



Dieses PDF/A-Dokument wurde maschinell aus der  
approbierten Originalversion erzeugt. Die Originalversion  
finden Sie an der Universitätsbibliothek der  
Veterinärmedizinischen Universität, Wien

Aus dem Institut für Ernährung  
der Veterinärmedizinischen Universität Wien  
(Vorstand: Univ. Prof. Dr. Josef Troxler)

UNTERSUCHUNGEN ZUM VORKOMMEN DER MYKOTOXINE  
DEOXYNIVALENOL, ZEARALENON, FUMONISINE, OCHRATOXIN A UND  
AFLATOXINE IN TROCKENFUTTERN FÜR HUNDE

**INAUGURAL – DISSERTATION**  
zur Erlangung der Würde eines  
**DOCTOR MEDICINAE VETERINARIAE**  
der Veterinärmedizinischen Universität Wien

vorgelegt von  
Mag. med. vet. Lisa Koinig

Wien, im August 2008

**1. Begutachter:**

Univ. Prof. Dr. Josef Böhm  
Institut für Tierernährung

**2. Begutachter:**

Univ. Prof. Dr. Mathias Ritzmann  
Klinik für Schweine

**GEWIDMET  
MEINER FAMILIE**

## Abkürzungsverzeichnis

µg/kg	Mikrogramm pro Kilogramm
AF	Aflatoxin
AFB <sub>1</sub>	Aflatoxin B <sub>1</sub>
ALP	Alkalische Phosphatase
ALT	Alanin Amino Transferase
AST	Aspartat Amino Transferase
AUT	Österreich
BEN	Endemische Balkannephropathie
CH	Schweiz
D	Deutschland
DON	Deoxynivalenol
ELEM	Equine Leukoenzephalomalazie
ELISA	Enzym-linked Immuno Sorbent Assay
F	Frankreich
FB1	Fumonisin B1
FIN	Finnland
FUM	Fumonisine
GC	Gas-Chromatographie
GGT	Gamma Glutamat Transferase
HPLC	Hochdruckflüssigkeitschromatographie
HWZ	Halbwertszeit
i.v.	intravenös
IAC	Immunoaffinitätssäulchen
IgA	Immunglobulin A
IgG	Immunglobulin G
IgM	Immunglobulin M
KGW	Körpergewicht
LD 50	Letale Dosis 50
LDH	Laktat Dehydrogenase
LOD	Limit of detection = Nachweisgrenze
LOQ	Limit of quantitation = Quantifizierungsgrenze
Max	Maximalwert
MD	Medianwert
min.	Minuten
MW	Mittelwert
n.d.	nicht detektierbar
n.q.	nicht quantifizierbar
ng/g	Nanogramm pro Gramm
OTA	Ochratoxin A
OT $\alpha$	Ochratoxin $\alpha$

PBS	Phosphatgepufferte Kochsalzlösung
PCNA	proliferating cell nuclear antigen
ppb	parts per billion = $\mu\text{g}/\text{kg}$ = $\text{ng}/\text{g}$
PPE	Porzines Pulmonäres Ödem
PT	Prothrombinzeit
RIA	Radioimmunoassay
SD	Standardabweichung
Sek.	Sekunden
TLC	Dünnschicht-Chromatographie
UK	Großbritannien
USA	Vereinigte Staaten von Amerika
WFR	Wiederfindungsrate
ZEA	Zearalenon

<b>1. EINLEITUNG.....</b>	<b>1</b>
<b>2. LITERATUR .....</b>	<b>3</b>
<b>2.1. Mykotoxine.....</b>	<b>3</b>
<b>2.2. Deoxynivalenol (DON) .....</b>	<b>7</b>
2.2.1. Herkunft und Vorkommen von DON.....	7
2.2.2. Eigenschaften von DON.....	8
2.2.3. Absorption, Verteilung, Exkretion von DON.....	8
2.2.4. Biotransformation.....	9
2.2.5. Klinik und Pathologie.....	10
2.2.6. Auswirkung auf das Immunsystem .....	12
<b>2.3. Zearalenon (ZEA).....</b>	<b>13</b>
2.3.1. Herkunft und Vorkommen .....	13
2.3.2. Eigenschaften von Zearalenon.....	14
2.3.3. Absorption, Verteilung, Exkretion .....	15
2.3.4. Biotransformation.....	16
2.3.5. Klinik und Pathologie.....	17
2.3.6. Bindung an Östrogenrezeptoren .....	21
<b>2.4. Fumonisine (FUM) .....</b>	<b>22</b>
2.4.1. Herkunft und Vorkommen .....	22
2.4.2. Eigenschaften der Fumonisine .....	23
2.4.3. Absorption, Verteilung, Exkretion .....	26
2.4.4. Biotransformation.....	28
2.4.5. Klinik und Pathologie.....	28
2.4.6. Beeinträchtigung des Sphingolipidmetabolismus .....	32
<b>2.5. Ochratoxin A (OTA) .....</b>	<b>33</b>
2.5.1. Herkunft und Vorkommen .....	33
2.5.2. Eigenschaften von Ochratoxin A.....	34
2.5.3. Absorption, Verteilung, Exkretion von Ochratoxin A .....	35
2.5.4. Biotransformation von OTA.....	37
2.5.5. Klinik und Pathologie der Ochratoxikose .....	37
2.5.6. Ochratoxin A im Futter .....	40
<b>2.6. Aflatoxine (AF) .....</b>	<b>41</b>
2.6.1. Herkunft und Vorkommen .....	41
2.6.2. Eigenschaften der Aflatoxine .....	42
2.6.3. Absorption, Verteilung und Exkretion von Aflatoxinen .....	43
2.6.4. Biotransformation.....	43
2.6.5. Klinik und Pathologie.....	44
2.6.6. Aflatoxine im Futter .....	47
<b>2.7. Mehrfach - Kontamination verschiedener Mykotoxine.....</b>	<b>48</b>

<b>2.8. Nationale und internationale Grenz- und Richtwerte für DON, ZEA, FUM, OTA und AF .....</b>	<b>49</b>
<b>3. EIGENE UNTERSUCHUNGEN .....</b>	<b>51</b>
<b>3.1. Material und Methode .....</b>	<b>51</b>
3.1.1. Bestimmung der Mykotoxine DON, ZEA, FUM, OTA, AF mittels ELISA .....	51
3.1.2. Bestimmung des Mykotoxins DON mittels HPLC .....	56
3.1.3. Bestimmung des Mykotoxins ZEA mittels HPLC .....	60
<b>3.2. Validierung der Methode.....</b>	<b>65</b>
3.2.1. Richtigkeit .....	65
3.2.2. Nachweisgrenze.....	65
<b>3.3. Untersuchungsgut.....</b>	<b>66</b>
<b>3.4. Ergebnisse .....</b>	<b>70</b>
3.4.1. ELISA Ergebnisse .....	70
3.4.2. HPLC Ergebnisse .....	77
3.4.3. Korrelation ELISA – HPLC .....	88
<b>4. DISKUSSION .....</b>	<b>89</b>
<b>4.1. Analytische Verfahren zur Bestimmung von DON, ZEA, FUM, OTA und AF .....</b>	<b>89</b>
<b>4.2. Deoxynivalenol.....</b>	<b>94</b>
<b>4.3. Zearalenon.....</b>	<b>95</b>
<b>4.4. Fumonisine .....</b>	<b>97</b>
<b>4.5. OTA .....</b>	<b>98</b>
<b>4.6. Aflatoxine .....</b>	<b>99</b>
<b>5. ZUSAMMENFASSUNG.....</b>	<b>103</b>
<b>6. SUMMARY .....</b>	<b>104</b>
<b>7. LITERATURVERZEICHNIS .....</b>	<b>105</b>
<b>8. ANHANG .....</b>	<b>130</b>
<b>8.1. Übersicht über die Probennummerierung .....</b>	<b>130</b>
<b>8.2. Übersicht über die Ergebnisse aller Proben (ELISA und HPLC).....</b>	<b>134</b>

## 1. EINLEITUNG

Mykotoxine sind von Schimmelpilzen gebildete toxische Sekundärstoffwechselprodukte. In den letzten Jahrzehnten ist man zunehmend zu der Erkenntnis gekommen, dass diese Stoffwechselprodukte in unterschiedlichen Konzentrationen in Nahrungs- und Futtermitteln vorkommen und zu gesundheitlichen Problemen bei Mensch und Tier führen können.

Mykotoxine schädigen den Organismus nach deren Aufnahme über die Haut, Schleimhaut, sowie über die orale Aufnahme oder Inhalation. Die Zahl der bekannten Schimmelpilzarten beträgt ungefähr 120.000. Von diesen sind derzeit ca. 400 chemisch definierte Mykotoxine bekannt. Ein kumulativer Effekt ist dann zu erwarten, wenn mehrere Pilzarten sowie unterschiedliche Mykotoxine gleichzeitig vorkommen.

Die Bildung von Mykotoxinen erfolgt vor allem dann, wenn die natürliche Keimflora während des Wachstums der Futterpflanzen oder der Lagerung der Futtermittel einer besonderen Pilzflora weicht. Futterpflanzen werden gegenüber Pilzkontamination empfindlicher, wenn bereits Schädigungen der Futterpflanzen durch Insekten, bestimmte Witterungseinflüsse wie Hagelschlag und mechanische Einflüsse während der Ernte bzw. des Transportes stattgefunden haben.

Mykotoxinkontaminierte Nahrungs- und Futtermittel stellen wegen des Toxizitätspotentials weltweit ein ernsthaftes Problem dar. Die FAO (Food and Agriculture Organisation) der Vereinten Nationen schätzt, dass bis zu 25 % des Getreideaufkommens der gesamten Welt mit Mykotoxinen belastet ist. Etwa 20 % der Zerealienenernte der EU enthält messbare Mengen Mykotoxine (GERSTELL aktuell, 2006). Den Aflatoxinen und Ochratoxinen kommt aufgrund ihrer hohen Toxizität eine große Bedeutung zu. Jedoch spielen sie in unseren Breitengraden eine untergeordnete Rolle. In unserer gemäßigten Klimazone mit mittleren Temperaturen und Niederschlägen ist vor allem die Schimmelpilzgattung *Fusarium* von Bedeutung, die hauptsächlich auf Getreide und Mais zu finden ist. Fusarien sind in der Lage eine Reihe von Mykotoxinen zu synthetisieren. Von Bedeutung sind vor allem Trichothecene (Deoxynivalenol, T2-Toxin,..), Zearalenon und Fumonisine.

Wegen des hohen Standards der Nahrungsmittelproduktion in Mitteleuropa und anderen entwickelten Staaten wird eine akute Gefährdung durch Mykotoxine als gering eingeschätzt.

In österreichischen Futtermittelproben der Jahre 1995 bis 1999 wurden in 95 % der durchgeführten Mykotoxinanalysen Fusarientoxine nachgewiesen. Besonders stark belastet mit Fusarientoxinen waren Mais, Hafer und Weizen (HOCHSTEINER und SCHUH, 2001).

RAZZAZI-FAZELI et al. (2001) untersuchten 10 Trockenfutter und 30 Feuchtfutter für Hunde und Katzen auf OTA. Bei 47 % der untersuchten Futtermittel wurden Konzentrationen von 0.1 – 0.8 µg/kg Futter gefunden.

SONGSERMSAKUL et al. (2004) testeten 29 Hundetrockenfutter und 11 Nassfutter auf das Vorkommen von DON und OTA. Alle Trockenfutter waren mit DON kontaminiert. Der Konzentrationsbereich reichte von 22 – 1837 µg/kg Futter. In 3 Nassfutterproben konnte DON nachgewiesen werden. Drei Trockenfutterproben (7 – 40 µg/kg) und 2 Nassfutterproben (45 und 115 µg/kg) konnten OTA positiv getestet werden.

PÜHRINGER (2003) testete 55 Katzenfuttermittel auf den OTA Gehalt. Von diesen 55 Katzenfuttermitteln entfielen 45 auf Feuchtfuttermittel und 10 auf Trockenfuttermittel. Von den insgesamt untersuchten Futtermitteln wiesen 14 einen positiven Gehalt im Bereich von 0.11 bis 2.41 µg OTA/kg Futter auf. Sieben Feuchtfutter waren von 0.65 bis 2.33 µg OTA/kg Futter kontaminiert und sieben von zehn Trockenfutter wiesen einen Gehalt von 0.31 bis 2.41 µg OTA/kg Futter auf.

In der EU gibt es Höchstwerte und Richtlinien bezüglich unterschiedlicher Mykotoxine für verschiedene Lebensmittel und Futtermittel. Leider gibt es meist keine eigenen Grenzwerte für Futter für Haustiere. Hunde zählen zur Gattung der Fleischfresser, dennoch spielen Getreide und Getreideprodukte in ihrer Ernährung eine große Rolle.

Im Rahmen der vorliegenden Dissertation wurden am Institut für Ernährung und auf der Klinik für Schweine der Veterinärmedizinischen Universität 76 Hundetrockenfuttermittel im Zeitraum von März bis September 2007 auf das Vorkommen von 5 bedeutenden Mykotoxinen (DON, ZON, FUM, OTA und AF) untersucht.

Ziel dieser Dissertation war den Gehalt der Mykotoxine Deoxynivalenol, Zearalenon, Fumonisine, Ochratoxin A und Aflatoxine im Hundetrockenfutter zu bestimmen und einen allgemeinen Überblick zu schaffen.

## 2. LITERATUR

### 2.1. Mykotoxine

Mykotoxine sind sekundäre Stoffwechselprodukte von Schimmelpilzen, hauptsächlich von *Aspergillus* – , *Penicillium* – und *Fusarien* – Gattungen. Diese werden auf Futter- und Lebensmitteln gebildet. Bei Warmblütern rufen sie nach Aufnahme über die Nahrung, Hautkontakt oder Inhalation Schädigungen hervor.

Neben der Pathogenität ihrer Toxine für Mensch und Tier ist bei den *Fusarien* noch die Pflanzenpathogenität zu erwähnen.

Manche Mykotoxine haben auch antibiotische Eigenschaften. Ihr Einsatz als Antibiotikum ist aber meist wegen ihrer überwiegenden Toxizität nicht möglich.

In Abhängigkeit von den vorherrschenden Konditionen (Temperatur, Feuchtigkeit, Sauerstoffgehalt, Substrat, konkurrierende Mikroflora, Insektenbefall, Zustand des Getreides, Anfälligkeit unterschiedlicher Getreidesorten) werden sie in unterschiedlichem Ausmaß gebildet (DIEKMAN und GREEN, 1992).

Auf Grund moderner Labormethoden und aufgrund des wachsenden Forschungsinteresses an Mykotoxinen konnten bislang über 400 unterschiedliche Mykotoxine differenziert werden. Aus praktischer Sicht ist nur eine kleine Anzahl an Mykotoxinen, wie Aflatoxine, Trichothecene, Zearalenon, Ochratoxine und Fumonisine von Bedeutung (BINDER et al., 2007).

Man unterscheidet drei Möglichkeiten der Nahrungsmittelkontamination mit Mykotoxinen. An erster Stelle steht die Primärkontamination der Lebensmittelrohstoffe durch Toxinbildner. Des weiteren gibt es die Sekundärkontamination der verarbeiteten oder zubereiteten Lebensmittel durch Mykotoxine.

Eine dritte wichtige Möglichkeit der Kontamination stellt der sogenannte „Carry over“ Effekt dar. Hier nehmen Nutztiere toxinhaltige Futtermittel auf, sodass Mykotoxine in unveränderter oder metabolisierter Form in verschiedenen Organen akkumulieren bzw. ausgeschieden werden und so mittelbar in die Nahrungsmittelkette eindringen.

Bei der Pilzflora der Getreidekörner unterscheidet man zwischen Feldpilzen und Lagerpilzen.

#### Feldpilze

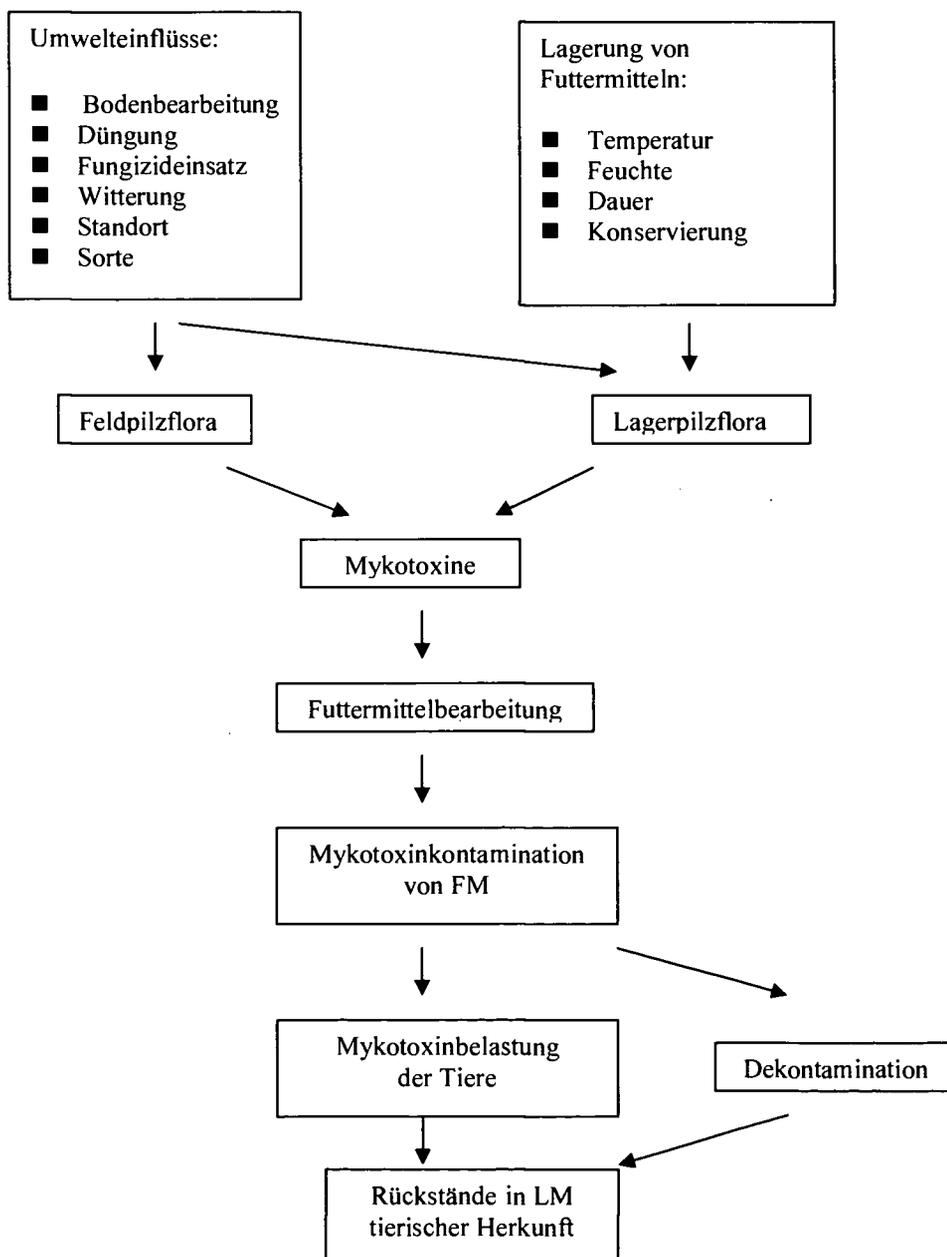
Feldpilze befallen Pflanzen bereits vor der Ernte. Sie sind an einen höheren Feuchtigkeitsgehalt des Substrates gebunden. Ein typischer Vertreter ist die Gattung *Fusarium* (OSWEILER, 1992). Feldpilze benötigen einen Feuchtigkeitsgehalt von über 20 %, den sie normalerweise nur auf dem Feld vorfinden (LEW, 1993). Sie können sich unter günstigen Bedingungen auch nach der Ernte weiterentwickeln. In unserem Klima bleibt das Getreide üblicherweise bis zur Totreife auf dem Feld. In dieser letzten Phase sind die Körner bei feuchter Witterung besonders anfällig für Verpilzung. Niederschläge zum Zeitpunkt der

Tot- oder Vollreife haben daher einen starken Einfluss auf die Entwicklung von Mikroorganismen. Feldpilze führen zu Erkrankungen der Nutzpflanzen und in Folge zu Ertragsverminderung. Sie sind in der Lage zahlreiche Mykotoxine zu bilden (SCHWADORF, 1995).

### Lagerpilze

Lagerpilze besiedeln das Getreide erst nach der Ernte bei einem Feuchtigkeitsgehalt von 14 – 18 % (OSWEILER, 1992). Aspergillus- und Penicilliumarten sind typische Vertreter der Lagerpilzflora, die auftritt, wenn Getreide mit einem zu hohen Feuchtigkeitsgehalt geerntet und gelagert oder nachträglich wieder feucht wird (LEW, 1993, SCHWADORF, 1995). Zwischen dem Übergang von Feldpilzen zu Lagerpilzen stellt sich eine Mischung aus beiden, die Intermediärflora ein.

Abb. 1 : Ursachen und Folgen einer Mykotoxinkontamination



### Fusarien

Fusarien sind die wichtigsten toxinbildenden Schimmelpilze der nördlichen Hemisphäre. Sie sind weltweit regelmäßige Kontaminanten in Getreideernten (BENNETT and KLICH, 2003). Als sogenannte Feldpilze infizieren sie verschiedene Getreidearten wie Mais, Weizen, Gerste und Hafer, aber auch andere pflanzliche Produkte bereits auf dem Feld während der Ährenblüte. Enorme Ertragseinbußen für die Landwirtschaft können die Folge sein. Die Toxinproduktion ist auch nach der Ernte möglich, wenn das Getreide nicht ausreichend getrocknet und falsch gelagert wurde.

Eine Reihe von Faktoren beeinflussen die Häufigkeit des Befalls mit Fusarien. Eine entscheidende Rolle spielt der Zeitpunkt des Niederschlags, aber auch die Regenmenge, Luftfeuchtigkeit und lokale Temperaturen sind bedeutend (JECFA JOINT FAO/WHO, 2001). Warmer Frühling und starke Regenfälle während der frühen Blütezeit begünstigen das Wachstum von Fusarien-Spezies.

Eine Korrelation zwischen Befallsrate der Getreidekörner mit Fusarien und Toxingehalt wird unterschiedlich diskutiert (SPINDELBOCK, 2004).

*F. graminearum* weist ein optimales Wachstum bei einer Temperatur von 25°C und einer Wasseraktivität  $> 0,88$  auf. Deshalb wächst er bevorzugt in wärmeren Gebieten, wie z.B. Nordamerika, Japan, China.

*F. culmorum* wächst optimal bei 21°C und einer Wasseraktivität von  $> 0,87$ . Dieser Pilz ist häufig in kühleren Regionen wie Skandinavien und Nordeuropa zu finden (ERIKSEN, 2003, JECFA (JOINT FAO/WHO), 2001).

*F. verticilloides* und *F. proliferatum* sind die häufigsten Pilze, die mit Mais in Verbindung gebracht werden. Sie können auf den meisten Maiskörnern gefunden werden, auch wenn diese nicht schimmelig erscheinen (PITT et al., 1993, SANCHIS et al., 1995). Es besteht eine positive Korrelation zwischen der Bildung von Fumonisin im Mais am Feld und dem Pilzbefall. Diese beiden Pilze treten nach der Blüte gegen Ende der Reifephase auf (CHULZE et al., 1996). Sie können Ährenfäulnis („kernel rot“) verursachen, welches eine der häufigsten und wichtigsten Ährenerkrankungen in Mais produzierenden Gebieten ist (KING und SCOTT, 1981). In warmen und trockenen Jahren ist der Befall höher, als in kühleren (MURPHY et al., 1993).

### Aspergillen und Penicillium

*Aspergillus parasiticus* und *Aspergillus flavus* sind für die Produktion der Aflatoxine verantwortlich. Für Europa sind Aflatoxine „importierte“ Toxine. Da die beiden Pilze Temperaturen von 25°C bis 40°C zur Bildung der Giftstoffe brauchen sind sie trotz des weltweiten Vorkommens der toxinbildenden Pilze vor allem in subtropischen und tropischen Gebieten und weniger in Anbaugebieten der gemäßigeren Klimazonen bedeutsam.

