mais, n = 5; Hafer, n = 4; Gerste, n = 2). Neben den Hauptinhaltsstoffen Weizen, Gerste, Hafer und Mais beinhalten die Mischfutter „Müsli“, „Mash“ und „Pellets“ auch eine Vielzahl anderer Inhaltsstoffe wie z. B. Luzerne, Sojaextraktionsschrot, Zuckerrübenmelasse, Öle (Leinöl, Sonnenblumenöl, Sojaöl, Mariendistelöl) und diverse Mineralstoff- und Spurenelementzusätze. Die genaue Futterzusammensetzung ist im Anhang in Tabelle 33 zusammengestellt. Drei Proben enthielten den Zusatzstoff „Mykosorb“ (Probennummer 2, 10 und 21). Da davon ausgegangen werden kann, dass der überwiegende Mykotoxineintrag in das Futter durch die Zutaten Hafer, Mais, Weizen und Gerste stattfindet (PLACINTA et al., 1999; EFSA 2004a, b, c; EFSA 2005a, b), werden die übrigen Zutaten bei der statistischen Auswertung im Hinblick auf den Einfluss der Inhaltsstoffe auf die Mykotoxinergebnisse vernachlässigt.

Die gekauften Futtermittel lagen als Sackware zu 10-30 kg (zumeist 20-25 kg) vor und wurden zum größten Teil als „Ergänzungsmittel für Pferde“ deklariert. Die Angaben zur täglichen Fütterungsmenge schwankten in Abhängigkeit von der Nutzung und der zu erbringenden Leistung des Pferdes stark. Als grober Richtwert kann von einer Menge von 0,5-1 kg / 100 kg Körpergewicht (KG) / Tag ausgegangen werden.

Zur Probengewinnung wurde das Futter in den Säcken durch mehrfaches Schütteln vor dem Öffnen gut durchmischt, anschließend eine Probenmenge von 3-5 kg entnommen und in einem 10 l Plastikeimer gelagert. Nach erneutem Mischen wurde ca. 1 kg Futter in einer Mühle fein gemahlen (Teilchengröße < 1 mm). Sehr feuchte Proben, wie z. B. einige Müsliarten, wurden vor dem Mahlen für 16-18 Stunden bei 50 °C in einem Trockenofen getrocknet. Die Ergebnisse der Mykotoxinuntersuchung wurden entsprechend dem hierbei entstandene Gewichtsverlust (typischerweise 5-20%) korrigiert. Das gemahlene Futter wurde in verschließbaren Plastikdosen gelagert und vor jedem Test erneut durch Schütteln gemischt.

3.2 Methodik

3.2.1 Nachweis von T-2 Toxin und HT-2 Toxin

3.2.1.1 Probenextraktion

Je 5 g des gemahlene Probenmaterials wurden in ein 100 ml Becherglas eingewogen, mit 25 ml Methanol/A. dest. (70/30; v/v) versetzt und 30 Minuten auf einem Magnetrührgerät extrahiert (ca. 600 U/min). Anschließend wurde das Extraktionsgemisch durch einen Papierfilter filtriert, 2 ml des Filtrates in ein Glasreagenzröhrchen mit Schraubverschluss pipettiert und mit 2 ml A. dest. versetzt. Danach wurden diesem Gemisch 3 ml Ethylacetat hinzugefügt und der Inhalt eine Minute ausgeschüttelt (Vortex-Genie[®] 2). Zur Trennung der wässrigen von der organischen Phase wurde die Probe zentrifugiert (ca. 3000 x g, 20 °C, 10 min.) und die obere, organische Phase in einen 25 ml Rundkolben überführt. Der unteren Phase wurden erneut 3 ml Ethylacetat zugefügt, der Inhalt eine Minute ausgeschüttelt (Vortex-Genie[®] 2) und die Probe anschließend zentrifugiert. Wie zuvor wurde dann die obere Phase in den Rundkolben überführt. Der Extrakt wurde im Rotationsverdampfer unter leichtem Unterdruck bei einer Temperatur von 50 °C bis zur Trockene eingengt. Der trockene Rückstand wurde mit 200 µl Methanol aufgenommen (Vortex-Genie[®] 2) und mit 1,8 ml PBS (pH 7,3) versetzt. Zur vollständigen Lösung des Rückstandes wurde der Rundkolben für 15-20 Sekunden in ein Ultraschallbad gehalten. Der nun gelöste Probenrückstand wurde in ein Glasreagenzglas überführt, mit 1 ml n-Heptan versetzt und, nach Ausschütteln der Probe (ca. 20 sec., Vortex-Genie[®] 2), zentrifugiert (3000 x g, 10 min.). Die untere, wässrige Phase konnte anschließend zur Testdurchführung mit Hilfe einer Glas-Pasteurpipette in ein Glasreagenzglas überführt werden.

Der aus der Extraktion resultierende Verdünnungsfaktor beträgt 5. Weitere Verdünnungen wurden mit Methanol/A. dest. (10/90; v/v) angelegt.

3.2.1.2 Testdurchführung

Der Nachweis von T-2 Toxin und HT-2 Toxin erfolgte mittels direkter kompetitiver Enzymimmuntests (EIAs), wobei in beiden Fällen die Doppelantikörpertechnik angewendet wurde.

3.2.1.2.1 Testdurchführung T-2 Toxin

Zur Durchführung wurden Mikrotiterplatten mit 100 µl/Kavität Anti-Maus-IgG (10 µg/ml in Bicarbonatpuffer) beschichtet und bei Raumtemperatur über Nacht in einer feuchten Kammer inkubiert und bis zu drei Wochen bei 4 °C gelagert. Beschichtete Platten wurden ausgeschlagen und zur Blockierung freier Bindungsstellen mit 2%-iger Casein/PBS-Lösung (200 µl/Kavität) 30 Minuten bei Raumtemperatur abgesättigt, anschließend dreimal gewaschen und die Platte zum Entfernen der Restfeuchtigkeit ausgeklopft. Anschließend wurden je Kavität 100 µl des monoklonalen Antikörpers (HT2 I 3E2, 15 ng/ml in PBS pH 7,3) pipettiert, für eine Stunde bei Raumtemperatur auf dem Mikrotiterplattentaumler inkubiert und erneut dreimal gewaschen und ausgeklopft. Je Kavität wurden 50 µl Standard- (sechs Verdünnungen in einem Konzentrationsbereich von 8,2 pg/ml bis 2000 pg/ml in Methanol/PBS pH 7,3 (10/90; v/v)) bzw. Probenextraktlösungen (in Methanol/PBS pH 7,3 (10/90; v/v)) und HT-2-HS-HRP-Konjugat (1:300 000 in 1% Casein-PBS pH 7,3) pipettiert. Die Platten wurden eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert und zur Entfernung der ungebundenen Reaktionspartner im Anschluss daran dreimal gewaschen und ausgeklopft. Nach Zugabe der Enzymsubstrat/Chromogenlösung (100 µl/Kavität) wurden die Platten bis zu 20 Minuten (abhängig von der Farbentwicklung) inkubiert und dann die Farbreaktion mit 1 mol/l Schwefelsäure (100 µl/Kavität) abgestoppt.

Die Extinktion wurde bei einer Wellenlänge von 450 nm gemessen und mit Hilfe der Software RIDAWIN ausgewertet. Die Quantifizierung der Toxingehalte der Proben erfolgte anhand der auf jeder Platte mit angesetzten Standardkurve. Alle Messwerte (B) wurden in Relation zur maximalen Extinktion des toxfreien Ansatzes (B_0) gesetzt und als Prozentwert ausgedrückt ($B/B_0 \times 100$). Alle Standard- und Probenlösungen wurden im Vierfachansatz eingesetzt. Die Probenextrakte wurden in verschiedenen Verdünnungsstufen (meistens unverdünnt, 1:3, 1:9) eingesetzt; zur Auswertung wurden diejenigen Verdünnungsstufen herangezogen, deren Extinktionswerte dem 50%-Extinktionswert ($50\% B/B_0 \times 100$) am nächsten und somit im nahezu linearen Bereich der Kurve lagen (typischerweise zwischen 25-75% Extinktion ($B/B_0 \times 100$)).

3.2.1.2.2 Testdurchführung T-2 Toxin/HT-2 Toxin

Zur Durchführung wurden Mikrotiterplatten mit 100 µl/Kavität Anti-Kaninchen IgG (10 µg/ml in Bicarbonatpuffer) beschichtet und bei Raumtemperatur über Nacht in einer feuchten Kammer inkubiert und bis zu drei Wochen bei 4 °C gelagert. Beschichtete Platten wurden ausgeschlagen und zur Blockierung freier Bindungsstellen mit 3%-iger Casein/PBS-Lösung (200 µl/Kavität) 30 Minuten bei Raumtemperatur abgesättigt, anschließend dreimal gewaschen und die Platte zum Entfernen der Restfeuchtigkeit ausgeklopft. Anschließend wurden je Kavität 100 µl des polyklonalen Antikörpers (HT-2, 1:10 000 in PBS pH 7,3) pipettiert, für eine Stunde bei Raumtemperatur auf dem Mikrotiterplattentaumler inkubiert und erneut dreimal gewaschen und ausgeklopft. Je Kavität wurden 50 µl Standard- (sechs Verdünnungen in einem Konzentrationsbereich von 4,9 pg/ml bis 5000 pg/ml in Methanol/PBS pH 7,3 (10/90; v/v)) bzw. Probenextraktlösungen (in Methanol/PBS pH 7,3 (10/90; v/v)) und T2-HS-HRP-Konjugat (1:75 000 (Untersuchungen im Jahr 2007), bzw. 1:150 000 (Untersuchungen im Jahr 2008) in 1% Casein-PBS pH 7,3) pipettiert. Die Platten wurden eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert und zur Entfernung der ungebundenen Reaktionspartner im Anschluss daran dreimal gewaschen und ausgeklopft. Nach Zugabe der Enzymsubstrat/Chromogenlösung (100 µl/Kavität) wurden die Platten bis zu 20 Minuten (abhängig von der Farbentwicklung) inkubiert und dann die Farbreaktion mit 1 mol/l Schwefelsäure (100 µl/Kavität) abgestoppt.

Die Extinktionsmessung und die Auswertung erfolgten wie in 3.2.1.2.1 beschrieben.

3.2.2 Nachweis von Deoxynivalenol

3.2.2.1 Probenextraktion

Je 5 g des gemahlten Probenmaterials wurden in ein 100 ml Becherglas eingewogen, mit 50 ml Methanol/PBS pH 7,3 (10/90; v/v) versetzt und 30 Minuten auf einem Magnetrührgerät extrahiert (ca. 600 U/min). Anschließend wurde das Extraktionsgemisch in ein Reagenzglas überführt, zentrifugiert (ca. 3000 x g, 15 min., 4 °C) und nach der Zentrifugation durch einen Papierfilter filtriert. 2 ml des Filtrates wurden mit 4 ml

Ethylacetat in einem Glasreagenzglas mit Schraubverschluss gemischt (Vortex-Genie® 2) und anschließend zentrifugiert (ca. 3000 x g, 15 min., 4 °C). Die obere, organische Phase wurde mit Hilfe einer Glas-Pasteurpipette in einen 50 ml Rundkolben überführt und die untere, wässrige Phase erneut mit 4 ml Ethylacetat ausgeschüttelt (Vortex-Genie® 2), zentrifugiert (ca. 3000 x g, 15 min., 4 °C) und die obere Phase ebenfalls in den 50 ml Rundkolben überführt. Der sich im Rundkolben befindliche Extrakt wurde im Rotationsverdampfer unter leichtem Unterdruck bei einer Temperatur von 50 °C bis zur Trockene eingengt. Anschließend wurde der Rückstand mit 1 ml PBS pH 7,3 aufgenommen und durch Ausschütteln (15-20 sec., Vortex-Genie® 2) und Halten in ein Ultraschallbad (15-20 sec.) gelöst. Dieser Extrakt wurde im Folgenden für die Untersuchung mittels Enzymimmuntest verwendet.

Der durch die Extraktion entstandene Probenverdünnungsfaktor beträgt 5. Weitere Verdünnungen wurden mit PBS pH 7,3 angelegt.

3.2.2.2 Testdurchführung

Grundlage dieses Tests ist ebenfalls ein direkter kompetitiver EIA, wobei auch in diesem Fall die Doppelantikörpertechnik angewendet wurde.

Zur Durchführung wurden Mikrotiterplatten mit 100 µl/Kavität Anti-Maus-IgG (10 µg/ml in Bicarbonatpuffer) beschichtet und bei Raumtemperatur über Nacht in einer feuchten Kammer inkubiert und bis zu drei Wochen bei 4 °C gelagert. Beschichtete Platten wurden ausgeschlagen und zur Blockierung freier Bindungsstellen mit 2%-iger Casein/PBS-Lösung (200 µl/Kavität) 30 Minuten bei Raumtemperatur abgesättigt, anschließend dreimal gewaschen und die Platte zum Entfernen der Restfeuchtigkeit ausgeklopft. Anschließend wurden je Kavität 100 µl des monoklonalen Antikörpers (60 ng/ml in 1% Casein/PBS) pipettiert, für eine Stunde bei Raumtemperatur auf dem Mikrotiterplattentaumler inkubiert und erneut dreimal gewaschen und ausgeklopft. Je Kavität wurden 50 µl Standard- (sechs Verdünnungen in einem Konzentrationsbereich von 0,41 ng/ml bis 100 ng/ml in PBS pH 7,3) bzw. Probenextraktlösungen (in PBS pH 7,3) und DON-HS-AE-Konjugat (1:50 000 in 1% Casein/PBS; Lyophilisat gelöst in 125 µl 2% BSA/A. dest. und 125 µl Glycerin) pipettiert. Die Platten wurden eine Stunde bei

Raumtemperatur inkubiert und zur Entfernung der ungebundenen Reaktionspartner im Anschluss daran dreimal gewaschen und ausgeklopft. Nach Zugabe der Enzymsubstrat/Chromogenlösung (100 µl/Kavität) wurden die Platten bis zu 20 Minuten (abhängig von der Farbentwicklung) inkubiert und dann die Farbreaktion mit 1 mol/l Schwefelsäure (100 µl/Kavität) abgestoppt.

Die Extinktionsmessung und die Auswertung erfolgten wie in 3.2.1.2.1 beschrieben.

3.2.3 Nachweis von Zearalenon

3.2.3.1 Probenextraktion

Je 5 g des gemahlten Probenmaterials wurden in ein 100 ml Becherglas eingewogen, 25 ml Acetonitril/A. dest. (84/16; v/v) zugegeben und 30 Minuten auf einem Magnetrührgerät extrahiert (ca. 600 U/min). Im Anschluss daran wurde das Extraktionsgemisch durch einen Papierfilter filtriert und, um eine Acetonitrilkonzentration von 5% zu erhalten, 100 µl Filtrat mit 1580 µl PBS pH 7,3 verdünnt.

Der durch die Extraktion entstandene Probenverdünnungsfaktor beträgt 84. Weitere Verdünnungen wurden mit Acetonitril/PBS pH 7,3 (5/95; v/v) angelegt.

3.2.3.2 Testdurchführung

Der Nachweis von Zearalenon erfolgte unter Verwendung eines direkten kompetitiven EIA.

Mikrotiterplatten wurden mit polyklonalem Antiserum gegen Zearalenon (1:4000 in Bicarbonatpuffer) beschichtet, über Nacht bei Raumtemperatur in einer feuchten Kammer inkubiert und danach bei 4 °C bis zu drei Wochen gelagert. Nach Ausschlagen der Platten wurden freie Proteinbindungsstellen mit 2% Casein/PBS-Lösung (200 µl/Kavität) 30 Minuten bei Raumtemperatur abgesättigt und die Platten danach dreimal gewaschen und ausgeklopft. Anschließend wurden je Kavität 50 µl Standard- (sechs Verdünnungen in

einem Konzentrationsbereich von 3,2 pg/ml bis 10 000 pg/ml in 5% Acetonitril/PBS pH 7,3) bzw. Probenextraktlösungen (in 5% Acetonitril/PBS pH 7,3) und ZEA-Oxim-HRP-Konjugat (1:150 000 in 1% Casein/PBS) pipettiert. Die Platten wurden zwei Stunden bei Raumtemperatur inkubiert und zur Entfernung der ungebundenen Reaktionspartner im Anschluss daran dreimal gewaschen und ausgeklopft. Nach Zugabe der Enzymsubstrat/Chromogenlösung (100 µl/Kavität) wurden die Platten bis zu 20 Minuten (abhängig von der Farbentwicklung) inkubiert und dann die Farbreaktion mit 1 mol/l Schwefelsäure (100 µl/Kavität) abgestoppt.

Die Extinktionsmessung und die Auswertung erfolgten wie in 3.2.1.2.1 beschrieben.

3.2.4 Nachweis von Fumonisin B₁

3.2.4.1 Probenextraktion

Je 5 g des gemahlten Probenmaterials wurden in ein 100 ml Becherglas eingewogen, 25 ml Methanol/A. dest. (75/25; v/v) zugegeben und 30 Minuten auf einem Magnetrührgerät extrahiert (ca. 600 U/min). Anschließend wurde das Extraktionsgemisch einige Minuten stehen gelassen, bis sich der größte Teil der Feststoffe abgesetzt hatte und danach der Überstand in ein Reagenzglas dekantiert, zentrifugiert (ca. 3000 x g, 15 min., 20 °C) und durch einen Papierfilter filtriert. Um für die weitere Untersuchung mittels Enzymimmuntest die Probe auf einen Methanolgehalt von 10% einzustellen, wurden 100 µl des Filtrates mit 650 µl PBS pH 7,3 vermischt.

Der durch die Extraktion entstandene Probenverdünnungsfaktor beträgt 37,5. Weitere Verdünnungen wurden mit Methanol/PBS pH 7,3 (10/90; v/v) angelegt.

3.2.4.2 Testdurchführung

Der Nachweis von Fumonisin B₁ erfolgte unter Verwendung eines direkten kompetitiven EIA.

Mikrotiterplatten wurden mit polyklonalem Antiserum gegen Fumonisin B₁ (1:4000 in Bicarbonatpuffer) beschichtet und über Nacht bei Raumtemperatur in einer feuchten Kammer inkubiert. Nach Ausschlagen der Platten wurden freie Proteinbindungsstellen mit 2% Casein/PBS-Lösung (200 µl/Kavität) 30 Minuten bei Raumtemperatur abgesättigt und die Platten danach dreimal gewaschen und ausgeklopft. Anschließend wurden je Kavität 50 µl Standard- (sechs Verdünnungen in einem Konzentrationsbereich von 0,01 ng/ml bis 10 ng/ml in 10% Methanol/PBS pH 7,3) bzw. Probenextraktlösungen (in 10% Methanol/PBS pH 7,3) und FB₁-HRP-Konjugat (1:50 000 in 1% Casein/PBS) pipettiert. Die Verdünnung des Toxinstandards auf eine Konzentration von 10 ng/ml erfolgte mit Methanol, wobei die Zwischenverdünnungen zur Verwendung im EIA mit PBS pH 7,3-Lösung auf eine Methanolkonzentration von 10% eingestellt wurden. Die Haltbarkeit der Zwischenverdünnungen bei 4 °C betrug maximal 2 Tage. Die Platten wurden zwei Stunden bei Raumtemperatur inkubiert und zur Entfernung der ungebundenen Reaktionspartner im Anschluss daran dreimal gewaschen und ausgeklopft. Nach Zugabe der Enzymsubstrat/Chromogenlösung (100 µl/Kavität) wurden die Platten bis zu 20 Minuten (abhängig von der Farbentwicklung) inkubiert und dann die Farbreaktion mit 1 mol/l Schwefelsäure (100 µl/Kavität) abgestoppt.

Die Extinktionsmessung und die Auswertung erfolgten wie in 3.2.1.2.1 beschrieben.

3.2.5 Nachweis von Ergotalkaloiden

3.2.5.1 Probenextraktion

Je 5 g des gemahlene Probenmaterials wurden in ein 100 ml Becherglas eingewogen, 25 ml Acetonitril/PBS pH 6,0 (60/40; v/v) zugegeben und 30 Minuten auf einem Magnetrührgerät extrahiert (ca. 600 U/min). Anschließend wurde das Extraktionsgemisch einige Minuten stehen gelassen, bis sich der größte Teil der Feststoffe abgesetzt hatte. Mittels einer Eppendorf-Pipette wurde ein Aliquot von ca. 2 ml des Extraktes aus dem Becherglas (oberer, flüssiger Bereich, da dort geringere Anteile von Feststoffen vorhanden sind) in ein 2 ml Eppendorfgefäß überführt und zentrifugiert (11000 x g, 20 °C, 4 min.). Zur Untersuchung im Enzymimmuntest wurde ein Volumenteil des Überstandes mit neun Teilen PBS pH 6,0 verdünnt.

Der aus der Extraktion und der Extraktionsverdünnung resultierende Probenverdünnungsfaktor beträgt 50. Weitere Verdünnungen wurden mit Acetonitril/PBS pH 6,0 (5/95; v/v) angelegt.

3.2.5.2 Testdurchführung

Grundlage dieses Tests ist ebenfalls ein direkter kompetitiver EIA.

Mikrotiterplatten wurden mit 100 µl/ Kavität polyklonalem Antiserum gegen Ergometrin (Ergonovin) (1:2000 in Bicarbonatpuffer) beschichtet, bei Raumtemperatur über Nacht in einer feuchten Kammer inkubiert und danach bei 4 °C bis zu drei Wochen gelagert. Nach Ausschlagen der Platten wurden freie Proteinbindungsstellen mit 2% Casein/PBS-Lösung (200 µl/Kavität) 30 Minuten bei Raumtemperatur abgesättigt und die Platten danach dreimal gewaschen und ausgeklopft. Anschließend wurden je Kavität 50 µl Standard- (sechs Verdünnungen in einem Konzentrationsbereich von 0,03 ng/ml bis 250 ng/ml in 5% Acetonitril/PBS pH 6,0) bzw. Probenextraktlösungen (in 5% Acetonitril/PBS pH 6,0) und Ergonovin-HS-HRP-Konjugat (1:2000 in 1% Casein/PBS) pipettiert. Als Toxinstandard wurde ein „Mix“ aus Ergometrin, Ergotamin und Ergocristin im Verhältnis von 1:10:14 (CURTUI et al., 2007) verwendet. Die Platten wurden zwei Stunden bei Raumtemperatur inkubiert und zur Entfernung der ungebundenen Reaktionspartner im Anschluss daran dreimal gewaschen und ausgeklopft. Nach Zugabe der Enzymsubstrat/Chromogenlösung (100 µl/Kavität) wurden die Platten bis zu 20 Minuten (abhängig von der Farbentwicklung) inkubiert und dann die Farbreaktion mit 1 mol/l Schwefelsäure (100 µl/Kavität) abgestoppt.

Die Extinktionsmessung und die Auswertung erfolgten wie in 3.2.1.2.1 beschrieben.

3.2.6 Nachweis von Ochratoxin A

3.2.6.1 Probenextraktion

Je 2 g des gemahlene Probenmaterials wurden in ein 100 ml Zentrifugenglas eingewogen und mit Hilfe eines Magnetrührers (ca. 500 U/min) mit 10 ml 1 mol/l Salzsäure (HCL) 5 Minuten vermischt. Anschließend wurde die Probe mit 20 ml Dichlormethan versetzt, erneut 15 Minuten gerührt und danach zentrifugiert (ca. 3000 x g, 15 min., 4 °C). Nach Abpipettieren der oberen wässrigen Phase und vorsichtigem Durchstechen des zwischen den Phasen liegenden Probenkuchens wurde die Dichlormethanphase quantitativ, über einen Papierfilter, in einen 50 ml Erlenmeyerkolben überführt und der Papierfilter im Anschluss mit ca. 5 ml Dichlormethan über dem Erlenmeyerkolben ausgespült. Dann wurden der Probe 20 ml 0,13 mol/l Natriumhydrogencarbonat (NaHCO₃) zugegeben und das Gemisch 15 Minuten auf einem Magnetrührer (ca. 500 U/min) extrahiert. Das Extraktionsgemisch wurde anschließend in ein 100 ml Zentrifugenglas gegeben, zentrifugiert (ca. 3000 x g, 15 min., 4 °C) und die obere, wässrige Phase zur weiteren Untersuchung, mittels Enzymimmuntest, in ein Glasreagenzglas mit Schraubverschluss überführt.

Der durch die Extraktion entstandene Probenverdünnungsfaktor beträgt 10. Weitere Verdünnungen wurden mit 0,13 mol/l NaHCO₃ angelegt.

3.2.6.2 Testdurchführung

Der Nachweis von Ochratoxin A erfolgte mittels eines direkten kompetitiven EIA.

Zur Durchführung wurden Mikrotiterplatten mit 100 µl/Kavität polyklonalem Ochratoxin A Antiserum (10 µg/ml in Bicarbonatpuffer) beschichtet, bei Raumtemperatur über Nacht in einer feuchten Kammer inkubiert und bis zu drei Wochen bei 4 °C gelagert. Beschichtete Platten wurden ausgeschlagen, anschließend dreimal gewaschen und zum Entfernen der Restfeuchtigkeit ausgeklopft. Anschließend wurden je Kavität 50 µl Standard- (sechs Verdünnungen in einem Konzentrationsbereich von 0,98 pg/ml bis 1000 pg/ml in 0,13 mol/l NaHCO₃-Lösung) bzw. Probenextraktlösungen (in 0,13 mol/l NaHCO₃-Lösung) und OA-HRP-Konjugat (1:150 000 in 1% Tween 20/0,13 mol/l NaHCO₃-Lösung) pipettiert. Die Platten wurden zwei Stunden bei Raumtemperatur inkubiert und zur Entfernung der ungebundenen Reaktionspartner im Anschluss daran dreimal gewaschen und ausgeklopft. Nach Zugabe der Enzymsubstrat/Chromogenlösung

(100 µl/Kavität) wurden die Platten bis zu 20 Minuten (abhängig von der Farbentwicklung) inkubiert und dann die Farbreaktion mit 1 mol/l Schwefelsäure (100 µl/Kavität) abgestoppt.

Die Extinktionsmessung und die Auswertung erfolgten wie in 3.2.1.2.1 beschrieben.

3.2.7 Validierung der verwendeten Testsysteme

Zur Ermittlung der Reproduzierbarkeit der Standardkurven der EIAs wurden die für jeden Einzeltest im Vierfachansatz eingesetzten Standardkurven über den gesamten Untersuchungszeitraum (je nach Test 16-26 Standardkurven) hinweg ausgewertet. Hierzu wurde jeweils der Testparameter 50%-Dosis ($50\% B/B_0 \times 100$) sowie die Variationskoeffizienten für die einzelnen Standardkonzentrationen herangezogen, welche mittels einer speziellen Software (RIDAWIN) ermittelt wurden.

Die Nachweisgrenze der Standardkurve wurde aufgrund der am Institut gemachten Erfahrungen mit anderen kompetitiven Testsystemen als diejenige Konzentration festgelegt, die $\frac{1}{4}$ der 50%-Dosis entsprach. Zur Bestimmung der Nachweisgrenze der Mykotoxine im Probenmaterial wurde dieser Wert mit dem jeweiligen Probenverdünnungsfaktor multipliziert. In diesen Erfahrungswert flossen neben der Reproduzierbarkeit der Standardmesswerte innerhalb eines Testsystems (Intraassayvariation) bzw. zwischen den verschiedenen Testsystemen (Interassayvariation) auch die Steilheit der Kurve, die Unterschiede zwischen maximalem und minimalem Extinktionswert sowie die Wiederfindungsraten mit ein.

Zur Validierung der verwendeten Probenextraktionsverfahren wurden Proben künstlich mit dem jeweiligen Toxin (Toxinstandards siehe 3.1.4) kontaminiert und zusammen mit der nicht künstlich kontaminierten Probe wie oben beschrieben extrahiert und anschließend im EIA untersucht. Der Toxinwert der nicht kontaminierten Probe wurde von dem Wert der kontaminierten subtrahiert und aus diesem Ergebnis die Wiederfindungsrate bestimmt. Die zum Spiken der Proben gewählten Toxinkonzentrationen lagen, je nach Toxin, im Bereich des 3 bis 500-fachen der Nachweisgrenze des jeweiligen EIAs (siehe 3.3.1.3). Das zur Probe gegebene Volumen der Toxinstandards lag je nach Toxinkonzentration bei 20-

150 µl pro 5 g Probe bei der Extraktion von T-2 Toxin, T-2 Toxin/HT-2 Toxin, DON, Zearalenon sowie den Ergotalkaloiden und bei 2 g Probe bei der Extraktion von OTA.

Zur Bestimmung der Spezifität der EIAs wurden die relativen Kreuzreaktionen der Antisera mit strukturverwandten Toxinen überprüft. Die Berechnung erfolgte, wie von den entsprechenden Autoren angegeben, anhand der ermittelten 50%-Dosis unter Berücksichtigung des Molekulargewichtes.

3.2.8 Auswertungskriterien und Statistik

Aus statistischen Gründen wurden alle Proben in die Auswertung mit einbezogen, das heißt, auch Proben mit Gehalten unterhalb der in 3.3.1.1 beschriebenen Nachweisgrenzen. Diese Proben werden im Folgenden mit der halben Nachweisgrenze bewertet.

Für die Unterscheidung in positive (Mykotoxine werden nachgewiesen) und negative (kein Mykotoxinnachweis) Proben gelten Proben oberhalb der Nachweisgrenze als positiv und Proben unterhalb der Nachweisgrenze als negativ.

Die Datenhaltung und –auswertung erfolgte auf den Rechnern im lokalen Rechnernetzwerk (LAN) der Arbeitsgruppe Biomathematik und Datenverarbeitung des Fachbereichs Veterinärmedizin der Justus-Liebig-Universität Gießen. Die statistischen Auswertungen wurden unter Verwendung des Statistikprogrammpaketes BMDP/Dynamic, Release 7.0 durchgeführt.

Zur Beschreibung der Daten wurden arithmetische Mittelwerte (MW), Standardabweichungen (s), Minima (x_{\min}), Maxima (x_{\max}), Stichprobenumfänge (n) sowie das 90ste Perzentil berechnet und tabellarisch wiedergegeben. Bei rechtsschiefer Verteilung positiver quantitativer Merkmale (Mykotoxingehalte) wurde zur weiteren Auswertung der Daten eine logarithmische Transformation durchgeführt. Zusätzlich erfolgte die Beschreibung der Mykotoxingehalte durch die Angabe der Mediane, der Quartile (Q_1 und Q_3) sowie der kleinsten und größten Beobachtungen mit Darstellung im Box-and-Whisker-Plot.

Die Untersuchung der Zusammenhänge erfolgte bei den quantitativen Merkmalen mit Hilfe von Korrelations- bzw. Regressionsanalysen mit dem Programm BMDP6D unter Angabe des Korrelationskoeffizienten (r) bzw. Regressionskoeffizienten (R) und der Regressionsgeraden ($y = m \cdot x + b$).

Bei der Bewertung der statistischen Signifikanzen wurde das Signifikanzniveau $\alpha = 0,05$ zugrunde gelegt, d.h. Ergebnisse mit $p \leq 0,05$ wurden als statistisch signifikant angesehen. Zusätzlich wurde, wenn möglich, der exakte p -Wert angegeben.

3.3 Ergebnisse

3.3.1 Untersuchungsverfahren

3.3.1.1 Auswertung der EIA-Standardkurven

Die Ergebnisse der Auswertung der mittleren 50%-Dosis der über den gesamten Untersuchungszeitraum erstellten Standardkurven der Enzymimmuntests für T-2 Toxin, T-2 Toxin/HT-2 Toxin, Deoxynivalenol, Zearalenon, Fumonisin B₁, Ergotalkaloide und Ochratoxin A sind in den Tabellen 16 bis 22 zusammengestellt. Zur Veranschaulichung des Messbereichs bzw. Kurvenverlaufs sind in den Abbildungen 8 bis 14 typische Standardkurven der oben genannten Testsysteme dargestellt. Die Variationskoeffizienten der jeweils im Vierfachansatz eingesetzten Standardkonzentrationen (Intraassayvariation) lagen typischerweise unter 5%.

Unter Berücksichtigung der in 3.2.7 aufgeführten Kriterien ergibt sich für den T-2 Toxin-EIA eine Nachweisgrenze von 0,1 µg/kg, für den T-2 Toxin/HT-2 Toxin-EIA eine Nachweisgrenze von 0,2 µg/kg, für den Zearalenon-EIA eine Nachweisgrenze von 5 µg/kg, für den FB₁-EIA eine Nachweisgrenze von 2 µg/kg sowie eine Nachweisgrenze von 30 µg/kg für den Ergotalkaloid (GEA)-EIA. Für das Testsystem zum Nachweis von Ochratoxin A wurde, unter besonderer Berücksichtigung der mittleren Wiederfindungsrate von nur 66,51% (3.3.1.3), eine Nachweisgrenze von 0,2 µg/kg definiert. Für den DON-EIA ergibt sich, unter besonderer Berücksichtigung der Streuung der Messwerte der einzelnen Standardkonzentrationen, eine Nachweisgrenze von 10 µg/kg.

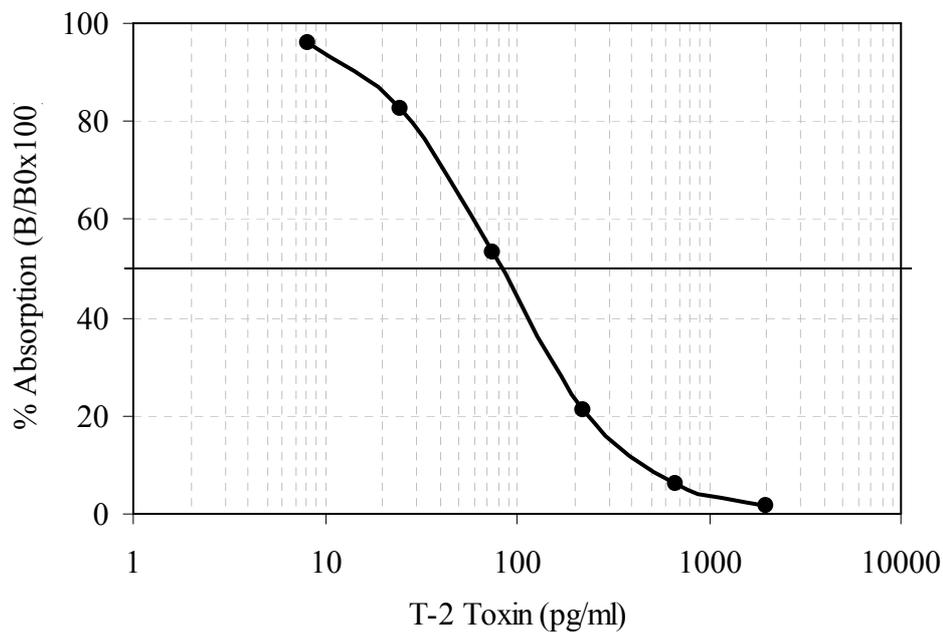


Abbildung 8: Charakteristische Standardkurve des Enzymimmuntests zum Nachweis von T-2 Toxin. Die Variationskoeffizienten der Standardkonzentrationen ($n=4$) lagen im Mittel bei 4,0% ($X_{\min} = 0\%$; $X_{\max} = 21,5\%$). B_0 lag typischerweise bei 0,99 Einheiten ($X_{\min} = 0,9$; $X_{\max} = 1,1$)

Tabelle 16: 50% Dosis der jeweils im Vierfachansatz angesetzten Standardkurven des Enzymimmuntests zum Nachweis von T-2 Toxin nach Auswertung von 26 Standardkurven

	50% Dosis (pg/ml)
Mittelwert	75,87
Standardabweichung	9,98
Median	76,35
Variationskoeffizient	13,15 %
Minimalwert	57,8
Maximalwert	93,8

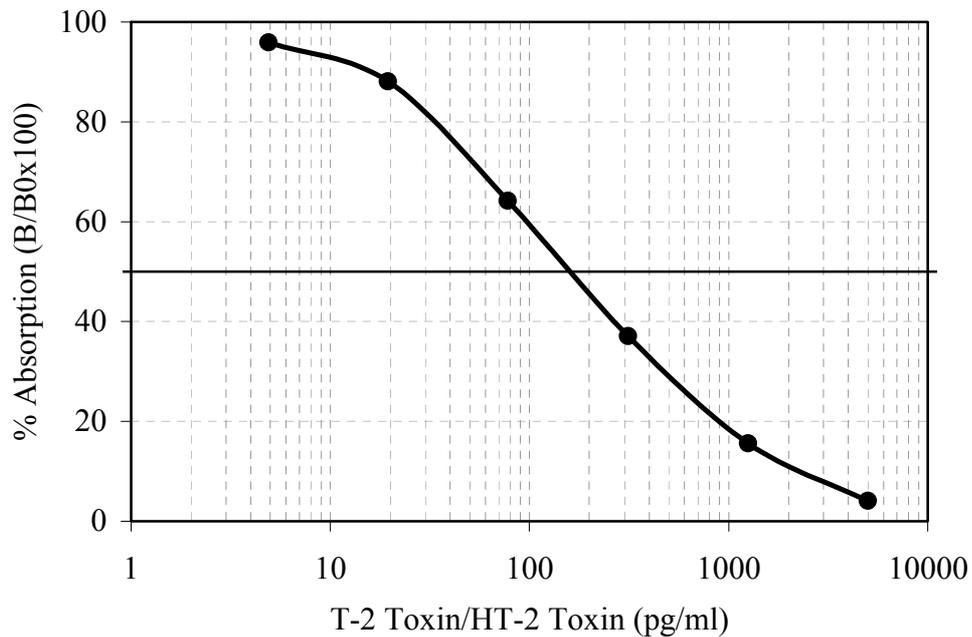


Abbildung 9: Charakteristische Standardkurve des Enzymimmuntests zum Nachweis von T-2 Toxin/HT-2 Toxin. Die Variationskoeffizienten der Standardkonzentrationen (n=4) lagen im Mittel bei 3,9% ($X_{\min} = 0,8\%$; $X_{\max} = 16,8\%$). B_0 lag typischerweise bei 1,08 Einheiten ($X_{\min} = 0,9$; $X_{\max} = 1,4$)

Tabelle 17: 50% Dosis der jeweils im Vierfachansatz angesetzten Standardkurven des Enzymimmuntests zum Nachweis von T-2 Toxin/HT-2 Toxin nach Auswertung von 20 Standardkurven

	50% Dosis (pg/ml)
Mittelwert	165,05
Standardabweichung	27,93
Median	163,45
Variationskoeffizient	16,92%
Minimalwert	126,9
Maximalwert	226,6

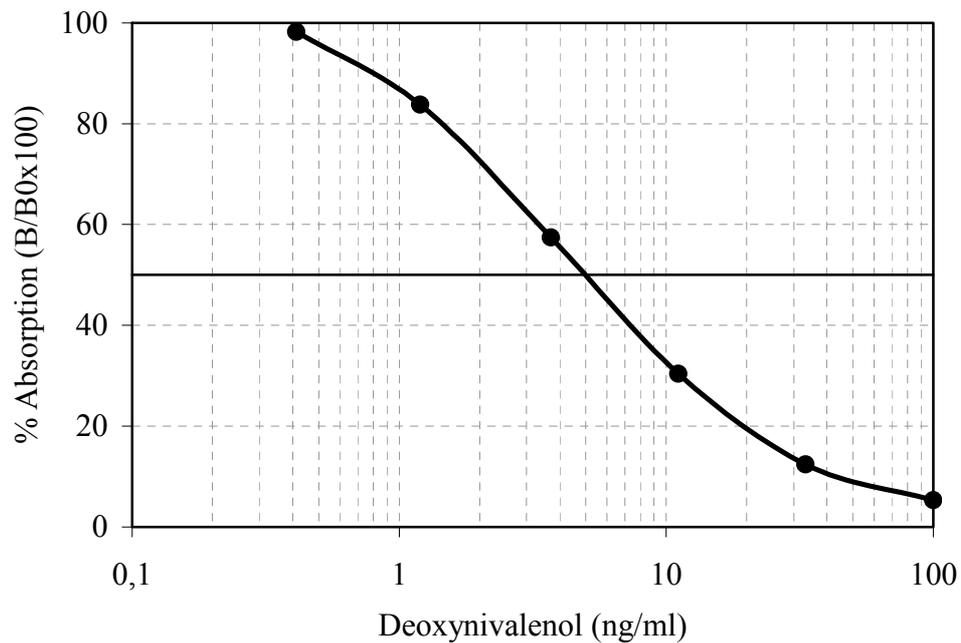


Abbildung 10: Charakteristische Standardkurve des Enzymimmuntests zum Nachweis von Deoxynivalenol. Die Variationskoeffizienten der Standardkonzentrationen ($n=4$) lagen im Mittel bei 12,4% ($X_{\min} = 1\%$; $X_{\max} = 34\%$). B_0 lag typischerweise bei 1,29 Einheiten ($X_{\min} = 0,9$; $X_{\max} = 2$)

Tabelle 18: 50% Dosis der jeweils im Vierfachansatz angesetzten Standardkurven des Enzymimmuntests zum Nachweis von Deoxynivalenol nach Auswertung von 21 Standardkurven

	50% Dosis (ng/ml)
Mittelwert	4,98
Standardabweichung	0,98
Median	4,9
Variationskoeffizient	19,68%
Minimalwert	3,4
Maximalwert	7,5

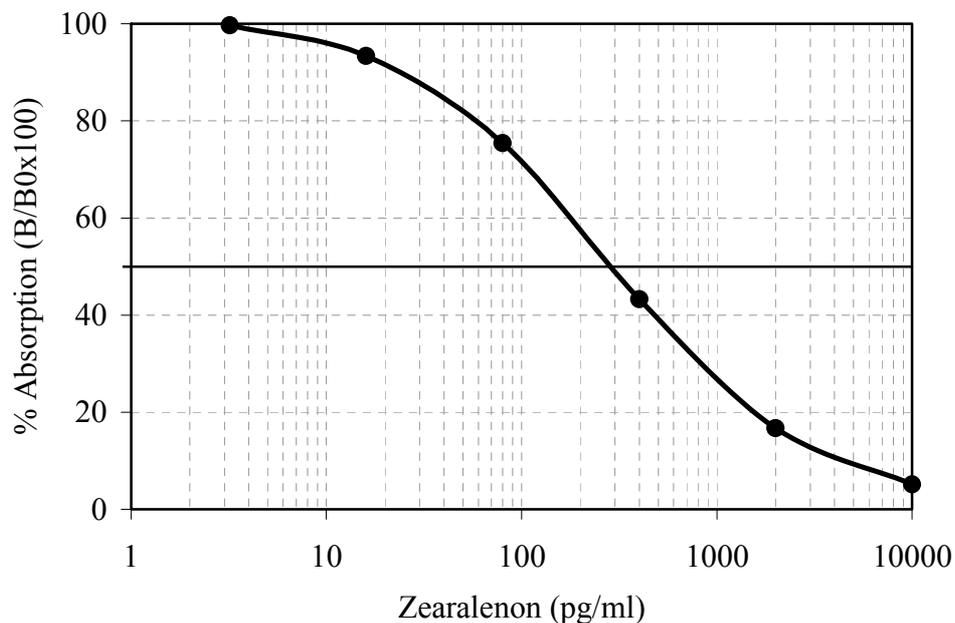


Abbildung 11: Charakteristische Standardkurve des Enzymimmuntest zum Nachweis von Zearalenon. Die Variationskoeffizienten der Standardkonzentrationen ($n=4$) lagen im Mittel bei 5,3% ($X_{\min} = 0,6\%$; $X_{\max} = 15,4\%$). B_0 lag typischerweise bei 1,06 Einheiten ($X_{\min} = 0,8$; $X_{\max} = 1,2$)

Tabelle 19: 50% Dosis der jeweils im Vierfachansatz angesetzten Standardkurven des Enzymimmuntests zum Nachweis von Zearalenon nach Auswertung von 20 Standardkurven

	50% Dosis (pg/ml)
Mittelwert	268,19
Standardabweichung	59,5
Median	274,25
Variationskoeffizient	22,19%
Minimalwert	155,9
Maximalwert	364,4

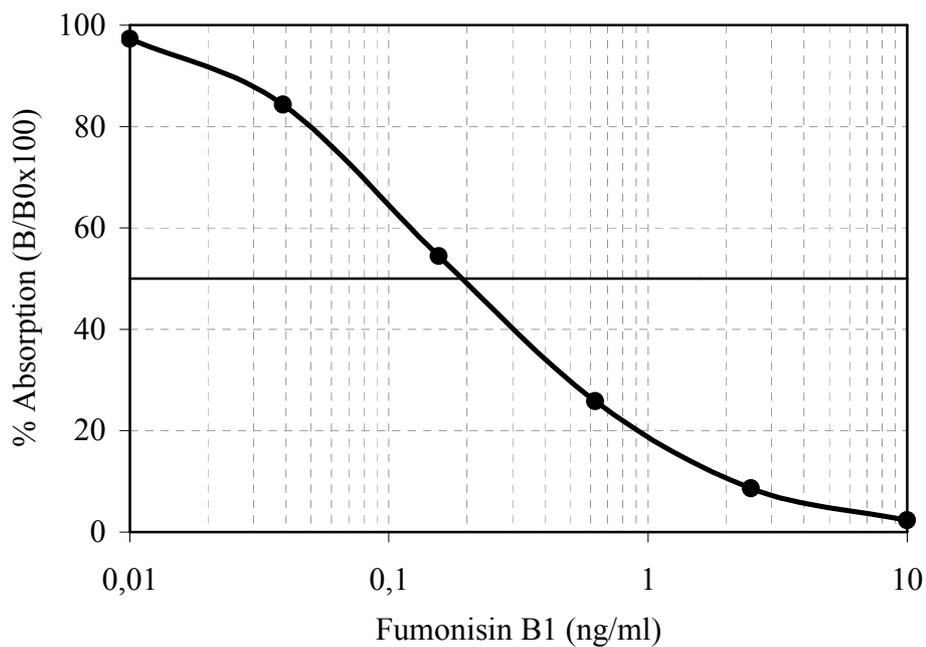


Abbildung 12: Charakteristische Standardkurve des Enzymimmuntest zum Nachweis von Fumonisin B₁. Die Variationskoeffizienten der Standardkonzentrationen (n=4) lagen im Mittel bei 4,6% ($X_{\min} = 0,3\%$; $X_{\max} = 15,7\%$). B₀ lag typischerweise bei 0,88 Einheiten ($X_{\min} = 0,61$; $X_{\max} = 1,14$)

Tabelle 20: 50% Dosis der jeweils im Vierfachansatz angesetzten Standardkurven des Enzymimmuntests zum Nachweis von Fumonisin B₁ nach Auswertung von 25 Standardkurven

	50% Dosis (ng/ml)
Mittelwert	0,22
Standardabweichung	0,04
Median	0,22
Variationskoeffizient	18,18%
Minimalwert	0,13
Maximalwert	0,29

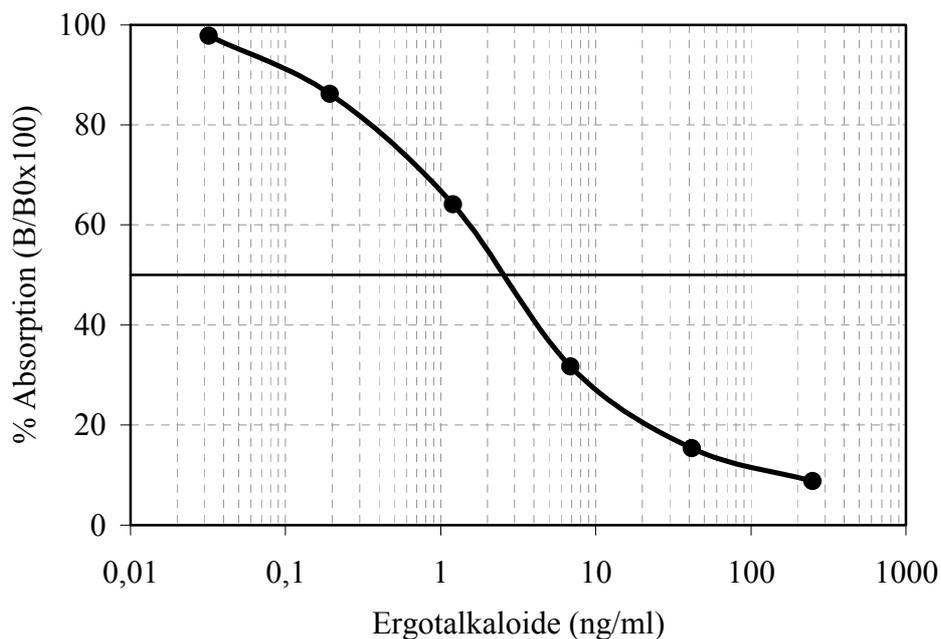


Abbildung 13: Charakteristische Standardkurve des Enzymimmuntest zum Nachweis von Ergotalkaloiden (GEA). Die Variationskoeffizienten der Standardkonzentrationen ($n=4$) lagen im Mittel bei 4,2% ($X_{\min} = 0,8\%$; $X_{\max} = 11,3\%$). B_0 lag typischerweise bei 1,04 Einheiten ($X_{\min} = 0,89$; $X_{\max} = 1,16$)

Tabelle 21: 50% Dosis der jeweils im Vierfachansatz angesetzten Standardkurven des Enzymimmuntests zum Nachweis von Ergotalkaloiden (GEA) nach Auswertung von 19 Standardkurven

	50% Dosis (ng/ml)
Mittelwert	2,4
Standardabweichung	0,4
Median	2,4
Variationskoeffizient	16,67%
Minimalwert	1,4
Maximalwert	3,1

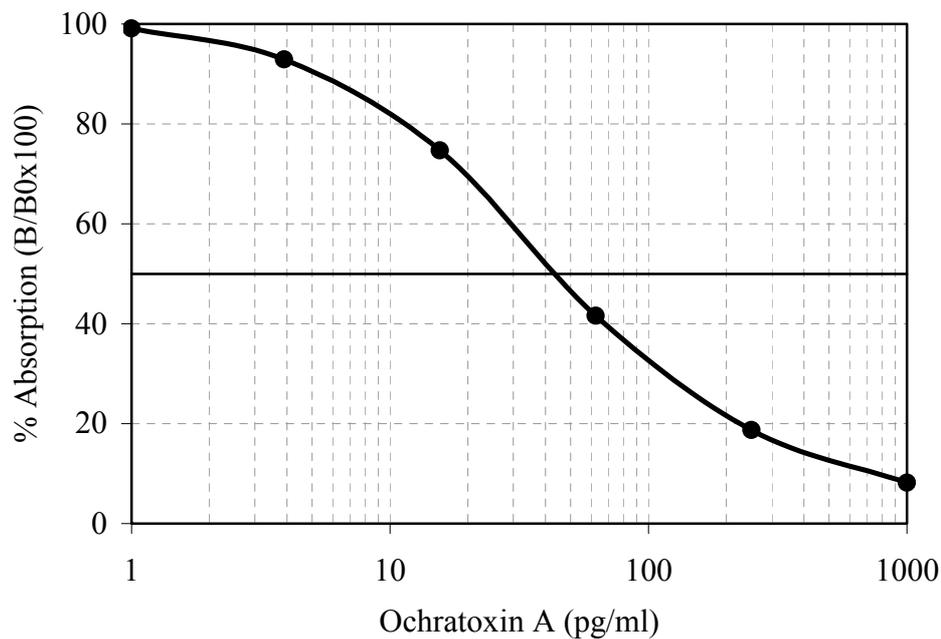


Abbildung 14: Charakteristische Standardkurve des Enzymimmuntest zum Nachweis von Ochratoxin A. Die Variationskoeffizienten der Standardkonzentrationen ($n=4$) lagen im Mittel bei 4,1% ($X_{\min} = 0,5\%$; $X_{\max} = 13,2\%$). B_0 lag typischerweise bei 1,07 Einheiten ($X_{\min} = 0,94$; $X_{\max} = 1,24$)

Tabelle 22: 50% Dosis der jeweils im Vierfachansatz angesetzten Standardkurven des Enzymimmuntests zum Nachweis von Ochratoxin A nach Auswertung von 16 Standardkurven

	50% Dosis (pg/ml)
Mittelwert	48,46
Standardabweichung	7,59
Median	48,15
Variationskoeffizient	15,67%
Minimalwert	36,6
Maximalwert	66,4

3.3.1.2 Spezifität der Enzymimmuntests

Die zur Spezifität der EIAs herangezogenen Kreuzreaktionen mit strukturverwandten Toxinen sind, wie von den Autoren angegeben, in Kapitel 3.1.5 in den Tabellen 10 bis 15 zusammengestellt. Grundsätzlich konnten mit jedem Testverfahren neben dem für die Quantifizierung eingesetzten „Leittoxin“ einige struktur- und wirkungsverwandte Toxine miterfasst werden, was im Sinne einer „Belastungsermittlung“ als vorteilhaft anzusehen ist. Grundsätzlich kann jedoch dadurch bei Proben die eine ungewöhnliche „Toxinzusammensetzung“ aufweisen, d.h. bei denen der Gesamttoxingehalt stark von kreuzreagierenden Verbindungen bestimmt wird und die nur geringe Gehalte des Leittoxins aufweisen die quantitative Bestimmung stark eingeschränkt sein.

3.3.1.3 Wiederfindungsraten

Die ermittelten Wiederfindungsraten für T-2 Toxin, T-2 Toxin/HT-2 Toxin, Deoxynivalenol, Zearalenon, Fumonisin B₁, Ergotalkaloide (GEA) und Ochratoxin A sind in den Tabellen 23 bis 29 zusammengestellt.