Aflatoxine werden hauptsächlich vor der Ernte gebildet. Sie können auch nach der Ernte gebildet werden, wenn geeignete Temperaturen und die richtige Wasseraktivität vorherrschen und ausreichend Substratzufuhr gewährleistet wird (GREENE et al., 1977).

Hohe Temperaturen (25-35°C), hohe Feuchtigkeit, Dürre und starker Insektenbefall begünstigen die Aflatoxinbildung.

*Aspergillus ochraceus* und *Penicillium verrucosum* sind für die Bildung von Ochratoxin A verantwortlich. Wobei in kühleren Klimazonen, bei Temperaturen unter 30 Grad Celsius wie sie z.B. in Europa und Kanada vorherrschen hauptsächlich *P. verrucosum*, in wärmeren Zonen hingegen hauptsächlich *A. ochraceus* für die Ochratoxin A – Produktion verantwortlich sind (HÄGGBLÖM, 1984).

*A. ochraceus* wächst bei moderaten Temperaturen und bei einer Wasseraktivität von über 0.8. Er wird sporadisch in einem großen Bereich von Lebensmittelerzeugnissen, auch Zerealien gefunden, ist aber selten der Grund für beträchtliche Konzentrationen von Ochratoxin A.

*P. verrucosum* wächst nur bei Temperaturen unter 30°C und einer Wasseraktivität von 0.8. Er ist der Hauptproduzent von Ochratoxin A in Getreideprodukten und Zerealien in Europa (IPCS INCHEM, 2001c).

**Tab. 1 :** Übersicht über die Produktion versch. Mykotoxine

Schimmelpilze	DON	ZEA	FUM	OTA	AF
Fusarium	verticilloides		X		
	proliferatum		X		
	graminearum	X	X		
	culmorum	X	X		
Aspergillus	ochraceus			X	
	flavus				X
	parasiticus				X
Penicillium	verrucosum			X	

Die Wirkung der Toxine kann, abhängig von der Toxinart und -menge, akut oder chronisch sein. Die Krankheitssymptome einer akuten Vergiftung durch Mykotoxine bei Tieren sind z.B. Herz-, Leber- und/oder Nierenschädigungen, Schädigungen des zentralen Nervensystems, Beeinträchtigung des Immunsystems, Störung der Reproduktion oder Haut- und Schleimhautschäden. Toxinmengen, die keine akuten Krankheitssymptome auslösen, können karzinogen, teratogen oder mutagen sein.

Über die Nahrung bzw. über Futtermittel aufgenommene Mykotoxine haben bei Mensch und Tier folgende Wirkungen: Aflatoxine vor allem hepatotoxische, Ochratoxine vor allem nephrotoxische, Zearalenon östrogene. Fumonisine stören den Sphingolipidmetabolismus und Deoxynivalenol führt zu Leistungseinbußen.

## 2.2. Deoxynivalenol (DON)

### 2.2.1. Herkunft und Vorkommen von DON

Deoxynivalenol wird als sekundäres Stoffwechselprodukt von verschiedenen Pilzen der Gattung *Fusarium* gebildet. Als Hauptmykotoxinproduzenten gelten *F. graminearum* und *F. culmorum*. Diese werden noch als Verursacher der Ährenfussariose im Weizen und der Ährenfäulnis im Mais angesehen.

Auch *F. avenaceum*, *F. poae* und *Microdochium nivale* sind in der Lage DON zu produzieren (SPINDELBOCK, 2004).

DON wird häufig in kanadischem, amerikanischem und europäischem Weizen nachgewiesen. Vor allem dann, wenn kühle und nasse Bedingungen während des Wachstums des Getreides vorherrschen (CAST REPORT, 2003).

DON wurde erstmals von einem Japanischen Wissenschaftler als „Rd-toxin“ isoliert. Kurze Zeit später beschrieben Yoshizawa and Morooka (1973) die chemische Struktur und bezeichneten es als „4-Deoxynivalenol“ (GOYARTS, 2006). Noch im gleichen Jahr wurde erforscht, dass DON Erbrechen auslöst, und somit als „Vomitoxin“ benannt (VESONDER et al., 1973).

Die DON Aufnahme erfolgt über Getreide und Getreideprodukte. Am häufigsten kontaminiert sind Weizen, Hafer, Gerste, Roggen und Mais, seltener Reis, Sorghum und Triticale.

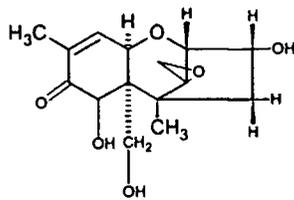
In einer weltweiten Untersuchung wurde DON in 57 % der Weizenproben, 40 % der Maisproben, 68 % der Haferproben, 59 % der Gersteproben, 59 % der Roggenproben und 27 % der Reisproben analysiert. Aber auch in Weizen und Maisprodukten wie Mehl, Brot und Frühstückszerealien konnte DON nachgewiesen werden. Die Konzentrationen reichten von 5 – 50 µg/kg (Nachweisgrenze) bis zu 30 mg/kg (IPCS INCHEM, 2001a).

SONGSERMSAKUL et al. (2007) führten eine Untersuchung von DON in trockenem und feuchtem Hundefutter mittels ELISA durch. Insgesamt wurden 29 Trockenfutter und 11 Feuchtfutter untersucht. Alle 29 Trockenfutter waren mit DON in den Konzentrationen von 22 – 1837 µg/kg kontaminiert. Drei Feuchtfutterproben wiesen Konzentrationen von 95 – 170 µg/kg auf.

### 2.2.2. Eigenschaften von DON

DON ist ein Sesquiterpen, mit einem 12,13-Epoxy Ringsystem (3 $\alpha$ ,7 $\alpha$ ,15-Trihydroxy-12,13-epoxytrichothec-9-en-8-on). An der 9,10 – Position besitzt dieses eine Doppelbindung und am C8 eine konjugierte Doppelbindung.

Strukturformel



(aus HUSSEIN et al., 2001)

Summenformel:	$C_{15}H_{20}O_6$
Molekulargewicht:	296,3
Schmelzpunkt:	151 – 153°C

DON ist ein farbloser, feinnadeliger, kristalliner Feststoff. Das Molekül ist löslich in Alkoholen, Chloroform, Wasser, Methanol Acetonitril und Ethylacetat. Es ist chemisch und physikalisch sehr stabil. Es wird während Lagerung, Erhitzen, Sterilisation, Autoklavieren, Mahlprozessen und anderen Produktionsschritten von Lebens- und Futtermitteln wie z.B. Extrudieren kaum zerstört (WOLF-HALL, 1999).

### 2.2.3. Absorption, Verteilung, Exkretion von DON

DON und andere Trichothecene werden vom Körper schnell absorbiert. Das Schwein weist, im Vergleich zu Schafen und Kühen, eine hohe Bioverfügbarkeit auf. Die durchschnittliche Bioverfügbarkeit beträgt beim Schwein 55 % der aufgenommenen Menge.

Bei oraler oder intragastraler Verabreichung kommt es im Plasma zwischen 15 und 30 min. zu einem Konzentrationshöhepunkt. Die Konzentration bleibt weiter bis zu 9 Stunden erhöht und sinkt dann langsam ab (PRELUSKY et al., 1988).

DON wird während der Passage durch den Magen und vorderen Dünndarm fast komplett absorbiert (DÄNICKE et al., 2004). Es umgeht den enterohepatischen Kreislauf und akkumuliert daher nicht in der Galle (DÖLL et al., 2003a).

DON wird sehr schnell wieder ausgeschieden ohne in irgendeinem Gewebe zu akkumulieren (ERIKSEN, 2003).

Die Ausscheidung erfolgt zu 68 % über den Urin und zu 20 % über die Fäzes.

Bereits nach 24 Stunden ist kein DON mehr im Körper nachweisbar.

Bei Verabreichung des Toxins über die Vene kommt es zu einer sehr schnellen, gefolgt von einer langsameren Verteilungsphase, wo es zu einer weiten Verteilung im Körper kommt. Schließlich folgt ein langsamer Konzentrationsabfall.

Im Gegensatz zur Ausscheidung bei oraler Verabreichung wird bei intravenöser Gabe kein DON über die Fäzes ausgeschieden.

Hier erfolgt die Hauptausscheidung über die Niere und den Harn, ein geringer Teil wird über die Galle ausgeschieden (PRELUSKY et al., 1988, BILY et al., 2004, DÄNICKE et al., 2004).

Bei den Wiederkäuern wird DON im Rumen von der dort vorherrschenden Mikroflora zu einem de-epoxid Metaboliten umgewandelt (ERIKSEN, 2003).

#### **2.2.4. Biotransformation**

ERIKSEN (2003) fand heraus, dass die Mikroorganismen im Darm von Schweinen die Fähigkeit besitzen Deoxynivalenol in seinen De-epoxi-Metaboliten zu transformieren.

Diese De-epoxi Metaboliten sind bis zu 51 mal weniger zytotoxisch. Das bedeutet, dass die Deepoxidation gleichzeitig eine Detoxifikation darstellt.

Da kein de-epoxi-DON über Plasma oder Urin ausgeschieden wird, doch aber über die Fäzes, geht man davon aus, dass die De-epoxidation in den hinteren Darmabschnitten stattfindet.

## **2.2.5. Klinik und Pathologie**

### **2.2.5.1. DON - Mykotoxikosen bei Menschen**

Im asiatischen Raum wurde schon mehrfach über akute Mykotoxikosen beim Menschen berichtet. Nach dem Verzehr von verschimmeltem Getreide traten Übelkeit, Erbrechen, Verdauungsstörungen, Schwindel, Diarrhoe und Kopfschmerz auf. In den kontaminierten Getreideproben konnte DON in Konzentrationen von 3 - 93 mg/kg nachgewiesen werden. Neben DON wurden auch noch andere Trichothecene gefunden, allerdings in deutlich geringeren Konzentrationen und mit weitaus niedrigerer Inzidenz (JECFA 2001).

Bei einer anderen Epidemie in Asien waren 130 000 Menschen betroffen und es konnten zusätzlich die Symptome Völlegefühl, Bauchschmerzen, Schläfrigkeit und Fieber beobachtet werden. Auch hier konnte nach eingehenden Untersuchungen der kontaminierten Lebensmittel, neben anderen Mykotoxinen DON als Hauptmykotoxin nachgewiesen werden (YOSHIZAWA, 1991, LI et al., 1999, 2002).

### **2.2.5.2. DON – Mykotoxikosen beim Hund**

1999 führten HUGHES et al. einen Fütterungsversuch mit DON bei Hunden und Katzen durch. Dieser Versuch wurde danach ausgelegt, die nötige Menge an DON zu bestimmen, bei der es klinisch zu Anzeichen einer Vergiftung kommt. Beagle und Brittany Spaniel Hunden wurden 14 Tage lang kontaminiertes Futter in den Konzentrationen 0, 1, 2, 4, 6, 8 oder 10 mg/kg Futter verabreicht. Diese Studie ergab, dass die Hunde ab einer Konzentration von 4,5 mg DON/kg Futter eine signifikante Verringerung der Futteraufnahme und eine deutliche Gewichtsabnahme zeigten. Erbrechen wurde bei Konzentrationen von 8 und 10 mg DON/kg Futter beobachtet.

Im Zuge dieser Studie wurde auch ein weiteres Experiment durchgeführt. Hunde hatten die Möglichkeit zwischen nicht kontaminiertem Futter und Futter, das mit 6 mg DON/kg Futter belastet war, zu wählen. Die, die vorab schon kontaminiertes Futter erhalten hatten, bevorzugten das nicht kontaminierte Futter. Hingegen zeigten jene, die kein kontaminiertes Futter erhielten keine Prävalenz und fraßen sowohl vom kontaminierten als auch nicht kontaminierten Futter gleich viel.

2006 führten LEUNG und SMITH einen weiteren Fütterungsversuch bei erwachsenen Beagle Hunden durch. Das verabreichte Futter war mit 4 mg DON/kg Futter und geringeren Mengen an 15-acetyl-DON und ZON belastet.

Die Futteraufnahme der Hunde sank um 45 %, ebenso kam es zu einer deutlichen Gewichtsabnahme. Es wurde kein Erbrechen beobachtet, jedoch entwickelten ein paar Hunde Diarrhoe.

### 2.2.5.3. DON – Mykotoxikosen beim Schwein

Deoxynivalenol gilt als häufige Ursache von Mykotoxikosen bei landwirtschaftlichen Nutztieren, wobei Monogastrier, insbesondere Schweine, empfindlicher sind als Tiere mit Vormägen.

Charakteristische Anzeichen einer akuten Intoxikation beim Schwein sind Anorexie, Vomitus, Diarrhoe, Gewichtsverlust. Bei längerer Exposition konnten auch Gewebnekrosen im Gastrointestinaltrakt, im Knochenmark und in lymphatischen Geweben beobachtet werden. Die niedrigste Dosis, die zu Erbrechen führte lag bei oraler Gabe bei 0.05 – 0.2 mg/kg KGW (SCF, 1999).

Über das Auftreten von klinischen Symptomen wie Erbrechen oder Futterverweigerung nach Exposition mit DON liegen unterschiedliche Daten vor.

BÖHM und RAZZAZI-FAZELI (2003) zum Beispiel konnten 2003 bei einer täglichen Verabreichung von 0.35 +/- 0.05 mg DON/kg KGW keine klinischen Symptome bei Ferkeln feststellen.

Hingegen trat bei einem Fütterungsversuch von FORSYTH et al. (1977) bei einer Dosis von 0.1 mg DON/kg KGW bereits Erbrechen auf.

BERGSJO et al. (1986) führten einen dreimonatigen Fütterungsversuch mit wachsenden Schweinen durch, wobei den Schweinen Konzentrationen von 0.05 bis 3.5 mg DON/kg Futter verabreicht wurden. Sie konnten neben verringerter Futteraufnahme, verminderten Gewichtszunahmen, geringerem Schlachtgewicht auch noch höhere Lebergewichte, einen Abfall des Albumins und Serumproteins und einen Abfall des Hämatokrits feststellen. Ebenso wurde ein Abfall des Phosphor- und Kalziumspiegels beobachtet. Auch kam es zu einer erhöhten IgA Konzentration im Serum.

Außerdem konnten nach oraler DON Gabe ein verminderter  $\alpha$ -Globulin Spiegel und ein erhöhter Serum Cortisol Spiegel nachgewiesen werden. Weiters wurde sporadisch eine Verminderung des Total Globulins, eine Erhöhung der Erythrozyten, der Thrombozyten, des Hämatokrits und des Hämoglobins beobachtet (PRELUSKY et al., 1994a).

YOUNG et al. (1983) stellten fest, dass es mit steigender DON-Konzentration im Futter zu einer Erhöhung des Albumin : Globulin Verhältnisses und des Bilirubin Spiegels im Blut kommt.

In der Literatur findet man geteilte Meinungen über die Ursache des veränderten Blutbildes. Es wird diskutiert, ob es auf die Wirkung von DON zurückzuführen ist, oder ein Resultat der verminderten Futteraufnahme und des daraus resultierenden Gewichtsverlustes ist (YOUNG et al., 1983, PRELUSKY et al., 1994a, ROTTER et al., 1995).

Zu weiteren pathologischen Veränderungen zählen Verdickung und Keratinisierung der Mucosa in der Ösophagusregion des Magens, größere und zahlreichere Schleimhautfalten in der Fundusregion, Atrophie, vermehrte Erosionen und Graufärbungen im Kardiabereich, sowie eine Erhöhung des Magengewichtes (TRENHOLM et al., 1984, PRELUSKY et al., 1994a, LUSKY et al., 1998).

Viele Tierversuche zeigen, dass natürlich mit DON kontaminiertes Futter toxischer wirkt, als mit Reinsubstanz versetztes (FORSYTH et al., 1977, FRIEND et al., 1986, PRELUSKY et al., 1994a).

Als hypothetisch mögliche Gründe für dieses Ergebnis wurden die Kontamination des Futters mit anderen Schimmelpilzmetaboliten, insbesondere Trichothecene, „maskierten Toxinen“, wie DON-Pflanzenmetabolite, sowie Unterschiede im Futtermanagement diskutiert (LAUBER et al., 2001).

#### **2.2.6. Auswirkung auf das Immunsystem**

DON kann sich einerseits stimulierend, andererseits aber auch suppressiv auf das Immunsystem auswirken.

Geringe Dosen haben einen immunstimulatorischen Effekt, wie erhöhte Resistenz gegenüber Pathogenen, erhöhter Serum IgA Spiegel und Erhöhung der Expression vieler immunmodulierender Gene.

Hohe Dosen schädigen sich aktiv teilende Zellen und Gewebe wie das Knochenmark, die Lymphknoten, Milz, Thymus und die Darmmukosa. Dies führt zu einer Immunsuppression, ersichtlich an einem verminderten IgG- und IgM- Spiegel im Blut, verminderter Resistenz gegenüber Pathogenen, Hemmung der Antikörper Reaktion und verzögerter Hypersensitivitätsreaktion (LARSEN et al., 2004).

PESTKA und ZHOU konnten zeigen, dass eine orale DON Aufnahme von 10 ppm über 12 Wochen bei Mäusen eine autoreaktive Serum-IgA-Überproduktion, eine Ablagerung von Immunkomplexen im Nierenmesangium, sowie eine Hämaturie induzierte. Ein Zusammenhang zwischen den Beobachtungen bei Mäusen und der menschlichen IgA-Nephropathie wurde intensiv diskutiert (PESTKA und ZHOU, 2002, PESTKA, 2003).

Beim Schwein konnte eine positive Korrelation zwischen dem IgA-Serumspiegel und der DON-Aufnahme gezeigt werden (DROCHNER et al., 2003).

## 2.3. Zearalenon (ZEA)

### 2.3.1. Herkunft und Vorkommen

Zearalenon ist ein nichtsteroidales östrogenes Mykotoxin oder Phytoöstrogen, das von einer Reihe von Fusarienpilzen biosynthetisiert wird. Zu diesen zählen *F. graminearum* (*Giberella zea*), *F. culmorum*, *F. cerealis*, *F. equiseti*, *F. crookwellense*, *F. semitectum*, *F. tricinctum*, *F. moniliforme*, *F. oxysporum*, *F. sporotrichoides* und *F. lateritium*, wobei *F. graminearum* (*Giberella zea*) hauptverantwortlich für die östrogenen Effekte ist (MIROCHA et al., 1971, MARASAS, 1991).

Bereits 1928 untersuchten McNUTT et al. (1928) ein Syndrom, genannt Vulvovaginitis, bei dem es bei Schweinen zu einer Entzündung der Vulva und des hinteren Teiles der Vagina kam. Sie assoziierten diese Erkrankung mit dem Verzehr von schimmeligem Mais.

Aber erst 1962 konnte von STOB et al. Zearalenon das erste Mal aus *Giberella zea* (Schw.) *Petsch* (*F. graminearum* NRRL 2830) aus amerikanischem Mais isoliert werden (BAUER et al., 1987, MARASAS, 1991, BENNETT und KLICH, 2003).

Derselbe Metabolit wurde von CHRISTENSEN et al. (1965) aus Mais isoliert. Diese inokulierten Mais mit *Fusarium* und nannten ihn „F-2“.

CALDWELL und TUIITE (1970) konnten 110 Isolate, aus 7 verschiedenen Fusarienstämmen finden, die für die ZEA Produktion verantwortlich sind. 34 Isolate produzierten ZEA in einer Menge von 0.2 bis 230 µg/g Mais.

Der Name Zearalenon ist eine Kombination aus *Giberella zea*, Resorcylsäurelaktone (RAL), -ene für die Doppelbindung zwischen C1 und C2 Atom und -on für das C6-Keton (SHIER, 1998, ZINEDINE et al., 2007).

In Europa ist in erster Linie Mais mit Zearalenon kontaminiert, aber auch Gerste, Hafer, Weizen, Sorghum, Hirse, Reis, Mehl, Malz, Heu, Maissilage, Sojabohnen und Bier können ZEA enthalten. (SHIER, 1998, EUROPEAN COMMISSION, 2004, ZINEDINE et al., 2007). SCOTT (1997) konnte in 919 Proben das höchste Auftreten (69 %) und die höchsten Konzentrationen (647 µg/kg) in Mais nachweisen.

Fusarientoxine treten häufig gemeinsam auf. So kann es vorkommen, dass befallenes Getreide neben ZEA auch DON oder andere Fusarientoxine enthält. Studien von mit Fusarien befallenen Mais und Weizen zeigen, dass Mais immer mit DON und ZEA kontaminiert ist, hingegen Weizen hohe Konzentrationen an DON und nur wenig oder gar kein ZEA enthalten kann (EUROPEAN COMMISSION, 2004).

Als Beispiel konnten in einer Probe Maismehl 1500 µg/kg ZEA, 4900 µg/kg DON 12000 µg/kg Fumonisin B1, 1600 µg/kg Nivalenol und 3200 µg/kg Moniliformin nachgewiesen werden (SCUDAMORE et al., 1998a).

TANAKA et al. (1988) konnten in ihrer Untersuchung erstmals eine weltweite Kontamination von landwirtschaftlichen Getreideprodukten mit Fusarientoxinen nachweisen. Untersucht wurden insgesamt 500 Proben aus Weizen, Gerste, Hafer, Roggen, Mais, Reis und deren

Produkte aus 19 unterschiedlichen Ländern (auch ein paar europäischer Länder) und Bezirken auf Deoxynivalenol, Nivalenol und Zearalenon. Ungefähr 40-50 % aller Proben konnten auf alle 3 Toxine positiv getestet werden.

Gerste war am häufigsten kontaminiert und wies die höchsten Toxinkonzentrationen auf, gefolgt von Weizen.

In einem Review über die weltweite Kontamination von Getreidekörnern und Tierfutter mit Fusarientoxinen wurde tabellarisch der Nachweis von Zearalenon in Weizen, Hafer, Gerste, Roggen und Tierfutter in Bulgarien, Finnland, Deutschland, Niederlande, Norwegen und Polen dargestellt. Die Konzentrationen reichten von 0 bis 8000 µg ZEA/kg (PLACINTA et al., 1999).

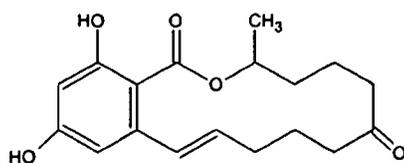
2005 führten NURYONO et al. (2005) eine ELISA und HPLC Untersuchung auf das Vorkommen von ZEA in indonesischen maishaltigen Lebens- und Futtermitteln durch. Von 89 untersuchten Proben konnten 32 Proben als positiv getestet werden, wobei 1 Probe sehr hohe Konzentrationen enthielt. Die Konzentrationen reichten von 5.5 µg/kg bis 589 µg/kg.

ZWIERZCHOWSKI et al. (2004) untersuchten in Polen 57 unterschiedliche Hundefutter auf das Vorkommen von Zearalenon und dessen Derivate. 41 dieser Proben waren Standardfutter, 16 waren Diätfutter. ZEA wurde in 48 Proben (85.96 %) gefunden, mit einer mittleren Konzentration von 36.18 µg/kg. Die höchste Konzentration im Standardfutter war 299.5 µg/kg, im Diätfutter 158 µg/kg.

### 2.3.2. Eigenschaften von Zearalenon

Zearalenon ist ein Makrolid, das chemisch als 6-(10-Hydroxy-6-oxo-trans-1-undecenyl)-β-Resorcyssäurelaktone bezeichnet wird. Die Hydroxylgruppe am C<sub>2</sub> Atom ist für die östrogene Aktivität verantwortlich.

Strukturformel:



(aus HUSSEIN et al., 2001)

Summenformel:	C <sub>18</sub> H <sub>22</sub> O <sub>5</sub>
Molekulargewicht:	318
Schmelzpunkt:	164-165°C

Zearalenon bildet weiße Kristalle. Diese sind praktisch unlöslich in Wasser, schwach löslich in Petroläther und n-Hexan und gut löslich in wässrigem Alkali, Äther, Benzol, Chloroform, Methylenchlorid, Essigsäureethylester, Acetonitril, Azeton und Alkoholen. ZEA ist eine stabile Verbindung, die durch Lagerung, Mahlen, diversen Produktionsschritten und Kochen kaum zerstört werden kann.

### 2.3.3. Absorption, Verteilung, Exkretion

Nach oraler Applikation wird Zearalenon schnell absorbiert. Obwohl der Grad der Absorption, aufgrund der extensiven biliären Exkretion sehr schwierig zu messen ist, scheint es, als würde es bei Ratten, Hasen und Menschen beträchtlich absorbiert werden (KUIPER-GOODMAN, 1987). Die Aufnahme von Zearalenon im Schwein nach einer einmaligen Verabreichung von 10 mg/kg KGW wurde auf 80-85% geschätzt (BIEHL et al., 1993).

In einem Fütterungsversuch mit Schweinen konnten Zearalenon und dessen Metaboliten bereits in weniger als 30 Minuten im Plasma nachgewiesen werden (KUIPER-GOODMAN, 1987).

Nach einer initialen Absorptions- und Distributionsphase kommt es zu einer Reduktion der Konzentration im Plasma, gefolgt von einem sekundären Konzentrationspeak und einer ausgedehnten Eliminationsphase (BIEHL et al., 1993).

Studien mit radiomarkiertem Zearalenon an Mäusen zeigten, dass es sich bei der Verteilung im Körper hauptsächlich in östrogenen Geweben wie Uterus, Interstitialzellen der Hoden und Ovarfollikel anreichert. Spuren von Radioaktivität konnten auch im Fettgewebe nachgewiesen werden. Daher ist auch eine Ablagerung von ZEA im Fett nicht ausgeschlossen (KUIPER-GOODMAN, 1987).

Zearalenon und dessen Metabolite werden innerhalb von 72 Stunden wieder ausgeschieden. Bei den meisten Tierarten erfolgt dies hauptsächlich über die Galle. Eine Ausnahme bildet hier der Hase, er scheidet ZEA über den Harn aus (KUIPER-GOODMAN, 1987).

BIEHL et al. (1993) führten Versuche mit jungen Schweinen durch. Diese erhielten 5 mg ZEA/kg KGW intravenös oder 10 mg ZEA/kg KGW oral. Die biologische Halbwertszeit wurde auf 87 Stunden geschätzt. Wurde bei diesen Schweinen die Galle mit einer Kanüle entfernt, so verkürzte sich die Halbwertszeit auf 3,3 Stunden. Die Autoren schlossen daraus, dass ZEA einem enterohepatischen Zyklus unterläuft.

Insgesamt können 64 – 67 % des verabreichten Toxins wieder im Harn und Kot nachgewiesen werden (BIEHL et al., 1993).

Auch DÄNICKE et al. (2005) führten einen Versuch mit Schweinen durch. Die Schweine erhielten einmalig 1 mg ZEA/kg KGW intravenös. Nach einer schnellen Distributionsphase mit einer Halbwertszeit von 12 Minuten folgte eine langsamere Eliminationsphase mit einer Halbwertszeit von 2,63 Stunden.  $\alpha$ -Zearalenol war der einzige detektierbare Metabolit. Die kumulative Wiederfindung von Zearalenon und  $\alpha$ -Zearalenol im Urin und Dünndarminhalt nach 72 Stunden, war 70 % und 35 %. Vierzehn Tage nach der Verabreichung konnte kein Zearalenon und  $\alpha$ -Zearalenol mehr in der Galle, Leber und Harn nachgewiesen werden.

OLSEN et al. (1985) verabreichten einem sexuell unreifem Schwein für 4 Tage 192  $\mu$ g ZEA/ kg KGW. Die Plasmakonzentration von  $\alpha$ -Zearalenol war 3 bis 4 mal höher als die Konzentration von ZEA. Ein Konzentrationshöhepunkt von ZEA und  $\alpha$ -ZEA konnte am 4. Tag der Behandlung festgestellt werden. Im Plasma und Urin war das gesamte Zearalenon und  $\alpha$ -Zearalenol an Glucuronsäure gebunden.

#### 2.3.4. Biotransformation

Es existieren 2 Hauptwege der Biotransformation von Zearalenon:

- 1.) Konjugation mit Glucuronsäure
- 2.) Hydroxylierung von Zearalenon zu  $\alpha$ - und  $\beta$ -Zearalenol (KIESSLING und PETTERSSON, 1978)

Daher sind die Hauptmetaboliten von Zearalenon  $\alpha$ - und  $\beta$ -Zearalenol und die jeweiligen Glucuronid-Konjugate. Verschiedenste Gewebe, wie Darmmukosa und Lebergewebe, sind in der Lage Zearalenon zu metabolisieren (KUIPER-GOODMAN et al., 1987), wobei aber davon ausgegangen wird, dass die Metabolisierung hauptsächlich in der Leber stattfindet (MAAROUFI et al., 1996).

Zwischen den einzelnen Tierarten wurden signifikante Unterschiede im metabolischen Profil von Urin und Fäzes gefunden. So wurde in einem Versuch bei Schweinen ein höherer Anteil des verabreichten Zearalenons zu  $\alpha$ -Zearalenol metabolisiert, als bei Ratten oder Kühen. Sowohl beim Menschen, als auch beim Schwein wurde Zearalenon hauptsächlich als Glucuronid-Konjugat von Zearalenon und  $\alpha$ -Zearalenol im Urin gefunden (MIROCHA et al., 1981).

KOLLARZIK (1990) beobachtete die Transformation von Zearalenon zu  $\alpha$ -Zearalenol nach der Inkubation mit der Mikroflora des Caecum-, Colon- und Rektuminhaltes. Am aktivsten erwies sich der Coloninhalt.

### **2.3.5. Klinik und Pathologie**

Zearalenon weist eine stark östrogene Wirkung auf, von der vor allem das weibliche Schwein betroffen ist (FARNWORTH und TRENHOLM, 1983, BAUER et al., 1987).

Bei oraler Verabreichung von ZEA an Mäuse, Ratten und Meerschweinchen ist bekannt, dass es von relativ geringer akuter Toxizität ist. Die intraperitoneale Verabreichung ist hier weitaus toxischer (KUIPER-GODMAN et al., 1987, ZINEDINE et al., 2007).

#### **2.3.5.1. Zearalenon – Mykotoxikosen beim Menschen**

In Polen wurde eine Studie über das Vorhandensein von Zearalenon im Blut bei Frauen durchgeführt, die an einer Neoplasie des Reproduktionstraktes erkrankt sind. Ziel der Studie war es herauszufinden, ob ZEA im Blut der Patientinnen nachgewiesen werden kann bzw. ob eine Korrelation zwischen dem Vorhandensein von ZEA und einer bestimmten Neoplasie besteht. Von 74 untersuchten Blutproben konnte ZEA in 10 Proben (13.51 %) nachgewiesen werden. Bei 6 dieser Proben (60 %) wiesen die Patientinnen ein Karzinom des Corpus uteri auf (GAJECKI et al., 2004).

In einer anderen Studie wurde das Plasma von 4 Gruppen von Frauen auf das Vorhandensein von Zearalenon untersucht. Die Gruppen setzten sich zusammen aus Frauen mit Brustkrebs, Gebärmutterkrebs, anderen Erkrankungen und gesunden Frauen. Es konnte kein signifikanter Unterschied im Vorkommen von ZEA zwischen diesen Gruppen gefunden werden (PILLAY et al., 2002).

#### **2.3.5.2. Zearalenon – Mykotoxikosen beim Hund**

Reproduktive Dysfunktionen, wie zum Beispiel Endometritis-Pyometra-Komplex, verlängerter Östrus, Eierstocksysten und andere Störungen kommen sehr häufig bei weiblichen Hunden vor (HOFFMANN und SCHULER, 2000, DeBOSSCHERE et al., 2002a).

Es wird angenommen, dass für diese Spezies bestimmte hormonelle Regulierungen der Reproduktionsprozesse, die auf langen Progesteron- und Prolaktinzyklen und hoher Sensibilität gegenüber Östrogenen basieren, eine wichtige Rolle in der Ätiopathogenese von diesen Dyfunktionen spielen (HOFFMANN et al., 1996, RODRIGUES und RODRIGUES, 2003).

Auch die Verabreichung von Hormonen zu therapeutischen und präventiven Zwecken sollte hier berücksichtigt werden (DeBOSSCHERE et al., 2002b). Ebenso verursacht die

unpassende Anwendung von Hormonen oft reproduktive Erkrankungen bei Hündinnen (HOFFMANN et al., 1996).

Ein Faktor, der häufig übersehen wird, ist die mögliche Einwirkung von Mykotoxinen, speziell Zearalenon, das häufig in kommerziellem Hundefutter gefunden werden kann (ZWIERZCHOWSKI et al., 2004).

Haustieren wird oft eine einzige Sorte an Hundefutter über eine längere Zeitspanne verabreicht. Diese längerdauernde Einnahme von Futter, das mit geringen Konzentrationen dieses Mykotoxins belastet ist, kann wiederum die Gefahr erhöhen, die dieses Phytoöstrogen ausübt (GAJECKA et al., 2004a, BINDER, 2007).

GAJECKA et al. (2004a) führten eine Pilotstudie an 6 Monate alten, klinisch gesunden weiblichen Hunden durch. Diese erhielten 200 µg pures ZON/ kg KGW für 7 Tage. Danach wurden alle Hunde ovariohysterektomiert und die Reproduktionsorgane wurden untersucht. Bei der histopathologischen Untersuchung wurden eine Hyperämie der Gefäßschichte der Ovarien und kleine extravasale Blutungen neben den Ovarfollikeln festgestellt. Weiters konnten apoptotische Veränderungen in den Granulazellen und Atresie in den Follikelzellen gefunden werden. Außerdem konnten nur ein paar Follikel gefunden werden. Das Endometrium war breiig, ödematös und rot, zeigte eine Hämostase, und massive extravasale Blutungen.

PCNA (proliferating cell nuclear antigen) ist ein Antigen, das als Indikator für proliferative, östrogen-induzierte Aktivität von Geweben angesehen wird.

Adenozyten und das Epithel des Endometriums waren PCNA positiv, sowie diverse Muskelzellen im Uterus.

GAJECKA et al. (2004b) führten noch einen anderen Versuch durch, bei dem 15 klinisch gesunden Hündinnen 25 bis 50 µg ZON/kg KGW für 50 Tage verabreicht wurde. Eine Blutuntersuchung der Hündinnen ergab einen Abfall der Konzentrationen von IgA, IgG und IgM. Auch die Anzahl der Leukozyten wurde geringer. Somit konnte daraus geschlossen werden, dass ZON einen immunsuppressiven Effekt sowohl auf die humorale, als auch auf die zelluläre Immunantwort hat. Weiters konnte ein Abfall der Lymphozyten und neutrophilen Granulozyten und ein Anstieg des Cholesterol, Bilirubins, der Aspartat-Amino-Transferase und der Alanin-Amino-Transferase beobachtet werden.

Erst kürzlich führten GAJECKA et al. (2007) einen weiteren Fütterungsversuch mit 9 gesunden, 1 bis 3 Jahre alten Mischlingshunden durch. Die Tiere bekamen 25 und 50 µg ZON/kg KGW/Tag für 100 Tage verabreicht. Nach Ablauf dieser 100 Tage wurden allen Hündinnen die Eierstöcke und der Uterus entfernt und diese histopathologisch und immunhistochemisch untersucht. Veränderungen zeigten sich in einer Hyperämie und extravasalen Blutungen in den oberflächlichen Schichten, gekoppelt mit einem Ödem und geringerer Hyperämie in den mittleren Schichten des Endometriums. Weiters konnte eine Atrophie oder Vergrößerung der uterinen Drüsen und ein Ödem des Zwischendrüsengewebes beobachtet werden. Alle Schichten des Uterus wiesen eine Atrophie des muskulösen Gewebes und ein Ödem des intermuskulären Bindegewebes auf. Auch ein Ödem des subserösen Bindegewebes konnte beobachtet werden. Bei der immunhistochemischen Untersuchung konnten keine bis ein paar PCNA positive Zellen gefunden werden.

Die Unterschiede zwischen der Schwere und der Ausgedehntheit der regressiven Läsionen und Funktionsstörungen ungeachtet der Dosierung des ZEA waren in dieser Studie nicht

signifikant. Es wird angenommen, dass die charakteristischen Läsionen innerhalb der uterinen Strukturen und Geweben aus der Langzeitaufnahme von ZEA resultieren.

Eine mögliche Erklärung für das Nichtvorhandensein der PCNA Zellen könnte sein, dass die Tiere ZEA für eine relativ lange Zeit, 100 Tage, erhielten. Die oben erwähnten proliferativen Läsionen sind hingegen eher charakteristisch für die initiale Phase der Östrogenaktivität.

Die mikroskopischen Untersuchungen und Ergebnisse sind ein bedeutsamer Beweis der ungünstigen Wirkung von ZEA und dessen Metaboliten auf die Reproduktionsorgane von Hündinnen, speziell, auf die Strukturen des Uterus. Beträchtliche Zerstörung des Endometriums und Myometriums wurde bei allen mit ZEA behandelten Hündinnen gefunden, im Vergleich zu den unveränderten Geweben der Kontrollgruppe. Dies weist darauf hin, dass ZEA ein wichtiger Faktor bei der Entstehung dieser Läsionen ist. Das junge Alter der Hündinnen, 1 bis 3 Jahre, ist ein weiterer Hinweis darauf, dass die Läsionen aufgrund der Aufnahme von ZEA entstanden sind.

### **2.3.5.3. Zearalenon – Mykotoxikosen beim Schwein**

Diverse Studien bewiesen, dass weibliche präpubertale Schweine besonders sensitiv auf Zearalenon reagieren (DIEKMANN und GREEN, 1992, DÖLL et al., 2003a, 2003b).

Diese zeigen pathologische Veränderungen wie Schwellung der Vulva, Vergrößerung und Gewichtszunahme des Uterus, Vergrößerung der Milchleiste (KURTZ et al., 1969, NELSON et al., 1973, YOUNG et al., 1981). In extremen Fällen kann es auch zu einem rektalen und vaginalen Prolaps kommen (CHRISTENSEN et al., 1972, YOUNG et al., 1981, BLANEY et al., 1984).

Zu den mikroskopischen Veränderungen zählen Ödemisierung und Verdickung des Uterus verursacht durch eine Hyperplasie und Hypertrophie des Endometriums und Myometriums. Die Ovarien zeigen eine Hypoplasie und Follikelatresie, Zervix und Vagina eine Metaplasie der Mucosa, wobei die Veränderungen der Vagina ausgeprägter sind und die Gänge der Milchdrüsen weisen eine Proliferation auf (KURTZ et al., 1969, NELSON et al., 1973).

EDWARDS et al. (1987a) berichteten von einer Untersuchung, bei der präpubertierende Sauen 10 mg ZEA/d erhielten. Das Auftreten des ersten Östrus erfolgte später als bei der Kontrollgruppe, jedoch wurden das Verhältnis der Schweine, die einen Östrus zeigten sowie die Östruslänge nicht beeinflusst.

In einer anderen Studie, bei der die Schweine 2 mg/d ZEA erhielten, kamen diese früher in die Pubertät, es kam aber zu keinen Veränderungen der Konzeptionsrate, Ovulationsrate und Fötusanzahl (RAINEY et al., 1990).

Eine Diät, die 3.6 bis 4.3 mg ZEA enthielt wurde jungen Schweinen von der Pubertät bis zur Geschlechtsreife verabreicht. Bei 45 % dieser Schweine konnte innerhalb von 50d nach der Pubertät kein Östrus festgestellt werden. Bei der Schlachtung stellte sich bei diesen dann eine Pseudoträchtigkeit heraus. Corpora lutea konnten auf beiden Ovarien, Corpora albicantia jedoch nicht gefunden werden (ETIENNE und JEMMALI, 1982).

Schweine im Proöstrus, die 25 bis 100 mg ZEA/d erhielten wiesen diverse Reproduktionsstörungen wie verminderte Fertilität, Infertilität, Pseudoträchtigkeit, verringerte Wurfgröße, kleinere Nachkommen, Malformation und juvenilen Hyperöstrogenismus auf (CHANG et al., 1979). Weiters kommt es unter Zearaleneinfluss zu verlängerten Inter-Östrus-Intervallen (EDWARDS et al., 1987b, FLOWERS et al., 1987).

Junge weibliche Schweine, die Zearalene in den Dosen 0, 3.5, 7.5 und 11.5 mg/kg KGW in Form von Gelatinekapseln einmalig verabreicht bekommen, weisen eine Woche nach Verabreichung Vulvovaginitis und vergrößerte Reproduktionsorgane auf (IPCS INCHEM, 2000).

BAUER et al. (1987) führten einen Fütterungsversuch an weiblichen Läuferschweinen durch. Ein Zearalengehalt von 10 µg/kg KGW ( $\cong$  250 µg/kg Futter) führte bei den Schweinen zu deutlichen östrogenen Erscheinungen in Form von Rötung und Schwellung der Vulva. Auch konnte eine geringgradige Anschwellung der Milchleiste beobachtet werden. Im Harn und Kot konnten sowohl Zearalene, als auch  $\alpha$ -Zearalene nachgewiesen werden, hingegen konnte im Blutserum keines der beiden detektiert werden. Die Schweine, die 2 µg ZEA/kg KGW ( $\cong$  50 µg/kg Futter) für 3 Wochen erhielten zeigten im Laufe der 3. Woche geringgradige Rötung und Schwellung der Vulva.

Die Verabreichung von Zearalene an trächtige Sauen führt zu verkleinerter Wurfgröße, Totgeburten, Aborte, fetale Mumifikation, erhöhte neonatale Mortalität, schwache Ferkel, Spreitzfüße, abnormaler Rückkehr zum Östrus und anderen Abnormalitäten (SHARMA et al., 1974, CHRISTENSEN, 1979).

BERGER et al. verabreichten Ebern 40 mg ZEA/d. Diese zeigten eine verminderte Libido und einen verminderten Plasma-Testosteronspiegel (BERGER et al., 1981).

Eber, die ZEA in Konzentrationen von 100 bis 600 mg/d erhalten, weisen eine Verminderung des Gewichts der Hoden, Nebenhoden und der Glandula vesicularis auf (CHRISTENSEN et al., 1972, DIEKMAN und GREEN, 1992). Weiters kann es zu einer Feminisierung kommen, die mit einer Atrophie der Hoden und einer Vergrößerung der Milchleiste einhergeht (CHRISTENSEN, 1979).

Die Verabreichung von 30 mg ZEA/d führte zu einer starken Beeinflussung der Hodenfunktion und zu einer Schädigung der Spermiogenese. Die Spermiogenese hat bei den behandelten Ebern 1.5 bis 2 Monate früher eingesetzt als bei den Kontrollebern. Gleichzeitig war eine Schädigung des Samenepithels festzustellen. Eine regressive Veränderung erfolgte zunächst in einigen Gebieten der Hoden, später nahezu im ganzen Hodenbestand. Anfangs trat eine Erweiterung des Interstitiums zwischen den stark gewundenen Kanälchen auf, später kam es zur allmählichen Anhäufung von bindegewebigen Elementen (VÁNYI und SZÉKY, 1980).

#### 2.3.5.4. Zearalenon – Mykotoxikosen bei Nagetieren

Zearalenon oral an Mäuse verabreicht (9.2 mg/kg) führte nach 2 Jahren zur Entstehung hepatozellulärer Adenome und Hypophysentumore (National Toxicology Program, USA, 1982).

MAAROUFI et al. (1996) verabreichten Wistar Ratten intraperitoneal Zearalenon in den Konzentrationen 1.5, 3 und 5 mg/kg KGW. 48 Stunden später wurde ihnen Blut abgenommen und anschließend wurden sie getötet. Die Auswertung der Blutproben ergab eine Erhöhung des Hämatokrits, Hämoglobins und der Leukozyten und eine Erniedrigung der Blutplättchen. Weiters kam es zu einem Abfall des Creatinins und einem Anstieg der Aspartat Aminotransferase (AST), der Alanin Aminotransferase (ALT) und der Alkalinen Phosphatase (ALP), wobei die Enzymwerte bei den mit 5 mg/kg ZEA behandelten Tieren bis zu 100 mal höhere Werte aufwiesen als die Kontrollgruppe.

Die Erhöhung des Bilirubin, ALT, AST und ALP weisen auf eine direkte toxische Leberschädigung und auf eine mögliche Hepatolyse hin.

CONKOVA et al. (2001) verabreichten 20 weiblichen ein Jahr alten Hasen 10 und 100 µg ZEA/kg KGW für 14 Tage. In regelmäßigen Abständen wurden Blutproben entnommen und die Tiere wurde klinisch untersucht.

Nach Ablauf der 14 Tage wiesen die Tiere keine klinischen Anzeichen einer Erkrankung auf. Eine signifikante Erhöhung des AST und ALT weisen auf initiale hepatozelluläre Schäden hin. ALP entspricht einer Mischung von Enzymen der Leber, Nieren, Knochen, Verdauungstrakt. Ein erhöhter ALP Wert, wie in diesem Experiment schließt dennoch keine Lebererkrankung aus. Der Anstieg der Gammaglutamattransferase (GGT) und der Laktatdehydrogenase (LD) weisen zusätzlich auf eine mögliche Schädigung des Lebergewebes hin.

#### 2.3.6. Bindung an Östrogenrezeptoren

Zearalenon passiert passiv die Zellmembran und bindet an den Zytosol-Östrogen-Rezeptor. Der Rezeptor-Zearalenon-Komplex wird schnell zum Nukleus übertragen, wo er an die östrogenantwortenden Elemente bindet und dabei die Gentranskription aktiviert (RILEY, 1998).

Die Bindungsaffinität von Zearalenon zu den Östrogen Rezeptoren in den Zielgeweben und -zellen liegt bei 1-10 % von der von 17-β-Östradiol. α-Zearalenol zeigte eine höhere, β-Zearalenol eine weitaus geringere Bindungsaffinität (KUIPER-GOODMAN et al., 1987).

Die relativen Bindungsaffinitäten von Zearalenon und dessen Derivaten zum uterinen zytoplasmatischen Rezeptor bei Ratten sind in der Reihenfolge: α-Zearalanol > α-Zearalenol > β-Zearalanol > Zearalenon > β-Zearalenol (EUROPEAN COMMISSION, 2004).

Studien haben gezeigt, dass zwei Subtypen von Östrogenrezeptoren existieren, ER-α und ER-β. Weiters wurde herausgefunden, dass Zearalenon in der Anwesenheit von 17-β-Östradiol, ein kompetitiver Agonist für ER-α und ein gemischter Agonist-Antagonist für ER-β ist (KUIPER et al., 1998).

## 2.4. Fumonisine (FUM)

### 2.4.1. Herkunft und Vorkommen

Bei Fumonisininen handelt es sich um eine spezifische Gruppe von Mykotoxinen, die von verschiedenen Feldpilzen der Gattung *Fusarium* gebildet werden. *F. verticilloides* (früher *F. moniliforme*) und *F. proliferatum* sind die beiden Hauptmykotoxinproduzenten. Auch *F. napiforme*, *F. dlamini*, *F. nyagami*, *F. anthophilum*, *F. beomiforme*, *F. globosum*, *F. oxysporum*, *F. polyphialidicum*, *F. subglutinans* und *F. thapsinum* können Fumonisine produzieren (WHO-IPCS, 2000).

Fumonisine wurden erstmals 1972 charakterisiert und isoliert (KELLERMANN et al., 1972). 1988 wurden aus *F. moniliforme* 2 Verbindungen isoliert, die dann die Bezeichnung Fumonisin B<sub>1</sub> und B<sub>2</sub> erhielten (GELDERBLOM et al., 1988).

Bis jetzt konnten 15 unterschiedliche Fumonisine und andere unwesentlichere Metaboliten identifiziert werden. Die meisten kommen jedoch nicht in der Natur vor. Sie wurden in 4 Hauptgruppen eingeteilt: FA<sub>1</sub>, FA<sub>2</sub>, FA<sub>3</sub>, FAK; FB<sub>1</sub>, FB<sub>2</sub>, FB<sub>3</sub>, FB<sub>4</sub>; FC<sub>1</sub>, FC<sub>2</sub>, FC<sub>3</sub>, FC<sub>4</sub>; FP<sub>1</sub>, FP<sub>2</sub> und FP<sub>3</sub> (WHO-IPCS, 2000).