Generell konnten zufriedenstellende Werte erzielt werden. In einigen Tests wurden für Toxinzusätze nahe der Nachweisgrenze Wiederfindungsraten von etwas über 100% erzielt, was z. B. auf unspezifische Probenmatrixeffekte zurückgeführt werden kann.

Tabelle 23: Wiederfindungsraten für T-2 Toxin in künstlich kontaminiertem Pferdefutter

Zusatz (ng/g)	n	Mittlere Wiederfindungsrate (ng/g)	Standard- abweichung (ng/g)	Variations- koeffizient (%)	Mittlere Wiederfindungsrate (%)
5,00	3	3,41	0,47	13,78	68,28
10,00	3	6,73	0,28	4,16	67,31
20,00	3	15,73	0,31	1,97	78,64
50,00	3	34,45	0,84	2,44	68,89

Tabelle 24: Wiederfindungsraten für T-2 Toxin/HT-2 Toxin in künstlich kontaminiertem Pferdefutter

Zusatz (ng/g)	n	Mittlere Wiederfindungsrate (ng/g)	Standardabweichung (ng/g)	Variationskoeffizient (%)	Mittlere Wiederfindungsrate (%)
5,00	3	5,47	0,34	6,22	109,47
10,00	3	10,9	1,48	13,58	108,93
20,00	3	17,7	2,85	16,1	88,49
50,00	3	44,12	9,5	21,53	82,24

Tabelle 25: Wiederfindungsraten für DON in künstlich kontaminiertem Pferdefutter

Zusatz (ng/g)	n	Mittlere Wiederfindungsrate (ng/g)	Standardabweichung (ng/g)	Variationskoeffizient (%)	Mittlere Wiederfindungsrate (%)
300	6	259,51	30,14	11,61	88,42
500	3	370,11	35,69	9,64	74,02

Tabelle 26: Wiederfindungsraten für Zearalenon in künstlich kontaminiertem Pferdefutter

Zusatz (ng/g)	n	Mittlere Wiederfindungsrate (ng/g)	Standardabweichung (ng/g)	Variationskoeffizient (%)	Mittlere Wiederfindungsrate (%)
50,00	3	46,96	10,12	21,55	93,92
100,00	4	98,30	7,72	7,85	98,29
300,00	2	254,16	1,56	0,64	81,68

Tabelle 27: Wiederfindungsraten für FB₁ in künstlich kontaminiertem Pferdefutter

Zusatz (ng/g)	n	Mittlere Wiederfindungsrate (ng/g)	Standardabweichung (ng/g)	Variationskoeffizient (%)	Mittlere Wiederfindungsrate (%)
100,00	4	118,14	7,42	6,28	118,14
250,00	3	262,80	40,23	15,31	105,12

Tabelle 28: Wiederfindungsraten für Ergotalkaloide (GEA) in künstlich kontaminiertem Pferdefutter

Zusatz (ng/g)	n	Mittlere Wiederfindungsrate (ng/g)	Standardabweichung (ng/g)	Variationskoeffizient (%)	Mittlere Wiederfindungsrate (%)
100,00	1	178,99			178,99
200,00	4	294,46	44,74	15,19	146,99
500,00	5	553,45	28,11	5,08	110,69

Tabelle 29: Wiederfindungsraten für OTA in künstlich kontaminiertem Pferdefutter

Zusatz (ng/g)	n	Mittlere Wiederfindungsrate (ng/g)	Standardabweichung (ng/g)	Variationskoeffizient (%)	Mittlere Wiederfindungsrate (%)
2,00	5	1,28	0,30	23,44	64,09
4,00	3	2,82	0,64	22,70	70,54

3.3.2 Ergebnisse der Untersuchung von kommerziell hergestelltem Pferdefutter auf T-2 Toxin, T-2 Toxin/HT-2 Toxin, DON, Zearalenon, FB₁, Ergotalkaloide und OTA

Unter Verwendung der enzymimmunologischen Verfahren wurden insgesamt 62 Proben untersucht. Die Einzelergebnisse, sowie die vom Hersteller angegebenen, prozentualen Getreideanteile des Futters (n=60, da auf zwei Säcken die Inhaltsstoffe nur quantitativ angegeben wurden), sind im Anhang in Tabelle 32 zusammengestellt.

Alle 62 untersuchten Proben zeigten positive Ergebnisse für T-2 Toxin, T-2 Toxin/HT-2 Toxin und DON. ZEA konnte in 61 Proben und FB₁ 58 Proben nachgewiesen werden. Ergotalkaloide wurden in 38 und OTA in 26 der untersuchten Futterproben nachgewiesen (Abbildung 15). Eine Kontamination mit allen in die Untersuchung einbezogenen Mykotoxinen zeigte sich bei 20 Proben.

Tabelle 30 stellt eine Übersicht der Untersuchungsergebnisse aller positiven Proben dar.

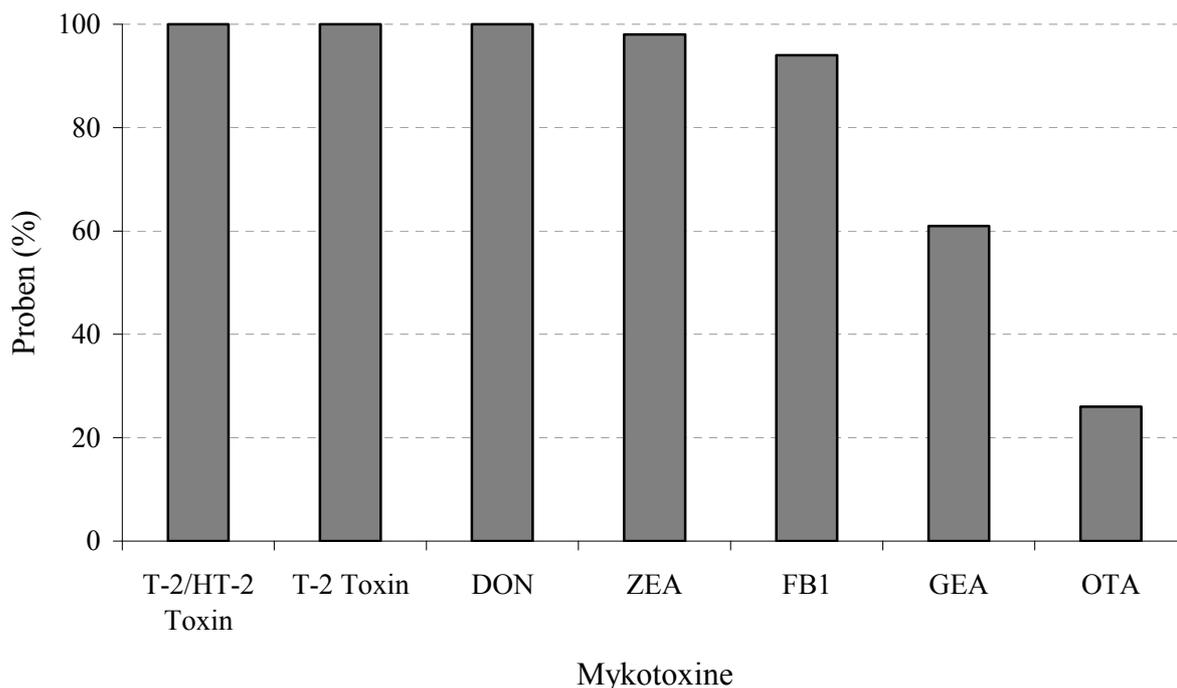


Abbildung 15: Prozentuale Nachweishäufigkeit der untersuchten Mykotoxine in kommerziell hergestelltem Pferdefutter (n = 62)

Tabelle 30: Übersicht der Untersuchungsergebnisse aller untersuchter Mykotoxine in kommerziell hergestelltem Pferdefutter

Toxin	Pos. (n)	Pos. (%)	Toxinkonzentrationen positiver Proben ($\mu\text{g}/\text{kg}$)					
			x_{\min}	x_{\max}	MW	s	Median	90stes Perzentil
T-2/HT-2 Toxin	62	100	0,75	228	38	42	24	78
T-2 Toxin	62	100	0,28	90,5	12	15	7	24
DON	62	100	16,4	4860	406	659	219	687
ZEA	61	98	6,89	312	78	65	61	139
FB ₁	58	94	2,04	2190	101	294	27	152
GEA	38	61	34,3	1200	144	198	97	205
OTA	26	42	0,21	4,12	0,66	0,81	0,35	1,28

MW: Mittelwert, s: Standardabweichung

3.3.2.1 T-2 Toxin und HT-2 Toxin

Bei 100% des untersuchten Probenmaterials konnten T-2 Toxin und HT-2 Toxin nachgewiesen werden. Für das Testsystem T-2 wurden Toxingehalte zwischen 0,28 µg/kg und 90,5 µg/kg gemessen. Der Mittelwert der Messergebnisse lag bei 12 ± 15 µg/kg und der Median bei 7 µg/kg.

Die Untersuchung mittels T-2 Toxin/HT-2 Toxin-EIA ergab Toxingehalte von 0,75 µg/kg bis 228 µg/kg. Der Mittelwert lag hier bei 38 ± 42 µg/kg, der Median bei 24 µg/kg. Zur Veranschaulichung der Spannweite des Messbereichs sind in Abbildung 16 die Minimal- und Maximalwerte sowie die Mediane und Quartile (Q_1 (T-2 Toxin: 3,56 µg/kg; T-2 Toxin/HT-2 Toxin: 10,9 µg/kg und Q_3 (T-2 Toxin: 18 µg/kg; T-2 Toxin/HT-2 Toxin: 49 µg/kg)) dargestellt.

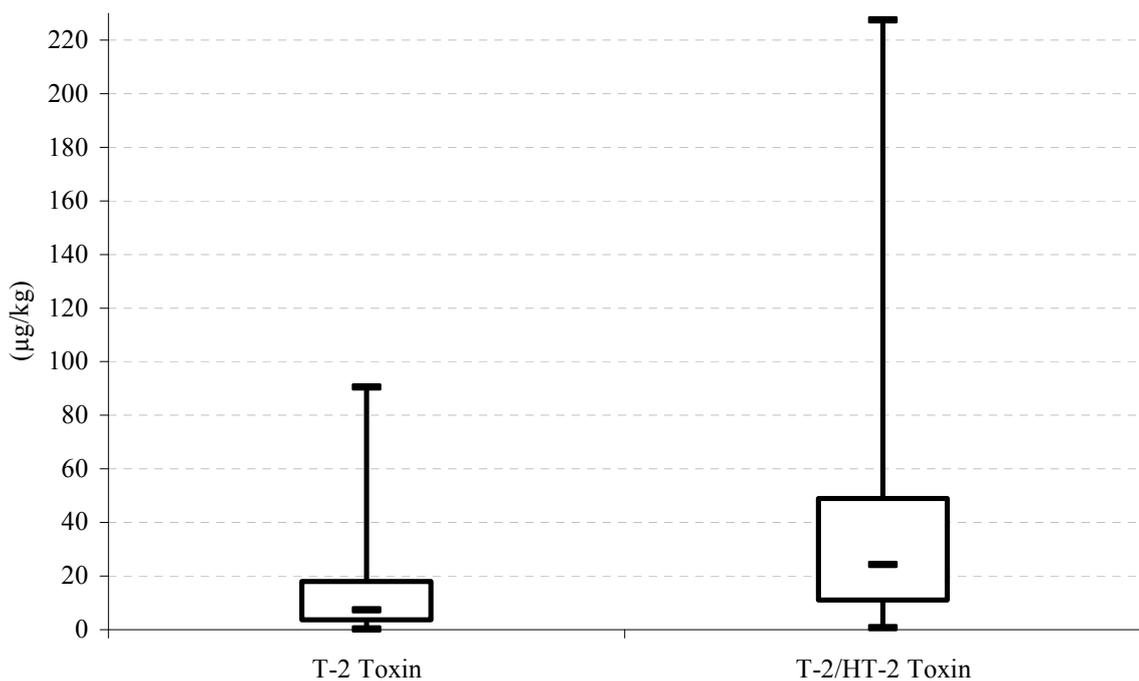


Abbildung16: Ergebnisse der EIA-Untersuchung von kommerziell hergestelltem Pferdefutter auf T-2 Toxin und HT-2 Toxin mit Darstellung der Minimal- und Maximalwerte sowie dem Median und der Quartile (n=62)

3.3.2.2 Deoxynivalenol

Alle 62 untersuchten Pferdefutterproben enthielten DON. Es wurden Toxingehalte zwischen 16,42 µg und 4860 µg/kg nachgewiesen. Die mittlere Belastung lag bei 406 ± 659 µg/kg, der Median bei 219 µg/kg. Die drei höchsten Messwerte (1120 µg/kg, 2200 µg/kg und 4860 µg/kg) wurden in reinen Maisproben ermittelt. Zur Veranschaulichung der Spannbreite des Messbereichs sind in Abbildung 17 die Minimal- und Maximalwerte sowie der Median und die Quartile (Q_1 (164 µg/kg) und Q_3 (432 µg/kg)) dargestellt.

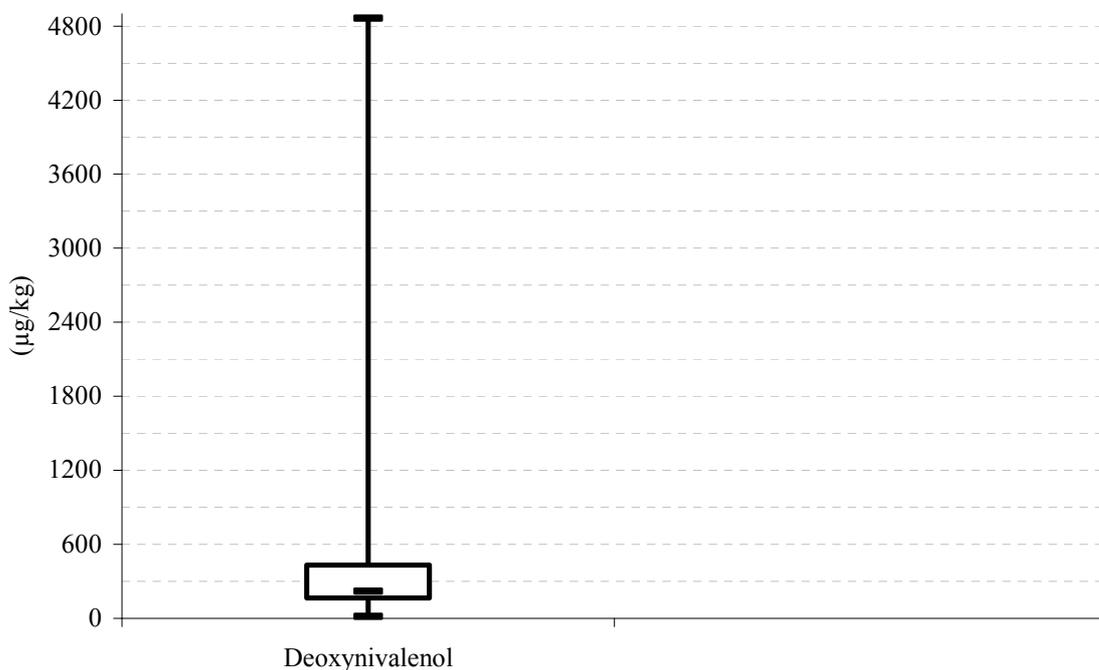


Abbildung 17: Ergebnisse der EIA-Untersuchung von kommerziell hergestelltem Pferdefutter auf Deoxynivalenol mit Darstellung der Minimal- und Maximalwerte sowie dem Median und der Quartile (n=62)

3.3.2.3 Zearalenon

Von den 62 mittels EIA auf Zearalenon untersuchten Proben wurde in 61 Zearalenon nachgewiesen. Die Zearalenon-Gehalte positiver Proben lagen zwischen 6,89 µg/kg und 312 µg/kg. Für die weitere statistische Auswertung werden, wie in 3.2.8 beschrieben, negative Proben unter Angabe der halben Nachweisgrenze (2,5 µg/kg) mit in die

Berechnung einbezogen. Die mittlere Belastung lag bei $76,5 \pm 65 \mu\text{g}/\text{kg}$, der Median bei $58,9 \mu\text{g}/\text{kg}$. Zur Veranschaulichung der Spannweite des Messbereichs sind in Abbildung 18 die Minimal- und Maximalwerte sowie der Median und die Quartile (Q_1 ($34,8 \mu\text{g}/\text{kg}$) und Q_3 ($95,3 \mu\text{g}/\text{kg}$)) dargestellt.

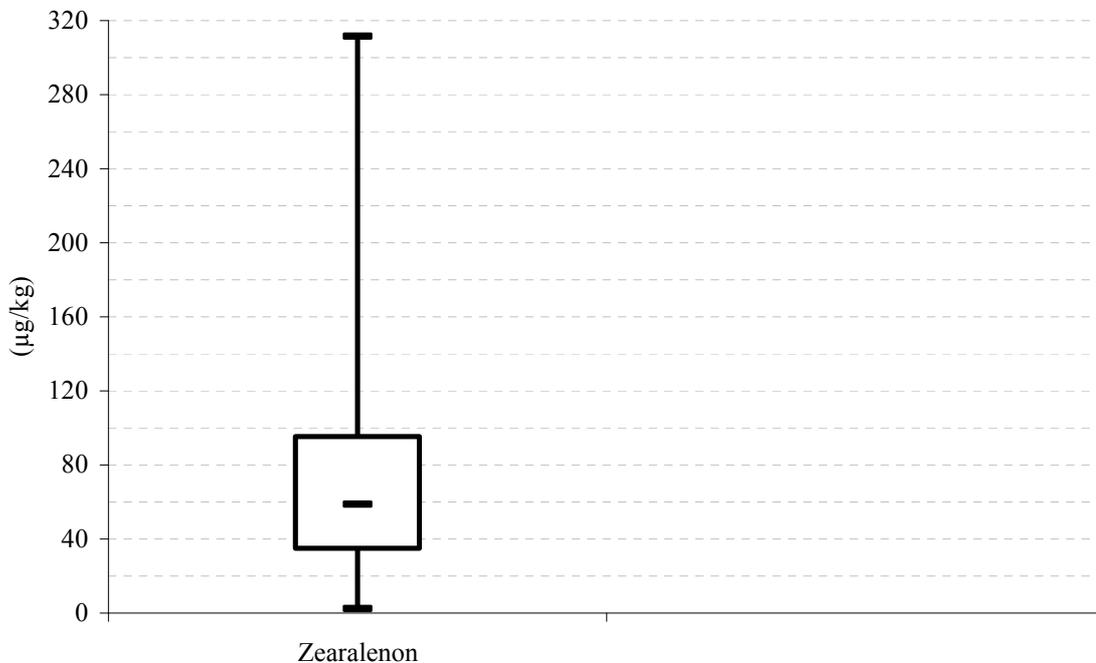


Abbildung 18: Ergebnisse der EIA-Untersuchung von kommerziell hergestelltem Pferdefutter auf Zearalenon mit Darstellung der Minimal- und Maximalwerte sowie dem Median und der Quartile ($n=62$)

3.3.2.4 Fumonisin B₁

58 der 62 untersuchten Pferdefutterproben enthielten Fumonisin B₁. Die Messwerte der positiven Proben lagen zwischen $2,04 \mu\text{g}/\text{kg}$ und $2190 \mu\text{g}/\text{kg}$. Die mittlere Belastung des Pferdefutters in Bezug auf Fumonisin B₁ lag, unter Einbeziehung der negativen Proben mit der halben Nachweisgrenze (3.2.8), bei $94,4 \pm 286 \mu\text{g}/\text{kg}$, der Median bei $24,7 \mu\text{g}/\text{kg}$. Wie auch bei der Untersuchung auf Deoxynivalenol wurde der höchste Wert in einer reinen Maisprobe gemessen. Zur Veranschaulichung der Spannweite des Messbereichs sind in Abbildung 19 die Minimal- und Maximalwerte sowie der Median und die Quartile (Q_1 ($7,93 \mu\text{g}/\text{kg}$) und Q_3 ($80,7 \mu\text{g}/\text{kg}$)) dargestellt.

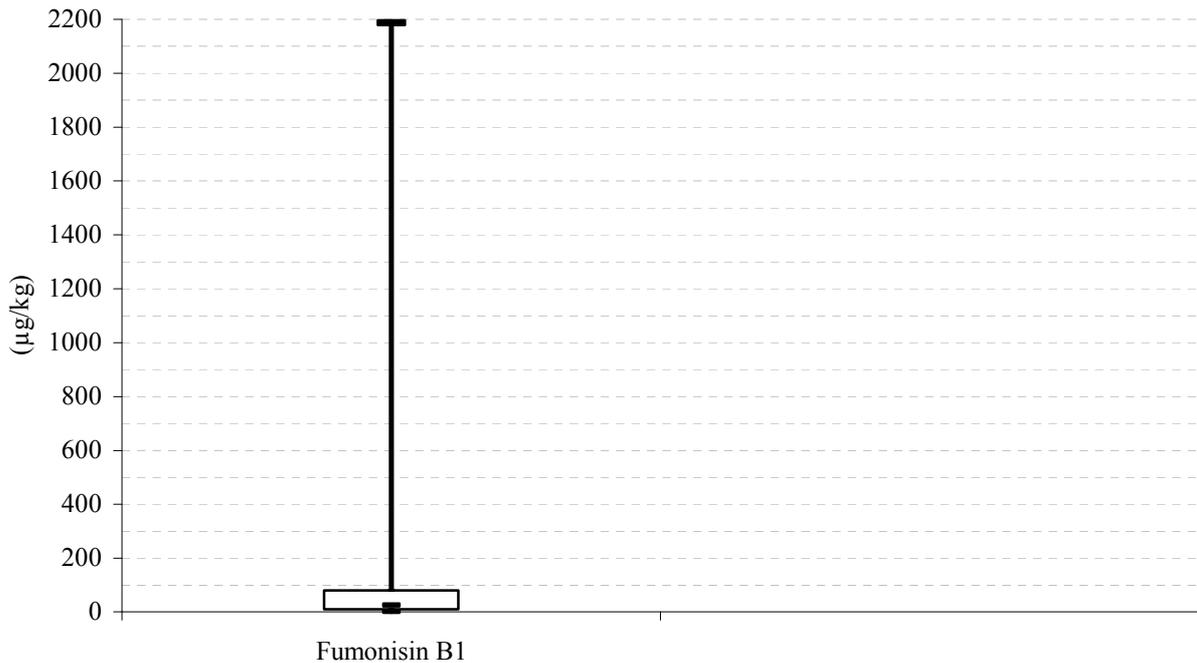


Abbildung 19: Ergebnisse der EIA-Untersuchung von kommerziell hergestelltem Pferdefutter auf Fumonisin B₁ mit Darstellung der Minimal- und Maximalwerte sowie dem Median und der Quartile (n=62)

3.3.2.5 Ergotalkaloide

Ergotalkaloide konnten mittels des GEA-EIA in 38 der 62 untersuchten Futterproben nachgewiesen werden. Es wurden Werte zwischen 34,3 µg/kg und 1200 µg/kg gemessen. Die mittlere Belastung des Pferdefutters in Bezug auf Ergotalkaloide lag, unter Einbeziehung der negativen Proben mit der halben Nachweisgrenze (3.2.8), bei $93,8 \pm 166$ µg/kg, der Median bei 48,8 µg/kg. Der Maximalwert von 1200 µg/kg wurde in einer reinen Gerstenprobe gemessen. Zur Veranschaulichung der Spannweite des Messbereichs sind in Abbildung 20 die Minimal- und Maximalwerte sowie der Median und die Quartile (Q₁ (15 µg/kg) und Q₃ (109 µg/kg)) dargestellt.

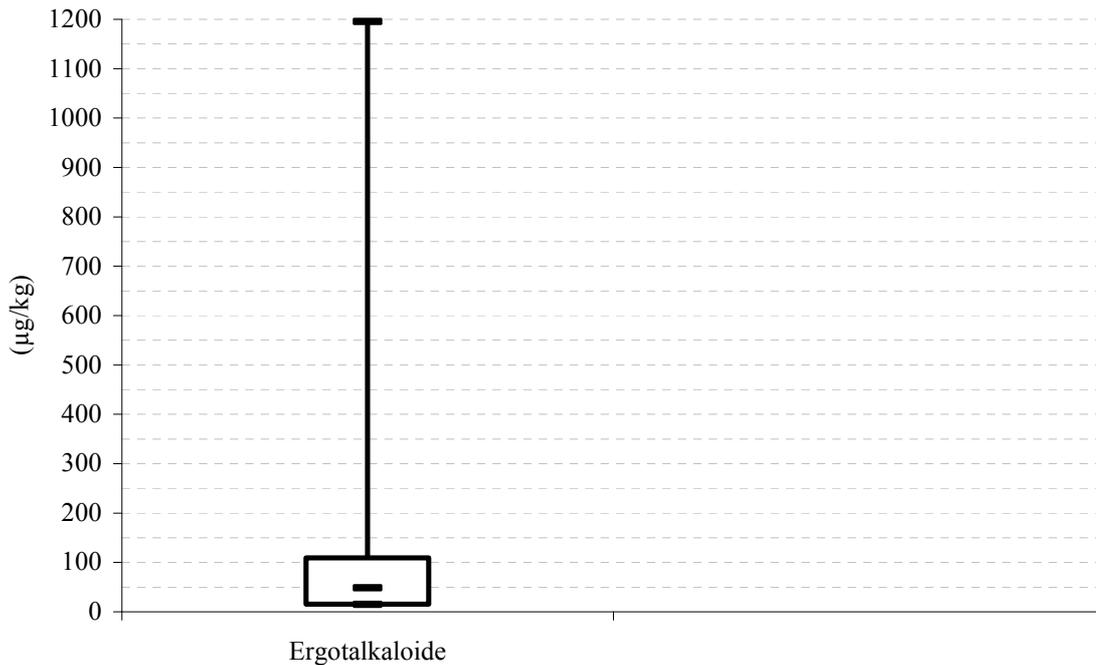


Abbildung 20: Ergebnisse der EIA-Untersuchung von kommerziell hergestelltem Pferdefutter auf Ergotalkaloide mit Darstellung der Minimal- und Maximalwerte sowie dem Median und der Quartile (n=62)

3.3.2.6 Ochratoxin A

Ochratoxin A konnte mittels EIA in 26 der 62 untersuchten Proben nachgewiesen werden. Es wurden Toxingehalte zwischen 0,21 µg/kg und 4,12 µg/kg gemessen. Die mittlere Belastung des Pferdefutters in Bezug auf Ochratoxin A lag unter Einbeziehung der negativen Proben mit der halben Nachweisgrenze (3.2.8) bei $0,33 \pm 0,59$ µg/kg, der Median bei 0,1 µg/kg. Zur Veranschaulichung der Spannweite des Messbereichs sind in Abbildung 21 die Minimal- und Maximalwerte sowie der Median und die Quartile (Q_1 (0,1 µg/kg) und Q_3 (0,3 µg/kg)) dargestellt.

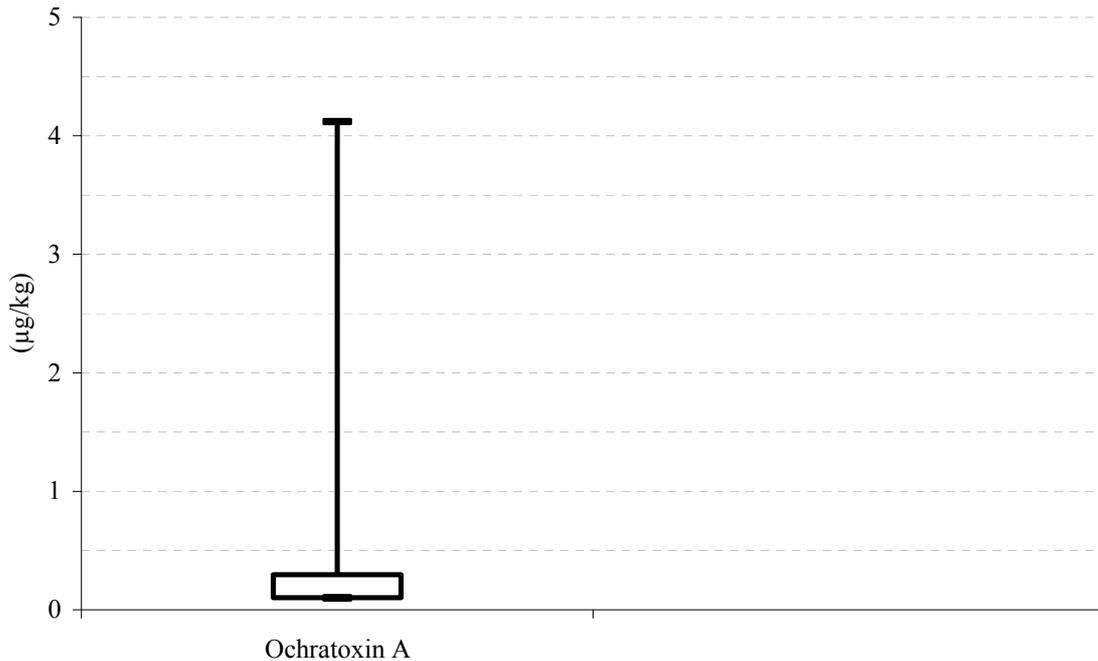


Abbildung 21: Ergebnisse der EIA-Untersuchung von kommerziell hergestelltem Pferdefutter auf Ochratoxin A mit Darstellung der Minimal- und Maximalwerte sowie dem Median und der Quartile (n=62)

3.3.2.7 Korrelation zwischen verschiedenen Mykotoxinen in kommerziell hergestelltem Pferdefutter

Die Ergebnisse der Untersuchung zeigen, dass in allen untersuchten Pferdefutterproben mehr als ein Mykotoxin nachgewiesen werden konnte. 20 der 62 untersuchten Proben enthielten alle sieben Mykotoxine. Die Korrelation der einzelnen Mykotoxine untereinander wurde mittels Korrelationsanalyse berechnet. Tabelle 31 zeigt die Korrelationskoeffizienten (r), sowie die Regressionsgeradengleichung ($y = m \cdot x + b$) der untersuchten Mykotoxine. Die Mykotoxine, deren Gehalte miteinander korrelieren ($p \leq 0,05$) sind in der Tabelle fett umrandet. So zeigt sich zwischen dem Ergebnis des T-2 Toxin und des gruppenspezifischen T-2 Toxin/HT-2 Toxin-EIA eine erwartete starke Korrelation ($r = 0,97$). Des Weiteren korrelieren beide EIAs in vergleichbarer Stärke mit DON und den Ergotalkaloiden. Zwischen der T-2 Toxin-Kontamination (ebenso die T-2 Toxin/HT-2 Toxin-Kontamination) und den Deoxynivalenon-Gehalten stellt sich eine negative Korrelation mit einem Korrelationskoeffizienten von $r = -0,37$ (entsprechend T-2

Toxin/HT-2 Toxin $r = -0,31$) dar. Mit einem Korrelationskoeffizient von $r = 0,42$ korrelieren die Gehalte der Ergotalkaloide mit den T-2 Toxin-Gehalten (entsprechend T-2 Toxin/HT-2 Toxin $r = 0,38$) in positiver Weise miteinander.

Die Gehalte der Zearalenonkontamination stehen jeweils in positivem Zusammenhang mit der Höhe der Werte von DON ($r = 0,57$), FB₁ ($r = 0,38$) und OTA ($r = 0,29$).

Tabelle 31: Ergebnisse der Korrelationsanalyse zwischen den untersuchten Mykotoxingehalten in kommerziell hergestelltem Pferdefutter

Ergebnisse der Korrelationsanalyse (abhängige (Y) Variable)							
Toxine	T-2 Toxin	DON	ZEA	FB1	GEA	OTA	
Ergebnisse der Korrelationsanalyse (unabhängige (X) Variable)	T-2/HT-2 Toxin	$r^1 = 0,97$ $p^2 = < 0,001$ $y^3 = -0,4+0,93x$	$r = - 0,37$ $p = 0,003$ $y = 2,75-0,26x$	$r = 0,028$ $p = 0,83$ $y = 1,7+0,2x$	$r = - 0,06$ $p = 0,62$ $y = 1,5-0,08x$	$r = 0,42$ $p = < 0,001$ $y = 1,21+0,36x$	$r = 0,06$ $p = 0,63$ $y = 2,22+0,05x$
	T-2 Toxin		$r = - 0,31$ $p = 0,01$ $y = 2,6-0,23x$	$r = 0,65$ $p = 0,61$ $y = 1,7+0,04x$	$r = -0,012$ $p = 0,93$ $y = 1,4-0,02x$	$r = 0,38$ $p = 0,002$ $y = 1,4+0,34x$	$r = 0,04$ $p = 0,78$ $y = 2,22+0,03x$
	DON			$r = 0,57$ $p = < 0,001$ $y = 0,38+0,57x$	$r = 0,1$ $p = 0,43$ $y = 0,96+0,18x$	$r = -0,12$ $p = 0,34$ $y = 2,05-0,15x$	$r = 0,017$ $p = 0,89$ $y = 2,24+0,02x$
	ZEA				$r = 0,38$ $p = 0,002$ $y = 0,18+0,7x$	$r = 0,13$ $p = 0,32$ $y = 1,4+0,16x$	$r = 0,29$ $p = 0,021$ $y = 1,75+0,31x$
	FB1					$r = 0,05$ $p = 0,71$ $y = 1,28+0,07x$	$r = 0,18$ $p = 0,14$ $y = 0,64+0,34x$
	GEA						$r = 0,16$ $p = 0,23$ $y = 2,1+0,13x$

- 1: Korrelationskoeffizient (r)
- 2: Bei der Bewertung der Signifikanzen wurde das Signifikanzniveau $\alpha = 0,05$ zugrunde gelegt, d.h. Ergebnisse mit $p \leq 0,05$ wurden als statistisch signifikant angesehen.
- 3: Regressionsgeradengleichung mit $y = m \cdot x + b$



Werte mit $p \leq 0,05$ sind fett umrandet

3.3.2.8 Einfluss der Inhaltsstoffe Weizen, Gerste, Hafer und Mais sowie des Futtertyps auf die Mykotoxinbelastung von kommerziell hergestelltem Pferdefutter

Es wurden verschiedene Berechnungen durchgeführt, um den Einfluss des Getreides, bzw. des Futtertyps auf die Mykotoxingehalte im Pferdefutter zu untersuchen.

Zunächst wurde mittels einer einfachen Regressionsanalyse der Einfluss jedes einzelnen Getreides, ohne Berücksichtigung der anderen Inhaltsstoffe, auf seinen Einfluss auf die gemessenen Mykotoxinergebnisse hin überprüft.

Für **Hafer** konnte ein signifikanter, positiver Einfluss auf das T-2 Toxin/HT-2 Toxin-Ergebnis nachgewiesen werden. Die Regressionskoeffizienten (R) lagen hier mit einem p-Wert von 0,001 bei 0,48 (T-2 Toxin/HT-2 Toxin), sowie bei 0,41 (T-2 Toxin). Für die DON-Gehalte im Pferdefutter zeigten sich, genauso wie für die Ergebnisse der FB₁-Konzentrationen in Bezug auf Hafer signifikant negative Regressionskoeffizienten (DON: R = - 0,37, p = 0,004; FB₁: R = - 0,435 und p < 0,001).

Bei **Mais** konnte, in Bezug auf die T-2 Toxin/HT-2 Toxin- und GEA-Konzentrationen ein signifikant negativer Einfluss und in Bezug auf die DON-Konzentrationen ein signifikant positiver Einfluss nachgewiesen werden (T-2 Toxin/HT-2 Toxin: R = - 0,766, p = 0,001; T-2 Toxin: R = - 0,701, p ≤ 0,001; GEA: R = - 0,407, p = 0,001; DON: R = 0,456, p ≤ 0,001).

Darüber hinaus zeigte **Gerste** einen signifikanten gering-positiven Einfluss auf das GEA-Ergebnis und einen signifikanten gering-negativen Einfluss auf das ZEA-Ergebnis (GEA: R = 0,267, p = 0,039; ZEA: R = - 0,267, p = 0,044).

Für **Weizen**, bzw. für OTA wurde hier kein signifikanter Zusammenhang mit einem der anderen Parameter festgestellt.

Da die Getreideanteile des untersuchten Futters zwischen 0 und 100% in der entsprechenden Mischung schwanken und weitere Zutaten (Luzerne, Soja, Öl etc.) in den Futtermitteln enthalten sein können, wurde zusätzlich, um die Variablen in Abhängigkeit

voneinander zu betrachten, eine multiple Regressionsanalyse durchgeführt. Hier zeigte sich, ebenso wie in der einfachen Regressionsanalyse, kein signifikanter Zusammenhang zwischen der Getreidekonzentration und den **OTA**-Werten.

Insgesamt konnten die oben beschriebenen Werte in ihrer Tendenz bestätigt werden. Bei allen untersuchten Toxinen, außer bei **OTA**, konnte ein signifikanter p-Wert aus der Varianzanalyse ermittelt werden, was den Einfluss der Getreide auf die Toxinkonzentrationen bestätigt.

Im Bezug auf die Ergebnisse von **T-2 Toxin/HT-2 Toxin** wurden signifikant negative Regressionskoeffizienten für Weizen ($R = -0,148$, $p < 0,01$) und Mais ($R = -0,0204$, $p < 0,01$) ermittelt, was, nach Entlogarithmieren der Werte zu einem „Weizenabnahmefaktor“ (pro 1% mehr Weizen) von 0,97 und einem „Maisabnahmefaktor“ (pro 1% mehr an Mais) von 0,95 führt. Ähnlich verhält es sich mit den Regressionskoeffizienten der **T-2 Toxin** Ergebnisse (Weizen: $R = -0,0149$, $p < 0,01$; Mais: $R = -0,019$, $p < 0,01$). Der positive Einfluss von Hafer aus der einfachen Regressionsanalyse konnte hier tendenziell bestätigt werden, da er den stärksten positiven Regressionskoeffizienten der beiden Toxine darstellte; er zeigte jedoch keine Signifikanz.

Bei der Prüfung des Zusammenhangs zwischen den **DON**-Ergebnissen und den Getreideanteilen konnte kein signifikanter Zusammenhang nachgewiesen werden. Obwohl keiner der Regressionskoeffizienten signifikant war, zeigte sich dennoch eine Tendenz entsprechend der einfachen Regressionsanalyse. So war der Regressionskoeffizient von Hafer am stärksten negativ und von Mais am deutlichsten positiv.

Bezüglich der **GEA**- Ergebnisse konnten signifikant negative Regressionskoeffizienten für Weizen ($R = -0,0132$, $p = 0,03$), Hafer ($R = -0,0082$, $p = 0,04$) und Mais ($R = -0,00132$, $p < 0,01$) nachgewiesen werden. Für Gerste konnte zwar der am stärksten positive Regressionskoeffizient errechnet werden, welcher aber, im Vergleich zu erster Analyse nicht signifikant war.

Für die Ergebnisse von **ZEA** und **FB₁** wurden für alle Getreide signifikant negative Regressionskoeffizienten nachgewiesen (ZEA: Gerste: $R = -0,0145$, $p < 0,01$; Weizen: $R = -0,0154$, $p < 0,01$; Hafer: $R = -0,0119$, $p < 0,01$; Mais $R = -0,008$, $p = 0,01$. FB₁:

Gerste: $R = -0,0208$, $p < 0,01$; Weizen: $R = -0,0225$, $p = 0,01$; Hafer: $R = -0,0268$, $p < 0,01$; Mais: $R = -0,0117$, $p = 0,02$).

Des Weiteren wurde der Einfluss des **Futtertyps** (Müsli oder Pellet) auf die Mykotoxinkonzentrationen mittels multipler Regressionsanalyse überprüft. Hier zeigte sich nach Entlogarithmieren der Werte eine Zunahme der OTA-, bzw. GEA-Konzentration von Müsli nach Pellet um ca. 200% ($p = 0,05$ für GEA und $p = 0,03$ für OTA). Das heißt, dass die Konzentrationen dieser Toxine in den Pelletproben doppelt so hoch waren, wie in den Müsliproben.

4. DISKUSSION

Aufgrund ihres weltweiten natürlichen Vorkommens (PLACINTA et al., 1999; EFSA, 2004a,b,c; EFSA, 2005a,b; LAUBER et al., 2005) und ihrer vielfältigen toxischen Wirkungsweisen stellen Mykotoxine in Getreide ein Gesundheitsrisiko für Mensch und Tier dar. Daher ist eine routinemäßige Untersuchung von Futter- bzw. Ernteproben zum Schutz des Verbrauchers und zur Erhaltung der Tiergesundheit erforderlich (KELLER et al., 2007; RAFAI et al., 2000). Da für Deutschland bisher keine einschlägigen Untersuchungen von kommerziell hergestelltem Pferdefutter publiziert wurden und Daten aus anderen Ländern eher anekdotischen Charakter haben, sollte in der vorliegenden Arbeit ein erster umfassender Überblick über die Mykotoxinbelastung des auf dem deutschen Markt erhältlichen Pferdefutters erstellt werden. An dieser Stelle sei darauf hingewiesen, dass kommerzielle Fertig-Futtermittel natürlich nur einen Teil der Gesamtdiät von Pferden darstellen und dass prinzipiell alle weiteren Futtermittel auch potentielle Mykotoxinquellen sein können. Hofeigene, lokale Futtermittel sind jedoch sehr variabel und im Hinblick auf die Mykotoxinbelastung kaum repräsentativ beprobbar. Zudem dürfte zumindest im Hinblick auf die in dieser Arbeit interessierenden Mykotoxine die getreidebasierten, kommerziellen Futtermittel die wichtigste Quelle darstellen. Da für Mykotoxine, mit Ausnahme von Aflatoxinen, bezüglich der tolerierbaren Höchstmengen bei Pferdefuttermitteln kaum konkrete Werte existieren, muss bisher im Wesentlichen mit von anderen Spezies abgeleiteten Empfehlungen gearbeitet werden. Hier wäre durch eine bessere Kenntnis der realen Situation ein erster, sinnvoller Ansatzpunkt für eine Erhöhung der Futtermittelsicherheit gegeben.

Aus diesem Grund forderte die Europäische Kommission in ihrer Empfehlung betreffend des Vorhandenseins von Deoxynivalenol, Zearalenon, Ochratoxin A, T-2- und HT-2-Toxin sowie von Fumonisin in zur Verfütterung an Tiere bestimmten Erzeugnissen (Europäische Kommission, 2006) wortwörtlich: *„Die Mitgliedstaaten sollten dafür sorgen, dass die Proben gleichzeitig auf das Vorhandensein von Deoxynivalenol, Zearalenon, Ochratoxin A, Fumonisin B1 + B2 sowie auf T-2- und HT-2-Toxin untersucht werden, damit das Ausmaß des gleichzeitigen Vorkommens bewertet werden kann.“* Bisher wurden allerdings immer noch keine einschlägigen Daten publiziert. Konsequenterweise war exakt dieses Toxinspektrum, plus der in Mitteleuropa bedeutsamen Ergotalkaloide, Gegenstand der vorliegenden Arbeit.

Generell birgt das weitgehende Fehlen von klar definierten Höchstmengen einerseits und das Fehlen von Untersuchungsdaten andererseits auch ein gewisses Risiko, dass Pferdefuttermittel zur Verwertung von – aufgrund beispielsweise hoher Mykotoxinbelastung - anders nicht vermarktbareren Getreiden missbraucht werden könnten. Zwar ist davon auszugehen, dass die Hersteller im Rahmen ihrer Eigenkontrolle Mykotoxinuntersuchungen durchführen, die Ergebnisse (und die Konsequenzen aus diesen Ergebnissen) werden jedoch nicht veröffentlicht. Die Tatsache, dass der Zusatz von sogenannten „Mykotoxinbindern“ (deren Wirkung wissenschaftlich bisher nicht belegt wurde) zu kommerziellen Fertigfuttern durchaus nicht selten ist, könnte auch als Indiz für die Verwendung von hochkontaminierten Rohstoffen bei der Pferdefutterherstellung interpretiert werden.

Eine wesentliche Erkenntnis aus den regelmäßig auftretenden „Futtermittelskandalen“ ist, dass fehlende Kontrollen im Futtermittelbereich immer auch einen Anreiz für unredliches Handeln darstellen. Hierbei ist dann stets die Frage des carry-overs in essbare Gewebe und in Milch und damit die lebensmittelrechtliche Relevanz dieser Situation zu sehen, auch wenn der Anteil der zur Lebensmittelproduktion eingesetzten Pferde an der Gesamtpopulation relativ gering ist.

Mittels EIAs wurden in dieser Arbeit 62 kommerziell hergestellte Pferdefuttermittel von 22 verschiedenen Herstellern auf die Mykotoxine Zearalenon, DON, T-2 Toxin, HT-2 Toxin, FB₁, OTA und Ergotalkaloide untersucht. Die Proben deckten die überwiegende Mehrzahl der überregional verfügbaren Produkte ab, so dass davon ausgegangen wurde, dass das Probenmaterial repräsentativ für den Deutschen Markt der Jahre 2007 und 2008 war.

Alle 62 untersuchten Proben zeigten positive Ergebnisse für T-2 Toxin, T-2 Toxin/HT-2 Toxin und DON. Zearalenon konnte in 61 Proben und FB₁ in 58 Proben nachgewiesen werden. Ergotalkaloide wurden in 38 und OTA in 26 der untersuchten Futterproben nachgewiesen. Eine Kontamination mit allen in die Untersuchung einbezogenen Mykotoxinen zeigte sich bei 20 Proben. Das heißt, eine Multimykotoxin-Belastung von Pferdefutter stellt eher die Regel als die Ausnahme dar.

Das häufige Vorkommen der Mykotoxine und die Co-Kontamination der Futterproben durch mehrere Mykotoxine ist auf die Mischung unterschiedlicher Getreidesorten im Pferdefutter und die niedrigen Nachweisgrenzen der in dieser Studie verwendeten EIA zurückzuführen. Die Co-Kontamination des Futters und die Korrelation der einzelnen Toxine untereinander sind mit Angaben aus der Literatur vergleichbar (PLACINTA et al., 1999; RAFAI et al., 2000). So konnte eine signifikant positive Korrelation zwischen der Zearalenonkonzentration und der DON-Konzentration sowie der Zearalenonkonzentration und der FB₁-Konzentration nachgewiesen werden. Des Weiteren wurde eine signifikant negative Korrelation zwischen der T-2 Toxin/HT-2 Toxin-Konzentration und der DON-Konzentration nachgewiesen, was durch das, im Gegensatz zu DON, vermehrte Vorkommen von T-2 Toxin/HT-2 Toxin auf Hafer zu erklären ist. Die signifikant positive Korrelation zwischen den T-2 Toxin/HT-2 Toxin- und den Ergotalkaloidkonzentrationen lässt sich jedoch nicht eindeutig erklären. Erstaunlich ist, dass Ergotalkaloide gemäß Angaben aus der Literatur (EFSA, 2005a) sehr selten auf Hafer vorkommen, wohingegen T-2 Toxin/HT-2 Toxin sehr häufig auf Hafer nachgewiesen wurde (JECFA, 2001; BAUER, 1995). Eine Erklärung für das gemeinsame Vorkommen dieser Toxine könnte ihr gemeinsames Vorkommen auf Gerste sein. In dieser Studie wurde mittels einfacher Regressionsanalyse ein signifikant positiver Zusammenhang zwischen Gerstekonzentration und Ergotalkaloidergebnis nachgewiesen. Es wurde zwar kein signifikanter Zusammenhang zwischen Gerstekonzentration und T-2 Toxin/HT-2 Toxin-Ergebnis festgestellt, allerdings wiesen die Proben mit den zweit- und dritthöchsten T-2 Toxin/HT-2 Toxinergebnissen einen hohen Gersteanteil auf. Darüber hinaus decken sich höhere T-2 Toxin/HT-2 Toxin-Konzentrationen auf Gerste mit vorausgegangenen Untersuchungen (GREENWAY und PULS, 1976; PLACINTA, 1999).

Bei einer futtermittelrechtlichen Betrachtung der durchschnittlichen und maximalen Mykotoxingehalte im Pferdefutter ergibt sich ein im Wesentlichen erfreuliches Bild. Tatsächlich lagen die in Pferdefutter gefundenen Toxingehalte zumeist sogar unterhalb der gesetzlichen Grenzwerte für Lebensmittelgetreide.

Gemäß Verordnung (EG) Nr. 1881/2006 der Kommission zur Festsetzung der Höchstgehalte für bestimmte Kontaminanten in Lebensmitteln (EUROPÄISCHE UNION, 2006), zuletzt geändert durch Verordnung (EG) Nr. 1126/2007 (EUROPÄISCHE UNION, 2007), gilt für DON in unverarbeitetem Mais, Hafer und Hartweizen ein Grenzwert von

1750 µg/kg. Dieser Lebensmittelgrenzwert wurde in nur zwei Pferdefuttermitteln (4860 µg/kg und 2200 µg/kg) überschritten, wobei es sich jeweils um reine Maisproben handelte. Darüber hinaus lagen bei 57 der 62 Futterproben die DON-Gehalte unterhalb von 750 µg/kg. Dieser Wert wird in oben genannter Verordnung als Grenzwert für „zum unmittelbaren menschlichen Verzehr bestimmtes Getreide, Getreidemehl (einschließlich Maisschrot, Maismehl und Maisgrits) sowie als Enderzeugnis zum unmittelbaren menschlichen Verzehr vermarktete Kleie und Keime“ angegeben.

Die von der EU empfohlenen Richtwerte (EUROPÄISCHE KOMMISSION, 2006) betreffend das Vorhandensein von DON in zur Verfütterung an Tiere bestimmten Erzeugnissen (siehe Tabelle 9) werden für Ergänzungs- und Alleinfuttermittel (5 mg/kg Futtermittel) von keiner Probe überschritten. Ein eigener Richtwert für DON in Pferdefutter wurde von der Kommission nicht vorgeschlagen, möglicherweise auch aus Mangel an konkreten toxikologischen Daten.

Bei der toxischen Wirkung von DON wurden große tierartliche Unterschiede festgestellt. Das Schwein stellt nach derzeitigem Kenntnisstand die empfindlichste Spezies dar (EFSA, 2004a). Aus diesem Grund wurde für Ergänzungs- und Alleinfuttermittel für Schweine ein Richtwert von 0,9 mg/kg Futtermittel vorgeschlagen. Auch dieser Wert wurde in nur drei Pferdefutterproben überschritten (4860 µg/kg, 2200 µg/kg und 1120 µg/kg). Damit lag die DON-Belastung des untersuchten Pferdefutters deutlich unter den vorgegebenen Empfehlungswerten für Futtermittel, sie wies in diesem Kriterium sogar nahezu „lebensmitteltaugliche“ Qualität auf.

Ob die Toxingehalte im Futter beim Pferd zu einer Erkrankung führen, hängt zum einen von der Belastung des Futters, zum anderen von der aufgenommenen Futtermenge ab. Die Angaben zur täglichen Futtermenge des kommerziell erhältlichen Pferdefutters schwanken in Abhängigkeit von der Nutzung und der zu erbringenden Leistung des Pferdes stark (ca. 1-5 kg Futter pro Tag). Als grober Richtwert kann von einer Menge von 0,5-1 kg/100 kg Körpergewicht und Tag ausgegangen werden. Im Folgenden ist eine Beispielrechnung für ein 500 kg schweres Warmblutpferd mit mittlerer sportlicher Leistung und einer Futtermenge von 2,5 kg/Tag dargestellt.

Der Mittelwert der DON-Belastung des in dieser Studie untersuchten Pferdefutters lag bei 410 µg/kg, der Maximalwert bei 4860 µg/kg. Bei einer Futteraufnahme von 2,5 kg/Tag würde also im Durchschnitt ca. 1 mg bzw. als Maximalwert ca. 12 mg DON je Tag aufgenommen, entsprechend einer gewichtsbezogenen Aufnahme von ca. 2 µg (Mittelwert) bis 24 µg (Maximalwert) DON je kg Körpergewicht. Damit bewegt sich die mittlere Aufnahme im Bereich der tolerierbaren Tagesaufnahme von DON beim Menschen (1 µg/kg Körpergewicht und Tag), die Maximalaufnahme liegt deutlich darüber.

JOHNSON et al. (1997) fütterten 2,72 kg Gerste pro Tag mit einem DON-Gehalt von 36000-44000 µg/kg über 40 Tage, was einer täglichen Aufnahme von bis zu rund 120 mg DON pro Pferd entspricht. Diese DON-Konzentration liegt deutlich über den in den eigenen Untersuchungen für dieses Toxin gemessenen Werten. Die Autoren konnten keine Veränderungen des Verhaltens und der Futteraufnahme feststellen. Auch beim weißen und roten Blutbild sowie bei einigen Leber- oder Nierenparametern und den IgG/IgA-Werte stellten sie keine Veränderungen fest.

Im Gegensatz zu den Befunden von JOHNSON et al. (1997) stellten RAYMOND et al. (2003) in einer ähnlichen Studie durchaus Wirkungen von Fusarientoxinen beim Pferd fest. Diese Autoren verfütterten ein Gemisch aus 15000 µg/kg DON, 800 µg/kg 15-Acetyldeoxynivalenol, 9700 µg/kg Fusarinsäure (Fusaric acid, FA) und 2000 µg/kg Zearalenon (2,8 kg des Futters zusammen mit 5 kg Heu) über 21 Tage an neun adulte, untrainierte Stuten, was einer DON-Aufnahme von 42 mg/Pferd pro Tag entsprach. Die Autoren beobachteten eine reduzierte Futteraufnahme. Darüber hinaus wurden, bis auf einen Anstieg der Gamma-Glutamyltransferase (γ -GT) in den ersten zwei Wochen, welcher am 21. Tag jedoch nicht mehr zu beobachten war, auch hier keine Veränderungen der Immunglobuline oder anderer Blutparameter festgestellt. Die Abnahme der Futteraufnahme führen die Autoren auf den synergistischen Effekt der in der Studie gefütterten Mykotoxine zurück.