Innerhalb der Gruppe der Fumonisine gilt Fumonisin B<sub>1</sub> als das am häufigsten vorkommende und auch giftigste Toxin.

Fumonisine sind verwickelt in eine Vielzahl an Erkrankungen, wie Equine Leukoencephalomalazie (ELEM), Porzines Pulmonäres Ödem (PPE), Leber und Nierenerkrankungen bei Nagetieren und Atherosklerose bei Primaten (KELLERMAN et al., 1972, HARRISON et al., 1990, THIEL et al., 1991, FINCHAM et al., 1992, GELDERBLOM et al., 1992, NORRED und VOSS., 1994, JACKSON et al., 1996a, 1996b). Epidemiologische Studien deuten darauf hin, dass Fumonisine teilweise verantwortlich sein könnten für das hohe Auftreten von Ösophaguskrebs in der Transkei Region in Südafrika, der Linxian Region in China und in Nordost-Italien (CHENG et al., 1985, FRANCESCHI et al., 1990, SYDENHAM et al., 1991, RHEEDER et al., 1992).

Untersuchungen haben gezeigt, dass Fumonisine weltweit in allen möglichen Sorten von Getreide und Getreideprodukten vorhanden sind (SYDENHAM et al., 1991, STACK und EPPLEY, 1992, MURPHY et al., 1993, DOKO und VISCONTI, 1994, VISCONTI et al., 1995).

Am häufigsten ist Mais mit Fumonisininen kontaminiert, es können aber auch Sorghum, Asparagus, Reis, Bier und Mungbohnen kontaminiert sein (IPCS INCHEM, 2001b).

In Italien wurden Mais und Maisprodukte auf das Vorkommen von Fumonisin B<sub>1</sub> und B<sub>2</sub> untersucht. Alle Maisproben wurden Fumonisin positiv getestet, wobei die Konzentrationen von FB<sub>1</sub> weitaus höher waren, als die von FB<sub>2</sub>. Maismehl und -schrot wiesen sehr hohe Konzentrationen an Fumonisininen auf. Der höchste Wert lag hier bei 6790 µg/kg. Auch in Polentamehl und extrudiertem Mais wurden sehr hohe Konzentrationen gefunden (bis zu 4380 µg/kg). Tortillachips, Popcorn und Cornflakes enthielten Konzentrationen < 100 µg/kg.

Sowohl der Getreideextrusionsprozess, als auch die Zubereitung der Polenta erfordern hohe Temperaturen. Der hohe Fumonisingehalt in diesen Produkten bestätigt die Ergebnisse der Untersuchungen von ALBERTS et al. betreffend der Hitzestabilität von FB<sub>1</sub> (ALBERTS et al., 1990, DOKO und VISCONTI, 1994).

Ähnliche Ergebnisse lieferten auch Untersuchungen über Getreideprodukte aus der Schweiz, Portugal, Spanien, Nordamerika und Argentinien. Zwei Proben aus Portugal überschritten das festgelegte maximale Limit für Fumonisine in Lebensmitteln der European Commission. Regulation (PITTET et al., 1992, HOPMANS und MURPHY, 1993, SYDENHAM et al., 1993, CASTELLA et al., 1999, SILVA et al., 2007).

MURPHY et al. (1993) untersuchten 4 Jahre lang Mais und Maisprodukte im mittleren Westen der USA. Mehr als die Hälfte der Proben enthielten Fumonisine. FB<sub>1</sub> und FB<sub>2</sub> Konzentrationen reichten von 0 – 38 mg/kg und von 0 – 12 mg/kg.

SCUDAMORE et al. (1997) untersuchten Hunde- und Katzenfutter und Futter für Wildvögel auf deren Fumonisin Kontamination. Fumonisine wurden in 30 % der 20 untersuchten Proben mit einem Höchstwert von 750 µg/kg in einem Katzenfutter gefunden. Von diesen 20 Proben fielen 9 Proben auf Hundefutter. Nur 1 Hundefutterprobe wies einen positiven Fumonisingehalt auf.

#### 2.4.2. Eigenschaften der Fumonisine

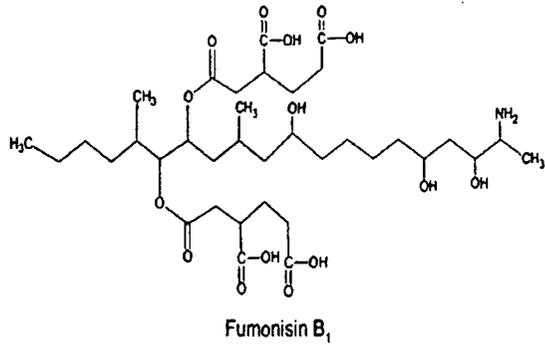
Fumonisine sind eine Gruppe von chemisch sehr ähnlichen Mykotoxinen. Ihre Struktur ähnelt der des Sphingosins. Die Biosynthese erfolgt über einen Polyketid-Weg.

FB<sub>1</sub> ist ein Diester von Propan-1,2,3-tricarbonsäure und 2S-amino-12S,16R-dimethyl-3S,5R,10R,14S,15R-pentahydroxyeicosan, bei dem die C-14 und C-15 Hydroxylgruppen mit der terminalen Carboxygruppe von Propan-1,2,3-tricarboxylessig verestert sind.

FB<sub>2</sub>, FB<sub>3</sub> und FB<sub>4</sub> unterscheiden sich von FB<sub>1</sub> durch das Fehlen einer Hydroxylgruppe. FA<sub>1</sub>, FA<sub>2</sub> und FA<sub>3</sub> sind wie FB<sub>1</sub>, FB<sub>2</sub> und FB<sub>3</sub>, aber sie sind N-acetyliert. FAK ist wie FA<sub>1</sub>, aber 15-keto funktionalisiert. FCs sind prinzipiell wie FBs, hier fehlt jedoch die Methylgruppe, die der Aminogruppe benachbart ist. FPs haben eine 3-Hydroxypyridgruppe anstelle der Aminogruppe der FBs (WHO-IPCS, 2000).

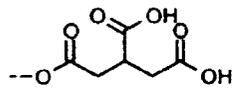
Den hydrolysierten Fumonisinen (HFB<sub>1,2,3 und4</sub>) fehlen beide Tricarboxylsäure-Seitenketten (TCA), den partiell hydrolysierten Fumonisinen (PHFB<sub>1,2,3und4</sub>) fehlt nur eine TCA (POLING und PLATTNER, 1999).

Strukturformel FB<sub>1</sub>:

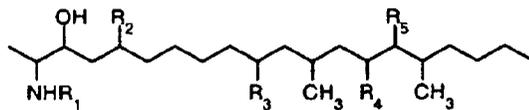


(aus HUSSEIN et al., 2001)

Summenformel FB <sub>1</sub> :	C <sub>34</sub> H <sub>59</sub> NO <sub>15</sub>
Molekulargewicht:	722
Schmelzpunkt:	nicht bekannt



Tricarballic Acid (TCA)



(aus POLING und PLATTNER, 1999)

Tab. 2 : chemische Strukturen der Fumonisine

Fumonisin	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>	R <sub>3</sub>	R <sub>4</sub>	R <sub>5</sub>
<b>FB<sub>1</sub></b>	H	OH	OH	TCA	TCA
<b>HFB<sub>1</sub></b>	H	OH	OH	OH	OH
<b>PHFB<sub>1a</sub></b>	H	OH	OH	OH	TCA
<b>PHFB<sub>1b</sub></b>	H	OH	OH	TCA	OH
<b>FB<sub>2</sub></b>	H	OH	H	TCA	TCA
<b>FB<sub>3</sub></b>	H	H	OH	TCA	TCA
<b>FA<sub>3</sub></b>	COCH <sub>3</sub>	H	OH	TCA	TCA
<b>HFA<sub>3</sub></b>	COCH <sub>3</sub>	H	OH	OH	OH
<b>PHFA<sub>3a</sub></b>	COCH <sub>3</sub>	H	OH	OH	TCA
<b>PHFA<sub>3b</sub></b>	COCH <sub>3</sub>	H	OH	TCA	OH
<b>FB<sub>4</sub></b>	H	H	H	TCA	TCA

Fumonisin ist ein weißes hygroskopisches Pulver, dessen Schmelzpunkt unbekannt ist. Es ist löslich in Wasser, Methanol und Acetonitril-Wasser und unlöslich in unpolaren Lösungsmitteln.

Fumonisine sind generell relativ stabile Verbindungen (ALBERTS et al., 1990, VISCONTI et al., 1994, JACKSON et al., 1996a, 1996b, 1997). Eine Vielzahl von Faktoren macht es schwierig diese von bearbeiteten Lebensmitteln zu extrahieren (SCOTT, 1993, BULLERMANN und TSAI, 1994).

Mit FB<sub>1</sub> gespicktes Maismehl wurde bei 175 – 200°C für 20 min gebacken. Danach konnten nur mehr 45 % des hinzugefügten FB<sub>1</sub> nachgewiesen werden (JACKSON et al., 1997). In einem weiteren Versuch von JACKSON et al. wurde FB<sub>1</sub> wärmebehandelt. Eine Wärmebehandlung von 100°C führte zu keinen signifikanten Verlusten von FB<sub>1</sub>. Die Behandlung mit 125°C führte zu einer Reduktion um <27 %, mit 150°C zu einer Reduktion von 18 – 90 % und bei >175°C konnten >90 % des FB<sub>1</sub> nicht mehr nachgewiesen werden (JACKSON et al., 1996b).

ALBERTS et al. (1990) hingegen berichteten, dass es nach 30 minütigem Kochen von *F. moniliforme*-Kulturen, zu keiner Reduktion des FB<sub>1</sub> kam.

### 2.4.3. Absorption, Verteilung, Exkretion

Fumonisine werden schlecht absorbiert und die orale Bioverfügbarkeit liegt generell unter 5 % für FB<sub>1</sub> und scheint noch weniger für FB<sub>2</sub> zu sein (SHEPHARD und SNIJMAN, 1999). Die absorbierten Fraktionen werden schnell im Körper verteilt und schnell wieder eliminiert (EFSA, 2005).

#### Ratten

Nach intraperitonealer Applikation von FB<sub>1</sub> folgt bei Ratten eine schnelle Absorptions- und Verteilungsphase (ca. 20 min), gefolgt von einer Eliminationsphase (ca. 3h) (SHEPHARD et al., 1992).

FB<sub>1</sub> wird schnell, aber nur teilweise vom Gastrointestinaltrakt nach oraler Verabreichung absorbiert. Obwohl die Bioverfügbarkeit nur bei ungefähr 3,5 % liegt, können trotzdem relativ hohe Konzentrationen in der Leber und in den Nieren nachgewiesen werden (MARTINEZ-LARRANAGA et al., 1999).

Nach intravenöser Verabreichung findet man im Plasma höhere Toxinkonzentrationen und die Elimination des Toxins erfolgt schneller, als nach oraler Verabreichung (MARTINEZ-LARRANAGA et al., 1999).

#### Schweine

Bei intravenöser Verabreichung von Fumonisin kommt es zu einer sehr schnellen Absorptionsphase, gefolgt von einer langsameren Verteilungsphase und einer terminalen, noch langsameren Eliminationsphase, sodass es innerhalb der ersten 60 Minuten zu einem signifikanten Abfall der Plasmakonzentration kommt. Es wird angenommen, dass die verlängerte Eliminationsphase auf eine enterohepatische Zirkulation zurückzuführen ist. Dies wurde demonstriert, indem bei den Tieren, denen die Galle entfernt wurde und somit der enterohepatische Kreislauf unterbrochen wurde, eine viel schnellere Eliminationsphase nachgewiesen werden konnte.

Fumonisine oral verabreicht können erstmals 30 bis 45 Minuten nach Verabreichung im Blut nachgewiesen werden und erreichen einen Konzentrationshöhepunkt nach ungefähr 60 bis 90 Minuten. Nach 3 Stunden kann kein Toxin mehr im Blut nachgewiesen werden. Allerdings liegt die orale Bioverfügbarkeit hier bei 3 – 6 % (PRELUSKY et al., 1994b, HASCHEK et al., 1996).

Ähnliche Resultate über die schlechte orale Bioverfügbarkeit zeigen Studien über Affen (SHEPHARD et al., 1995). Auch bei der oralen Verabreichung von Fumonisin an Legehennen und Milchkühen wurde die systemische Absorption basierend auf den Plasmalevels und den <sup>14</sup>C-markierten Verbindungen auf weniger als 1 % der Dosis geschätzt

(SCOTT et al., 1994, VUDATHALA et al., 1994, PRELUSKY et al., 1995). Der Rumen Metabolismus kann die Bioverfügbarkeit von FB<sub>1</sub> reduzieren.

Bei Ratten und Schweinen, die oral <sup>14</sup>C-FB<sub>1</sub> verabreicht bekommen, verteilt es sich in den meisten Geweben, wobei Leber und Nieren die höchsten Konzentrationen von radiomarkiertem Fumonisin aufweisen. Typischerweise enthält die Leber mehr Toxin als die Nieren, obwohl in der Studie von NORRED und VOSS die Nieren mehr Radioaktivität aufwiesen als die Leber (NORRED und VOSS, PRELUSKY et al., 1994b, 1996, HASCHEK et al., 1996).

Tiere, die FB<sub>1</sub> oral verabreicht bekommen weisen eine um 10 bis 20-fache geringere Gewebekonzentration auf, als Tiere, die es i.v. verabreicht bekommen. Eine messbare Radioaktivität im Gehirn, der Lunge und der Nebennieren konnte nur bei den i.v. dosierten Tieren nachgewiesen werden.

Somit sind Leber und Nieren hauptverantwortlich für den Metabolismus und die Ausscheidung von Fumonisinen und der enterohepatische Kreislauf verlängert die Verweildauer im Körper (HASCHEK et al., 1996).

Bei Hühnern und Kühen wird die geringe Absorption von <sup>14</sup>C-FB<sub>1</sub> dadurch reflektiert, dass ausschließlich Spuren von Radioaktivität in den Geweben gefunden werden können (EHC 219, 2000). Keine Rückstände können in Eiern von Legehennen gefunden werden, und keine bzw. geringe Mengen an FB<sub>1</sub> können in der Milch nachgewiesen werden (VUDATHALA et al., 1994, SCOTT et al., 1994, SPOTTI et al., 2001).

Studien an Ratten belegen, dass es sowohl zu einer, aber auch zu keiner plazentaren Übertragung des Toxins kommen kann (HAMMER et al., 1996, VOSS et al., 1996a, 1996b, COLLINS et al., 1998a, 1998b). Auch bei Hasen konnte keine Diffusion von Fumonisin in die Plazenta nachgewiesen werden (LaBORDE et al., 1997).

Bei Ratten werden die Fumonisine nach oraler Applikation unmetabolisiert hauptsächlich über den Kot ausgeschieden (80-100 %) und zu einem geringen Teil über den Harn (3-4 %). Nach intraperitonealer Aufnahme erfolgt die Hauptausscheidung über die Galle in den Kot (66-67 %), aber auch über den Harn (16-32 %). Bei intravenöser Verabreichung werden 35 % des Toxins über den Kot und 10 % über den Harn ausgeschieden (SHEPHARD et al., 1992, NORRED et al., 1993, SHEPHARD et al., 1994).

Schweine scheiden nach oraler Verabreichung 91 % des Toxins über den Kot und nur einen ganz geringen Teil (0.6 %) über den Harn aus. Nach intravenöser Verabreichung werden 58 % über den Kot und 21 % über den Harn ausgeschieden (PRELUSKY et al., 1994b).

Zusammenfassend werden Fumonisine unmetabolisiert hauptsächlich über den Kot ausgeschieden, obwohl sie auch in verschiedenen Geweben gespeichert werden können. Biliäre Exkretion stellt den Hauptausscheidungsweg dar. Nach oraler Verabreichung können nur geringe Mengen des Toxins in der Galle nachgewiesen werden, was wiederum ein Anzeichen für die geringe orale Bioverfügbarkeit des Toxins ist (SHEPHARD und SNIJMAN, 1999).

#### 2.4.4. Biotransformation

Es gibt geringe Anzeichen dafür, dass Fumonisine in vitro oder in vivo metabolisiert werden, obwohl sie über die Galle ausgeschieden werden.

Studien, in denen primäre Hepatozyten 44 Stunden mit [<sup>14</sup>C]-Fumonisin B<sub>1</sub> inkubiert wurden konnten keine Metaboliten nachgewiesen werden. Ebenso führte die Inkubation mit Lebermikrosomen von Ratten und Pankreaslipasen von Schweinen zu keiner Metabolisierung (IPCS INCHEM, 2001b).

Diverse Studien zeigten, dass Fumonisine primär über den Kot ausgeschieden werden, entweder unverändert oder verbunden mit dem Verlust von einer oder beiden Tricarboxylsäure – Seitenketten. Der Stoff, der über die Galle ausgeschieden wird ist noch biologisch aktiv (ENONGENE et al., 2000).

Der Verlust der Tricarboxylsäure-Seitenketten findet wahrscheinlich im Darm statt, da komplett hydrolysiertes Fumonisin B<sub>1</sub> in den Fäzes, aber nicht in der Galle nachgewiesen werden kann. Dies konnten SHEPHARD und SNIJMAN (1999) in einer Studie mit Affen bestätigen. Der Hauptanteil der hydrolysierten Fumonisine war partiell hydrolysierte Fumonisine, während komplett hydrolysierte Fumonisine nur zu einem geringen Teil nachgewiesen werden konnten. Keine hydrolysierten Produkte waren im Urin nachweisbar, was wiederum die Annahme bestätigt, dass die Hydrolyse im Darm stattfindet.

Bei Wiederkäuern bildet die hydrolysierte Form von FB<sub>1</sub> einen signifikanten Teil der totalen FB<sub>1</sub> Konzentration (60-90 %), die im Kot gefunden wird.

Bei Nichtwiederkäuern ist die Hauptkomponente, die im Kot nachgewiesen werden kann FB<sub>1</sub> (RICE und ROSS, 1994).

#### 2.4.5. Klinik und Pathologie

##### 2.4.5.1. Ösophaguskrebs bei Menschen

Das Vorkommen des Pilzes, *Fusarium moniliforme* Sheldon im Mais wurde mit dem Auftreten von Ösophaguskrebs in verschiedenen Regionen der Welt in Verbindung gebracht. Geographische Unterschiede, ethnische Gruppen, genetische Prädisposition, Kultur, wirtschaftlicher Status und Ernährungsstatus, all diese Faktoren beeinflussen das Auftreten von Erkrankungen. Häufiges Vorkommen von Ösophaguskrebs wurde mit eingeschränkter Ernährung, die hauptsächlich aus Mais und Weizen besteht und geringen Gehalten an bestimmten Mineralien und Vitaminen und dem Konsum von Tabak und Alkohol in Verbindung gebracht (LI et al., 1989, BLOT, 1994). Die Kontamination von Weizen und Mais mit Pilzen zog das Interesse vieler Forscher auf sich, die die toxischen, mutagenen und karzinogenen Metaboliten der Hauptkontaminanten dieser Getreidesorten charakterisiert haben. Die mögliche Beteiligung von *F. moniliforme* und Fumonisinen an der Entstehung von

Ösophaguskrebs wird beurteilt auf der Basis der Häufigkeit des Vorkommens, dem Vorhandensein von *Fusarium* spp. im Mais, dem Vorhandensein von Fumonisinen und Fusarium-Mykotoxinen, Ernährungsmängel und anderen ernährungsbedingten Risikofaktoren (IPCS INCHEM, 2001b).

Ein unüblich hoher Anteil an Ösophaguskrebs trat in Transkei, einer Region von Südafrika auf. Das Hauptnahrungsmittel der Population in dieser Region ist Mais. Und Mais ist häufig mit Pilzen, speziell mit *F. moniliforme* befallen (MARASAS et al., 1981).

Aus diesem Grund wurden in den betroffenen Regionen Untersuchungen an Mais vorgenommen. Diese ergaben, dass in den Gebieten mit einem hohen Anteil an Ösophaguskrebs in der Population, höhere Gehalte an *F. moniliforme* und Fumonsisinen enthalten sind, als in Gebieten mit geringerer Krebserkrankung (SYDENHAM et al., 1990, RHEEDER et al., 1992, NORRED und VOSS, 1994).

Ösophaguskrebs tritt häufiger als normal noch in Teilen Chinas und Italiens auf (YANG, 1980, LI et al., 1989, FRANCESCHI et al., 1990, CHU und LI, 1994, YOSHIZAWA et al., 1994). In China sind in den betroffenen Regionen die Ernährungsgewohnheiten ähnlich wie in Transkei. Auch dort dient Mais als Hauptnahrungsmittel.

Die große Aufnahme von Weizen und Mais, geringere Flüssigkeitsaufnahme, Alkoholkonsum und Rauchen wurden in China mit vermehrtem Auftreten von Ösophaguskrebs in Verbindung gebracht (LI et al., 1989).

Studien, in denen Maisproben analysiert wurden ergaben hohe Gehalte an Fumonisin B<sub>1</sub> und B<sub>2</sub>. Ebenso war in den Gebieten mit höherem Ösophaguskrebsrisiko der Gehalt an Fumonisinen doppelt so hoch wie in den Gebieten mit geringem Risiko (CHU und LI, 1994, YOSHIZAWA et al., 1994).

Im Nordosten Italiens zeigte eine Studie eine Korrelation zwischen dem Konsum von Mais, und dem Auftreten von Krebs im oberen Teil des Verdauungstraktes und des Ösophagus. Mängel an Mikronährstoffen in Mais, wie Riboflavin und Niacin, speziell in Verbindung mit Alkoholkonsum können die Nahrungsmängel, die durch die Maisaufnahme induziert werden, verschlimmern (FRANCESCHI et al., 1990).

Diese Daten/Fakten deuten darauf hin, dass hohe Gehalte an FB<sub>1</sub> und andere Mykotoxine im Mais und die Fähigkeit von *F. moniliforme* zur Produktion von Nitrosaminen eine wichtige Rolle bei der Krebsentstehung spielen (CHU und LI, 1994, NORRED und VOSS, 1994).

#### 2.4.5.2. Porzines Pulmonäres Ödem (PPE)

Eine Fumonisinvergiftung beim Schwein wird charakterisiert durch pulmonäre, kardiovaskuläre und hepatische Symptome.

Das erste Auftreten einer Fumonisinvergiftung beim Schwein wurde erstmals 1981 berichtet (KRIEK et al., 1981). Die klinischen Symptome treten typischerweise am 2. bis 7. Tag nach der Aufnahme von Fumonisin auf. Die Tiere zeigen eine Dyspnoe, Schwäche, Zyanose, Erytheme der Haut, Ikterus und manchmal plötzlichen Tod (OSWEILER et al., 1992, COLVIN et al., 1993). Pathologische Veränderungen sind pulmonäres Ödem, hyperplastische Ösophagitis, Hyperkeratose, Ulzeration und Blutungen des Magens, Herzhypertrophie und Hypertrophie der pulmonalen Arterien (COLVIN et al., 1993, CASTEEL, et al., 1994, HASCHEK et al., 1996, GUMPRECHT et al., 1998, 2001, SMITH et al., 1996a, 1996b, 1999).

Letales pulmonäres Ödem und Hydrothorax konnte in Schweinen beobachtet werden, die 16 mg FB<sub>1</sub>/kg KGW erhielten (COLVIN et al., 1993, HASCHEK, et al., 2001).

Grobe pathologische Untersuchungen zeigen ein starkes Lungenödem (schwere, nasse Lungen) mit verbreiterten interlobulären Septen, aber keine weiteren Anzeichen einer Entzündung. Wenn 1 mg FB<sub>1</sub>/kg Futter 8 Wochen lang verabreicht wird führt dies zu einer Proliferation des Bindegewebes, primär um die lymphatischen Gefäße, aber auch subpleural und interlobulär, bis hin zu den peribronchialen und den peribronchiolären Räumen. Diese Veränderungen werden aber nicht von klinischen Symptomen begleitet. Bei der Aufnahme von 5 und 10 mg/kg Futter kommt es zu einer dosisabhängigen Zunahme des Lungengewichtes (ZOMBORSKY-KOVÁCS et al., 2002a, 2002b).