Obwohl die in der Studie von RAYMOND et al. (2003) verfütterten Toxinmengen deutlich über den in der eigenen Arbeit festgestellten DON-Konzentrationen lag, sei darauf hingewiesen, dass alle untersuchten Proben ein Gemisch aus verschiedenen Mykotoxinen enthielten und in 20 Proben sogar alle sieben untersuchten Mykotoxine gefunden wurden. Auch wenn negative Auswirkungen der festgestellten DON-Belastung der Futtermittel auf

die Gesundheit von Pferden insgesamt eher nicht zu erwarten sind, können synergistische Wirkungen nicht ausgeschlossen werden. Interessant wäre zudem die Klärung eines möglichen Einflusses einer chronischen DON-Aufnahme auf die Gesundheit der Pferde.

Auch im Hinblick auf die Zearalenonergebnisse konnte bei dem untersuchten Pferdefutter nahezu Lebensmittelqualität nachgewiesen werden. So wurde der ZEA-Grenzwert für unverarbeiteten Mais von 350 µg/kg nach Verordnung (EUROPÄISCHE GEMEINSCHAFT, 2007) in keiner Probe überschritten, nur in 14 Proben (Maximalwert 312 µg/kg) wurden Gehalte über dem Grenzwert für unverarbeitetes Getreide sowie für den unmittelbaren menschlichen Verzehr bestimmten Mais, Snacks und Frühstückscerealien auf Maisbasis von 100 µg/kg festgestellt.

Für Zearalenon existiert kein Richt- oder Grenzwert für Pferdefutter. Alle gemessenen Zearalenonwerte der untersuchten Proben lagen jedoch deutlich unterhalb der in der Empfehlung der Kommission (2006/576/EG) angegebenen Werte für Getreide, Getreideerzeugnisse (2 mg/kg) und Maisnebenprodukte (3 mg/kg). Darüber hinaus wurde der Richtwert für Ergänzungs- und Mischfuttermittel für Sauen und Mastschweine (0,25 mg/kg) von nur 3 Proben überschritten (312 µg/kg, 303 µg/kg und 285 µg/kg). Ähnlich wie bei DON gilt das Schwein auch im Hinblick auf eine Zearalenonintoxikation als die empfindlichste Tierart unter den Haustieren (ZÖLLNER et al., 2002).

Die mittlere Belastung des in dieser Studie untersuchten Pferdefutters lag bei 78 µg/kg, der Maximalwert betrug 312 µg/kg. Bei einer täglichen Futteraufnahme von 2,5 kg würde ein Pferd eine Zearalenonmenge von 195 µg bzw. maximal 780 µg aufnehmen. Dies entspricht bei einem Pferd mit einem Gewicht von 500 kg einer täglichen Toxinaufnahme von durchschnittlich 0,39 µg bis maximal 1,56 µg/kg Körpergewicht.

Im Vergleich mit den Zearalenonkonzentrationen, die bei verschiedenen klinischen Studien an Pferde verabreicht wurden, sind die in dieser Studie gemessenen Zearalenonwerte deutlich niedriger. JUHÁSZ et al. (2001) konnten nach Verabreichung von 7000 µg Zearalenon an Traberstuten über 10 Tage keinerlei Veränderungen feststellen. AURICH et al. (2006) konnten bei einem Fütterungsversuch mit natürlich kontaminiertem Material (3000 µg Zearalenon sowie 36000 µg DON je Pferd und Tag) über fünf Rossezyklen als einzige Veränderung eine Steigerung hämorrhagischer Gelbkörper bzw. Follikel

nachweisen. GIMENO und QUINTANILLA (1983) beobachteten bei Zearalenonkonzentrationen im Futter von 2600 µg/kg verschiedene Symptome, wie Futterverweigerung, Ödeme der Vulva, Vaginalprolaps, Vergrößerung des Uterus und innere Blutungen. Zumindest die Futterverweigerung dürfte jedoch eher auf DON als auf Zearalenon zurückzuführen sein.

Für T-2 Toxin/HT-2 Toxin existieren zurzeit keine Grenz- oder Richtwerte. Aufgrund der stärkeren Toxizität dieser Toxine im Vergleich zu DON (VISCANTI et al., 2005; ROCHA et al., 2005) kann bei der Bewertung der vorliegenden Daten als grober Anhaltspunkt die Erfordernis eines rund 20-fach niedrigeren Richtwerts konstatiert werden.

Unter Berücksichtigung des empfohlenen Richtwertes für DON von 5 mg/kg für Ergänzungs- und Alleinfuttermittel gemäß der Empfehlung der Kommission (2006/576/EG) würde als grober Richtwert für die T-2 Toxin/HT-2 Toxin-Kontamination dieses Futters ein Richtwert von rund 250 µg/kg gelten. Alle in dieser Studie untersuchten Proben lagen unterhalb dieses Wertes (Mittelwert: 38 µg/kg, Maximalwert: 228 µg/kg). Beim Vergleich des spezifischen T-2 Toxin-EIA mit dem gruppenspezifischen T-2 Toxin/HT-2 Toxin-EIA wird deutlich, dass das HT-2 Toxin in dem untersuchten Probenmaterial den Gesamtoxingehalt dominierte. Das Verhältnis der beiden Toxine untereinander wies jedoch eine große Variabilität auf, so dass nur näherungsweise von einem Quotienten der Gehalte von T-2 Toxin : HT-2 Toxin entsprechend 1 : 2,2 gesprochen werden kann.

Die mittlere Belastung des in dieser Studie untersuchten Pferdefutters lag bei dem gruppenspezifischen T-2 Toxin/HT-2 Toxin-EIA bei 38 µg/kg, der Maximalwert bei 228 µg/kg. Bei einer täglichen Futteraufnahme von 2,5 kg würde ein Pferd eine T-2 Toxin/HT-2 Toxinmenge von 95 µg bzw. maximal 570 µg aufnehmen. Diese entspricht bei einem Pferd mit einem Gewicht von 500 kg einer Toxinaufnahme von 0,19 µg/kg KG bzw. 1,14 µg/kg KG pro Tag.

Klinische Studien zur Wirkung von T-2 Toxin/HT-2 Toxin bei Pferden sind selten. GREENWAY und PULS (1976) beschreiben Krankheitsfälle von Pferden nach Fütterung von Gerste mit einem Gehalt an T-2 Toxin von 25000 µg/kg, deutlich höher als die in den eigenen Untersuchungen gemessenen Werte für diese Toxine. JUHÁSZ et al. (1997)

fütterten sechs Traberstuten mit einem mit T-2 Toxin kontaminierten Futter in einer Konzentration von 7000 µg/Tag über 40 Tage. Drei der sechs Stuten zeigten Schleimhautveränderungen im Mundbereich, weitere Veränderungen wurden nicht nachgewiesen. Auch diese T-2 Toxinkonzentration lagen deutlich über den in der vorliegenden Arbeit gemessenen Werten.

FB₁ ist das einzige Mykotoxin, für das in der Empfehlung der Europäischen Kommission (EUROPÄISCHE KOMMISSION, 2006) ein spezifischer Richtwert für Ergänzungs- und Alleinfuttermittel für Pferde vorgeschlagen wird (5 mg/kg). Dieser Wert wurde in den eigenen Untersuchungen von keiner Pferdefutterprobe überschritten. Unter Berücksichtigung der Verordnung (EG) 1126/2007 (EUROPÄISCHE UNION, 2007) kann auch im Hinblick auf FB₁ von einer nahezu „lebensmitteltauglichen“ Qualität des Pferdefutters gesprochen werden. So wurde der Fumonisin-Grenzwert von 4000 µg/kg für unverarbeiteten Mais für Lebensmittelzwecke in keiner Probe überschritten (Maximalwert: 2190 µg/kg). Von den 62 untersuchten Proben lagen 61 unterhalb von 800 µg/kg und unterschritten damit auch den Grenzwert für zum unmittelbaren menschlichen Verzehr bestimmten Mais (1000 µg/kg) und den Grenzwert für Frühstückscerealien und Snacks auf Maisbasis (800 µg/kg).

Der Maximalwert des in dieser Studie untersuchten Futters lag bei 2190 µg FB₁/kg Futtermittel, die mittlere Belastung bei 101 µg/kg. Da es sich bei dem Maximalwert um einen Ausreißerwert handelte, der bei einer reinen Maisprobe gemessen wurde, soll darauf hingewiesen werden, dass der Medianwert der FB₁-Ergebnisse bei lediglich 27 µg/kg lag.

Bei einer täglichen Futteraufnahme von 2,5 kg würde ein Pferd eine FB₁- Toxinmenge von ca. 250 µg (Mittelwert) bzw. 5500 µg (Maximalwert) aufnehmen. Dies entspricht bei einem Pferd mit einem Gewicht von 500 kg einer Toxinaufnahme von 0,5 µg FB₁/kg Körpergewicht (Mittelwert) bzw. 10,9 µg FB₁/kg Körpergewicht (Maximalwert) pro Tag.

Beim Vergleich dieser Ergebnisse mit den in der Literatur angegebenen FB₁-Konzentrationen, die zu einem erhöhten Risiko einer Erkrankung an equiner Leukoenzephalomalazie (ELEM) führten, wird deutlich, dass von den untersuchten kommerziell erhältlichen Pferdefutterproben kein erhöhtes ELEM-Risiko ausgeht.

WILSON et al. (1992) fütterten 65 µg FB₁/kg KG/Tag über 122 Tage, gefolgt von 130 µg FB₁/kg KG/Tag über 58 Tage an Ponies und konnten mit dieser Dosis klinische und pathologisch nachweisbare ELEM-Symptome auslösen.

Die EFSA 2005b beschreibt ein erhöhtes ELEM-Risiko ab Konzentrationen von 200 µg FB₁/kg KG/Tag (LOAEL) und geht davon aus, dass orale Konzentrationen von < 120 µg FB₁/kg KG/Tag kein erhöhtes ELEM-Risiko befürchten lassen. Somit liegt selbst der in dieser Studie gemessene Maximalwert von 10,9 µg FB₁/kg KG/Tag eine Zehnerpotenz unter der Konzentration, von der kein erhöhtes ELEM-Risiko mehr zu erwarten ist. Würde hier von einem Hochleistungspferd mit 5 kg Futteraufnahme pro Tag ausgegangen werden, so würde die aufgenommene FB₁-Dosis von 0,02 µg/kg KG/Tag ebenfalls deutlich unter diesem Wert liegen.

OTA wurde nur in 26 der untersuchten Futterproben nachgewiesen und ist somit das in dieser Untersuchung am „seltensten“ vorkommende Mykotoxin. Ein Richtwert speziell für Pferdefutter wird in der Empfehlung der Kommission (2006/576/EG) nicht vorgeschlagen. Alle Untersuchungsergebnisse liegen aber unterhalb der Richtwerte für Getreide und Getreideerzeugnisse (0,25 mg/kg) sowie Ergänzungs- und Alleinfuttermittel für Schweine (0,05 mg/kg). Das Schwein gilt als die empfindlichste Spezies in Bezug auf die Symptome einer OTA-Intoxikation (EFSA, 2004c). Darüber hinaus wird der in der Verordnung (EG) 1881/2006 angegebene Grenzwert für unverarbeitetes Getreide von 5 µg/kg ebenfalls von keiner der Proben überschritten und es liegt nur ein Probenergebnis (4,1 µg/kg) oberhalb des Grenzwertes für „aus unverarbeitetem Getreide gewonnene Erzeugnisse, einschließlich verarbeitete Getreideerzeugnisse und zum unmittelbaren menschlichen Verzehr bestimmtes Getreide [...]“ (3 µg/kg). Somit erreicht das untersuchte Pferdefutter auch in Bezug auf OTA nahezu Lebensmittelqualität.

Die mittlere Belastung des in dieser Studie untersuchten Pferdefutters lag bei 0,66 µg/kg. Der Maximalwert betrug 4,12 µg/kg. Bei einer täglichen Futteraufnahme von 2,5 kg würde ein Pferd eine OTA-Menge von 1,65 µg bzw. maximal 10,3 µg aufnehmen. Diese entspricht bei einem Pferd mit einem Gewicht von 500 kg einer Toxinaufnahme von 0,003 µg/kg KG bzw. 0,02 µg/kg KG pro Tag.

Da beim Verfassen dieser Arbeit keine Ergebnisse klinischer OTA-Fütterungsstudien bei Pferden vorlagen, kann über die Wirkung der OTA-Ergebnisse nur gemutmaßt werden. Nach Einschätzung der EFSA (2004c) sind Schweine gegenüber OTA sehr empfindlich, während Wiederkäuer eher unempfindlich sind. Pferde würden also aufgrund ihres Verdauungstraktes (pflanzenfressender Monogastrier) möglicherweise eine „mittlere Empfindlichkeitsstufe“ zwischen den beiden anderen Tierarten einnehmen. Da die in den eigenen Untersuchungen gefundenen OTA-Konzentrationen im Pferdefutter deutlich unter den Richtwerten von Schweinefutter liegen, könnte daher davon ausgegangen werden, dass keine Gesundheitsrisiken zu erwarten sind. Es sei jedoch darauf hingewiesen, dass aufgrund der schlechten Datenlage in Bezug auf OTA-Intoxikationen bei Pferden eine Schädigung der Pferdegesundheit durch eine eventuell vorliegende Langzeitexposition nicht ausgeschlossen werden kann.

Die Untersuchung auf Ergotalkaloide erfolgte mit einem gruppenspezifischen „Generic Ergot Alkaloid (GEA)“-EIA. Ziel dieser Untersuchung war nicht der Nachweis von Einzeltoxinen, sondern vielmehr der Überblick über die Gesamtergotalkaloidbelastung des Pferdefutters, da natürlich kontaminiertes Probenmaterial stets eine Mischung mehrerer Ergotalkaloide enthält. Da diese Toxine hinsichtlich ihrer kompetitiven Eigenschaften im EIA additiv wirken, können somit mehrere Ergotalkaloide in Konzentrationen von jeweils unterhalb ihrer individuellen Erfassbarkeit dennoch in ihrer Summe ein deutlich positives Messergebnis liefern (CURTUI et al., 2007). Der in dieser Studie verwendete GEA-EIA ist aufgrund der Alkaloidzusammensetzung des Toxinstandards (Ergometrin, Ergotamin, Ergocristin, im Verhältnis 1:10:14) in Verbindung mit den Immunreagenzien für Ergometrin in der Lage, 14 verschiedene Ergotalkaloide zu erfassen (Ergometrin, Ergotamin, Ergocristin, α -Ergocryptin, β -Ergocryptin, Ergocornin, Ergosin sowie die sieben korrespondierenden -inin Isomere). Darüber hinaus konnten CURTUI et al. (2007) anhand der experimentell ermittelten Kreuzreaktivitäten auf die wahrscheinliche Kreuzreaktivität weiterer Ergotalkaloide schließen, deren Toxinstandards nicht zur Verfügung standen. Dies betrifft u. a. auch Ergovalin. Für Ergovalin wurde im Testsystem unter Verwendung von Antikörpern gegen Ergometrin eine wahrscheinliche Kreuzreaktivität von $> 2,1\%$ ermittelt. Das heißt, dass bei dem in dieser Studie verwendeten EIA Ergovalin relativ nicht sehr sensitiv erfasst werden konnte, was allerdings aufgrund des insgesamt sehr hohen Empfindlichkeitsniveaus immer noch auf eine Nachweisgrenze von rund $30 \mu\text{g}/\text{kg}$ hinausläuft.

Die am häufigsten und normalerweise am höchsten mit Ergotalkaloiden belastete Getreideart ist der Roggen, jedoch können durchaus auch andere Getreidearten vom Mutterkorn befallen sein. Obwohl in den untersuchten Pferdefutterproben kein Roggen enthalten war, konnten Ergotalkaloide dennoch relativ häufig nachgewiesen werden. So wurden in 38 Futterproben Ergotalkaloidgehalte gemessen, welche im Mittel bei 144 µg/kg lagen, der Maximalwert betrug 1200 µg/kg. Bei einer täglichen Futteraufnahme von 2,5 kg würde ein Pferd eine Gesamtergotalkaloid-Menge von im Mittel 360 µg bzw. maximal ca. 3000 µg aufnehmen. Diese entspricht bei einem Pferd mit einem Gewicht von 500 kg einer Toxinaufnahme von 0,72 µg/kg KG bzw. 6 µg/kg KG pro Tag. Dies liegt deutlich unter einer Alkaloid-Aufnahme, bei der eine akute Intoxikation mit deutlicher klinischer Symptomatik zu erwarten ist. Allerdings sind die diesbezüglichen Angaben in der Literatur teilweise recht ungenau und widersprüchlich.

In einem historischen Bericht schildert LORINSER (1824) Versuche, „die in der Thierarzneischule in Berlin auf Veranlassung der Medicinalbehörde im Jahre 1822 angestellt wurden“, um die Wirkung von Mutterkorn auf Mensch und Tier zu prüfen. Im Rahmen dieser Versuche wurden einem Pferd 12 Unzen (ca. 350 g; 1 Unze = ca. 30 g) Mutterkorn - über mehrere Tage verteilt - verabreicht, was bei einem angenommenen Ergotalkaloidgehalt von 0,2% einer Ergotalkaloid-Dosis von 700 mg entsprechen würde, also vermutlich mehr als 1 mg/kg Körpergewicht. Das Tier zeigte Senken des Kopfes, Erweiterung der Pupille, verminderten Puls, reduzierte Fresslust und wankenden Gang. Es erholte sich aber nach einigen Tagen wieder.

Ergotalkaloidintoxikationen beim Pferd treten heute vor allem nach Aufnahme von Weidegräsern auf, welche mit den endophytisch lebenden *Neotyphodium spp.* infiziert sind (FAYRER-HOSKEN et al., 2008; LEZICA et al., 2009). In diesem Fall stellt Ergovalin das am häufigsten nachgewiesene Ergotalkaloid dar. Hierbei soll darauf hingewiesen werden, dass nicht geklärt ist, ob Ergovalin alleine zu den beim Pferd beobachteten Symptomen führt (FAYRER-HOSKEN et al., 2008). Studien zu Intoxikationen mit anderen Ergotalkaloiden bei Pferden sind selten. In einem *in vitro* Experiment an equinem arterio-venösem Gewebe zeigten ABNEY et al. (1993) einen vasokonstriktiven Effekt von Ergometrin und Ergovalin. Die Autoren schlussfolgern aus diesen Ergebnissen, dass es durch die Gefäßverengungen und den dadurch entstehenden verminderten Blutfluss zu chronischen Huf- und Gliedmaßenstörungen kommen kann. Aufgrund dieser Ergebnisse

sollte eine chronische Ergotalkaloidintoxikation gerade bei unklaren Hufrehefällen als Ursache mit in Betracht gezogen werden.

Ergotalkaloid-Fütterungsstudien bei Pferden wurden teilweise ohne Angabe der genauen Toxinkonzentration durchgeführt, insbesondere wenn „mit Endophyten infiziertes“ Gras verfüttert wurde (VIVRETTE et al., 2001; YOUNGBLOOD et al., 2004). Die EFSA (2005a) gibt als kritische Ergovalinkonzentrationen 50-100 µg/kg bei Stuten an. Allerdings konnten WEBB et al. (2008) selbst nach Fütterung von Gras/Heu mit Ergotalkaloidkonzentrationen von $1995 \pm 241,5$ ng/g keine Veränderungen der Thermoregulation und der Rekonvaleszenzzeit bei Pferden feststellen.

Da in den eigenen Untersuchungen nur ein gruppenspezifischer Ergotalkaloidnachweis durchgeführt wurde, ist ein Vergleich mit den unterschiedlichen Daten aus Literaturangaben schwierig. In Anlehnung an die Ergovalin-Bewertung der EFSA (2005a) liegen die hier gemessenen Ergotalkaloidwerte durchaus in einem als kritisch anzusehenden Bereich.

Die gesetzlichen Grenzwerte für Ergotalkaloide in Futtermitteln beziehen sich nicht auf einen konkreten Toxingehalt, sondern sind lediglich indirekt über den tolerierten Mutterkornanteil im Getreide bzw. Futtermittel definiert. Da durch den Transport des Getreides die Mutterkörner zerbrechen können und die Ergotalkaloide auch im sogenannten Mutterkornstaub vorhanden sein können, wären genaue Alkaloidricht- bzw. Alkaloidgrenzwerte zum Schutz des Verbrauchers und zur Erhaltung der Tiergesundheit erforderlich.

Gemäß Angaben aus der Literatur in Bezug auf das Vorkommen verschiedener Mykotoxine auf Getreide sind Mais und Weizen die hauptsächlichen Wirtspflanzen der Zearalenon-produzierenden bzw. DON-produzierenden Fusarienspezies. Fumonisine werden vorrangig auf Mais (BACON und NELSON, 1994) und T-2 Toxin und HT-2 Toxin fast ausschließlich auf Hafer nachgewiesen (BAUER, 1995). Innerhalb Europas wurde vor allem für Hafer eine hohe Belastung von T-2 Toxin/HT-2 Toxin (>20%) festgestellt, während für Mais, Weizen und Roggen seltener T-2 Toxin/HT-2 Toxin-positive Befunde gemeldet wurden (JECFA, 2001).

Bei verschiedenen Untersuchungen von Futtermitteln wurde OTA am häufigsten in Getreide (Roggen, Gerste, Mais und Weizen) und seltener in Erdnüssen oder Sojabohnen nachgewiesen. Die Toxinbildung erfolgt gewöhnlich während der Lagerung (EFSA, 2004c).

Die Toxinbelastung des Getreides mit Ergotalkaloiden stellt sich in absteigender Reihenfolge wie folgt dar: Hybrid-Roggen > Roggen > Triticale > Hartweizen, Mais > Weizen, Gerste > Hafer. Neben den kommerziell angebauten Getreidearten stellen Gräser das natürliche Reservoir der Pilze dar (EFSA, 2005a). CURTUI et al. (2007) konnten darüber hinaus auch eine Ergotalkaloidbelastung von Dinkel nachweisen. Diese befindet sich auf ähnlichem Niveau wie bei Weizen.

Das in der Literatur beschriebene Vorkommen der Toxine auf den entsprechenden Getreidearten ist mit den in dieser Arbeit erzielten Ergebnissen vergleichbar. So wurde der höchste T-2/HT-2 Toxingehalt in einer reinen Haferprobe, die drei höchsten DON-Gehalte in reinen Maisproben, der höchste Zearalenongehalt in einer Probe mit hohem Maisanteil und der höchste FB₁-Wert in einer reinen Maisprobe gemessen. Für OTA konnte kein eindeutiger Zusammenhang zwischen dem Getreide und der Toxinbelastung gefunden werden. Der höchste OTA-Wert wurde in einem Mischfutter mit relativ hohem Mais- und Gersteanteil gemessen. Im Gegensatz zu der in der Literatur beschriebenen Ergotalkaloidbelastung des Roggens wurde in dieser Studie eine relativ hohe Ergotalkaloidbelastung von gerstehaltigem Futtermittel nachgewiesen.

Um den Einfluss des Getreides auf die Toxinbelastung des Pferdefutters genauer zu untersuchen, wurden verschiedene Berechnungen durchgeführt. So zeigte sich in der einfachen Regressionsanalyse, dass die Haferkonzentration einen signifikant positiven Einfluss auf das T-2 Toxin/HT-2 Toxin-Ergebnis und einen signifikant negativen Einfluss auf das DON- und FB₁-Ergebnis des untersuchten Pferdefutters hat. Im Gegensatz dazu hat Mais einen signifikant positiven Einfluss auf die DON-Konzentration und einen signifikant negativen Einfluss auf die T-2 Toxin/HT-2 Toxin-Konzentration sowie auf die Ergotalkaloidkonzentration. Wie bereits oben beschrieben, konnte, im Gegensatz zu anderen Literaturangaben, ein signifikant positiver Einfluss von Gerste auf das Ergebnis der Ergotalkaloidkonzentration ermittelt werden. Darüber hinaus hatte Gerste einen signifikant negativen Einfluss auf die Zearalenonkonzentration der Pferdefutterproben.

Weizen konnte in dieser Studie kein signifikanter Einfluss auf eines der Toxinergebnisse nachgewiesen werden. Des Weiteren konnte auch kein signifikanter Einfluss einer Getreideart auf die OTA-Konzentration gefunden werden.

Da die Getreideanteile des untersuchten Futters zwischen 0 und 100% in der entsprechenden Mischung schwanken und weitere Zutaten (Luzerne, Soja, Öl etc.) in den Futtermitteln enthalten sein können, wurde zusätzlich, um die Variablen in Abhängigkeit voneinander zu betrachten, eine multiple Regressionsanalyse durchgeführt. Hier zeigte sich, ebenso wie in der einfachen Regressionsanalyse, kein signifikanter Zusammenhang zwischen der Getreidekonzentration und den OTA-Werten.

Insgesamt konnten die oben beschriebenen Werte in ihrer Tendenz bestätigt werden. Bei allen untersuchten Toxinen, außer bei OTA, konnte ein signifikanter p-Wert aus der Varianzanalyse ermittelt werden, was den Einfluss des Getreides auf die Toxinkonzentrationen bestätigt.

In Bezug auf die Ergebnisse von T-2 Toxin und HT-2 Toxin wurden signifikant negative Regressionskoeffizienten für Weizen und Mais ermittelt. Der positive Einfluss von Hafer aus der einfachen Regressionsanalyse konnte hier tendenziell bestätigt werden, da er den stärksten positiven Regressionskoeffizienten der beiden Toxine darstellte, zeigte jedoch keine Signifikanz.

Bei der Zusammenhangsprüfung zwischen den DON-Ergebnissen und den Getreideanteilen konnte kein signifikanter Zusammenhang nachgewiesen werden. Obwohl keiner der Regressionskoeffizienten signifikant war, zeigte sich dennoch eine Tendenz entsprechend der einfachen Regressionsanalyse. So war der Regressionskoeffizient von Hafer am stärksten negativ und von Mais am deutlichsten positiv.

Bezüglich der Ergotalkaloid-Ergebnisse wurden signifikant negative Regressionskoeffizienten für Weizen, Hafer und Mais nachgewiesen werden. Für Gerste konnte zwar der am stärksten positive Regressionskoeffizient errechnet werden, dieser war aber, im Vergleich zu erster Analyse, nicht signifikant.

Für die Ergebnisse von ZEA und FB₁ wurden für alle Getreide signifikant negative Regressionskoeffizienten nachgewiesen, was in letzter Konsequenz auf einen starken Eintrag dieser Mykotoxine durch andere Inhaltsstoffe als Getreide, wie z. B. Luzerne, Soja o. ä., hindeuten würde.