Manche Studien belegen aus ihren Untersuchungen, dass den Lungenveränderungen kardiovaskuläre Störungen and hämodynamische Veränderungen mit pulmonärer Hypertension und Linksherzinsuffizienz vorausgehen (COLVIN et al., 1993, SMITH et al., 1999, CONSTABLE et al., 2000).

Andere Studien wiederum schließen aus den signifikanten Veränderungen der Sauerstoffaufnahme und diverser hämodynamischer Parameter, dass die pulmonäre Hypertension, die durch die hypoxische Vasokonstriktion verursacht wird, zum PPE beitragen könnte (SMITH et al., 1996a, 1996b).

Weiters führt die Aufnahme von Fumonisin zu Leberveränderungen mit Lebernekrose und Cholestasis. Histologische Veränderungen der Leber sind zytoplasmatische Vakuolisierung, Apoptose, erhöhte Zellproliferation, noduläre Hyperplasie. Betroffene Tiere zeigen eine verminderte Futteraufnahme und verlieren Körpergewicht. Diese Veränderungen werden von Änderungen der biochemischen Parameter begleitet. Erhöhung der Gallensäuren, der Bilirubinkonzentration, der AST, ALP, GGT und LDH Aktivität sind konzentrations- und zeitabhängig (OSWEILER et al., 1992, COLVIN et al., 1993, CASTEEL et al., 1994, HASCHEK et al., 1996, ZOMBORSKY-KOVÁCS et al., 2002a, 2002b).

Toxische Leberentzündung tritt gleichzeitig mit PPE auf. Sie kann aber auch bei Tieren beobachtet werden, die zwar Fumonisin aufnehmen aber kein PPE entwickeln (HASCHEK et al., 1996).

COLVIN et al. (1993) folgerten aus ihren Untersuchungen, dass der ausschlaggebende Faktor, ob das Lungenödem oder der Leberschaden die Todesursache war, die verabreichte Menge an Fumonisin war. Bei Verabreichung von Fumonisin über 16 mg/kg KGW pro Tag führt das PPE, bei weniger als 16 mg/kg KGW pro Tag führen die Lebererkrankungen zum Tod.

Natürliche Ausbrüche von Fumonisinvergiftungen bei Schweinen wurden 1989 und 1990 in verschiedenen Teilen der USA berichtet (HARRISON et al., 1990, OSWEILER et al., 1992).

#### 2.4.5.3. Equine Leukoenzephalomalazie (ELEM)

Das Equine Leukoenzephalomalazie – Syndrom wird charakterisiert durch verflüssigte nekrotische Läsionen in der weißen Substanz des Kleinhirns. Der Name ist ziemlich irreführend da auch die graue Substanz des Gehirns betroffen sein kann (MARASAS et al., 1988). Diese fatale Erkrankung scheint nur bei Pferden aufzutreten, obwohl Hirnläsionen auch bei Hasen und Schweinen berichtet wurden (BUCCI et al., 1996, FAZEKAS et al., 1998).

WILSON und MARONPOT (1971) konnten erfolgreich *F. verticilloides* als Hauptkontaminant in schimmeligem Mais und als Hauptverursacher der ELEM in Ägypten nachweisen. Weiters konnten sie ELEM hervorrufen, indem sie Material dieses Pilzes an 2 Esel verfütterten. Später bestätigten Forscher in Südafrika die Fähigkeit von *F. verticilloides* die charakteristischen klinischen Symptome und pathologischen Veränderungen der ELEM und Hepatitis bei Pferden und Eseln herbeizuführen (KELLERMAN et al., 1972, MARASAS et al., 1976, 1988, KRIEK et al., 1981).

ELEM trat schon Mitte des 18. Jahrhunderts auf und wurde lange Zeit mit der Aufnahme von Mais assoziiert, der mit *Fusarium moniliforme* kontaminiert war. Später wurde dann bewiesen, dass *F. moniliforme* Fumonisin B<sub>1</sub> produziert und dass dieses Mykotoxin für die Erkrankung verantwortlich ist (MARASAS et al., 1988, KELLERMAN et al., 1990).

Die ersten klinischen Symptome äußern sich in Lethargie, Apathie, Kopfpresen, Inappetenz. Weitere Symptome sind Inkoordination, Benommenheit, Unruhe, Ataxie, Parese, Hypersensitivität, Hyperästhesie, Muskelatrophie, Paralyse der Lippen und der Zunge, Nystagmus, Ikterus, Petechien, Konvulsionen und Tod nach mehreren Tagen (MARASAS et al., 1976, KELLERMAN et al., 1990, FOREMAN et al., 2004).

Ebenso wie bei Schweinen verursachen Fumonisine bei Pferden kardiovaskuläre Funktionsstörungen mit einer verringerten Herzrate, vermindertem Output und verminderter Kontraktilität (SMITH et al., 2002).

Pathologisch ist das Hirn geschwollen, hat kleine hämorrhagische Areale und perivaskulär Hämorrhagien. Es zeigt eine Degeneration der weißen Substanz und kleine nekrotische Areale. Die weiße Substanz ist weicher als normal und rötlichbraun verfärbt. Die Hirnflüssigkeit ist vermehrt und gelblichbraun gefärbt (KELLERMANN et al., 1990, ROSS et al., 1993).

Zusätzlich zu den Hirnläsionen treten noch histopathologische Veränderungen der Leber und Nieren bei Pferden auf, denen pures Fumonisin, natürlich kontaminierter Mais oder künstlich kontaminierter Mais verabreicht wurde (KELLERMAN et al., 1990, ROSS et al., 1993).

Die Leber erscheint kleiner, fest und gelb, die Leberläppchen sind teilweise vollkommen durch proliferatives Bindegewebe zerstört außerdem kommt es zu einer Proliferation der Gallengänge (ROSS et al., 1993).

Die Nieren sind moderat geschwollen und weisen eine diffus graugelbe Verfärbung auf (KELLERMAN et al., 1990).

Fatale Lebererkrankungen ohne gleichzeitigem Vorhandensein von Hirnläsionen wurden nach intravenöser Verabreichung von FB<sub>1</sub> gefunden (WHO-IPCS, 2000). ELEM gleichzeitig mit Leberveränderungen konnte in Pferden und Ponies nachgewiesen werden, die natürlich kontaminiertes Futter mit geringen FB<sub>1</sub> Konzentrationen erhielten (MARASAS et al., 1988, ROSS et al., 1993).

ROSS et al. (1993) kamen zu dem Schluss, dass die Länge der Verabreichung, die Höhe der Konzentration, individuelle Unterschiede der einzelnen Tiere, vorherige Verabreichung oder schon vorher bestehende Lebererkrankungen alle zum Auftreten der klinischen Symptome beitragen.

Die Beurteilung vieler ELEM Fälle in der USA lässt darauf schließen, dass die Aufnahme von Futter, das mehr als 10 mg FB<sub>1</sub>/kg (= 0.2 mg/kg KGW) enthält mit einem erhöhten Risiko der Entstehung einer ELEM verbunden ist, während die Aufnahme von weniger als 6 mg FB<sub>1</sub>/kg (= 0.12 mg/kg KGW) Futter kein erhöhtes Risiko darstellt (ROSS et al., 1993).

#### **2.4.6. Beeinträchtigung des Sphingolipidmetabolismus**

Fumonisin B<sub>1</sub> ist ein typischer Inhibitor der zellulären Sphingosin(Sphinganin)-N-Acetyltransferase. In eukaryotischen Zellen führt die Hemmung dieses Enzyms zu einer Akkumulation von Sphinganin und in einigen Fällen auch von Sphingosin und in Folge zu einer Abnahme komplexer Sphingolipide in der Zelle. Hierdurch kommt es zu einer Beeinträchtigung des Zellzyklus und zellulärer Differenzierungsprozesse, gefolgt durch oxidativen Stress sowie Zellapoptose und -nekrose (EFSA, 2005).

Die Störung des Sphingolipidmetabolismus führt zu einer Akkumulation von sehr viel freiem Sphinganin in der Leber, den Nieren, im Serum und/oder Urin und gleichzeitig zu einer Verminderung der komplexen Sphingolipide. Der Anstieg des freien Sphinganin ist ein nützlicher Biomarker für die Aufnahme von toxischen Konzentrationen von Fumonisinen bei landwirtschaftlichen Nutztieren (ENONGENE et al., 2000).

## 2.5. Ochratoxin A (OTA)

### 2.5.1. Herkunft und Vorkommen

Ochratoxin ist auf Grund seiner hohen Toxizität als ein wichtigstes Mykotoxin anzusehen. Es ist ein potenter sekundärer Stoffwechselmetabolit, der von verschiedenen Pilzen der Gattung *Penicillium* und *Aspergillus* produziert wird.

VAN DER MERWE et al. (1965) konnten 1965 erstmals OTA aus Kulturen des Pilzstammes *Aspergillus ochraceus* Wilhelm isolieren.

Als Hauptmykotoxinproduzenten gelten *Aspergillus ochraceus* und *Penicillium verrucosum*. Des weiteren können auch *A. alliaceus*, *A. sclerotiorum*, *A. sulphureus*, *A. albertensis*, *A. auricomus*, *A. wentii*, *A. melleus*, *A. ostianus* und *A. niger*, *P. nordicum* sowie *P. viridicatum* Ochratoxin A produzieren (VARGA et al., 1996, BAYMANN et al., 2002, EFSA, 2004a, HÄGGBLÖM, 1984).

In kühleren Klimazonen, bei Temperaturen unter 30 Grad Celsius wie sie z.B. in Europa und Kanada vorherrschen, sind hauptsächlich *Penicillium*arten, vor allem *P. verrucosum*, in wärmeren Zonen hingegen ist hauptsächlich *A. ochraceus* für die Ochratoxin A – Produktion verantwortlich (HÄGGBLÖM, 1984).

Neben der Temperatur ist die Bildung von Ochratoxin auch noch von Sauerstoff- und Substratzufuhr, sowie von Feuchtigkeit, gemessen als Wasseraktivität ( $a_w$ ), während der Ernte und Lagerung abhängig. Diese muss über 0.97 sein, um ein Pilzwachstum zu ermöglichen. Der optimale pH-Wert für die Ochratoxinproduktion liegt bei 5.6 (MOSS, 1996, EFSA, 2004a, JORGENSEN et al., 1996).

Bei Futtermitteln wird Ochratoxin am häufigsten in Getreide (Weizen, Roggen, Gerste und Mais) und seltener in Erdnüssen und Sojabohnen nachgewiesen. Die Toxinbildung erfolgt gewöhnlich während der Lagerung. Eine Einschränkung der Toxinbildung erfordert eine angemessene Trocknung vor und während der Lagerung, sodass auch die Entstehung von sogenannten Hot Spots (Schimmelpilznestern) vermieden wird.

BAUER und GAREIS konnten eine Ochratoxin A – Kontamination in Sonnenblumenschrot, Futtererbse und Heu feststellen (BAUER und GAREIS, 1987).

Für den Menschen zählen Getreide und Getreideprodukte, Kaffee, Bier, Wein und Traubensaft zu den am höchsten mit OTA belasteten Lebensmitteln.

Geflügel, Rindfleisch und Milch sind praktisch OTA frei. Bei Milch und Milchprodukten kann es durch OTA belastete Zusätze, wie Gewürze, Müsli oder Trockenfrüchte zu Kontaminationen kommen (WOLFF und GAREIS, 1999).

WOLFF und GAREIS (1999) führten von 1996 bis 1999 die bisweilen weltweit größte Studie über Ochratoxin A durch. Insgesamt konnten von 7000 Mustern 4004 als Ochratoxin A

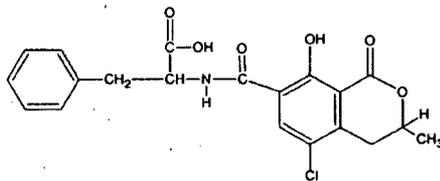
positiv bewertet werden, was einem Prozentsatz von 57.2 entspricht (Nachweisgrenze 0.01µg/kg).

In 68.6 % der Getreideprodukte und in 50 % der getesteten Bier- und Weinproben wurde OTA gefunden. OTA Gehalte über 3 µg/kg wurden in 1.4 %, über 5µg/kg in 0.8 % der Proben festgestellt.

### 2.5.2. Eigenschaften von Ochratoxin A

Ochratoxin A besteht aus einem Dihydroisokumarin, dem Ochratoxin  $\alpha$ , welches über eine  $\alpha$ -Amidbindung mit L- $\beta$ -Phenylalanin verbunden ist.

Strukturformel:



(aus HUSSEIN et al., 2001)

Summenformel:	$C_{20}H_{18}O_6NCl$
Molekulargewicht:	403,82
Schmelzpunkt:	168 – 173°C

Ochratoxin A ist ein farbloser, kristalliner Feststoff, der in Wasser schwer löslich ist. Es ist im festen Zustand stabil, kann jedoch durch starke Säuren oder Basen, sowie Oxidationsmittel, DMSO, Ethanol und Chloroform zerstört werden. Auch durch Kochen, Rösten und Fermentierungsprozesse kann Ochratoxin zumindest teilweise zerstört werden.

### 2.5.3. Absorption, Verteilung, Exkretion von Ochratoxin A

Die gastrointestinale Absorption von Ochratoxin A erfolgt sehr schnell in allen Abschnitten des Verdauungstraktes, wobei der Dünndarm eine höhere Absorptionskapazität besitzt. Die maximale Absorption findet im proximalen Jejunum statt (KUMAGAI und AIBARA, 1982).

Bei Wiederkäuern kommt es zu einer geringen Absorption. Ochratoxin A wird in den Vormägen mikrobiell durch die Carboxypeptidase zu dem wesentlich weniger toxischen Ochratoxin  $\alpha$  und Phenylalanin hydrolysiert (HULT et al., 1976, KIESSLING et al., 1984).

Die Bioverfügbarkeit beträgt beim Schwein 66 %, beim Hasen 56 % und beim Geflügel 40% (GALTIER et al., 1981).

Nach der Absorption aus dem Verdauungstrakt gelangt OTA hauptsächlich über die Portalvene und zu einem geringen Teil über die Lymphgefäße in den Blutkreislauf (KUMAGAI und AIBARA, 1982). Im Blut wird es zu 99 % an Serumproteine gebunden. Der größte Teil bindet an Albumin, ein geringerer Teil an nicht näher charakterisierte Serumproteine mit Molekulargewichten von 20 000 Da (STOJKOVIC et al., 1984).

Aufgrund der starken Bindung des OTA an Proteine, ist der Transfer des Toxins vom Blut zu den Leber- und Nierenzellen eingeschränkt und dadurch die Eliminierung aus dem Blut verzögert.

Dies bewies auch KUMAGAI (1985) in seiner Studie. Sowohl Albumin-defizienten als auch normalen Ratten wurde OTA intravenös verabreicht. Die Albumin-defizienten Ratten waren in der Lage, das verabreichte Toxin 20 bis 70 fach schneller über Urin und Galle auszuscheiden, als die normalen Ratten.

Die biologische Halbwertszeit (HWZ) des Toxins ist abhängig von der verabreichten Dosis, der Applikationsmethode und der Tierart.

So ist die HWZ nach oraler Aufnahme kürzer, als nach intravenöser Verabreichung. Wahrscheinlich, weil es bei oraler Aufnahme zuerst durch die Leber transportiert und anschließend über die Galle eliminiert wird, bevor es in den Blutkreislauf gelangt.

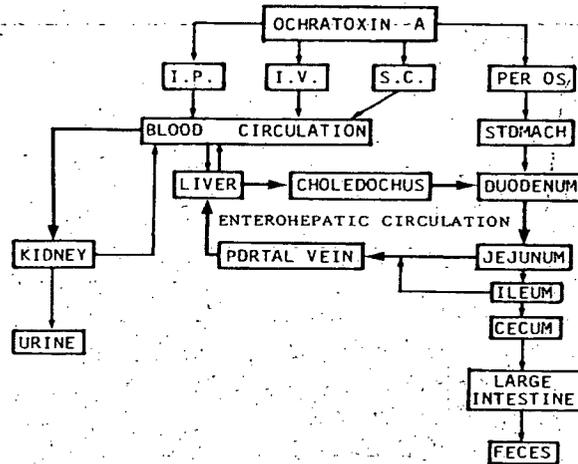
Die HWZ variiert von 0.68 Stunden nach oraler Gabe beim Fisch bis zu 840 Stunden nach intravenöser Gabe beim Menschen. Die längste HWZ weist der Affe auf mit bis zu 1400 Stunden (PETZINGER und ZIEGLER, 2000).

Ochratoxin A unterliegt sowohl nach intravenöser, als auch nach parenteraler Aufnahme einer enterohepatischen Zirkulation.

Dies konnte in diversen Studien nachgewiesen werden (KUMAGAI und AIBARA, 1982, SREEMANNARAYANA et al., 1988).

Nach Auftreten eines zweiten Verteilungspeaks im Serum wurde daraus geschlossen, dass es zu einer Sekretion des Toxins über die Galle und einer anschließenden Reabsorption aus dem Darm kommt (Abb. 2).

**Abb. 2 :** Absorption und Verteilung des OTA nach unterschiedlichen Verabreichungsarten  
(aus KANISAWA, 1990)



Die Konzentration, Verteilung und Anreicherung des Ochratoxin A in verschiedenen Geweben hängt von der Tierart, der verabreichten Dosis, der Form des OTA, der Futterzusammensetzung und dem Gesundheitszustand des Tieres ab.

Die Anreicherung des OTA beim Schwein, der Ratte, dem Huhn und der Ziege ist in der Niere am größten, gefolgt von Leber, Muskel und Fett (LI et al., 1997, ZEPNIK et al., 2003, RINGOT et al., 2006, PFOHL-LESZKOWICZ und MANDERVILLE, 2007).

Generell ist die Eliminations-Halbzeit im Blut länger, als in den Geweben. Dies wird auf die höhere Bindungsaffinität der Toxine zu den Proteinen im Blut zurückgeführt.

Der Hauptausscheidungsweg von Ochratoxin A ist die Elimination über die Niere in den Harn. Da der Hauptteil des OTA an Serumalbumin gebunden ist, kann die Niere nur den freien Anteil im Blut über die Glomeruli ausscheiden.

Die renale Elimination beträgt ungefähr 48 % der Totalclearance. Eine effektive glomeruläre Filtration wird durch die Bindung an Albumin verhindert (LI et al., 1997). Vielmehr kommt es zu einer Elimination des OTA über die Tubuli. Zusätzlich wird es in allen Nephronsegmenten reabsorbiert (RINGOT et al., 2006).

Diese Reabsorption verzögert die OTA Ausscheidung and führt möglicherweise zur Akkumulation in der Niere und trägt zur renalen Toxizität bei (RINGOT et al., 2006).

Aufgrund der eingeschränkten glomerulären Filtration von Ochratoxin A durch die Proteinbindung kommt es bei fast allen Lebewesen zu anderen Ausscheidungswegen, wie z.B. über die Leber, die Galle, den Darm in den Kot.

Die fäkale Ausscheidung von OTA erfolgt hauptsächlich, aber nicht ausschließlich über die Galle. Es besteht die Möglichkeit einer direkten Exkretion in das Darmlumen. Dies ist insbesondere dann der Fall, wenn die Toxinkonzentration im Darmlumen im Vergleich mit der Konzentration im Blut sehr niedrig oder nahezu Null ist. Abgesehen davon gilt aber, dass die Absorption von Ochratoxin A vom Darmlumen in das Blut deutlich effizienter als in der entgegengesetzten Richtung verläuft (KUMAGAI und AIBARA, 1982).

#### **2.5.4. Biotransformation von OTA**

Ochratoxin A wird im Dickdarm und Zäkum der monogastrischen Lebewesen größtenteils zu dem weniger toxischem OT $\alpha$  und Phenylalanin metabolisiert. Dies kann durch die Carboxypeptidase A, Trypsin oder  $\alpha$ -Chymotrypsin erfolgen (MADHYASTA et al., 1992, RINGOT et al., 2006).

Ein kleiner Prozentsatz von OTA wird in der Leber zu Hydroxy-Ochratoxin hydroxyliert. Wobei man hier zwischen drei Formen, dem 4(R)-, 4(S)- und 10-OH-OTA unterscheiden kann. OTB und OP-OTA sind weitere Metabolite von Ochratoxin A (RINGOT et al., 2006, LI et al., 1997).

#### **2.5.5. Klinik und Pathologie der Ochratoxikose**

Bei allen bislang untersuchten Tierarten wie Hund, Schwein, Ratte, Hamster, Meerschweinchen, Kaninchen, Huhn und Fisch führte Ochratoxin A zu pathologischen Veränderungen an den Nieren, die sich mikroskopisch als Degeneration der Epithelzellen, Nekrose, Karyolyse und Plasmolyse der proximalen Tubuli, atrophische Glomeruli oder im fortgeschrittenen Stadium als eine interstitielle kortikale Fibrose bzw. Sklerose darstellen.

Makroskopisch sind die Nieren blass, vergrößert und gesprenkelt.

Die klinischen Symptome äußern sich in Depression, Inappetenz, Polyurie, Polydipsie, Verlust der Fähigkeit der Harnkonzentrierung, Proteinurie und Glukosurie.

Außerdem kann Ochratoxin A die Proteinsynthese hemmen, die DNA und RNA Synthese in vielen verschiedenen Organen beeinflussen, die Lipid-Peroxidation erhöhen und die Mitochondrienfunktion und die Kalzium-Homöostase stören. Weiters kann es schon in geringsten Konzentrationen zur Nekrose und Apoptose vieler Zellen in verschiedenen Organen führen (DIERHEIMER und CREPPY, 1991, SCHILTER et al., 2005, RINGOT et al., 2006). Die Verabreichung von Ochratoxin A führt zur Unterdrückung des Immunsystems, indem es die Proliferation der B- und T- Lymphozyten hemmt, die Aktivität der Killerzellen reduziert und zu einer Lymphopenie führt. Eine karzinogene Wirkung konnte vor allem in Nagetieren nachgewiesen werden (PFOHL-LESZKOWICZ und MANDERVILLE, 2007).

### 2.5.5.1. Die Endemische Balkannephropathie (BEN) des Menschen

Die endemische Balkannephropathie des Menschen ist eine chronische Nierenerkrankung unbekannter Ursache. Sie wurde in Bulgarien, Kroatien, Rumänien, Serbien, Bosnien-Herzegowina, Slowenien und Mazedonien identifiziert.

Viele und lange Untersuchungen diverser Studien über die ätiologischen Ursachen der BEN führten zur Erstellung von 4 Hypothesen: virale Infektion, genetische Prädisposition, Kontamination des Wassers mit Toxinen und Aufnahme von Ochratoxin A mit kontaminierten Lebensmitteln (PUNTARIC et al., 2001).

In sämtlichen Studien konnte tatsächlich ein Zusammenhang zwischen der Aufnahme von Ochratoxin A-hältigen Lebensmitteln und Nierenerkrankungen (BEN, Tumore) nachgewiesen werden.

Das Gebiet von Slavonski Brod ist endemisch an BEN erkrankt. Daher untersuchten PUNTARIC et al. (2001) 92 Weizen- und 51 Getreideproben auf das Vorkommen von Ochratoxin A. In 74 der Weizenproben und 17 der Getreideproben konnte OTA nachgewiesen werden.

Ebenso konnten PETKOVA-BOCHAROVA und CASTEGNARO (1985) einen höheren Anteil an OTA belasteten Proben in endemischen Gebieten in Bulgarien, als in nicht endemischen Gebieten nachweisen.

ABOUZIED et al. (2002) untersuchten Lebens- und Futtermittel in Bulgarien. Die Proben stammten von einem Dorf aus Haushalten mit BEN, aus anderen Haushalte vom selben Dorf und aus Haushalten von nicht endemischen Dörfern. Diese Studie ergab einen höheren Anteil an OTA positiven Proben in den BEN Haushalten im Vergleich zu den Proben aus den Haushalten vom selben Dorf. Jedoch war der Anteil an OTA positiven Proben in den BEN Haushalten gleich oder geringer, als in den Haushalten aus nicht endemischen Dörfern.

Dieses Ergebnis unterstützt die Vermutungen wiederum, dass das Entstehen der endemischen Balkannephropathie nicht ausschließlich auf die Aufnahme von Ochratoxin A zurückgeführt werden kann, sondern noch von anderen Umwelteinflüssen abhängig ist.

Studien über Ochratoxin A Gehalte im Blut weisen genauso widersprüchliche Ergebnisse auf. Einerseits konnten bei Patienten mit Erkrankungen des Harntraktes höhere OTA Konzentrationen im Blut nachgewiesen werden (ÖZCELIK et al., 2001), andererseits bewiesen Studien, dass die OTA Konzentration bei chronisch nierenkranken Patienten niedriger ist, als bei gesunden (MAAROUFI et al., 1995, GROSSO et al., 2003).

Bei Erkrankung an einer BEN treten keine Akutsymptome auf. Die ersten Anzeichen einer Erkrankung äußern sich in Anämie und milder Proteinurie. In weiterer Folge führt es zu einer Verkleinerung der Niere und diffuser interstitieller Fibrose. Im letzten Stadium führt die BEN zu Enzymurie, Kopfweh, Lendenschmerz, Gewichtsabnahme, Durst und bitterem Geschmack im Mund (PFOHL-LESZKOWICZ et al., 2002, PFOHL-LESZKOWICZ und MANDERVILLE, 2007, FUCHS und PERAICA, 2005).

### 2.5.5.2. Ochratoxikose des Hundes

Im Jahre 1973 führten SZCZECH et al. (1973a, 1973b) Fütterungsversuche mit jungen Beaglehunden durch. Die Hunde erhielten kristallines Ochratoxin A in den Konzentrationen von 0.2 bis zu 3 mg/kg Körpergewicht für 14 Tage.

Sie wiesen folgende klinische Symptome auf: Anorexie, Emesis, Würgen, Tenesmus, erhöhte innere Körpertemperatur, bilaterale purulente Konjunktivitis, Tonsillitis, Polydipsie, Polyurie, Dehydration, Erschöpfung und Tod. Bei der Dosis von 3 mg/kg Körpergewicht trat der Tod innerhalb von 3 Tagen ein.

Weiters bestand eine Proteinurie und Glucosurie. Der Harn war blass gelblich und trüb und zeigte ein geringes spezifisches Gewicht. Im Harnsediment konnten Klumpen von nekrotischen Tubulusepithelzellen nachgewiesen werden.

Pathologische Veränderungen zeigten sich in Ödemen, Kongestionen und Nekrosen der Lymphgewebe, Erosionen, Ulzerationen und Blutungen der Darmmukosa und nekrotische und degenerative Veränderungen im Konvolut der proximalen Tubuli der Nieren.

1987 wurde über einen Fall von akuter Welpensterblichkeit berichtet, der bei 4 Wochen alten Afghanenwelpen im Zusammenhang mit der Verfütterung eines handelsüblichen Milchpulvers auftrat.

Eine Untersuchung des Futters ergab eine hohe antibiotische Aktivität und eine Kontamination mit 6.8 µg Ochratoxin A / kg Futter. Ein Zusammenhang zwischen Futteraufnahme, der daraus möglicherweise resultierenden enteralen Dysbiose und dem Ausbruch der Herpesvirus canis – Infektion wurde diskutiert (GAREIS et al., 1987).

### 2.5.5.3. Ochratoxikose der Katze

Die Ochratoxikose der Katze wurde bislang noch nicht untersucht. Weiters gibt es in der Literatur keine Daten über den Zusammenhang zwischen der Aufnahme von Ochratoxin A kontaminiertem Futter und pathologischen Veränderungen der Nieren.

Auch PÜHRINGER (2003) konnte in ihrer Arbeit keinen signifikanten Zusammenhang zwischen den OTA Konzentrationen in den Nieren und den pathologischen Veränderungen der Nieren nachweisen.

Aber von insgesamt 55 untersuchten Katzenfuttermitteln konnte sie in 14 Ochratoxin A nachweisen.

RAZZAZI-FAZELI et al. (2001) untersuchten 28 Katzenfutter auf den OTA Gehalt. In dieser Studie wurden 12 Futtermittel als Ochratoxin A positiv bewertet (> 0,1 µg/kg).

#### 2.5.5.4. Ochratoxikose des Schweines – porzine Nephropathie

Im Jahre 1928 entdeckte der Veterinärpathologe Larsen eine Nierenerkrankung beim Schwein, die er nach einigen Versuchen auf die Aufnahme von Futter zurückführen konnte, das mit den Pilzen *P. viridicatum* und *P. cyclopium* belastet war (KROGH und ELLINGER, 1977).

Die Epidemiologie der porzinen Nephropathie weist Ähnlichkeiten mit der Epidemiologie der endemischen Balkannephropathie auf (KROGH, 1976).

KROGH (1976) konnte in allen Gebieten Dänemarks einen endemischen Befall der porzinen Nephropathie nachweisen. Hauptsächlich betroffen sind kleinere Farmen und weibliche Schweine eher als männliche.

TAPIA und SEAWRIGHT (1984, 1985) führten diverse Versuche mit Ochratoxin A haltigem Futter bei Schweinen durch. Tiere, die nur 1 und 2 mg OTA/kg Futter für 20 Tage erhielten wiesen nur leichte Degenerationen der renalen Tubuli und interstitielle Fibrosen auf. Hingegen kam es bei den Tieren, die die höchste OTA Dosierung (16 mg/kg) erhielten zu Inappetenz, Gewichtsverlust, Polydipsie, Polyurie, Proteinurie, Glucosurie, blasse geschwollene Nieren, Degeneration der Tubuli und kortikale Fibrose.

Auch STOEV et al. (2001) führten Fütterungsversuche durch. Mikroskopische Veränderungen der Nieren wie Degeneration der proximalen Tubuli und proliferative Vorgänge konnten bereits bei geringeren Konzentrationen (90 µg/kg und 130 µg/kg) beobachtet werden. Makroskopische Veränderungen konnten jedoch erst bei 180 µg/kg Futter nachgewiesen werden und klinische Symptome traten erst bei Konzentrationen von 790 µg/kg Futter auf.

#### 2.5.6. Ochratoxin A im Futter

SCUDAMORE et al. (1997) untersuchten Futtermittel für Katzen, Hunde und Wildvögel auf deren OTA Gehalt. In 10 % der Proben konnte OTA in niedrigen Konzentrationen nachgewiesen werden. Der höchste Gehalt war 7 µg/kg und wurde in einem Vogelfutter gefunden. Zwei Hundefutterproben enthielten geringe Mengen an OTA (1.3 µg/kg).

Auch RAZZAZI et al. (2001) untersuchten Trocken- und Feuchtfuttermittel für Hunde und Katzen. Von 2 Hundetrockenfuttern war eines mit weniger als 0.1 µg/kg und das andere mit 13.12 µg/kg belastet. Ebenso konnten beim Feuchtfutter 5 Proben als OTA negativ und 5 Proben als positiv bewertet werden.

PÜHRINGER (2003) untersuchte 45 Feuchtfutter und 10 Trockenfuttermittel für Katzen auf OTA. Von den insgesamt 55 untersuchten Futtermitteln wiesen 14 einen positiven Gehalt im Bereich von 0.11 bis 2.17 µg OTA/kg ursprünglicher Substanz auf. Von 45 Feuchtfuttermitteln waren 7 Proben positiv, von den 10 Trockenfuttermitteln waren ebenfalls 7 Proben positiv.

In einer Analyse von Hundefutter waren 3 von 29 Trockenfutter und 2 von 11 Feuchtfuttermitteln mit OTA in einem Bereich von 7 – 40 und 54 – 115 µg/kg kontaminiert (SONGSMERSAKUL et al., 2007).

## 2.6. Aflatoxine (AF)

### 2.6.1. Herkunft und Vorkommen

Aflatoxine sind zweifellos die am häufigsten untersuchten und dokumentierten Toxine von allen Mykotoxinen. Sie sind natürlich auftretende sekundäre Stoffwechselprodukte von Pilzen der Gattung *Aspergillus*. Hauptsächlich für die Aflatoxinproduktion verantwortlich sind *Aspergillus flavus* and *Aspergillus parasiticus*, seltener *Aspergillus nomius*.

Insgesamt sind heute 6 verschiedene Aflatoxine bekannt: B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>, G<sub>1</sub>, G<sub>2</sub>, M<sub>1</sub> und M<sub>2</sub>, wobei Aflatoxin B<sub>1</sub> am häufigsten anzutreffen ist und als das gefährlichste von allen Aflatoxinen gilt.

*Aspergillus flavus* produziert nur B Aflatoxine, während die anderen 2 Spezies sowohl B, als auch G Aflatoxine produzieren. Aflatoxin M<sub>1</sub> und M<sub>2</sub> sind hydroxylierte Metaboliten von Aflatoxin B<sub>1</sub> und B<sub>2</sub>. Sie entstehen bei der Verdauung von kontaminiertem Futter und spielen eine große Rolle in der Milch und in Milchprodukten (IPCS INCHEM, 2001d, HUSSEIN et al., 2001).

Aflatoxin-produzierende Pilze sind allgegenwärtig, sowohl in der Luft, als auch im Boden und unter geeigneten Bedingungen können sie auf einer Vielzahl von natürlichen Nährböden wachsen.

Trotz des weltweiten Vorkommens der toxinbildenden Pilze sind die Toxine selbst vor allem in subtropischen und tropischen Gebieten und weniger in Anbaugebieten der gemäßigteren Klimazonen bedeutsam.

Deshalb gilt die Kontamination von europäischen Produkten mit Aflatoxinen als eher unwahrscheinlich, kann jedoch nicht gänzlich ausgeschlossen werden (PUSCHNER, 2002, EFSA, 2004b).

Vor allem betroffen ist die Maisproduktion in den USA und in tropischen Ländern, wo der Pilz schon auf dem Feld die Körner befallen kann. Gefährdet sind auch öl- und stärkehaltige Samen und Nüsse, wie Erdnüsse, Mandeln, Pistazien, Walnüsse, Haselnüsse, Mohn, Sesam, aber auch Reis, Hirse oder Ackerbohnen (FACT SHEET AFLATOXINE, 2003).

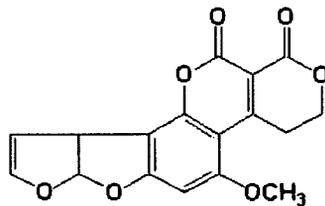
Häufig findet man Aflatoxine in Mais, Erdnussmehl, Baumwollsamensamen, aber auch in Sojabohnen, Hafer, Weizen, Maniok, Feigen, Trockenfrüchten und Gewürzen (PUSCHNER, 2002, BINGHAM et al., 2003, GERSTEL aktuell, 2006).

### 2.6.2. Eigenschaften der Aflatoxine

Chemisch gesehen sind die Aflatoxine fluoreszierende, heterozyklische Verbindungen, bestehend aus einer Dihydro- oder Tetrahydrofuranofuraneinheit, die wiederum mit einem substituierten Cumarinring verbunden ist.

Im ultraviolettem Licht fluoreszieren die B Aflatoxine blau und die G Aflatoxine gelb-grün.

Strukturformel Aflatoxin B<sub>1</sub>:



(aus Fact Sheet Aflatoxine)

Tab. 3 : chemische Eigenschaften verschiedener Aflatoxine

Aflatoxin	Summenformel	Molekulargewicht	Schmelzpunkt
B <sub>1</sub>	C <sub>17</sub> H <sub>12</sub> O <sub>6</sub>	312	268-269 °C
B <sub>2</sub>	C <sub>17</sub> H <sub>12</sub> O <sub>6</sub>	314	286-289 °C
G <sub>1</sub>	C <sub>17</sub> H <sub>12</sub> O <sub>7</sub>	328	244-246 °C
G <sub>2</sub>	C <sub>17</sub> H <sub>12</sub> O <sub>7</sub>	330	237-240 °C

Aflatoxine sind im festen Zustand stabil, können aber durch 90 % Aceton, 95 % Ethanol, 80 % Isopropylalkohol und Ammoniak gelöst werden. Weiters führen UV-Licht und ionisierende Strahlung zur Zersetzung der Toxine.

Außerdem sind Aflatoxine sehr hitzestabil. Durch Rösten und Autoklavieren können sie jedoch zu 40 – 60 % zerstört werden. Mahlen, Kochen, Extrudieren und Fermentieren führt nur zu einer geringen Zersetzung der Toxine (WEIDENBÖRNER, 2001).

### 2.6.3. Absorption, Verteilung und Exkretion von Aflatoxinen

Aflatoxine werden im Körper sehr schnell absorbiert. Bereits nach einer halben Stunde sind diese im Dünndarm nachzuweisen. Die höchste Konzentration kann 2 Stunden nach der Applikation gefunden werden. In den distaleren Darmabschnitten kann Aflatoxin frühestens nach 4 Stunden nachgewiesen werden.

Bereits eine halbe Stunde nach der Applikation hat sich Aflatoxin in den Geweben angereichert. Wobei die höchsten Konzentrationen in der Leber gefunden werden, gefolgt von den Nieren. Die Toxinkonzentration in der Leber ist 5 bis 15 fach höher als in anderen Organen. Sogar vierundzwanzig Stunden später kann noch immer 10 % der verabreichten Dosis nachgewiesen werden.

Siebzig bis achtzig Prozent des verabreichten Toxins werden vom Körper innerhalb von 24 Stunden wieder ausgeschieden. Der Hauptausscheidungsweg führt über die Galle in den Kot. Dies erfolgt sehr schnell, denn bereits nach 5 Minuten ist das Toxin in der Galle nachweisbar und nach 5-15 Minuten ist ein Konzentrationshöhepunkt erreicht. Auf diesem Wege werden rund 60 % des Toxins wieder ausgeschieden. Die restlichen 20 % werden über den Harn ausgeschieden (WOGAN et al., 1967).

### 2.6.4. Biotransformation

Aflatoxine werden in der Leber metabolisiert. Der eigentliche Sinn dieser Metabolisierung besteht in der Detoxifikation und Elimination der Toxine. Es folgt eine Umwandlung der lipophilen Verbindungen in polarere und wasserlösliche Metaboliten, die leichter über Galle und Urin ausgeschieden werden können. Aflatoxin M<sub>1</sub> entsteht durch Hydroxylierung des Aflatoxin B<sub>1</sub>. Es war der erste Metabolit der identifiziert werden konnte. Aflatoxin M<sub>1</sub> trägt seinen Namen vom Vorkommen in der Milch, wo es stets an die Proteinfraction gebunden ist. Weitere Metaboliten die durch Epoxidation, Hydroxylierung und Dehydrogenierung entstehen sind Aflatoxin B<sub>1</sub>-2,3-Oxide, Aflatoxin B<sub>2a</sub>, Aflatoxin P<sub>1</sub>, Aflatoxin Q<sub>1</sub> und Aflatoxikol (BINGHAM et al., 2004).

### 2.6.5. Klinik und Pathologie

Fische, Geflügel, Hunde, Schweine, Schafe, Rinder, Hasen, Meerschweinchen und Ratten reagieren sehr empfindlich auf Aflatoxine (NEWBERNE, 1973).

Aflatoxin B<sub>1</sub> gilt als das toxischste aller Aflatoxine.

Sie führen zu einer Beeinträchtigung des humoralen und zellulären Immunsystems. Dies äußert sich in einer erhöhten Anfälligkeit gegenüber bakteriellen, viralen, fungalen und parasitären Erkrankungen (EFSA, 2004b).

Eine Vergiftung führt in den meisten Fällen zu Anorexie, Lethargie, Vomitus, Dehydration, Ikterus, hämorrhagische Diathese, Melena, Hämatemesis, Depression, Polydipsie, Polyurie, Bilirubinurie, anämischen Schleimhäuten, petechialen Blutungen der Schleimhäute und blutigem Nasenausfluss. Weiters kann es zu Aszites, Gewichtsverlust, Ödemen in den Beinen und plötzlichem Tod kommen (SEIBOLD et al., 1952, BÖHM und RAZZAZI, 2005, BÖHM, 2006, STENSKE et al., 2006).

Anorexie und Depression sind die beiden häufigsten Symptome der Aflatoxikose, obwohl plötzliche Todesfälle genauso oft berichtet werden (LEUNG et al., 2006).

Häufig besteht eine Aflatoxikose schon einige Monate ohne eindeutige klinische Symptome, bevor sie überhaupt diagnostiziert werden kann.

Die vermehrte Blutungsneigung führten GREEN et al. auf zwei mögliche Theorien zurück. Die erste ist, dass Aflatoxine aufgrund ihrer kumarin-ähnlichen Struktur als Antikoagulantien wirken. Die zweite ist, dass die Blutungen aus der verminderten Leberfunktion resultieren (GREEN et al., 1977).

Auch die Blutwerte zeigen typische Veränderungen wie Erhöhung der Leberenzymaktivitäten, der Bilirubinkonzentration, Verlängerung der Prothrombin-Zeit (PT), Thrombozytopenie und Hypofibrinogenämie (CHAFFEE et al., 1969, GREENE et al., 1977, STENSKE et al., 2006).

Das Organ, das am meisten von den Auswirkungen der Aflatoxine betroffen ist, ist die Leber. Diese weist bei der pathologischen Untersuchung von erkrankten Tieren häufig eine gelbe, rötlich-gelbe, orange-gelbe oder grünlich-gelbe Verfärbung auf, mit manchmal rötlich gepunkteter und grober knotiger Oberfläche (SEIBOLD, 1952, 1953, BASTIANELLO et al., 1987). In manchen Fällen führt die Aflatoxikose auch zu einer Leberfibrose (NEWBERNE et al., 1955).

Weitere pathologische Veränderungen sind ikterische Schleimhäute und seröse Häute, Aszites, Ödeme und Blutungen der Gallenblase, petechiale Blutungen und Ekchymosen an serösen Oberflächen vieler Abdominalorgane, des Mesenteriums und der Lungen, Blutungen in verschiedenste Gewebe und Organe, speziell in den Gastrointestinaltrakt.

Auch kommt es häufig zu Hydrothorax, Hydroperikard, Anasarka, pulmonäres Ödem, Lymphknotenödem, pulmonäre Kongestion und Nephrose (SEIBOLD und BAILEY, 1952, SEIBOLD, 1953, NEWBERNE et al., 1955, NEWBERNE et al., 1966, CHAFFEE et al., 1969, EDDS, 1973, NEWBERNE, 1973, KETTERER et al., 1975, GREENE et al., 1977, LIGGETT und COLVIN, 1986, BASTIANELLO et al., 1987, STENSKE et al., 2006).

Auch bei der histopathologischen Untersuchung treten die Leberveränderungen am deutlichsten hervor. Es zeigt sich ein Verlust des Parenchyms im zentralen Teil der Leberläppchen, eine hepatozelluläre zentrolobuläre Nekrose, Fibrose, Lymphozyten- und Plasmazellinfiltration um die Zentralvene, fettige Vakuolen in den Parenchymzellen und vereinzelte Regeneration der hepatischen Parenchymzellen.

Die Gallengänge sind ödemisiert, proliferiert, dilatiert und mit basophilen Koagula gefüllt.

Die Nieren weisen ein geschwollenes Epithel der proximalen Tubuli auf, welches das Lumen verschließt. Weiters findet man eine Atrophie vereinzelter Glomeruli, generalisierte Degeneration des tubulären Epithels und abgelagertes Gallenpigment in den renalen Epithelzellen (SEIBOLD und BAILEY 1952, SEIBOLD 1953, NEWBERNE et al., 1955, GREENE et al., 1977, BAILEY und GROTH, 1959, NEWBERNE et al., 1966, KETTERER et al., 1975, STENSKE et al., 2006).

NEWBERNE und BUTLER (1969) beschrieben die karzinogene Wirkung der Aflatoxine auf Fische, Vögel und Säugetiere. Eine kontinuierliche längere Aufnahme von 0.015 mg/kg oder eine 14-tägige Aufnahme von 0.4 mg Aflatoxin B<sub>1</sub> führte zu einem hohen Auftreten von Leberkarzinomen. Wenn man diese Konzentration mit anderen Leberkarzinogenen vergleicht, wird klar, dass Aflatoxin das stärkste bekannteste Hepatokarzinogen ist.

Auf zellulärer Ebene führen Aflatoxine zu einer Hemmung der DNA, RNA und Protein - Synthese. Weiters konnte nachgewiesen werden, dass sie im humanen Lungengewebe die Mitose hemmen (CHAFFEE et al., 1969, EDDS, 1973, GREENE et al., 1977).

#### **2.6.5.1. Aflatoxikose – Geschichte**

In den frühen 50er Jahren kam es zu tödlichen Leberentzündungen bei Hunden. Diese wurden provisorisch als Hepatitis X diagnostiziert (SEIBOLD und BAILEY, 1952, SEIBOLD, 1953, NEWBERNE et al., 1955). Zu dieser Zeit war die Ätiologie der Erkrankung noch unbekannt, aber es konnten Übereinstimmungen/Ähnlichkeiten zu einer Erkrankung von Schweinen gefunden werden, die verschimmelteres Futter aufgenommen hatten (BAILEY und GROTH, 1959). Als die Aflatoxikose als Aflatoxikose diagnostiziert wurde, waren auch hier Übereinstimmungen der Symptome zwischen beiden Erkrankungen auffällig.

Nach der Isolation und chemischen Identifikation des Toxins, das von *Aspergillus flavus* produziert wurde, wurde ein enger Zusammenhang zwischen der Hepatitis X und der Aflatoxikose hergestellt.

1960 starben tausende Puten und Entenküken nach dem Verzehr von Erdnussmehl. Bei der Untersuchung des Erdnussmehls konnte eine Kontamination mit Aflatoxinen nachgewiesen werden (ASPLIN und CARNAGHAN, 1961).

### **2.6.5.2. Aflatoxischen Hunde – Fütterungsversuche**

Ab den 50er Jahren wurden immer wieder Studien durchgeführt, die bewiesen, dass auch Hunde sehr empfindlich auf Aflatoxine reagieren (NEWBERNE et al., 1955, NEWBERNE et al., 1966, CHAFFEE et al., 1969, NEWBERNE und BUTLER, 1969). Die mittlere tödliche Dosis, oral verabreicht, ( $LD_{50}$ ) von reinem Aflatoxin liegt bei Hunden bei 0.5-1 mg/kg KGW (NEWBERNE und BUTLER, 1969).

### **2.6.5.3. Aflatoxischen Hunde – natürliche Ausbrüche**

Akute, subakute und chronische Aflatoxischen traten auf bei Verabreichung von kommerziell erhältlichem Hundefutter, das mit 0.1 bis 0.3 mg/kg Aflatoxin kontaminiert war und nach dem Verzehr von aflatoxinhaltigem schimmeligem Brot mit einer Kontamination von 6.7 bis 15 mg/kg (KETTERER et al., 1975, BASTIANELLO et al., 1987, PUSCHNER, 2002).

GREENE et al. (1977) berichteten von einem Ausbruch einer chronischen Lebererkrankung mit Todesfällen bei einer Reihe von Hunden. Bei der pathologischen Untersuchung wurde eine subakute Hepatitis diagnostiziert und auch die restlichen pathologischen Befunde wiesen auf eine Aflatoxikose hin. Diese Vermutung wurde dann bei der Untersuchung des verzehrten Hundefutters bestätigt. Es konnten 0.6 mg/kg Aflatoxin darin nachgewiesen werden.

Auch BASTIANELLO et al. (1987) berichteten von einem natürlichen Ausbruch einer Aflatoxikose und plötzlichen Todesfällen bei 10 Hunden in Südafrika. Auch hier konnte im Hundefutter 0.1 bis 0.3 mg/kg Aflatoxin nachgewiesen werden.

Erst 2006 wurden 2 Todesfälle von Hunden berichtet, die aflatoxinhaltiges Futter aufgenommen hatten (STENSKE et al., 2006).

Erstaunlicherweise konnten bis jetzt noch keine Ausbrüche von Aflatoxischen bei Katzen nachgewiesen werden.