Einschränkend ist bezüglich der praktischen Aussagekraft einer rein statistischen Betrachtungsweise der Beziehung zwischen Getreidezutat und Mykotoxingehalt zu bedenken, dass zumindest in einzelnen Fällen bei der Herstellung der Rezeptur gezielt Getreidezutaten mit hoher und niedriger Toxinbelastung miteinander vermischt und verarbeitet worden sein könnten. Beispielsweise wäre es denkbar, dass bei bekannt hohen Gehalten an DON in einer bestimmten Charge von Weizen oder Mais ein relativ niedriger Anteil beigemischt wurde, während weniger stark belastete Chargen von Weizen oder Mais dem Futtermittel in höhern Anteilen beigemischt worden sein könnte. Dadurch würde letztlich der – völlig falsche - Eindruck entstehen, dass Weizen oder Mais keine wichtige Quelle für DON darstellen. Da die Streuung der DON-Belastung verschiedener Weizenchargen durchaus zwischen <0,01 mg/kg und >10 mg/kg liegen kann, kann dieser Unterschied (Faktor >1000) die möglichen Unterschiede in den relativen Gewichtsanteilen (0-100%) im Mischfuttermittel völlig überlagern. Solange also die Möglichkeit einer Untermischung kleiner Anteile „schlechter Chargen“ nicht ausgeschlossen werden kann, sind Getreide-Toxin-Korrelationen stets sehr vorsichtig zu interpretieren.

Darüber hinaus muss die statistische Auswertung in Bezug auf den Einfluss der Inhaltsstoffe auf die Mykotoxinbelastung des untersuchten Pferdefutters aus einem weiteren Grund vorsichtig interpretiert werden. Gemäß der Futtermittelverordnung in der Fassung vom 24.05.2007, zuletzt geändert 15.12.2008, wird in § 13 festgelegt, dass „bei Mischfuttermitteln für Nutztiere die Einzelfuttermittel [...] in vom Hundert in der absteigenden Reihenfolge ihrer Gewichtsanteile“ angegeben werden müssen. Des Weiteren darf gemäß § 13 die tatsächliche Zusammensetzung der Einzelfutter eines Mischfuttermittels für Nutztiere bis zu 15% vom tatsächlichen Gehalt des jeweiligen Einzelfuttermittels abweichen. Das heißt, dass die in dieser Studie verwendeten Zahlen zum prozentualen Getreideanteil des Futters nur näherungsweise die tatsächliche Zusammensetzung wiedergeben. Die seit dem 01.09.2010 gültige Verordnung (EG) 767/2009 über das Inverkehrbringen und die Verwendung von Futtermitteln (Futtermittelverkehrsverordnung) findet bei den in dieser Studie untersuchten

Pferdefutterproben keine Anwendung, da die Proben in den Jahren 2007 und 2008 gekauft wurden.

Bei der Untersuchung des Futtertyps (Müsli oder Pellets) auf dessen Einfluss auf die Mykotoxinkonzentration wurde für OTA und Ergotalkaloide eine deutliche Konzentrationszunahme in Pellets nachgewiesen. Ein Grund hierfür kann die durch den Herstellungsprozess in Form von Erwärmung und Trocknung erhöhte Stresssituation für die bereits vorhandenen Pilze sein und so zu einer vermehrten Toxinproduktion führen (BUCKLEY et al., 2007).

Abschließend kann gesagt werden, dass bei der ersten systematischen Untersuchung von kommerziell hergestelltem Pferdefutter in Deutschland eine weit verbreitete Kontamination des Futters mit den untersuchten Mykotoxinen nachgewiesen wurde. Da die Mykotoxinkonzentrationen zum größten Teil nur sehr niedrige Werte aufwiesen, ist von dem in dieser Studie untersuchten Pferdefutter jedoch keine akute Gesundheitsgefahr für Pferde bzw. den Verbraucher zu erwarten. Ein negativer Langzeiteffekt durch die Mykotoxinbelastung des Futters kann allerdings nicht ausgeschlossen werden, da zurzeit nur wenige klinische Studien zur Langzeitwirkung einzelner Mykotoxine bei Pferden vorliegen. Auch im Hinblick auf die synergistische Wirkung verschiedener Mykotoxine auf die Pferdegesundheit kann, aufgrund der geringen Anzahl an Studien, keine eindeutige Aussage getroffen werden.

Um die tatsächliche Gefährdung der Pferdegesundheit besser einschätzen zu können, wären weitere Fütterungsstudien, insbesondere im Hinblick auf die Langzeitwirkung niedrig kontaminierten Futters mit verschiedenen Mykotoxinen, wichtig.

Darüber hinaus wäre es von großem Interesse, Pferdefutter nach der Lagerung in einer Stallkammer auf dessen Mykotoxingehalt zu untersuchen. Denn selbst kommerziell gekauftes Futter wird in der Praxis teilweise über einen längeren Zeitraum hinweg offen gelagert, bevor Pferde damit gefüttert werden. Die Konzentration der Mykotoxine, insbesondere von sogenannten Lagerungsschimmelpilzen (z. B. OTA produzierende *Penicillium spp.*), könnte dabei erheblich steigen.

Im Hinblick auf einen möglichen Übergang der in dieser Arbeit im Pferdefutter nachgewiesenen Mykotoxine in die Milch laktierender Stuten wäre es von Interesse Studien zum carry-over dieser Toxine durchzuführen, da Stutenmilch auch unter dem Gesichtspunkt „Lebensmittel“ zu betrachten ist. Daten zum carry-over bei Wiederkäuern sind für die Situation bei der Stute aufgrund des verschiedenen Verdauungssystems nicht aussagekräftig. Die in dieser Arbeit eingesetzten Enzymimmuntests könnten bei der Prüfung einer Mykotoxinbelastung von Stutenmilch, bzw. des carry-overs der Mykotoxine hilfreiche analytische Werkzeuge sein.

Einige der in dieser Arbeit geprüften Toxine wurden kürzlich in einer Dissertationsarbeit untersucht (SIXT, 2011). Sie zeigte, dass die untersuchte Milch zum größten Teil lediglich Spuren der geprüften Toxine enthielt und keine Anhaltspunkte für eine gesundheitsgefährdende Kontamination vorliegen. Weitere Studien hierzu sind allerdings angezeigt.

5. ZUSAMMENFASSUNG

In vorliegender Arbeit wurden 62 kommerziell hergestellte Pferdefutterproben von 22 verschiedenen Herstellern auf die Mykotoxine T-2 Toxin und HT-2 Toxin, DON, Zearalenon, FB₁, OTA und Ergotalkaloide mittels EIA untersucht. Bei dem untersuchten Probenmaterial handelte es sich um Mischfuttermittel (Müsli/Mash, n = 39, Pellets, n = 12) und Einzelfuttermittel (Mais, n = 5, Hafer, n = 4, Gerste, n = 2).

Für die Nachweisgrenzen bzw. die Wiederfindungsraten der einzelnen Mykotoxin-EIA konnten folgende Ergebnisse ermittelt werden: T-2 Toxin: 0,1 µg/kg; 71%, T-2 Toxin/HT-2 Toxin: 0,2 µg/kg; 97%, DON: 10 µg/kg; 84%, Zearalenon: 5 µg/kg; 93%, FB₁: 2 µg/kg; 113%, OTA: 0,2 µg/kg; 67%, Ergotalkaloide (gruppenspezifischer Generic Ergot Alkaloid-EIA, GEA): 30 mg/kg; 132%.

Alle 62 untersuchten Proben waren positiv für T-2 Toxin (0,28-90,5 µg/kg, Median: 7 µg/kg), T-2 Toxin/HT-2 Toxin (0,75-228 µg/kg, Median: 24 µg/kg) und DON (16,4-4860 µg/kg, Median: 219 µg/kg). Zearalenon konnte in 61 Proben (6,89-312 µg/kg, Median: 61 µg/kg) und FB₁ in 58 Proben (2,04-2190 µg/kg, Median: 27 µg/kg) nachgewiesen werden. Ergotalkaloide wurden in 38 (34,3-1200 µg/kg, Median: 97 µg/kg) und OTA in 26 (0,21-4,12 µg/kg, Median: 0,35 µg/kg) der untersuchten Futterproben nachgewiesen. Eine Kontamination mit allen in die Untersuchung einbezogenen Mykotoxinen zeigte sich bei 20 Proben.

Die höchsten Mykotoxinkonzentrationen wurden vor allem in den Einzelfuttermitteln gefunden. So wurden die höchsten DON- und FB₁-Konzentrationen in reinen Maisproben, die höchste T-2 Toxin/HT-2 Toxin-Konzentration in einer reinen Haferprobe und die höchste Ergotalkaloidkonzentration in einer reinen Gersteprobe nachgewiesen.

Eine signifikant positive Korrelation zwischen den einzelnen Mykotoxinen wurde zwischen Zearalenon und DON, Zearalenon und FB₁, Zearalenon und OTA sowie zwischen T-2 Toxin/HT-2 Toxin und den Ergotalkaloiden festgestellt. Darüber hinaus zeigte sich eine signifikant negative Korrelation zwischen T-2 Toxin/HT-2 Toxin und DON.

Die Ergebnisse demonstrieren das häufige Vorkommen von Mykotoxinen im Pferdefutter. Darüber hinaus wurde eine starke Co-Kontamination der Futterproben mit mehreren Mykotoxinen festgestellt. Insgesamt waren die Mittelwerte und Medianwerte der gemessenen Toxinkonzentrationen aber relativ niedrig, so dass – soweit anwendbar – Richt- oder Höchstmengen nicht überschritten wurden. Hinweise auf akute Gesundheitsrisiken wurden nicht gefunden. Wegen der unbefriedigenden Datenlage zur Wirkung von Mykotoxinen und ihrer kombinierten Aufnahme durch Pferde können mögliche Langzeiteffekte aber nicht ausgeschlossen werden.

6. SUMMARY

In this thesis a total of 62 samples of commercial horse feed preparations from 22 different producers were analysed by EIA for the mycotoxins T-2 toxin and HT-2 toxin, DON, zearalenone, FB₁, OTA and ergot alkaloids. The analysed samples contained cereal mixtures (“muesli”/mash, n = 39, pellets, n = 12) and plain feed grains (maize, n = 5; oats, n = 4; barley, n = 2).

The results of detection limits and mean recoveries of mycotoxin-EIA were: T-2 toxin: 0.1 µg/kg; 71%, T-2 toxin/HT-2 toxin: 0.2 µg/kg; 97%, DON: 10 µg/kg; 84%, zearalenone: 5 µg/kg; 93%, FB₁: 2 µg/kg; 113%, OTA: 0.2 µg/kg; 67%, ergot alkaloids (group specific Generic Ergot Alkaloids-EIA, GEA): 30 mg/kg; 132%.

All 62 samples contained T-2 toxin (0.28-90.5 µg/kg, Median: 7 µg/kg), T-2 toxin/HT-2 toxin (0.75-228 µg/kg, median: 24 µg/kg) and DON (16.4-4860 µg/kg, median: 220 µg/kg). Zearalenone was detected in 61 samples (6.89-312 µg/kg, median: 61 µg/kg) and FB₁ in 58 samples (2.04-2190 µg/kg, median: 27 µg/kg). Ergot alkaloids were detected in 38 samples (34.3-1200 µg/kg, median: 97 µg/kg) and OTA in 26 samples (0.21-4.12 µg/kg, median: 0.35 µg/kg). A contamination of any of the analysed mycotoxins was shown in 20 samples.

The highest concentrations were mostly found in single-grain cereal feed. The maximum values for DON and FB₁ were found in maize, the highest T-2 toxin/HT-2 toxin concentrations were found in a sample of pure oats, and the highest concentration of ergot alkaloids was found in a sample of pure barley.

A significant positive correlation of mycotoxins was found between zearalenone and DON, between zearalenone and FB₁, between zearalenone and OTA as well as between T-2 toxin/HT-2 toxin and ergot alkaloids. In addition there was a significant negative correlation between T-2 toxin/HT-2 toxin and DON.

The results demonstrate the frequent appearance of mycotoxins in horse feed. Furthermore a strong co-contamination of feed samples with multiple mycotoxins was detected. Overall mean and median values of the measured toxin-concentrations were at such low level, that

- as far as applicable - none of the legitimate limit and reference values was exceeded. Indication for acute health hazard was not found. Due to the dissatisfying data records regarding the effects of mycotoxins and its combined intake by horses possible long term effects may not be excluded.

7 LITERATURVERZEICHNIS

ABNEY, L.K., J.W. OLIVER und C.R. RENEMEYER (1993)

Vasoconstrictive effects of tall fescue alkaloids on equine vasculature

J. Equine Vet. Sci. 13, 334-340

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

Immunotoxic activity of ochratoxin A

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

ASQUITH, R.L. (1991)

Mycotoxycosis in horses, Chapter 28

In: Smith, J.E. und R.S. Henderson; Mycotoxins and animal food

CRC Press Inc. ISBN: 0-8493-4904-4

AURICH, J.E., H.-O. HOPPEN, R. TRAMPLER, J. ZENTEK, J. BOEHM, E. RAZZAZI-FAZELI und C. AURICH (2006)

Effects of mycotoxins on reproductive function in mares

Anim. Reprod. Sci. 94, 238-241

BACON, C.W. und P.E. NELSON (1994)

Fumonisin Production in Corn by Toxigenetic Strains of *Fusarium moniliforme* and *Fusarium proliferatum*

J. Food Prot. 57, 514-521

BAUER, J. und M. GAREIS (1991)

Ochratoxin A in the food chain

Anim. Res. and Dev. 33, 80-97

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

Veränderungen am Genitaltrakt des weiblichen Schweines nach Verfütterung praxisrelevanter Zearalenonmengen

Tierärztl. Prax. 15, 33-36

BAUER, J. (1995)

Zum Metabolismus von Trichothecenen beim Schwein

Dtsch. Tierärztl. Wschr. 102, 50-52

BECCI, P.J., W.D. JOHNSON, F.G. HESS, M.A. GALLO und R.A. PARENT (1982a)

Combined Two-Generation Reproduction-Teratogenesis Study of Zearalenone in the Rat

J. Appl. Toxicol. 2, 201-206

BECCI, P.J., K.A. VOSS, F.G. HESS, M.A. GALLO, R.A. PARENT und

K.R. STEVENS (1982b)

Long-term Carcinogenicity and Toxicity Study of Zearalenone in the Rat

J. Appl. Toxicol. 2, 247-254

BfR, BUNDESINSTITUT FÜR RISIKOBEWERTUNG (2004)

Mutterkornalkaloide in Roggenmehl

Stellungnahme vom 22. Januar 2004

http://www.bfr.bund.de/cm/208/mutterkornalkaloide_in_roggenmehl.pdf

BfR, BUNDESINSTITUT FÜR RISIKOBEWERTUNG (2008)

Rechtliche Regelungen zu Mykotoxinen in Lebens- und Futtermitteln

Letzte Änderung 6. Juni 2006

<http://www.bfr.bund.de/cd/8873>

BICKHARDT, K., K. BRANDT, E. DEEGEN, M. GANTER und F. GLITZ (2003)

Zum Vorkommen von Nierenfunktionsstörungen beim Pferd

Pferdeheilkd. 19, 481-489

BIEHL, M.L., D.B. PRELUSKY, G.D. KORITZ, K.E. HARTIN, W.B. BUCK und
H.L. TRENHOLM (1993)

Biliary Excretion and Enterohepatic Cycling of Zearalenone in Immature Pigs

Toxicol. Appl. Pharmacol. 121, 152-159

BIRZELE, B., A. PRANGE und J. KRÄMER (2000)

Deoxynivalenol and ochratoxin A in German wheat and changes of levels in relation to storage parameters

Food Addit. Contam. 17, 1027-1035

BONY, S., A. DURIX, A. LEBLOND und P. JAUSSAUD (2001)

Toxicokinetics of ergovaline in the horse after an intravenous administration

Vet. Res. 32, 509-513

BUCKLEY, T., A. CREIGHTON und U. FOGARTY (2007)

Analysis of Canadian and Irish forage, oats and commercially available equine concentrate feed for pathogenic fungi and mycotoxins

Ir. Vet. J. 60, 231-236

BULLERMAN, L.B. und A. BIANCHINI (2007)

Stability of mycotoxins during food processing

Int. J. Food Microbiol. 119, 140-146

CALONI, F. und C. CORTINOVIS (2009)

Effects of fusariotoxins in the equine species

Vet. J. 2009, doi:10.1016/j.tvjl.2009.09.020

CHU, F.S. (1996)

Recent studies on immunoassays for mycotoxins

in: BEIER, R.C. und L.H. STANKER: Immunoassays for residue analysis

ASC symposium series 621, p. 294-313

American Chemical Society, Washington D.C.

CÔTÉ, L.-M., J. NICOLETTI, S.P. SWANSON und W.B. BUCK (1986)

Production of Deepoxydeoxynivalenol (DOM-1), a Metabolite of Deoxynivalenol, by in Vitro Rumen Incubation

J. Agric. Food Chem. 34, 458-460

CREPPY, E.E., F.C. STRØMER, D. KERN, R. RÖSCHENTALER und
G. DIRHEIMER (1983)

Effects of ochratoxin A metabolites on yeast phenylalanyl-tRNA Synthetase and on the
growth and in vivo protein synthesis of hepatoma cells

Chem.-Biol. Interactions 47, 239-147

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

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

Food Addit. Contam. 18, 730-738

CURTUI, V., C. GASSEN, L. DEWENTER, E. SCHNEIDER und E. USLEBER (2007)

Immunchemische Nachweisverfahren für Mutterkornalkaloide

Forschungsprojekt 03HS019, Abschlussbericht

<http://www.leaderplus.de/download/pdf/03HS019.pdf>

DAHME, E. und W. SCHMAHL (1999)

Nervensystem

In: DAHME, E. und E. WEISS (Hrsg.)

Grundriss der speziellen pathologischen Anatomie der Haustiere

5. Auflage, Ferdinand Enke Verlag, Stuttgart

DESJARDINS, A.E., T.M. HOHN und S.P. McCORMICK (1993)

Trichothecene Biosynthesis in Fusarium Species: Chemistry, Genetics, and Significance

Microbiol. Rev. 57, 595-604

DEUTSCHE REITERLICHE VEREINIGUNG, FN (2010)

Zahlen, Daten, Fakten

<http://www.pferd-aktuell.de/Wir-ueber-uns/Zahlen-Fakten/-96/Zahlen-Fakten.htm>

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

Use of monoclonal antibodies for the analysis of mycotoxins

Natural Toxins 3, 288-293

DOI, K., J. SHINOZUKA und S. SEHATA (2006)

T-2 Toxin and Apoptosis

J. Toxicol. Pathol. 19, 15-27

DOI, K., N. ISHIGAMI und S. SEHATA (2008)

T-2 Toxin-induced Toxicity in Pregnant Mice and Rats

Int. J. Mol. Sci. 9, 2146-2158

EFSA, EUROPEAN FOOD SAFETY AUTHORITY (2004a)

Opinion of the scientific panel on contaminants in the food chain on request from the commission related to deoxynivalenol (DON) as undesirable substance in animal feed

EFSA J. 73, 1-42

<http://www.efsa.europa.eu>

EFSA, EUROPEAN FOOD SAFETY AUTHORITY (2004b)

Opinion of the scientific panel on contaminants in the food chain on request from the commission related to zearalenone as undesirable substance in animal feed

EFSA J. 89, 1-35

<http://www.efsa.europa.eu>

EFSA, EUROPEAN FOOD SAFETY AUTHORITY (2004c)

Opinion of the scientific panel on contaminants in the food chain on 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>

EFSA, EUROPEAN FOOD SAFETY AUTHORITY (2005a)

Opinion of the scientific panel on contaminants in the food chain on request from the commission related to ergot as undesirable substance in animal feed

EFSA J. 225, 1-27

<http://www.efsa.europa.eu>

EFSA, EUROPEAN FOOD SAFETY AUTHORITY (2005b)

Opinion of the scientific panel on contaminants in the food chain on request from the commission related to fumonisins as undesirable substance in animal feed

EFSA J. 235, 1-32

<http://www.efsa.europa.eu>

ENGELHARDT, G., M. SCHUSTER, J. LEPSCHY und P.R. WALLNÖFER (1986)

Production of mycotoxins by *Fusarium* species isolated in Germany

Z. Lebensm. Unters. Forsch. 182, 123-126

ENGVALL, E. und P. PERLMANN (1971)

Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). Quantitative assay of immunoglobulin G

Immunochem. 8, 871-874

ERIKSEN, G.S., H. PETTERSSON, K. JOHNSEN und J.E. LINDBERG (2002)

Transformation of trichothecenes in ileal digesta and faeces from pigs

Arch. Anim. Nutr. 56, 263-274

ERIKSEN, G.S., H. PETTERSSON und J.E. LINDBERG (2003)

Absorption, metabolism and excretion of 3-acetyl don in pigs

Arch. Anim. Nutr. 57, 335-345

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

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

Arch. Lebensmittelhyg. 40, 109-112

FAYRER-HOSKEN, R., G. HEUSER, N. HILL und A. CAUDLE (2008)

Review on effects of fescue grass ergot alkaloids in the horse and preliminary study on effect of fescue grass ergot alkaloid in the stallion

J Equine Vet. Sci. 28, 666-671

FIORAMONTI, J., C. DUPUY, J. DUPUY und L. BUENO (1993)

The Mycotoxin, Deoxynivalenol, Delays Gastric Emptying Through Serotonin-3 Receptors in Rodents

J. Pharmacol. Exp. Ther. 266, 1255-1260

FOREMAN, J.H., P.D. CONSTABLE, A.L. WAGGONER, M. LEVY, R.M. EPPLEY, G.W. SMITH, M.E. TUMBLESON und W.M. HASCHEK (2004)

Neurologic abnormalities and cerebrospinal fluid changes in horses administered fumonisin B1 intravenously

J. Vet. Intern. Med. 18, 223-230

GALTIER, P., M. ALVINERIE und J.L. CHARPENTEAU (1981)

The pharmacokinetic profiles of ochratoxin A in pigs, rabbits and chickens

Fd. Cosmet. Toxicol. 19, 735-738

GIMENO, A. und J.A. QUINTANILLA (1983)

Analytical and mycological study of a natural outbreak of zearalenone mycotoxicosis in horses

Proceeding of the International Symposium of Mycotoxins, Cairo, Egypt, pp.387-392

zit. nach CALONI, F. und C. CORTINOVIS (2009)

Effects of fusariotoxins in the equine species

Vet. J. 2009, doi:10.1016/j.tvjl.2009.09.020

GREENWAY, J.A. und R. PULS (1976)

Fusariotoxigenesis from Barley in British Columbia. 1. Natural Occurrence and Diagnosis

Can. J. comp. Med. 40, 12-15

GUERRA, M.M., H.M. MARTINS, M.F. GOUVEIA und F. BERNARDO (2005)

Considerations on sanitary safety of mixed feed for horses

Rev. Portuguesa de Zootecnia 12, 63-75

HACK, R., M. MÄRTLBAUER und G. TERPLAN (1989)

A monoclonal antibody-based enzyme immunoassay for the detection of T-2 toxin at picogram levels

Lett. Appl. Microbiol. 9, 133-135

HULT, K., E. HÖKBY, S. GATENBECK und L. RUTQUIST (1980)

Ochratoxin A in Blood from Slaughter Pigs in Sweden: Use in Evaluation of Toxin Content of Consumed Feed

Appl. Environ. Microbiol. 39, 828-830

ISHII, K. (1983)

Chemistry and Bioproduction of Non-macrocyclic Trichothecenes

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

Elsevier, Amsterdam

JECFA, JOINT EXPERT COMMITTEE ON FOOD ADDITIVES (2001)

Fumonisin

JECFA 47, 1-152

<http://www.inchem.org/documents/jecfa/jecmono/v47je03.htm>

JECFA, JOINT EXPERT COMMITTEE ON FOOD ADDITIVES (2001)

Ochratoxin A

JECFA 47, 1-132

<http://www.inchem.org/documents/jecfa/jecmono/v47je04.htm>

JECFA, JOINT EXPERT COMMITTEE ON FOOD ADDITIVES (2001)

T-2 and HT-2

JECFA 47, 1-97

<http://www.inchem.org/documents/jecfa/jecmono/v47je06.htm>

JIMÉNEZ, M., M. MÁÑEZ und E. HERNÁNDEZ (1996)

Influence of water activity and temperature on the production of zearalenone in corn by three *Fusarium* species

Int. J. Food Microbiol. 29, 417-421

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

Effect of feeding deoxynivalenol (vomitoxin)-contaminated barley to horses

J. Vet. Diagn. Invest. 9, 219-221

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

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

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

JUHÁSZ, J., P. NAGY, M. KULCSÁR, G. SZIGETI, J. REICZIGEL und G. HUSZENICZA (2001)

Effect of low-dose zearalenone exposure on luteal function, follicular activity and uterine oedema in cycling mares

Acta Vet. Hung. 49, 211-22

KAMPHUES, J. (1996)

Risiken durch Mängel in der hygienischen Qualität von Futtermitteln für Pferde

Pferdeheilkd. 12, 326-332

KELLER, K.M., B.D. QUEIROZ, L.A.M. KELLER, J.M.M. RIBEIRO, L.R. CAVAGLIERI, M.L.GONZÁLEZ PEREYRA, A.M. DALCERO und C.A.R. ROSA (2007)

The Mycobiota and Toxicity of Equine Feeds

Vet. Res. Commun. 31, 1037-1045

KLUWE, H. (2006)

Untersuchung zum Vorkommen und zur Toxizität von *Stachybotrys spp.* in Heu- und Strohproben aus Pferdeställen

München, Veterinärmed. Fak., Diss.

KOLLARCZIK, B., M. GAREIS und M. HANELT (1994)

In Vitro Transformation of the *Fusarium* Mycotoxins Deoxynivalenol and Zearalenone by the Normal Gut Microflora of Pigs

Nat. Toxins 2, 105-110

KROGH, P. und F. ELLING (1977)

Mycotoxic nephropathy

Vet. Sci Commun. 1, 51-63

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

Risk Assessment of the Mycotoxin Zearalenone

Regul. Toxikol. Pharmacol. 7, 253-306

KUIPER-GOODMAN, T. und P.M. SCOTT (1989)

Risk Assesment of the Mycotoxin Ochratoxin A

Biomed. Environ. Sci. 2, 179-248

LAUBER, U., T. DILLENBURGER, M. SCHOLLENBERGER, H.M. MÜLLER und W. DROCHER (2000)

Transformation von Deoxynivalenol durch die Darmflora des Schweines – In vitro Untersuchungen zur Adaptation in Abhängigkeit von der Darreichungsform

Mycotoxin Res. 16A, 166-169

LAUBER, U., R. SCHNAUFER, M. GREDZIAK und Y. KIESSWETTER (2005)

Analyses of rye grains and rye meals for ergot alkaloids

Mycotoxin Res. 21, 258-262

LEITNER, S., A. BUCHER, J. BÖHM und C. ROSENKRANZ (2001)

Gewebespezifische Veränderungen bei geschlechtsreifen Sauen nach Aufnahme von zearalenonhaltigem Futter

Mycotoxin Res. 17A, 37-40

LEZICA, F.P., R. FILIP, S. GORZALCZANY, G. FERRARO, G.A. de ERAUSQUIN, C. RIVAS und G.J.B. LADAGA (2009)

Prevalence of ergot derivatives in natural ryegrass pastures: Detection and pathogenicity in the horse

Theriogenology 71, 422-431

LILLEHOJ, E.B. und F. ELLING (1983)

Environmental Conditions That Facilitate Ochratoxin Contamination of Agricultural Commodities

Acta Agric. Scand. 33, 113-128

LORINSER, C.J. (1824)

Versuche und Beobachtungen über die Wirkung des Mutterkorns auf den menschlichen und thierischen Körper, größtentheils aus actenmäßigen Quellen und mit besonderer Rücksicht auf die medicinische Polizey

Schüppel, Berlin

zit. nach: HUFELAND, C.W. und OSANN, E. (1824)

Handbuch der Practischen Heilkunde, Bd. 52, S. 22-36, Reimer, Berlin

MAAROUFI, K., L. CHEKIR, E.C. CREPPY, F. ELLOUZ und H. BACHA (1996)

Zearalenone induces modifications of haematological and biochemical parameters in rats

Toxicol. 34, 535-540

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

Erfahrungen bei der Anwendung von Immunoassays zum Nachweis von Mykotoxinen in Lebensmitteln

Arch. Lebensmittelhyg. 42, 3-6

MANN, D.D., G.M. BUENING, B.S. HOOK und G.D. OSWEILER (1982)

Effect of T-2 Toxin on the Bovine Immune System: Humoral Factors

Infect. Immun. 36, 1249-1252

MARASAS, W.F., T.S. KELLERMAN, W.C. GELDERBLOM, J.A. COETZER, P.G. THIEL und J.J. VAN DER LUGT (1988)

Leukencephalomalacia in a horse induced by fumonisin B₁ isolated from *Fusarium moniliforme*

Onderstepoort J. Vet. Res. 55, 197-203

MARASAS, W.F.O. (1995)

Fumonisin: Their Implications for Human and Animal Health

Nat. Toxins 3, 193-198

McMASTERS, D.R. und A. VEDANI (1999)

Ochratoxin Binding to Phenylalanyl-tRNA Synthetase: Computational Approach to the Mechanism of Ochratoxicosis and Its Antagonism

J. Med. Chem. 42, 3075-3086

MEYER, K., E. USLEBER, E. MÄRTLBAUER und J. BAUER (2000)

Vorkommen von Zearalenon, α - und β -Zearalenol in Gallen von Zuchtsauen in Relation zum Fruchtbarkeitsgeschehen

Berl. Münch. Tierärztl. Wschr. 113, 374-379

MINERVINI, F., A. GIANNOCCARO, F. FORNELLI, M.E. DELL'AQUILA, P. MINOIA und 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

MINERVINI, F., G.M. LACALANDRA, A. FILANNINO, M. NICASSIO, A. VISCONTI und M.E. DELL'AQUILA (2010)

Effects of in vitro exposure to natural levels of zearalenone and its derivatives on chromatin structure stability in equine spermatozoa

Theriogenology 73, 392-403

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

Fungus metabolites toxic to animals

Annu. Rev. Phytopathol. 12, 303-330

MIROCHA, C.J., S.V. PATHRE und T.S. ROBINSON (1981)

Comparative metabolism of zearalenone and transmission into bovine milk

Fd. Cosmet. Toxicol. 19, 25-30

MIROCHA, C.J., W. XIE, Y. XU, R.D. WILCOXSON, R.P. WOODWARD, R.H. ETEBARIAN und G. BEHLE (1994)

Production of Trichothecene mycotoxins by *Fusarium graminearum* and *Fusarium culmorum* on barley and wheat

Mycopathologia 128, 19-23

OELLERICH, M. (1984)

Enzyme-immunoassay: a review

J. Clin. Chem. Clin. Biochem. 22, 895-904

OLSEN, M., H. PETTERSSON, K. SANDHOLM, A. VISCONTI und

K.-H. KIESSLING (1987)

Metabolism of zearalenone by sow intestinal mucosa *in vitro*

Food Chem. Toxic. 25, 681-683

OUYANG, Y.L., L. SHIGUANG und J.J. PESTKA (1996)

Effects of Vomitoxin (Deoxynivalenol) on Transkription Factor NF- κ B/Rel Binding Activity in Murine EL-4 Thymoma and Primary CD4⁺ T Cells

Toxicol. Appl. Pharmacol. 140, 328-336

PESTKA, J.J. und W. DONG (1994)

Progressive Serum IgE Elevation in the B6C3F1 Mouse Following Withdrawal of Dietary Vomitoxin (deoxynivalenol)

Fundam. Appl. Toxicol. 22, 314-316

PESTKA, J.J. und 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. Toxic. 40, 1623-1631

PETZINGER, E. und K. ZIEGLER (2000)

Ochratoxin A from a toxicological perspective

J. Vet. Pharmacol. Ther. 23, 91-98

PLACINTA, C.M., J.P.F. D'MELLO und A.M.C. McDONALD (1999)

A review of worldwide contamination of cereal grains and animal feed with *Fusarium* mycotoxins

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

PORCHER, J.-M., C. DAHEL, C. LAFARGE-FRAYSSINET, F.S. CHU und C. FRAYSSINET (1988)

Uptake and metabolism of T-2 toxin in relation to its cytotoxicity in lymphoid cells

Food Chem. Toxic. 26, 587-593

PRELUSKY, D.B., K.E. HARTIN, H.L. TRENHOLM und J.D. MILLER (1988)

Pharmacokinetic Fate of ¹⁴C-Labeled Deoxynivalenol in Swine

Fundam. Appl. Toxicol. 10, 276-286

RAFAI, P., A. BATA, L. JAKAB und A. VÁNYI (2000)

Evaluation of mycotoxin-contaminated cereals for their use in animal feeds in Hungary

Food Addit. Contam. 17, 799-808

RAYMOND, S.L., T.K. SMITH und 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 adsorbent

J. Anim. Sci. 81, 2123-2130

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

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

J. Anim. Sci. 83, 1267-1273

RICHARD, J.L. (2007)

Some major mycotoxins and their mycotoxicosis-An overview

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

RIZZO, A.F., F. ATROSHI, T. HIRVI und H. SALONIEMI (1992)

The Hemolytic Activity of Deoxynivalenol and T-2 Toxin

Nat. Toxins 1, 106-110

ROCHA, O., K. ANSARI und F.M. DOOHAN (2005)

Effects of trichothecene mycotoxins on eukaryotic cells: A review

Food Addit. Contam. 22, 369-378

ROSS, P.F., P.E. NELSON, J.L. RICHARD, G.D. OSWEILER, L.G. RICE, R.D. PLATTNER und T.M. WILSON (1990)

Production of Fumonisin by *Fusarium moniliforme* and *Fusarium proliferatum* Isolates Associated with Equine Leukencephalomalacia and Pulmonary Edema Syndrome in Swine
Appl. Environ. Microbiol. 56, 3225-3226

ROSS, P.F., L.G. RICE, J.C. REAGOR, G.D. OSWEILER, T.M. WILSON, H.A. NELSON, D.L. OWENS, R.D. PLATTNER, K.A. HARLIN, J.L. RICHARD, B.M. COLVIN und M.I. BANTON (1991)

Fumonisin B₁ concentrations in feeds from 45 confirmed equine leukencephalomalacia cases

J. Vet. Diagn. Invest. 3, 238-241

ROSS, P.F., A.E. LEDET, D.L. OWENS, L.G. RICE, H.A. NELSON, G.D. OSWEILER und T.M. WILSON (1993)

Experimental equine leukoencephalomalacia, toxic hepatitis, and encephalopathy caused by corn naturally contaminated with fumonisins

J. Vet. Diagn. Invest. 5, 69-74

ROTH, L., H. FRANK und K. KORMANN (1990):

Giftpilze - Pilzgifte. Schimmelpilze - Mykotoxine

Vorkommen - Inhaltsstoffe - Pilzallergien - Nahrungsmittelvergiftungen

ecomed Verlagsgesellschaft, Landsberg/Lech.

RYAN, P.L., K. BENNETT-WIMBUSH, W.E. VAALA und C.A. BAGNELL (2001)

Systemic relaxin in pregnant pony mares grazed on endophyte-infected fescue: Effects of fluphenazine treatment

Theriogenology 56, 471-483

SACCHI, C., H.H.L. GONZÁLEZ, L.E. BROGGI, A.PACIN, S.L. RESNIK, G. CANO und D. TAGLIERI (2009)

Fungal contamination and mycotoxin natural occurrence in oats for race horses feeding in Argentina

Anim. Feed Sci. Technol. 152, 330-335

SAPER, J.R. und S. SILBERSTEIN (2006)

Pharmacology of dihydroergotamine and evidence for efficacy and safety in migraine

Headache 46, 171-181

SCF, EUROPEAN COMMISSION; SCIENTIFIC COMMITTEE ON FOOD (2001)

Opinion of the Scientific Committee on Food on Fusarium Toxins.

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

SCF/CS/CBTR/MYC/25 Rev 6 Final

SCHIFF, P.L. (2006)

Ergot and its alkaloids

Am. J. Pharm. Educ. 70, Artikel 98, 1-10

SCHLICHTERLE, C. (1996)

Fumonisine – Bedeutung und Vorkommen einer neuen Gruppe von Mykotoxinen

München, Vetrinärmed. Fak., Diss.

SCHNEIDER, E., E. USLEBER und R. DIETRICH (1992)

Zur Entwicklung immunchemischer Schnellnachweise für Trichothecene und Saxitoxin

Arch. Lebensmittelhyg. 43, 36-38

SCHNEIDER, E., E. USLEBER, E. MÄRTLBAUER, R. DIETRICH und

G. TERPLAN (1995)

Multimycotoxin dipstick enzyme immunoassay applied to wheat

Food Addit. Contam. 12, 387-393

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

Entwicklung eines hochempfindlichen Enzymimmuntests zum Nachweis von

Ochratoxin A

Mycotoxin Res. 17A, 170-173

SCHOCH, U. und C. SCHLATTER (1985)

Gesundheitsrisiken durch Mutterkorn aus Getreide

Mitt. Gebiete Lebensm. Hyg. 76, 631-644

SCHOLLENBERGER, M., H.T. JARA, S. SUCHY, W. DROCHNER und

H.-M. Müller (2002)

Fusarium toxins in wheat flour collected in an area in southwest Germany

Int. J. Food Microbiol. 72, 85-89

SCHULTZ, C.L., S.L. LODGE-IVEY, L.P. BUSH, A.M. CRAIG und

J.R. STRICKLAND (2006)

Effects of initial and extended exposure to an endophyte-infected tall fescue seed diet on faecal und urinary excretion of ergovaline and lysergic acid in mature geldings

N. Z. Vet. J. 54, 178-184

SCHUMANN, B., P. LEBZIEN, K.-H. UEBERSCHÄR und S. DÄNICKE (2009)

Effects of the level of feed intake and ergot contaminated concentrate on ergot alkaloid metabolism and carry over into milk

Mol. Nutr. Food Res. 53, 931-938

SCOTT, P.M. (1993)

Fumonisin

Int. J. Food Microbiol. 18, 257-270

SCUDAMORE, K.A., S. PATEL und U.K. BERKS (1999)

Surveillance of stored grain from the 1997 harvest in the United Kingdom for ochratoxin A

Food Addit. Contam. 16, 281-290

SEIDLER, C. (2007)

Nachweis der Fusarientoxine Deoxynivalenol und Zearalenon in Lebensmitteln

Gießen, Vetrinärmed. Fak., Diss.

<http://geb.uni-giessen.de/geb/volltexte/2007/4728/pdf/SeidlerCaroline-2007-04-25.pdf>

SETTIVARI, R.S., T.J. EVANS, E. RUCKER, G.E. ROTTINGHAUS und

D.E. SPIERS (2008)

Effects of ergot alkaloids associated with fescue toxicosis on hepatic cytochrome P450 and antioxidant proteins

Toxicol. Appl. Pharmacol. 227, 347-356

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

Long-Term Storage Stability of Deoxynivalenol Standard Reference Solutions

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

SIXT, M. (2011)

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

Gießen, Vetrinärmed. Fak., Diss.

<http://geb.uni-giessen.de/geb/volltexte/2011/8172/pdf/SixtMichael-2011-04-20.pdf>

SMITH, G.W., P.D. CONSTABLE, J.H. FOREMAN, R.M. EPPLEY, A.L. WAGGONER, M.E. TUMBLESON und W.M. HASCHEK (2002)

Cardiovascular changes associated with intravenous administration of fumonisin B₁ in horses

AJVR 63, 538-545

STEFANOVIĆ, V. und M. POLENAKOVIĆ (2009)

Fifty Years of Research in Balkan Endemic Nephropathy: Where Are We Now?

Nephron Clin. Pract. 112, 51-56

SWANSON, S.P., C. HELASZEK, W.B. BUCK, H.D. ROOD JR. und

W.M. HASCHEK (1988)

The role of intestinal microflora in the metabolism of trichothecene mycotoxins

Food Chem. Toxic. 26, 823-829

SYDENHAM, E.W., W.F.O. MARASAS, P.G. THIEL, G.S. SHEPHARD und J.J. NIEUWENHUIS (1991)

Production of mycotoxins by selected *Fusarium graminearum* and *F. crookwellense* isolates

Food Addit. Contam. 8, 31-41

SYDENHAM, E.W., P.G. THIEL und R. VLEGGAR (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 und Y. UENO (1988)

Worldwide Contamination of Cereals by the *Fusarium* Mycotoxins Nivalenol, Deoxynivalenol, and Zearalenone. 1. Survey of 19 Countries

J. Agric. Food Chem. 36, 979-983

TIEMANN, U., T. VIERGUTZ, L. JONAS und F. SCHNEIDER (2003)

Influence of the mycotoxins α - and β -zearalenol and deoxynivalenol on the cell cycle of cultured porcine endometrial cells

Reprod. Toxicol. 17, 209-218

TRAULSEN, K. (2005)

Untersuchungen zur intestinalen Absorption von Ochratoxin A bei der Ratte

Leipzig, Vetrinärmed. Fak., Diss.

UENO, Y., K. ISHII, K. SAKAI, S. KANAEDA und H. TSUNODA (1972)

Toxicological approaches to the metabolites of Fusaria. IV. Microbial survey on "bean-hulls poisoning of horses" with the isolation of toxic trichothecenes, neosolaniol and T-2 toxin of *Fusarium solani* M-1-1

Jpn J Exp Med. 42, 187-203

UENO, Y., N. SATO, K. ISHII, K. SAKAI, H. TSUNODA und M. ENOMOTO (1973)

Biological and Chemical Detection of Trichothecene Mycotoxins of *Fusarium* Species

Appl. Microbiol. 25, 699-704

UENO, Y. (1983)

Trichothecenes – Chemical, Biological and Toxicological Aspects

Developments in food science 4

Elsevier Science Publishers B.V., Amsterdam

UHLIG, S., T. VIKØREN, L. IVANOVA und K. HANDELAND (2007)

Ergorgotalkaloids in Norwegian wild grasses: a mass spectrometric approach

Rapid Commun. Mass. Spectrom. 21, 1651-1660

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

The structure of zearalenone

Tetrahedron Lett. 27, 3109-3114

USLEBER, E. (1997)

Immunchemische Verfahren in der Lebensmittelhygiene:

Nachweis niedermolekularer Toxine und Rückstände

München, Vetrinärmed. Fak., Habil.

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

Studies on the application of enzyme immunoassays of the *Fusarium* mycotoxins deoxynivalenol, 3-acetyldeoxynivalenol, and zearalenone

J. Vet. Med. B. 39, 617-627

USLEBER, E., M. STRAKA und G. TERPLAN (1994)

Enzyme immunoassay for fumonisin B₁ applied to corn based food

J. Agric. Food Chem. 42, 1392-1396

VAN DER MERWE, K.J., P.S. STEYN, L. FOURIE, D.B. SCOTT und

J.J. THERON (1965)

Ochratoxin A, a toxic metabolite produced by *Aspergillus ochraceus* Wilh.

Nature 205, 1112-1113

VISCONTI, A., V.M.T. LATTANZIO, M. PASCALE und M. HAIDUKOWSKI (2005)

Analysis of T-2 and HT-2 toxins in cereal grains by immunoaffinity clean-up and liquid chromatography with fluorescence detection

J. Chromatogr. A 1075, 151-158

VIVRETTE, S., M.E. STEBBINS, O. MARTIN, K. DOOLEY und D. CROSS (2001)

Cardiorespiratory and thermoregulatory effects of endophyte-infected fescue in exercising horses

J. Equine Vet. Sci. 21, 65-67

WANG, E., P.F. ROSS, T.M. WILSON, R.T. RILEY und A.H. MERRIL, JR (1992)

Increases in Serum Sphingosine and Shinganine and Decreases in Complex Sphingolipids in Ponies Given Feed Containing Fumonisin, Mycotoxins Produced by *Fusarium moniliforme*

J. Nutr. 122, 1706-1716

WEBB, G.W., S.P. WEBB und R.A. HUMES (2008)

Effects of ingestion of endophyte-infested fescue on post-exercise recovery of horses

J. Equine Vet. Sci. 28, 363-366

WIDESTRAND J. und H. PETTERSSON (2001)

Effect of time, temperature and solvent on the stability of T-2 toxin, HT-2 toxin, deoxynivalenol and nivalenol calibrants

Food Addit. Contam. 18, 987-992

WILSON, T.M., P.F. ROSS, L.G. RICE, G.D. OSWEILER, H.A. NELSON, D.L. OWENS, R.D. PLATTNER, C. REGGARDIO, T.H. NOON und J.W. PICKRELL (1990)

Fumonisin B₁ levels associated with an epizootic of equine leukencephalomalacia

J. Vet. Diagn. Invest. 2, 213-216

WILSON, T.M., P.F. ROSS, D.L. OWENS, L.G. RICE, S.A. GREEN, S.J. JENKINS und H.A. NELSON (1992)

Experimental reproduction of ELEM

Mycopathologia 117, 115-120

YAGEN, B. und M. BIALER (1993)

Metabolism and pharmacokinetics of T-2 Toxin and related trichothecenes

Drug Metab. Rev. 25, 281-323

YOSHIZAWA, T. und N. MOROOKA (1975)

Biological Modification of Trichothecene Mycotoxins: Acetylation and Deacetylation by *Fusarium* spp.

Appl. Microbiol. 29, 54-58

YOUNGBLOOD, R.C., N.M. FILIPOV, B.J. RUDE, D.L. CHRISTIANSEN, R.M. HOPPER, P.D. GERARD, N.S. HILL, B.P. FITZGERALD und P.L. RYAN (2004)

Effects of short-term early gestational exposure to endophyte-infected tall fescue diets on plasma 3,4-dihydroxyphenyl acetic acid and fetal development in mares

J. Anim. Sci. 82, 2919-2929

ZÖLLNER, P., J. JODLBAUER, M. KLEINOVA, H. KAHLBACHER, T. KUHN, W. HOCHSTEINER und 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

7.1 Zitierte Rechtsvorschriften

EUROPÄISCHE KOMMISSION (2006)

Empfehlung der Kommission vom 17. August 2006 betreffend das Vorhandensein von Deoxynivalenol, Zearalenon, Ochratoxin A, T-2 und HT-2 Toxin sowie von Fumonisin in zur Verfütterung an Tiere bestimmten Erzeugnissen (2006/576/EG)

Amtsblatt der Europäischen Union 2006, L 229, 7-9

<http://eur-lex.europa.eu/de/index.htm>

EUROPÄISCHE KOMMISSION (2006)

Verordnung (EG) Nr. 1881/2006 der Kommission vom 19. Dezember 2006 zur Festsetzung der Höchstgehalte für bestimmte Kontaminanten in Lebensmitteln

Amtsblatt der Europäischen Union 2006, L 364, 5-24

<http://eur-lex.europa.eu/de/index.htm>

EUROPÄISCHE KOMMISSION (2007)

Verordnung (EG) Nr. 1126/2007 der Kommission vom 28. September 2007 zur Änderung der Verordnung (EG) Nr. 1881/2006 zur Festsetzung der Höchstgehalte für bestimmte Kontaminanten in Lebensmitteln hinsichtlich Fusarientoxinen in Mais und Maiserzeugnissen

Amtsblatt der Europäischen Union 2007, L 255, 14-17

<http://eur-lex.europa.eu/de/index.htm>

EUROPÄISCHE KOMMISSION (2009)

Verordnung (EU) Nr. 1272/2009 der Kommission vom 11. Dezember 2009 mit gemeinsamen Durchführungsbestimmungen zur Verordnung (EG) Nr. 1234/2007 des Rates hinsichtlich des An- und Verkaufs von landwirtschaftlichen Erzeugnissen im Rahmen der öffentlichen Intervention

Amtsblatt der Europäischen Union 2009, L 349, 1-68

<http://eur-lex.europa.eu/de/index.htm>

EUROPÄISCHE UNION (2009)

Verordnung 767/2009/EG des Europäischen Parlaments und des Rates vom 13. Juli 2009 über das Inverkehrbringen und die Verwendung von Futtermitteln, zur Änderung der Verordnung 1831/2003/EG und zur Aufhebung der Richtlinien 79/373/EWG, 80/511/EWG, 82/471/EWG, 83/228/EWG, 93/74/EWG, 93/113/EG und 96/25/EG und der Entscheidung 2004/217/EG

Amtsblatt der Europäischen Union L 229, 1-28

<http://eur-lex.europa.eu/de/index.htm>

EUROPÄISCHE UNION (1999)

Richtlinie 1999/29/EG des Rates vom 22. April 1999 über unerwünschte Stoffe und Erzeugnisse in der Tierernährung

Amtsblatt der Europäischen Union L 115, 32-46

<http://eur-lex.europa.eu/de/index.htm>

EUROPEAN COMMISSION (2002)

SCOOP, task 3.2.2. Assessment of dietary intake of ochratoxin A by the population of EU Member States

European Commission, Directorate-General Health and Consumer Protection, Reports on tasks for scientific cooperation, January 2002

http://europa.eu.int/comm/food/fs/scoop/3.2.7_en.pdf

FUTTERMITTELVORORDNUNG (2008)

Ausfertigungsdatum: 08.04.1981

In der Fassung vom 24. Mai 2007 (BGBl. I S. 770)

geändert am 15.12.2008 (BGBl. I S. 2438); a. F.

LFGB, LEBENSMITTEL-, BEDARFSGEGENSTÄNDE- UND FUTTERMITTEL-
GESETZBUCH (2005)

Ausfertigungsdatum 01.09.2005

Neugefasst durch Bek. v. 22.8.2011 (BGBl. I S. 1770)

Tabelle 32: Prozentuale Getreideanteile und Mykotoxinuntersuchungsergebnisse des Pferdefutters

Proben- nummer	Futtern Müsli=1 Pellets=2	Getreidezutat (%)			T-2/HT-2 Toxin ¹ (µg/kg)	T-2 Toxin ¹ (µg/kg)	DON ¹ (µg/kg)	Zearalenon ¹ (µg/kg)	Ergot- alkaloide ¹ (µg/kg)	OTA ¹ (ng/kg)	F B ₁ ¹ (µg/kg)	
		Gerste	Weizen inkl. Dinkel	Hafer								Mais
1	1	18,0	22,5	8,5	8,5	31,43	10,78	213,7	64,16	115,7	100,0	50,99
2	1	30,0	23,9	1,4	5,0	35,02	13,25	261,3	53,36	116,1	1585	120,6
3	1	26,0	0,0	0,0	48,5	36,60	17,83	327,6	28,16	15,00	100,0	46,35
4	2	24,1	17,5	13,5	4,4	92,83	37,14	210,5	138,4	89,08	1214	118,3
5	1	38,0	8,0	7,5	20,3	57,92	23,00	153,2	67,65	74,07	386,4	50,10
6	2	15,6	20,5	23,0	0,0	80,52	23,40	171,5	109,4	521,6	1049	7,075
7	1	27,6	7,2	9,4	9,4	47,58	17,00	166,8	303,4	109,5	244,6	52,29
8	1	31,0	8,9	13,0	20,4	52,64	20,78	251,3	108,3	38,94	220,6	49,80
9	1	34,7	0,0	0,0	26,4	8,281	2,104	191,0	75,72	122,5	279,1	87,69
10	2	25,5	35,0	5,1	0,0	20,60	9,000	208,1	90,62	97,46	279,8	18,36
11	1	14,4	10,8	18,8	25,0	22,52	6,358	158,3	74,66	104,3	100,0	22,17
12	2	19,0	29,0	0,0	0,0	36,54	12,30	351,7	44,60	232,6	359,5	57,65
13	1	25,0	22,0	10,0	20,0	27,13	7,902	472,7	51,80	96,66	100,0	22,10
14	1	35,0	3,0	10,0	20,5	44,49	7,559	215,2	24,06	193,1	100,0	23,97
15	1	15,0	38,0	0,0	15,0	11,52	4,237	254,2	31,64	15,00	311,3	38,10
16	2	18,0	0,0	6,0	28,0	127,4	55,56	287,9	311,5	166,2	100,0	555,1
17	1	29,0	40,0	0,0	20,0	9,538	4,528	349,5	28,26	15,00	100,0	6,422
18	1	43,3	5,7	0,0	33,0	5,815	2,362	452,2	44,61	15,00	100,0	15,83

Fortsetzung Tabelle 32:

Proben- nummer	Futtermitteltyp Müslis=1 Pellets=2	Getreidezutat (%)				T-2/HT-2 Toxin ¹ (µg/kg)	T-2 Toxin ¹ (µg/kg)	DON ¹ (µg/kg)	Zearalenon ¹ (µg/kg)	Ergot- alkaloide ¹ (µg/kg)	OTA ¹ (ng/kg)	F B ₁ ¹ (µg/kg)
		Gerste	Weizen inkl. Dinkel	Hafer	Mais							
19	2	17,5	11,8	18,1	18,0	28,44	9,620	509,1	143,8	36,07	254,6	115,2
20	1	25,5	34,0	10,0	20,0	22,57	7,329	137,7	22,48	15,00	100,0	12,46
21	1	*	*	*	*	78,64	21,26	593,6	126,2	91,87	897,9	199,5
22	1	26,0	14,3	16,9	10,0	62,48	23,60	144,0	44,11	139,6	100,0	40,99
23	1	24,7	7,5	0,0	24,0	8,310	2,900	524,6	94,42	48,43	288,3	61,45
24	1	20,0	0,0	11,2	30,0	62,12	18,76	388,4	167,2	38,89	100,0	175,4
25	1	0,0	0,0	58,5	0,0	109,6	39,30	188,9	45,92	15,00	100,0	6,622
26	1	100,0	0,0	0,0	0,0	17,82	5,900	144,6	2,500	1195	100,0	1,000
27	1	32,7	18,4	0,0	34,0	7,700	2,480	333,6	46,00	15,00	100,0	83,58
28	1	33,0	12,9	0,0	33,0	14,00	3,030	471,4	55,02	15,00	100,0	15,67
29	2	34,0	21,0	0,0	0,0	19,75	4,980	82,13	56,47	49,11	343,8	4,190
30	1	28,0	37,0	1,5	7,8	11,14	5,230	241,7	107,1	108,1	226,2	138,2
31	1	0,0	0,0	100,0	0,0	34,57	8,470	186,5	38,11	15,00	100,0	2,040
32	1	20,0	23,0	0,0	30,0	19,30	5,221	426,8	72,55	87,33	350,4	17,69
33	2	12,8	20,0	20,0	16,0	31,63	8,440	156,8	52,88	348,8	781,6	11,20
34	1	31,0	10,2	11,3	22,7	38,82	15,88	687,9	97,81	109,0	100,0	48,98
35	1	*	*	*	*	37,20	9,245	223,2	54,19	15,00	455,8	8,211
36	1	20,0	17,0	21,0	15,0	18,00	4,330	398,1	71,96	57,87	100,0	5,480

Fortsetzung Tabelle 32:

Proben- nummer	Futtermitt- typ Müslis=1 Pellets=2	Getreidezutat (%)				T-2/HT-2 Toxin ¹ (µg/kg)	T-2 Toxin ¹ (µg/kg)	DON ¹ (µg/kg)	Zearalenon ¹ (µg/kg)	Ergot- alkaloide ¹ (µg/kg)	OTA ¹ (ng/kg)	F B ₁ ¹ (µg/kg)
		Gerste	Weizen inkl. Dinkel	Hafer	Mais							
37	1	15,0	12,2	17,9	15,0	16,85	4,562	438,8	87,48	15,00	1352	8,730
38	1	20,0	26,0	7,0	20,0	11,21	4,440	196,0	28,96	15,00	100,0	79,72
39	1	0,0	0,0	100,0	0,0	75,00	24,44	43,90	29,11	89,60	100,0	1,000
40	1	0,0	0,0	0,0	100,0	1,720	0,750	2201	109,5	15,00	100,0	3,210
41	1	0,0	0,0	0,0	100,0	1,240	0,660	4864	289,5	15,00	207,5	254,8
42	1	15,0	65,0	0,0	0,0	15,78	5,090	261,6	33,71	15,00	100,0	5,512
43	1	24,0	16,0	20,0	6,0	18,78	4,089	159,9	51,09	36,54	238,1	43,10
44	1	19,8	24,4	0,0	19,8	17,20	4,453	213,7	49,29	82,16	100,0	4,453
45	2	20,0	33,0	7,0	10,0	10,30	1,890	150,7	102,2	77,30	581,6	22,04
46	1	26,0	40,0	0,0	20,0	8,061	2,061	82,72	6,888	15,00	719,3	27,84
47	1	23,0	12,30	19,0	14,1	195,8	90,53	166,5	35,22	34,32	100,0	105,1
48	1	0,0	0,0	0,0	100,0	0,770	0,280	16,42	7,850	15,00	100,0	2187
49	1	50,0	3,0	0,0	36,0	6,480	1,934	673,8	202,9	15,00	4120	73,71
50	1	0,0	0,0	100,0	0,0	227,5	42,68	32,86	9,765	15,00	100,0	1,000
51	1	39,0	0,0	28,0	10,0	54,86	24,56	258,7	82,98	141,7	100,0	26,96
52	1	45,0	0,0	36,0	10,0	57,81	7,511	193,2	43,05	55,50	100,0	8,510
53	1	24,0	9,0	40,0	20,0	25,85	3,730	810,6	86,22	129,4	100,0	25,39
54	1	100,0	0,0	0,0	0,0	47,80	18,33	199,9	17,45	15,00	100,0	3,000

Fortsetzung Tabelle 32:

Proben- nummer	Futtrertyp Müslis=1 Pellets=2	Getreidezutat (%)				T-2/HT-2 Toxin ¹ (µg/kg)	T-2 Toxin ¹ (µg/kg)	DON ¹ (µg/kg)	Zearalenon ¹ (µg/kg)	Ergot- alkaloi- ¹ (µg/kg)	OTA ¹ (ng/kg)	F B ₁ ¹ (µg/kg)
		Gerste	Weizen inkl. Dinkel	Hafer	Mais							
55	1	15,3	9,5	0,0	21,0	22,72	5,972	821,1	138,8	157,1	100,0	142,2
56	1	0,0	0,0	0,0	100,0	0,760	0,390	1121	67,10	15,00	100,0	1,000
57	1	14,0	15,0	17,0	11,0	68,90	18,86	144,3	32,60	37,52	100,0	17,50
58	1	0,0	0,0	0,0	100,0	0,750	0,400	716,1	66,18	15,00	100,0	17,00
59	2	10,0	10,0	0,0	21,3	6,400	2,180	176,7	29,32	15,00	100,0	20,90
60	2	18,5	18,0	27,0	0,0	39,20	8,830	145,6	62,10	156,3	246,9	6,590
61	2	16,0	21,5	7,0	15,5	46,50	10,40	135,5	61,26	68,70	291,7	357,0
62	1	18,5	13,5	0,0	23,0	4,000	1,810	429,9	65,53	15,00	100,0	116,0

¹ Aus statistischen Gründen wurden alle Proben in die Auswertung mit einbezogen, das heißt, auch Proben mit Toxingehalten unterhalb der in 3.3.1.1 beschriebenen Nachweisgrenzen. Diese Proben wurden mit der halben Nachweisgrenze angegeben.

Tabelle 33: Bezeichnung und Zusammensetzung der untersuchten Futterproben

Proben-nummer	Warenbe-zeichnung	Zusammensetzung
1	Mash	Weizenkleie, Gersteflocken, Vollkornhaferflocken, Maisflocken, Apfeltrester, Leinsamen, ZR Melasse, Apfelsirup, Traubenschalen, ZR Schnitzel, getrocknete Grashäcksels, Sonnenblumenkerne fein gemahlen, Bierhefe, Seesalz, Leinen-Sonnenblumenöl kaltgepresst, Weizenkeime, Koriander, Seealgenkalk
2	Müsli	Gersteflocken+C3, Weizengriesskleie, Luzernegrünmehl, Maisflocken, Zuckerrohrmelasse, Weizenflocken, Haferschälkleie, Calciumcarbonat, Johannesbrotschrot, Sonnenblumenöl, Zuckerrübenmelasse, NaCl, Monocalciumphosphat, Hefe
3	Müsli	Maisflocken, Gerste, gepoppt, Luzernegrünmehl, Melasse, Leinsamen, Pflanzenöl raffiniert, Calciumcarbonat, Leinenschrot, NaCl, Ca-Na-P, Magnesium-Oxid
4	Pellets	Gersteflocken, Luzernehäcksels, Weizenkleie, Haferschälkleie, Apfeltrester, Leinsamen fein gemahlen, Weizenkeime, Maisflocken, Zuckerrübenschnitzel, Gerstenkeime, Kräuter (Rosmarin, Fenchel, Anis, Kamille), Seealgenkalk, Zuckerrübenmelasse, Grashäcksels warmluftgetrocknet, Traubenkernextrakt, Seesalz, Maiskeime, Schwarzkümmelsamen, Bierhefe, Leinen-Sonnenblumenöl kaltgepresst
5	Müsli	Gersteflocken, Maisflocken, Weizenkleie, Haferschälkleie, Luzernehäcksels, Apfeltrester, Zuckerrübenmelasse, Seealgenkalk, Apfelsirup, Zuckerrübenschnitzel, Lein-/Sonnenblumenöl kaltgepresst, Leinsamen fein gemahlen, Seesalz, Koriander, Maiskeime, Bierhefe
6	Pellets	Luzernegrünmehl, Haferschälkleie, Weizenkleie, Gerste, ZR-Melasse, Calciumcarbonat, NaCl, Monocalciumphosphat (anorganisch)
7	Müsli	Gersteflocken, Maisflocken, ZR-Melasse, Grashäcksels "Prä-Alpin", Weizenkleie, Haferschälkleie, Trockenapfel, Luzernehäcksels, Maiskeime, Apfelsüsse, kohlsaurer Algenkalk, Sonnenblumenkerne, fein gemahlen, Kräuter (Knoblauch, Anis, Fenchel, Salbei, Rosmarin, Mariendistel, Malve), ZR-Schnitzel, Weizenkeime, Seesalz, Leinsamen, fein gemahlen, Leinöl, kalt gepresst, Bierhefe, Hanfnüsse
8	Müsli	Gersteflocken, Maisflocken, Haferschälkleie, Luzernegrünmehl, Weizenkleie, Zuckerrohrmelasse, Mais (expandiert), Calciumcarbonat, Obst(Apfel)trester getr., Gerste, NaCl, Mais, Mariendistelöl, Dicalciumphosphat, Kräutermischung (Pertersilie, Pfefferminze, Salbei, Goldrute, Rosmarin, Brennesselblätter, Rotklee). Futtermittel enthält Zusatzstoffvormischung
9	Müsli	Mais (aufgeschlossen), Luzernegrünmehl, Gersteflocken, Melasse, Johannisbrot, Luzerneheu (gehäckselt), Biertreber (getrocknet), Bierhefe (BT-Hefe), Möhren (extrudiert), Sonnenblumenöl, Calciumcarbonat, Anis, Fenchel, Thymian, Rosmarin, Brennessel
10	Pellets	Gerste, Luzernegrünmehl, Weizenkleie, Weizen, Weizengriesskleie, ZR-Melasse, Haferschälkleie, ZR-Mellasseschnitzel, Calciumcarbonat, NaCl, Pflanzenöl (Soja), Hefe (getrocknet), Monocalciumphosphat
11	Müsli	Mais, geflockt, Hafer, Sojaextraktionsschrot dampferhitzt, Gerste geflockt, Weizenkleie, Zuckerrohrmelasse, Erbsen geflockt, Calciumcarbonat, NaCl, Dicalciumphosphat, Mariendistelöl, Magnesiumoxid. Differenz zu 100% ist der Anteil an Vormischung in der Rezeptur
12	Pellets	Gerste, Weizenkleie, Soja(bohnen)extraktionsschrot dampferhitzt, Sojaschalen eiweissarm, Zuckerrohrmelasse, Leinsamen, Weizen, Calciumcarbonat, Laktose, Palmölextrakt (Linol), NaCl, Monocalciumphosphat
13	Müsli	Gerste geflockt, Mais geflockt, Weizengriesskleie, Haferschälkleie, Weizen geflockt, Apfeltrester, Meeressalgen, Melasseschnitzel, Bierhefe, Melasse, Knoblauch, NaCl

Fortsetzung Tabelle 33:

Probennummer	Warenbezeichnung	Zusammensetzung
14	Müsli	Gerste geflockt, Mais geflockt, Hafer geflockt, Leinschrot, Apfeltrester, Bierhefe, Leinsamen, Fermentgetreide, Weizengriesskleie, Melasse, Erbsenflocken, Karottenflocken, Weizennachmehl, Meeresalgen, Melasseschnitzel, Maiskleberfutter, NaCl, Dicalciumphosphat, Calciumcarbonat, Magnesiumoxid
15	Müsli, auch als Mash zu verwenden	Dinkel im Spelz stark gewalzt, Maisflocken, Gersteflocken thermisch behandelt, Weizenkleie, Luzerneblätter, Leinkuchenflocken kalt gepresst, Birtreber, Zuckerrübenmelasse, Bierhefe, Leinöl kaltgepresst, Echinacea purpurea, Calciumcarbonat, Monocalciumphosphat, NaCl, Magnesiumoxid
16	Pellets	Maiskeime, Malz, Maisflocken, Haferflocken, Gersteflocken, Leinsamen fein gemahlen, Apfelsüsse, Seesalz, Traubenkernextrakt, Leinöl kaltgepresst, Kräuter, Bierhefe, Seealgenmehl, Blütenpollen, Magnesiumfumerat, L-Lysin, DL-Methionin
17	Müsli	Dinkel im Spelz gewalzt, Gerste gewalzt, Maisflocken, Dinkelspelz, Zuckerrübenmelasse, Leinkuchenflocken kaltgepresst, Calciumcarbonat, Monocalciumphosphat, Magnesiumoxid, NaCl
18	Müsli	Gersteflocken, Maisflocken, Mais expandiert, Weizenkleie, Luzerne getrocknet (Heu), Erbsenflocken, Mariendistelöl, Johannesbrotstücke, Möhren getrocknet, NaCl, Calciumcarbonat, Dicalciumphosphat, Magnesiumoxid. Differenz zu 100% ist der Anteil an Vormischung in der Rezeptur
19	Pellets	Hafer, Mais, Gerste, Sojaextraktionsschrot, Weizenkleie, Zuckerrohrmelasse, Obst(Apfel)trester getrocknet, Calciumcarbonat, Dicalciumphosphat, NaCl, Birtreber getrocknet, Bierhefe, Magnesiumoxid. Differenz zu 100% ist der Anteil an Vormischung in der Rezeptur
20	Müsli	Dinkel im Spelz gewalzt, Gerste gewalzt, Maisflocken, Hafer gewalzt, Dinkelspelz, Zuckerrübenmelasse, Leinkuchenflocken kalt gepresst, Calciumcarbonat, Birtreber, Bierhefe, NaCl, Monocalciumphosphat, Magnesiumoxid
21	Müsli	Maisflocken, Gersteflocken, Duohafer, Luzernegrünmehl, Leinsamen extrudiert, Mais extrudiert, Johannesbrotschrot, Zuckerrohrmelasse, Tapioka extrudiert, Leinöl, Weizen extrudiert, getrocknete Hefe, Calciumcarbonat, Dicalciumphosphat (anorg.), NaCl, L-Lysin-Sulfat, Magnesiumacetat
22	Müsli	Gerste, Haferschälkleie, Weizen, Apfeltrester, Maisflocken, Zuckerrohrmelasse, Trockenschnitzel, Mais, Gersteflocken, Luzernegrünmehl, Calciumcarbonat, Weizenkleie, Weizengriesskleie, Zuckerrübenmelasse, NaCl, Monocalciumphosphat
23	Müsli	Gersteflocken, Maisflocken, Leinschrot, Sojaschrot, Weizenkleie, Mais, Melasse, Gerste, Zusatzstoffvormischung, Pflanzenfett raffiniert, Calciumcarbonat
24	Müsli	Maisflocken, Luzernegrünmehl, Gersteflocken, Haferschälkleie, Zuckerrübenmelasse, Leinkuchen, Sojaextraktionsschrot dampferhitzt, Sojaöl, Monocalciumphosphat, Calciumcarbonat, Mineral-, Vitamin- und Zusatzstoffvormischung, NaCl
25	Mischfutter	Rübenmelasse, Haferschälkleie, Hafer gewalzt, Haferschalen, Leinöl
26	Einzelfuttermittel	Gerste, flockiert
27	Müsli	Maisflocken, Gersteflocken, Weizenflocken, Grünmehl, Melasseschnitzel, Weizenkleie, Birtreber getrocknet, Bierhefe (BT-Hefe), Zuckerrübenmelasse, Calciumcarbonat

Fortsetzung Tabelle 33:

Probennummer	Warenbezeichnung	Zusammensetzung
28	Müsli	Gersteflocken, Maisflocken, Luzernegrünmehl, Weizenflocken, Weizenkleie, Weizen, Leinöl, Calciumcarbonat, NaCl, Monocalciumphosphat, Magnesiumoxid
29	Pellets	Gerste, Luzernegrünmehl, Sojaextraktionsschrot, Weizenkleie, Weizenkeime, Zuckerrübenmelasseschnitzel, Weizen, Zuckerrübenmelasse, Vormischung, Calciumcarbonat, NaCl
30	Müsli	Weizengriesskleie, Zuckerrübentrockenschnitzel, Luzernegrünmehl, Gersteflocken, Maisflocken, Weizenflocken, Zuckerrohrmelasse, Sojaöl, Mais extrudiert, Johannisbrotschrot, Haferschälkleie, Weizenkleie, Zuckerrübenmelasse, Maiskleberfutter, Vormischung, Weizenkleberfutter, Calciumcarbonat, NaCl, Monocalciumphosphat
31		Hafer
32	Müsli	Luzerne, Weizenkleie, Gersteflocken, Maisflocken, Maiskleber, Weizen, Calciumcarbonat, Zuckerrohrmelasse, NaCl, Magnesiumoxid
33	Pellets	Haferschälkleie, Luzernegrünmehl, Gerste, Mais, Weizenkleberfutter, Weizenkleie, Trockenschnitzel, Maiskleberfutter, Zuckerrübenmelasse, Leinextraktionsschrot, Calciumcarbonat, NaCl
34	Müsli	Gersteflocken, Maisflocken, Haferschälkleie, Weizenkleie, Luzernegrünmehl, Zuckerrohrmelasse, Obst(Apfel)trester getr., Calciumcarbonat, NaCl, Gerste, Mais, Dicalciumphosphat
35	Müsli	Gerste, Hafernachmehl, Soja, Zuckerrüben, Glucosesirup, Weizen, Gras, Erbsen, Mais, Weizennachmehl, Pflanzenöl, Rohrzuckermelasse, Kalksteinmehl, Trockenkarotten, Dicalciumphosphat, NaCl, Vollfett Leinsamen, Mineralien, Yea-Sacc 1026 (<i>Saccharomyces cerevisiae</i> 2×10^8 cfu/kg), Frucht, Kräuter, Magnesiumoxid
36	Müsli	Gersteflocken, Maisflocken, Hafer geflockt, Apfeltrester, Weizengrießkleie, Haferschälkleie, Weizenkleie, Melasseschnitzel, Melasse, Calciumcarbonat, Dicalciumphosphat, NaCl, Vitamin- und Spurenelementvormischung
37	Müsli	Hafer, Sojaextraktionsschrot dampferhitzt, Gerste geflockt, Mais geflockt, Weizenkleie, Zuckerrohrmelasse, Sojabohnen expandiert, Johannesbrot zerkleinert, Mais, Calciumcarbonat, NaCl, Dicalciumphosphat, Mariendistelöl, Möhren getrocknet, Magnesiumoxid, Futtermittel enthält Zusatzstoffvormischung
38	Müsli	Dinkel im Spelz gewalzt, Maisflocken, Gersteflocken thermisch behandelt, Hafer gewalzt, Weizenkleie, Luzerneblätter, Leinkuchenflocken kalt gepresst, Zuckerrübenmelasse, Biertreber, Bierhefe, Monocalciumphosphat, NaCl, Magnesiumoxid
39	Schwarzhafer	Schwarzhafer
40	Maisflocken	Körnermais hydrothermisch aufgeschlossen und gewalzt
41	Mais	Mais gebrochen
42	Müsli	Dinkelspelz, Dinkel im Spelz, Gerste thermisch behandelt, Leinöl kalt gepresst, Ginkoblätter, Leinkuchenflocken kalt gepresst, Biertreber, Bierhefe, Calciumcarbonat, Monocalciumphosphat, NaCl, Magnesiumoxid, Vitamin- und Spurenelementmischung
43	Müsli	Gerste gepufft, Hafer, Luzerne, Weizenflocken gepufft, Rohrmelasse, Mais gepufft, Gerste, Sojaöl, Calciumcarbonat, Weizengrießkleie, Haferkleie, NaCl, Palmkernöl, Magnesiumoxid, Monocalciumphosphat
44	Mash	Weizenkleie, Mais geflockt, Gerste geflockt, Obst (Apfel) trester getr., Zuckerrohrmelasse, Leinsamen, Calciumcarbonat, Kräutermischung (Petersilie, Pfefferminz, Salbei, Goldrute, Rosmarin, Brennessel, Rotklee, Löwenzahn, Melissenkraut, Knoblauch), NaCl, Hefe, Dicalciumphosphat, Magnesiumoxid, Zusatzstoffvormischung enthalten

Fortsetzung Tabelle 33:

Probennummer	Warenbezeichnung	Zusammensetzung
45	Pellets	Gerste, Weizen, Sojaschalen, Mais, Weizengrießkleie, Hafer, Weizenkleie, Leinsamen, Rohrmelasse, Calciumcarbonat, Palmkernöl, NaCl, Magnesiumoxid, Monocalciumphosphat
46	Müsli	Dinkel im Spelz gewalzt, Gerste gewalzt, Maisflocken, Dinkelspelz, Zuckerrübenmelasse, Leinkuchenflocken kaltgepresst, Calciumcarbonat, Biertreber, Bierhefe, NaCl, Monocalciumphosphat, Magnesiumoxid, Vitamin- und Spurenelementmischung enthalten
47	Müsli	Gerste, Haferschälkleie, Weizen, Apfeltrester lose, Maisflocken, Trockenschnitzel, Zuckerrohrmelasse, Mais, Gersteflocken, Calciumcarbonat, Luzernegrünmehl, Weizenkleie, Weizengrießkleie, Zuckerrübenmelasse, NaCl, Monocalciumphosphat, Apfelaroma, Zusatzstoffe (Vitamine und Spurenelemente)
48	Mais	genetisch veränderter Mais
49	Müsli	Gerste getoastet, Mais aufgepoppt gewalzt, Weizen, Sonnenblumenkerne, Leinsamen, Melasse, Futteröl, Hefe, Lecithin, Vitamin- und Spurenelementmischung
50	Schwarzhafer	Französischer Schwarzhafer (melassiert)
51	Müsli	Gerste, Haferschälkleie, Trockengrünfutter, Wiesenheu, Mais, Weizen, Sonnenblumenkerne, Melasse, Vormischung (Vitam., Min., Spurenelem.), Bierhefe, Pflanzenöl, ätherische Kräuteröle
52	Müsli	Gerste, Haferschälkleie, Schwarzhafer, Mais, Vormischung, Sonnenblumenkerne, Leinsamen, Melasse, Zusatzstoffe (Vitamine und Spurenelemente)
53	Müsli	Haferschälkleie, Gerste, Mais, Weizen, Melasse, Vormischung, Zusatzstoffe (Vitamine und Spurenelemente)
54	Einzelfuttermittel	Gersteflocken
55	Müsli	Obst(Apfel)trester getr., Gerste geflockt, Mais geflockt, Zuckerrohrmelasse, Weizenkleie, Mais, Mariendistelöl, Luzerne getrocknet (Heu), Johannesbrotschrot, Calciumcarbonat, NaCl, Sonnenblumenkerne, Möhren getrocknet, Dicalciumphosphat, Magnesiumoxid, Luzernegrünmehl, Brennesselblätter, Koriander, Majoran, Gartenbohnenkraut, Kamille, Salbei, Haselnussblätter
56	Einzelfuttermittel	Maisflocken
57	Mash	Leinsamen, Weizenkleie, Obst(Apfel)trester getr., Mais geflockt, Gerste geflockt, Schwarzhafer, Hafer, Zuckerrohrmelasse, Calciumcarbonat, Gerste expandiert, Dicalciumphosphat, NaCl, Biertreber getrocknet, Magnesiumoxid, Bierhefe, Salbei, Haselnußblätter, Brennesselblätter, Koriander, Majoran, Gartenbohnenkraut, Kamille
58	Einzelfuttermittel	Maisflocken
59	Pellets	Mais, Calciumcarbonat, Calcium-Natrium-Phosphat, Gerste, Traubenzucker, Weizenkleie, NaCl, Zusatzstoffvormischung, Melasse, Magnesiumoxid, Pflanzenfett raffiniert
60	Pellets	Gerste, Weizenkleie, Hafer, Haferschälkleie, Palmkernexpeller, Luzernegrünmehl, Zuckerrübenmelasse, Zuckerrübenmelasseschnitzel, Obsttrester, Calciumcarbonat, Vinasse, NaCl, Monocalciumphosphat
61	Pellets	Gerste, Weizen, Weizenkleie, Mais aufgeschlossen, Mais, Leinsamenexpeller, Hafer, Sojaschrot, Sonnenblumenextraktionsschrot, Molkepulver, Rohrzuckermelasse, Sojaweißkonzentrat, Dextrose, Sojaschalen, Calciumcarbonat, Lactose, NaCl, Monocalciumphosphat, Premix, Sojaöl, Kartoffeleiweiß, Hefe, Kokosöl, L-Lysin, Methionin HA, Fructooligosaccharide
62	Müsli	Luzerne, Maisflocken, Gersteflocken, Vitaminpellets, Dinkel, Weizen aufgeschlossen, Mais aufgeschlossen, Rohrzuckermelasse

DANKSAGUNG

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. Ewald Usleber für die Überlassung des Themas und die stets gewährte freundliche Unterstützung bei der Anfertigung dieser Arbeit.

Herrn Dr. Valeriu Curtui danke ich herzlich für die hervorragende Betreuung, die vielen Anregungen und die geduldige Beantwortung zahlreicher Fragen.

Mein Dank gilt ebenso allen Mitarbeitern der Professur für Milchwissenschaften; insbesondere Frau Margit Keßler, Frau Renate Stumpf und Frau Yvonne Ackermann möchte ich für ihre Hilfsbereitschaft, Unterstützung und harmonische Zusammenarbeit während der Anfertigung dieser Arbeit danken. Darüber hinaus danke ich Frau Christa Zeidler für ihre Hilfe bei allen organisatorischen Angelegenheiten und nicht zuletzt auch fürs Babysitten.

Zudem danke ich allen, vor allem aber Frau Diana Klotz, Frau Yvonne Ackermann und Frau Madeleine Groß, die bei der Probenbeschaffung und dem Tragen der vielen Futtersäcke geholfen haben.

Weiterhin möchte ich mich bei Frau Prof. Dr. Kerstin Fey und der Klinik für Pferde, Innere Medizin, der Justus-Liebig-Universität Gießen für die Bereitstellung ihres Pferdefutters bedanken.

Herrn Dr. Failing und Frau Sparenberg danke ich herzlich für die stets gewährte Hilfe bei der statistischen Auswertung meiner Daten.

Abschließend danke ich Herrn Philipp Reif für die moralische, sowie fachliche Hilfe bei der Erstellung dieser Arbeit und allen Freunden, sowie meiner Familie, für die Geduld und Toleranz während dieser Zeit. Ganz besonders danke ich aber meinem Lebensgefährten Herrn Johannes Friedrich für die stets geduldig gewährte Hilfe, die liebevolle Unterstützung und dafür, dass er es mir ermöglicht hat, trotz unseres Babys diese Arbeit zu vollenden.

ERKLÄRUNG ZUR DISSERTATION

Ich erkläre: 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.

Kristina Liesener



édition scientifique
VVB LAUFERSWEILER VERLAG

VVB LAUFERSWEILER VERLAG
STAUFENBERGRING 15
D-35396 GIESSEN

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

ISBN: 978-3-8359-5919-4



9 783835 195919 4