### 2.6.6. Aflatoxine im Futter

In Mexiko untersuchten SHARMA und MARQUEZ (2001) 35 Hunde und Katzenfutter auf das Vorkommen von Aflatoxinen. Aflatoxin B<sub>1</sub> war das Toxin, das am häufigsten nachgewiesen werden konnte. Die meisten der Proben enthielten Aflatoxin B<sub>1</sub> zumindest in geringen Konzentrationen, in 6 der untersuchten Proben wurde es in sehr hohen Konzentrationen gefunden. Mais war die Hauptzutat aller kontaminierter Proben.

2002 wurde das Auftreten von Aflatoxinen in brasilianischem Futter für Hunde, Katzen und Vögel von MAIA und BASTOS de SIQUEIRA (2002) untersucht. Sie fanden Aflatoxin in 12 % der 100 untersuchten Proben in Konzentrationen zwischen 15 und 374 µg/kg. Fünf dieser 12 positiven Proben enthielten über 50 µg/kg Aflatoxin, dem maximalen Limit für Aflatoxin im Tierfutter in Brasilien. Alle Proben, die Erdnüsse enthielten konnten positiv auf Aflatoxin B<sub>1</sub> getestet werden.

Auch in der Türkei wurden 18 Hundefutter mittels ELISA auf das Vorkommen von Aflatoxinen getestet. Die nachgewiesenen Konzentrationen reichten von <1.75 bis 20 µg/kg. Drei dieser getesteten Proben überschritten das türkische Toleranzlimit von 10 µg/kg Aflatoxin in Lebensmitteln und Futtermitteln (GUNSEN und YAROGLU, 2002).

BASALAN et al. (2004) fanden in allen 21 von ihnen untersuchten pelletierten Hundefutter Aflatoxin B<sub>1</sub> mit einer mittleren Konzentration von 7 µg/kg.

## 2.7. Mehrfach - Kontamination verschiedener Mykotoxine

Unter geeigneten klimatischen Bedingungen befallen Schimmelpilze das Getreide und produzieren Mykotoxine. Es ist durchaus möglich, dass mehrere Arten von Schimmelpilzen eine Getreidesorte befallen und somit unterschiedliche Mykotoxine produzieren. Diese Gegebenheit wird als Mehrfach-Kontamination bezeichnet.

DOMIJAN et al. (2005a) eruierten an 49 kroatischen Maisproben die Konzentrationen von FB<sub>1</sub>, ZEA und OTA. FB<sub>1</sub> konnte in 100 %, ZEA in 84 % und OTA in 39 % der untersuchten Proben nachgewiesen werden. Eine Ko-Kontamination von FB<sub>1</sub> und ZEA konnte in 55 %, von FB<sub>1</sub>, ZEA und OTA in 37 % der Proben festgestellt werden.

Eine weitere Untersuchung von 15 Maismehlproben ergab, dass alle Proben mit *Fusarium* spp. und *Penicillium* spp. belastet waren. *Aspergillus* spp. konnte in 5 Proben nachgewiesen werden.

*F. proliferatum* und *F. verticilloides* wurden in 14 und 8 Proben gefunden, während *F. graminearum* in allen Proben gefunden wurde.

FB<sub>1</sub> konnte in 15, ZEA in 12 und OTA in 7 von 15 Proben nachgewiesen werden. Weiters ergab die Untersuchung eine Mehrfach-Kontamination von FB<sub>1</sub> und FB<sub>2</sub> in 1, von FB<sub>1</sub>, FB<sub>2</sub> und OTA in 1 Probe, von FB<sub>1</sub> und ZEA in 6 und FB<sub>1</sub>, ZEA und OTA in 6 Proben (DOMIJAN et al., 2005b).

VARGAS et al. (2001) untersuchten brasilianischen Mais auf das Vorkommen von Aflatoxinen, Zearalenon und Fumonisin B<sub>1</sub>. Insgesamt wurden 214 unbearbeitete Proben untersucht. Das Auftreten von Aflatoxin B<sub>1</sub>, Zearalenon und Fumonisin B<sub>1</sub> konnte in 38 %, 30 % und 99 % der Proben festgestellt werden. Eine Mehrfach-Kontamination von AFB<sub>1</sub> und FB<sub>1</sub> konnte in allen AFB<sub>1</sub> positiven Proben beobachtet werden. Gemeinsames Auftreten konnte in 18 Proben von AFB<sub>1</sub>, ZEA und FB<sub>1</sub>, von AFB<sub>1</sub>, AFB<sub>2</sub> und FB<sub>1</sub> in 43 Proben und ZEA und FB<sub>1</sub> in 65 Proben nachgewiesen werden.

Erst kürzlich führten ADEJUMO et al. (2007) eine Untersuchung von 182 Maisproben auf das Vorkommen von Fusariumtoxinen (FB<sub>1</sub>, ZEA) durch. In 170 Proben (93 %) konnten Mykotoxine nachgewiesen werden. 73 % waren mit FB<sub>1</sub> und 57 % mit ZEA kontaminiert.

DOKO et al. (1969) konnten allerdings keine Korrelation zwischen dem Auftreten von Fumonisin und Zearalenon nachweisen. Es wurden vierzig Getreideproben aus Afrika untersucht. FB<sub>1</sub> konnte in 37 Proben, ZEA hingegen nur in 5 Proben nachgewiesen werden.

## 2.8. Nationale und internationale Grenz- und Richtwerte für DON, ZEA, FUM, OTA und AF

Die Regelungen über den Mykotoxingehalt im Tierfutter beziehen sich größtenteils auf landwirtschaftliche Nutztiere. Anderen Tierspezies wird dabei oft nur wenig Beachtung geschenkt.

So haben zum Beispiel die USA und Kanada einen gesetzlichen Höchstwert für Aflatoxine für das gesamte Tierfutter. Ebenso beziehen sich die US Empfehlungen für DON und Fumonisine auf das gesamte Tierfutter.

Die kanadischen Empfehlungen für DON, ZEA und OTA gelten nur für Rinder-, Schweine- und Geflügelfutter.

Die Europäische Union hat für Aflatoxin B<sub>1</sub> ein gesetzliches Limit für Heimtierfutter von 10 µg/kg festgesetzt, für Deoxynivalenol und Fumonisin existieren Richtwerte.

Weltweit gibt es zwischen den verschiedenen Ländern starke Unterschiede bezüglich der Mykotoxin Regelungen. Der Gehalt an Aflatoxinen im Tierfutter ist in über 50 Ländern gesetzlich geregelt. Regelungen für DON existieren in 14 Ländern und für OTA in 9 Ländern, davon 6 in Europa.

(U.S. FOOD and DRUG ADMINISTRATION (FDA) 2001, CANADIAN FEEDS ACT and REGULATIONS 1983, FAO NUTRITION PAPER 81, EUROPEAN UNION COMMISSION DIRECTIVE 2003/100/EC, EUROPEAN UNION COMMISSION RECOMMENDATION 2006/576/EC)

Es scheint, dass sich die von der Regierung festgelegten Gesetze, Richtwerte und Regelungen auf die analytischen Detektionslimits und das regionalen Auftreten der Mykotoxine beziehen, und wenige die notwendigen risikoreduzierten Grenzen für unsere Haustiere darstellen.

**Tab. 4 :** Regelungen für den Mykotoxingehalt im Heimtierfutter (pet foods) in ausgewählten Regionen in mg/kg Futter

Toxine	Europäische Union	United States	Kanada	Japan
Deoxynivalenol	5 (b)	5 (b)	ng	1 (a)
Zearalenon	ng	ng	ng	1 (a)
Fumonisin	5 (b)	10 (b,c)	ng	ng
Ochratoxin A	ng	ng	ng	ng
Aflatoxine	ng	0,02 (a)	0,02 (a)	0,02 (a)
Aflatoxin B <sub>1</sub>	0,01 (a)	ng	ng	ng

ng... nicht geregelt; (a) ... gesetzlich festgelegt; (b) ... Richtwert; (c) ...geregelt für Hasen

(U.S. Food and Drug Administration 2001, Canadian Feeds Act and Regulations 1983, FAO Nutrition Paper 81, European Union Commission Directive 2003/100/EC, European Union Commission Recommendation 2006/576/EC)

Im Amtsblatt der Europäischen Union vom 17. August 2006 wird darauf hingewiesen, dass die Mitgliedsstaaten, die Tatsache berücksichtigen sollten, dass die Werte für die Tierarten mit größter Toleranz festgelegt wurden und daher als obere Richtwerte anzusehen sind (AMTSBLATT DER EUROPÄISCHEN UNION, 2006/576/EG).

In Österreich gibt es für Schweinefuttermittel neben den EU Vorschriften zusätzlich nach § 3 FMG 1999 noch Richtwerte, die von der österreichischen Arbeitsgemeinschaft Landwirtschaftlicher Versuchsanstalten "Richtwerte für Mykotoxine im Futter" nach 20jähriger Erfahrung festgelegt worden sind, um wirtschaftliche Verluste im Nutztierbereich zu verringern bzw. zu verhindern (ALVA, 1999).

**Tab. 5 : Richtwerte für Mykotoxine DON und ZEA in mg/kg Futtermittel**

<b>Schweine</b>	<b>DON</b>	<b>ZEA</b>
Ferkel und junge Zuchtschweine	0,5	
Junge, weibliche Zuchtschweine	0,5	0,05
Mastschweine und Zuchtsauen	0,5	0,15

### 3. EIGENE UNTERSUCHUNGEN

#### 3.1. Material und Methode

##### 3.1.1. Bestimmung der Mykotoxine DON, ZEA, FUM, OTA, AF mittels ELISA

###### 3.1.1.1. Geräte

- |   |                               |
|---|-------------------------------|
| ◆ Microplate Reader Modell 550            | BIO-RAD, Wien, AUT            |
| ◆ Computerprogramm Microplate Manager 5.2 | BIO-RAD, Wien, AUT            |
| ◆ Micro-Shaker                            | Dynatech, Massachusetts, USA  |
| ◆ Moulinette                              | Moulinex, Brunn/Gebirge, AUT  |
| ◆ Präzisionswaage GP 3202                 | Sartorius, Göttingen, D       |
| ◆ Schüttler: Ika® KS 260 basic            | Uni Lab, Innsbruck, AUT       |
| ◆ Dispensette® 0-100 ml                   | Brandt, Wertheim, Deutschland |
| ◆ Biohit Pipetten 1-5 ml                  | Biohit, Helsinki, FIN         |
| ◆ Biohit Pipetten 200 – 1000 µl           | Biohit, Helsinki, FIN         |
| ◆ Biohit Pipetten 20 – 200 µl             | Biohit, Helsinki, FIN         |
| ◆ 12-Kanalpipette 10 – 300 µl             | Biohit, Helsinki, FIN         |

###### 3.1.1.2. Verbrauchsmaterialien

- |   |                                 |
|---|---------------------------------|
| ◆ Veratox DON HS Lot:20021                      | Neogen Vertrieb Noack, W, AUT   |
| ◆ Veratox Zearalenon Lot: 4139                  | Neogen Vertrieb Noack, W, AUT   |
| ◆ Veratox Aflatoxin HS Lot: 17072               | Neogen Vertrieb Noack, W, AUT   |
| ◆ Veratox Fumonisin HS Lot: 21017               | Neogen Vertrieb Noack, W, AUT   |
| ◆ Veratox Ochratoxin Lot: 25173                 | Neogen Vertrieb Noack, W, AUT   |
| ◆ Glasflaschen: 50 ml, 250 ml                   | Schott-Duran, Mainz, D          |
| ◆ Löffelspatel, Metall                          | VWR, Wien, AUT                  |
| ◆ Eprovettenständer: Röhrchengestelle Combi Max | VWR, Wien, AUT                  |
| ◆ Reagenzgläser                                 | VWR, Wien, AUT                  |
| ◆ Trichter PP Ø100mm                            | VWR, Wien, AUT                  |
| ◆ Pulvertrichter 60°PE 125 ml Ø51mm             | VWR, Wien, AUT                  |
| ◆ Faltenfilter 595 ½ Ø150mm                     | Schleicher & Schuell, Dassel, D |
| ◆ Pipettenspitzen Biohit Tip 5 ml               | Fa. Biohit, Helsinki, FIN       |
| ◆ Pipettenspitzen Biohit Tip 1000µl             | Fa. Biohit, Helsinki, FIN       |
| ◆ Pipettenspitzen Biohit Tip 350 µl             | Fa. Biohit, Helsinki, FIN       |

### 3.1.1.3. Chemikalien

- ♦ Aqua destillata
- ♦ HPLC gradient grade Methanol

Fa. Fisher Scientific, Loughborough,  
UK

### 3.1.1.4. Deoxynivalenol

Die Probenaufbereitung erfolgte in Anlehnung an die von Neogen® mit den ELISA Testkits mitgelieferte Anleitung.

Der Testkit ist vorgesehen für die quantitative Analyse von DON in Weizen, Gerste und verarbeitetem Getreide.

#### Probenaufbereitung

Die Trockenfutter wurden bei Raumtemperatur gelagert. Vor der Probennahme wurden diese gut durchmischt. Eine ungefähre Menge von 20 g wurde entnommen und im Moulinex® zerkleinert. Vom zerkleinerten Futter wurden 10 g in eine Glasflasche eingewogen. Nach Hinzufügen von 50 ml Aqua destillata wurden die Proben 5 min kräftig geschüttelt. Dieses Gemisch wurde für 3 min stehen gelassen, um ein Setzen der größeren Partikel zu erreichen. Der Überstand wurde dann durch ein Filterpapier in ein Reagenzglas überführt.

#### Testdurchführung

Die benötigte Anzahl an rot gekennzeichneten (unbeschichteten) Kavitäten wurde in den Halterahmen eingesetzt. Danach wurden 100 µl Konjugat in jede rotmarkierte Kavität und 100 µl von den Standards und den Proben in eine extra (rote) Kavität pipettiert.

Anschließend wurde die benötigte Anzahl an durchsichtigen (beschichteten) Kavitäten in den Halterahmen eingesetzt. Das Konjugat-Standard – und das Konjugat-Probengemisch wurden durch dreimaliges auf- und abpipettieren ordentlich durchmischt.

Von diesen wurden 100µl entnommen und in die beschichteten Kavitäten überführt. Nach 10-20 sekundigem Kreisen des gesamten Halterahmens auf der Arbeitsplatte wurde dieser für 10 min. bei Raumtemperatur inkubiert.

Nach Ablauf dieser 10 min. wurden die Kavitäten durch Ausschlagen der Flüssigkeit geleert. Alle Kavitäten wurden 5 mal mit 300µl Aqua destillata gewaschen und die Restflüssigkeit wurde durch kräftiges Ausklopfen auf Labortüchern entfernt.

Anschließend wurden 100 µl der Reagenzlösung in jede Kavität pipettiert, neuerlich der Halterahmen 20 sek. auf der Arbeitsplatte gekreist und wiederum 10 min. bei Raumtemperatur inkubiert.

Zuletzt wurden noch 100 µl des Stoppreagenzes in jede Kavität pipettiert.

#### Auswertung

Der Halterahmen wurde in den Microplate-Reader gestellt und mit einer Extinktion von 630 nm gemessen.

Da der Reader unmittelbar mit einem Computer verbunden war, konnten die Ergebnisse direkt am Computer abgelesen werden.

Sowohl die Ergebnisse, als auch die Standardkurven wurden gespeichert.

Die Nachweisgrenze für DON lag bei 10 µg/kg, die Quantifizierungsgrenze bei 25 µg/kg.

#### **3.1.1.5. Zearalenon**

Die Probenaufbereitung erfolgte in Anlehnung an die von Neogen® mit den ELISA Testkits mitgelieferte Anleitung.

Der Testkit ist vorgesehen für die quantitative Analyse von ZEA in Mais, Weizen und Gerste.

#### Probenaufbereitung

Die Trockenfutter wurden bei Raumtemperatur gelagert. Vor der Probennahme wurden diese gut durchmischt. Eine ungefähre Menge von 10 g wurde entnommen und im Moulinex® zerkleinert. Vom zerkleinerten Futter wurden 5 g in eine Glasflasche eingewogen. Nach Hinzufügen von 25 ml 70% Methanol wurden die Proben 5 min kräftig geschüttelt. Der Überstand wurde dann durch ein Filterpapier in ein Reagenzglas überführt.

Anschließend wurde 1 ml Probenextrakt mit 4 ml Aqua dest. gemischt.

#### Testdurchführung und Auswertung

Es wurde wie bei den oben beschriebenen DON-Versuchen vorgegangen. Der Versuchsvorgang gleicht dem von DON, lediglich die Inkubationszeiten bei ZON sind von kürzerer Dauer – 5 min. sind einzuhalten.

Die Nachweisgrenze für ZEA lag bei 10 µg/kg, die Quantifizierungsgrenze bei 25 µg/kg.

### **3.1.1.6. Fumonisin**

Die Probenaufbereitung erfolgte in Anlehnung an die von Neogen® mit den ELISA Testkits mitgelieferte Anleitung.

Der Testkit ist vorgesehen für die quantitative Analyse von FUM in Mais, Maismehl und Reis.

#### Probenaufbereitung

Die Trockenfutter wurden bei Raumtemperatur gelagert. Vor der Probennahme wurden diese gut durchmischt. Eine ungefähre Menge von 10 g wurde entnommen und im Moulinex® zerkleinert. Vom zerkleinerten Futter wurden 5 g in eine Glasflasche eingewogen. Nach Hinzufügen von 25 ml 70% Methanol wurden die Proben 5 min. kräftig geschüttelt. Der Überstand wurde dann durch ein Filterpapier in ein Reagenzglas überführt. Anschließend wurde 1 ml Probenextrakt mit 7 ml Aqua destillata gemischt.

#### Testdurchführung und Auswertung

Es wurde im Prinzip wie bei den oben beschriebenen DON-Versuchen vorgegangen. Der Vorgang unterscheidet sich lediglich von den Inkubationszeiten. Die erste Inkubationszeit wurde mit 5 min. bemessen, wobei der Halterahmen die gesamte erste Minute auf einem Micro-Shaker geschüttelt wurde. Die zweite Inkubationszeit betrug 10 min., wobei die gesamte erste Minute der Halterahmen wieder auf dem Micro-Shaker geschüttelt wurde.

Die Nachweisgrenze für FUM lag bei 50 µg/kg, die Quantifizierungsgrenze bei 50 µg/kg.

### **3.1.1.7. Ochratoxin A**

Die Probenaufbereitung erfolgte in Anlehnung an die von Neogen® mit den ELISA Testkits mitgelieferte Anleitung.

Der Testkit ist vorgesehen für die quantitative Analyse von OTA in Mais, Weizen, Aprikosen, Datteln, Rosinen, Feigen und grünem Kaffee.

#### Probenaufbereitung

Die Trockenfutter wurden bei Raumtemperatur gelagert. Vor der Probennahme wurden diese gut durchmischt. Eine ungefähre Menge von 20 g wurde entnommen und im Moulinex® zerkleinert. Vom zerkleinerten Futter wurden 10 g in eine Glasflasche eingewogen. Nach

Hinzufügen von 40 ml 50% Methanol wurden die Proben 5 min. kräftig geschüttelt. Der Überstand wurde dann durch ein Filterpapier in ein Reagenzglas überführt.

#### Testdurchführung und Auswertung

Es wurde wie bei den oben beschriebenen DON-Versuchen vorgegangen. Der Versuchsvorgang gleicht dem von DON.

Die Nachweisgrenze für OTA lag bei 1 µg/kg, die Quantifizierungsgrenze bei 2 µg/kg.

#### **3.1.1.8. Aflatoxin**

Die Probenaufbereitung erfolgte in Anlehnung an die von Neogen® mit den ELISA Testkits mitgelieferte Anleitung.

Der Testkit ist vorgesehen für die quantitative Analyse von AF in Mais, Maismehl, Maiskeimmehl, Maisglutenmehl, Erdnüssen, gerösteten Erdnüssen, Erdnussbutter, Erdnussmehl, Popcorn, Reis und Weizen.

#### Probenaufbereitung

Die Trockenfutter wurden bei Raumtemperatur gelagert. Vor der Probennahme wurden diese gut durchmischt. Eine ungefähre Menge von 10 g wurde entnommen und im Moulinex® zerkleinert. Vom zerkleinerten Futter wurden 5 g in eine Glasflasche eingewogen. Nach Hinzufügen von 25 ml 70% Methanol wurden die Proben 5 min. kräftig geschüttelt. Der Überstand wurde dann durch ein Filterpapier in ein Reagenzglas überführt.

#### Testdurchführung und Auswertung

Es wurde wie bei den oben beschriebenen DON-Versuchen vorgegangen. Der Versuchsvorgang gleicht dem von DON.

Die Nachweisgrenze für AF lag bei 0.5 µg/kg, die Quantifizierungsgrenze bei 1 µg/kg.

### 3.1.2. Bestimmung des Mykotoxins DON mittels HPLC

#### 3.1.2.1. Toxinstandard

Als DON Standardsubstanz diene 1 mg/ml DON in Acetonitril der Fa. Biopure® mit der Cat.No: 002009 und der Nr. Lot: 03141B.

Es wurde eine verdünnte Lösung von 250 ng/ml hergestellt und bei jeder Versuchsreihe mitlaufen gelassen.

#### 3.1.2.2. Geräte

- |   |  |
|---|--|
| ♦ Autosampler AS – 2000   | Merck Hitachi, Darmstadt, D            |
| ♦ Spectra Physics Model Iso Chrom LC Pump<br>Serial No. 3238          | Spectra Physics, Mountain View,<br>USA |
| ♦ Detektor: Spectra Physics Spectra 100                               | Spectra Physics, Mountain View,<br>USA |
| ♦ Säule: phenomenex® synergy 4u POLAR-RP<br>80 A 00G-4336-EO          | Phenomenex, Aschaffenburg, D           |
| ♦ Evaporator PIERCE Reacti-Therm<br>Heating/stirring Module No. 18971 | Fisher Scientific, Rockford, USA       |
| ♦ Schüttler: Ika® KS 260 basic  | Uni Lab, Innsbruck, AUT                |
| ♦ Präzisionswaage GP 3202   | Sartorius, Göttingen, D                |
| ♦ Biohit Pipetten 1-5 ml  | Biohit, Helsinki, FIN                  |
| ♦ Biohit Pipetten 200 – 1000 µl                                       | Biohit, Helsinki, FIN                  |
| ♦ Biohit Pipetten 20 – 200 µl   | Biohit, Helsinki, FIN                  |
| ♦ Computer: Fujitsu Siemens Intel Pentium 4                           | Fujitsu Siemens, Wien, AUT             |
| ♦ Computerprogramm: Stratos Version 4.0.3.0                           | Polymer Laboratories, Darmstadt,<br>D  |

#### 3.1.2.3. Verbrauchsmaterial

- |   |                      |
|---|----------------------|
| ♦ DONtest™ HPLC Lot:168 G1006                                     | VICAM, Watertown,USA |
| ♦ Adapter und Trichter für Immunoaffinitätssäulchen               | VWR, Wien, AUT       |
| ♦ Toxinstandard: DON in Acetonitril<br>Cat.No: 002009 Lot: 03141B | Biopure, Tulln, AUT  |
| ♦ Adapter und Trichter für Immunoaffinitätssäulchen               | VWR, Wien, AUT       |

- ◆ Trichter PP Ø100mm VWR, Wien, AUT
  - ◆ Faltenfilter 595 ½ Ø125mm Schleicher & Schuell, Dassel, D
  - ◆ Erlenmeyerkolben weithals 500 ml VWR, Wien, AUT
  - ◆ Messzylinder PP 100 ml VWR, Wien, AUT
  - ◆ Cellstar® PP test tubes 50ml, sterile  
Cat.No: 210261 Lot: 05480194 Greiner Bio-One, Kremsmünster,  
AUT
  - ◆ Reagenzgläser VWR, Wien, AUT
  - ◆ Pipettenspitzen Biohit Tip 5 ml Biohit, Helsinki, FIN
  - ◆ Pipettenspitzen Biohit Tip 1000µl Biohit, Helsinki, FIN
  - ◆ Pipettenspitzen Biohit Tip 350 µl Biohit, Helsinki, FIN
- 
- ◆ Gewindeflasche 32 x 11,5 mm (Clean Pack),  
Mikroeinsätze farblos 5 x 30 mm (Art. No.  
702958.1),  
Federn für Mikroeinsätze 5 x 30 mm (Art. No.  
702974.1),  
Schraubendeckel für Probengläser,  
geschlitzte Silikon PTFE – Septen für Probengläser  
Macherey-Nagel, Düren, D
- 
- ◆ Parafilm® PM-992 Brand, Wertheim, D

#### 3.1.2.4. Chemikalien

- ◆ Aqua destillata
- ◆ HPLC Gradient grade Methanol Fisher Scientific, Loughborough,  
UK
- ◆ HPLC Gradient grade Acetonitril Far UV Fisher Scientific, Loughborough,  
UK
- ◆ Mobile Phase: A.bidest. + Acetonitril + Methanol  
(82/9/9)
- ◆ Polyethylenglykol (PEG) 5%
- ◆ HCl
- ◆ NaOH

### 3.1.2.5. Extraktion, IAC, HPLC

Die Probenaufbereitung erfolgte in Anlehnung an die von VICAM® mit den Immunoaffinitätssäulen mitgelieferte Instruktionsanleitung.

#### Probenaufbereitung

Die Trockenfutter wurden bei Raumtemperatur gelagert. Vor der Probennahme wurden diese gut durchmischt. Eine ungefähre Menge von 20 g wurde entnommen und im Moulinex® zerkleinert. Vom zerkleinerten Futter wurden 10 g in einen Erlenmeyerkolben eingewogen. Diesen wurden 40 ml 5 % Polyethylenglykol zugesetzt und anschließend 40 min. auf einem entsprechendem Gerät geschüttelt. Danach wurde das homogenisierte Gemisch über einen Trichter und Filterpapier abfiltriert und in einem sterilen PP Tube aufgefangen. Zu guter letzt wurde noch der ph-Wert der Proben auf ph7 eingestellt.

#### Reinigung der Proben mittels Immunoaffinitätssäulen

Vor Beginn wurde die benötigte Anzahl an Immunoaffinitätssäulen auf Zimmertemperatur gebracht, Adapter, Trichter und Aufsatz des Vakuumextraktionsgerätes mit Methanol gereinigt. Nach Aufstecken der Immunoaffinitätssäulen auf das Vakuumextraktionsgerät wurde 1 ml der vorbereiteten Probe vollständig auf die Säule aufgetragen. Der Probenextrakt wurde langsam und gleichmäßig mit einem Tropfen pro Sekunde durch die Säule geschickt, bis Luft durch die Säule kam. Die Adapter und die Trichter wurden auf die Säulen aufgesteckt. Anschließend wurden die Säulen mit 5 ml Aqua destillata, wieder mit einer Geschwindigkeit von 1 Tropfen /sek. , gewaschen. Die Flüssigkeitsreste wurden wiederum durch kurzes Ansaugen von Luft entfernt. Der Durchlauf wurde verworfen. Nach Platzieren eines sauberen Reagenzglases unter der Säule erfolgte die Elution mit 2 ml Methanol mit einer Durchflussgeschwindigkeit von 1 Tropfen/sek.. Die Eluatreste wurden durch neuerliches Absaugen von Luft aus der Säule gewonnen. Das Eluat wurde mit einem Stickstoffverdampfer eingedampft und anschließend mit 400µl mobile Phase (Laufmittel ACN:HPLC-Wasser:Methanol 9:82:9) aufgenommen.

Jeweils 200µl wurden in zwei Mikrogeläschen für die Analyse pipettiert.

#### High Performance Liquid Chromatography für DON

Die Proben wurden in den Autosampler gestellt.

Als mobile Phase wurde ein Gemisch aus ACN:Wasser:Methanol im Verhältnis 9:82:9 verwendet. Die Durchflussrate betrug 1 ml/min. Bevor die Pumpe die mobile Phase ins System beförderte wurde das Laufmittel permanent mit Helium entgast. Eine Menge von 100µl der Suspension wurde in die HPLC Anlage injiziert.

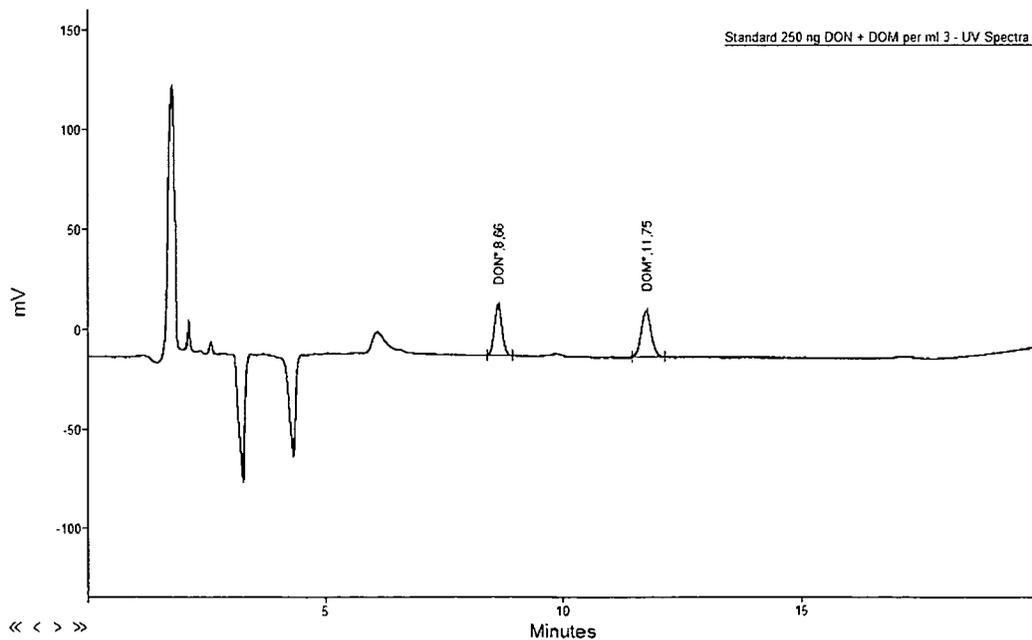
DON wurde bei einer Wellenlänge von 220 nm gemessen. Die Run Time wurde mit 20 min. festgelegt.

Zwischen HPLC-Anlage und Computer bestand eine Verbindung. Der Computer, der mit dem Programm Stratos 4.0.3.0 ausgestattet ist, zeichnete die Chromatogramme auf. Die Daten und Ergebnisse wurden ebenfalls gespeichert.

Da in diesem Programm die Standards von DON in den Konz. 0; 10; 12,5 ; 20; 25; 40; 45; 50; 80; 90; 100; 250; 300, 500; 1000; 2500 ng/ml gespeichert sind, wurde zur Absicherung bei jedem Probenlauf nur 1 Standard mit der Konzentration von 250 ng DON/ml mitlaufen gelassen. Aus dieser Reihe an Konzentrationen konnte eine Kalibrationsgerade erstellt werden.

### Nachweisgrenze

Die Nachweisgrenze betrug 5 ng/g. Die Quantifizierungsgrenze lag bei 25 ng/g.



**Abb. 3 :** HPLC - Chromatogramm einer Standardkonzentration von 250 ng DON/ml Lösung bei einer UV Detektion von 220 nm

### 3.1.3. Bestimmung des Mykotoxins ZEA mittels HPLC

#### 3.1.3.1. Toxinstandard

Als ZEA Standardsubstanz diente 1 mg/ml ZEA in Acetonitril der Fa. Biopure® mit der Cat.No: 002029 und der Nr. Lot: 02421Z.

Von dieser Stocksolution wurden Verdünnungsreihen in den Konzentrationen 250 ng/ml, 500 ng/ml, 750 ng/ml und 1000 ng/ml angefertigt. Bei jeder neuen Versuchsreihe ließ man diese mitlaufen.

#### 3.1.3.2. Geräte

- ◆ Autosampler AS – 2000 Merck Hitachi, Darmstadt, D
- ◆ Pumpe: Shimadzu Liquid Chromatograph LC-9A Shimadzu, Duisburg, D
- ◆ Detektor: Waters 474 Scanning Fluorescence Waters, Saint-Quentin, F  
Detektor EX: 274 nm EM: 450 nm
- ◆ Vorsäule: phenomenex® Guard Holder + Sample Cartridges AJO-4287 Phenomenex, Aschaffenburg, D
- ◆ analytische Säule: Bischoff Chromatography Bischoff, Leonberg, D  
Part: SC (125 x 4.6 mm)  
Waters-Spherisorb ODS2 5.0µm  
P/N: 1246 D181WS050  
S/N: 29049C052
- ◆ Säulenofen: Column – Thermostat, Jetstream 2 Plus Sigma Aldrich, St. Louis, USA  
Ser.No: 100-230 Vnc, 47-63 Hz
- ◆ Evaporator PIERCE Reacti-Therm Heating/stirring Module No. 18971 Pierce, Rockford, USA
- ◆ Ultra Turrax T25 IKA® Uni Lab, Innsbruck, AUT
  
- ◆ Schüttler: Ika® KS 260 basic Uni Lab, Innsbruck, AUT
- ◆ Präzisionswaage GP 3202 Sartorius, Göttingen, D
- ◆ Biohit Pipetten 1-5 ml Biohit, Helsinki, FIN
- ◆ Biohit Pipetten 200 – 1000 µl Biohit, Helsinki, FIN
- ◆ Biohit Pipetten 20 – 200 µl Biohit, Helsinki, FIN
  
- ◆ Computer: Fujitsu Siemens Intel Pentium 4 Fujitsu Siemens, Wien, AUT
- ◆ Computerprogramm: Stratos Version 4.0.3.0 Polymer Laboratories, Darmstadt, D

### 3.1.3.3. Verbrauchsmaterial

- ◆ ZearaStar HPLC Immunoaffinitätssäulchen  
COIAC 4000  
Lot: # ZE – 167  
Romer Labs, Tulln, AUT
- ◆ Adapter und Trichter für Immunoaffinitätssäulchen  
VWR, Wien, AUT
- ◆ Toxinstandard: ZON in Acetonitril  
Biopure, Tulln, AUT
- ◆ Cat.No: 002029 Lot: 02421Z
- ◆ Trichter PP Ø100mm  
VWR, Wien, AUT
- ◆ Faltenfilter 595 ½ Ø125mm  
Schleicher & Schuell, Dassel, D
- ◆ Cellstar® PP test tubes 50ml, sterile  
Greiner Bio-One, Kremsmünster,  
AUT
- ◆ Cat.No: 210261
- ◆ Cellstar® PP test tubes 15ml, sterile  
Greiner Bio-One, Kremsmünster,  
AUT
- ◆ Cat.No: 188261
- ◆ Reagenzgläser  
VWR, Wien, AUT
- ◆ Pipettenspitzen Biohit Tip 5 ml  
Biohit, Helsinki, FIN
- ◆ Pipettenspitzen Biohit Tip 1000µl  
Biohit, Helsinki, FIN
- ◆ Pipettenspitzen Biohit Tip 350 µl  
Biohit, Helsinki, FIN
- ◆ Gewindeflasche 32 x 11,5 mm (Clean Pack),  
Mikroeinsätze farblos 5 x 30 mm (Art. No.  
702958.1),  
Federn für Mikroeinsätze 5 x 30 mm (Art. No.  
702974.1),  
Schraubendeckel für Probengläser,  
geschlitzte Silikon PTFE – Septen für  
Probengläser  
Macherey-Nagel, Düren, D
- ◆ Parafilm® PM-992  
Brand, Wertheim, D

### 3.1.3.4. Chemikalien

- ◆ Aqua destillata
- ◆ HPLC Gradient grade Methanol  
Fisher Scientific, Loughborough,  
UK
- ◆ HPLC Gradient grade Acetonitril Far UV  
Fisher Scientific, Loughborough,  
UK
- ◆ Mobile Phase:  
Methanol: A. bidestillata - 65:35

- ◆ Extraktionslösung:  
Acetonitril: A.bidestillata - 75:25
- ◆ Phosphat buffered saline (PBS) 79382  
Fluka BioChemika, Buchs, CH

### 3.1.3.5. Extraktion, IAC, HPLC

Die Probenaufbereitung erfolgte in Anlehnung an die von Romer Labs® mit den Immunoaffinitätssäulen mitgelieferte Instruktionsanleitung.

#### Probenaufbereitung

Die Trockenfutter wurden bei Raumtemperatur gelagert. Vor der Probennahme wurden diese gut durchmischt. Eine ungefähre Menge von 20 g wurde entnommen und im Moulinex® zerkleinert. Vom zerkleinerten Futter wurden 5 g in ein CellStar® PP Tube (50 ml) eingewogen. Diesen wurden 20 ml Acetonitril/Wasser (75/25) zugesetzt. Anschließend wurde dieses Gemisch 3 min. mit einem Ultraturax durchmischt und weitere 15 min. auf einem entsprechendem Gerät geschüttelt.

Anschließend wurde es über einen Trichter und Filterpapier abfiltriert und in einem sterilen CellStar® PP Tube (15 ml) aufgefangen.

Davon wurde 1g Probe (4 ml) entfernt und mit 21 ml PBS-Lösung in einem CellStar® PP Tube (50 ml) verdünnt und gut durchmischt.

#### Reinigung der Proben mittels Immunoaffinitätssäulen

Vor Beginn wurde die benötigte Anzahl an Immunoaffinitätssäulen auf Zimmertemperatur gebracht, Adapter, Trichter und Aufsatz des Vakuumextraktionsgerätes mit Methanol gereinigt. Nach Aufstecken der Immunoaffinitätssäulen auf das Vakuumextraktionsgerät wurden noch die Adapter und die Trichter auf den Säulen befestigt.

Die gesamten 25 ml Lösung (4 ml Probe + 21 ml PBS) wurden vollständig auf die Säule aufgetragen.

Der Probenextrakt wurde langsam und gleichmäßig mit einem Tropfen pro Sekunde durch die Säule geschickt.

Anschließend wurden die Säulen 2 mal mit 10 ml Aqua destillata, wieder mit einer Geschwindigkeit von 1 Tropfen /sek. , gewaschen. Die Flüssigkeitsreste wurden durch kurzes Ansaugen von Luft entfernt. Der Durchlauf wurde verworfen. Nach Platzieren eines sauberen Reagenzglases unter der Säule erfolgte die Elution mit 3 mal 1 ml Methanol mit einer Durchflussgeschwindigkeit von 1 Tropfen/sek. . Die Eluatreste wurden durch neuerliches Absaugen von Luft aus der Säule gewonnen. Das Eluat wurde mit einem

Stickstoffverdampfer eingedampft und anschließend mit 1 ml mobile Phase (Laufmittel MeOH:A.destillata – 65:35) aufgenommen.  
Jeweils 200µl wurden in zwei Mikrogeläschen für die Analyse pipettiert.

#### High Performance Liquid Chromatography für ZEA

Die Proben wurden in den Autosampler gestellt.

Als mobile Phase wurde ein Gemisch aus Methanol:Wasser im Verhältnis 65:35 verwendet. Die Pumpe beförderte die mobile Phase durch das System. Die Durchflussrate betrug 1 ml/min. Bevor die Pumpe die mobile Phase ins System beförderte wurde das Laufmittel permanent mit Helium entgast. Eine Menge von 100µl der Suspension wurde in die HPLC Anlage injiziert. Der Säulenofen, in dem sich die HPLC – Trennsäule befand wurde auf 20°C eingestellt.

Das Spektrophotometer wurde auf eine Extinktionswellenlänge von 274 nm und eine Emissionswellenlänge von 450 nm eingestellt.

Die Run Time wurde auf 10 min. festgelegt.

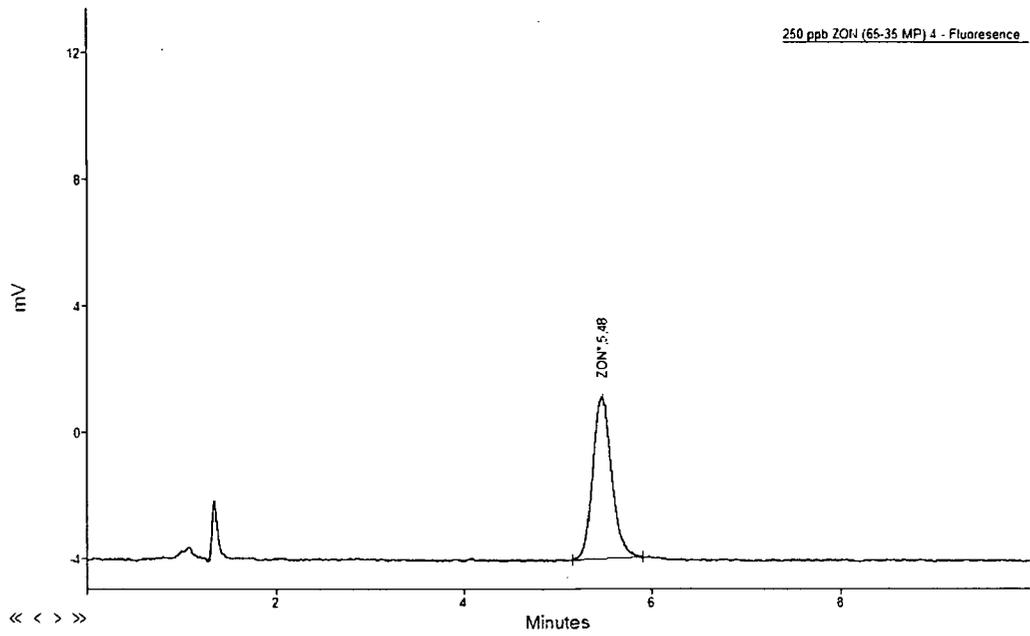
Zwischen HPLC-Anlage und Computer bestand eine Verbindung. Der Computer, der mit dem Programm Stratos 4.0.3.0 ausgestattet ist, zeichnete die Chromatogramme auf. Die Daten und Ergebnisse wurden ebenfalls gespeichert.

Zusätzlich zu den Proben wurden bei jedem Versuch 5 Standards mitlaufen gelassen. Diese hatten die Konzentrationen 0 ng/ml, 250 ng/ml, 500 ng/ml, 750 ng/ml, 1000 ng/ml.

Anhand dieser Standards konnte für jeden Versuchstag eine eigene Standardkurve und Kalibrationsgerade erstellt werden.

#### Nachweisgrenze

Die Nachweisgrenze betrug 3 ng/g. Die Quantifizierungsgrenze lag bei 20 ng/g.



**Abb. 4 :** HPLC - Chromatogramm einer Standardkonzentration von 250 ng ZEA/ml Lösung bei einer Fluoreszenzdetektion

## 3.2. Validierung der Methode

Um die Richtigkeit, Reproduzierbarkeit und Leistung der quantitativen Bestimmungen zu überprüfen, war eine Validierung der verwendeten Methode erforderlich. Bei der Durchführung der Validierung wurden negative Futtermittelproben verwendet. Aus der Standardlösung wurde eine vorher definierte Menge an Deoxynivalenol und Zearalenon zugesetzt („Spiken“). Es wurden den Proben folgende Konzentrationen zugesetzt: 500 ng/g DON jeweils vor und nach dem Clean up und 100 ng/g und 300 ng/g ZON vor und nach dem Clean up. Die Proben wurden einer Aufbereitung und Reinigung mit Immunaffinitätssäulchen unterzogen und dann mit der HPLC-Anlage doppelt gemessen. Die Identität ergab sich aus der Lage der Peaks der Einzelstandards im Vergleich zu einem Chromatogramm der „gespikten“ Proben.

### 3.2.1. Richtigkeit

Die Richtigkeit wird durch Ermittlung einer Wiederfindungsrate (WFR) überprüft. Die Wiederfindungsrate einer Bestimmungsmethode gibt den prozentualen Anteil der ermittelten Substanz von der tatsächlich hinzugefügten Menge an.

$$\text{WFR (\%)} = \frac{\text{nachgewiesene Toxinkonzentration} \times 100}{\text{hinzugefügte Toxinkonzentration}}$$

### 3.2.2. Nachweisgrenze

Während der Validierung der Methode werden die niedrigste DON und ZEA Konzentrationen empirisch ermittelt, welche die HPLC Anlage mit hinreichender Genauigkeit noch feststellt. Die niedrigste nachweisbare Konzentration wird bestimmt, indem man das Verhältnis Peak (Signal) zum Rauschen von 3:1 ermittelt. Die Quantifizierungsgrenze wird bestimmt, indem man das Verhältnis Peak zum Rauschen 10:1 ermittelt.

### 3.3. Untersuchungsgut

Die Trockenfuttermittel für Hunde wurden von verschiedenen Einzelhandelsgeschäften (Fressnapf, Hofer, Lidl, Merkur, Billa, Bipa, Schlecker, DM) in Ost-Österreich im Zeitraum von Anfang März bis Anfang April bezogen. Es handelte sich um Futtermittel von namhaften Herstellern und Handelsnamen. Die Untersuchung beschränkte sich auf 76 Hundetrockenfuttermittel.

Ziel war es, Proben von möglichst vielen unterschiedlichen Firmen und Handelsnamen zu kaufen. Weiters wurde darauf geachtet Futter für verschiedene Rassen, unterschiedliche Hundegrößen, verschiedene Altersstufen und auch Futter für sensible Tiere zu untersuchen.

**Tab. 6 :** Übersicht über das Untersuchungsgut

<b>Proben nummer</b>	<b>Identifikations nummer</b>	<b>Bezeichnung</b>
1	E_070611	PEDIGREE PAL Junior Complete Huhn+Reis
2	E_070612	PEDIGREE PAL Adult Complete Geflügel
3	E_070613	PURINA - MATZINGER Vollkornflocken mit Gemüse
4	E_070614	PURINA – MATZINGER 5 Korn Flocken kernig-kräftig
5	E_070615	SELECT GOLD Adult Pute
6	E_070616	SELECT GOLD Adult Chicken
7	E_070617	PEDIGREE PAL Adult Mini Gefl., Gem., Reis
8	E_070618	RUPP Hundeflocken +Fleisch+Gem
9	E_070619	RUPP Vollkorn Hundeflocken +Gem
10	E_070620	BERO Hunde Vollnahrung
11	E_070621	BERO Vollkorn Hundeflocken
12	E_070622	NUTRO CHOICE Adult Lamm+Reis

13	E_070623	PERFECT FIT In Home
14	E_070624	HAPPY DOG Natur Croq Original
15	E_070625	SCHLECKER Genießer Menü
16	E_070626	HOFER Maximus
17	E_070627	LIDL Optidog High Premium
18	E_070628	FROLIC Complete
19	E_070629	PURINA One Adult Huhn+Reis
20	E_070630	QUALITY LINE Mix Menü
21	E_070631	QUALITY FIRST Verwöhn Menü
22	E_070632	RisoBell
23	E_070633	Premium Belcando Senior Light
24	E_070634	BOZITA
25	E_070635	MARKUS MÜHLE Natur Nah Futter
26	E_070636	ANIFIT Flocken
27	E_070637	ROYAL CANIN Minidogs Mature
28	E_070638	ROYAL CANIN Minidogs Junior
29	E_070639	ROYAL CANIN Minidogs Adult
30	E_070640	ROYAL CANIN Medium Mature
31	E_070641	ROYAL CANIN Medium Junior
32	E_070642	ROYAL CANIN Medium Sensible
33	E_070643	ROYAL CANIN Maxi Babydog ultrasensibel
34	E_070644	ROYAL CANIN Maxi Junior

35	E_070645	ROYAL CANIN Maxi Adult
36	E_070646	ROYAL CANIN Maxi Sensible
37	E_070647	ROYAL CANIN Labrador Retriever
38	E_070648	SCIENCE PLAN Puppy Lamb & Rice
39	E_070649	SCIENCE PLAN Adult Chicken
40	E_070650	SCIENCE PLAN Senior Large Breed
41	E_070651	NATURES BEST Puppy Mini/Medium
42	E_070652	NATURES BEST Adult Mini/Medium
43	E_070653	BIOMILL Junior Medium
44	E_070654	BIOMILL Adult Medium
45	E_070655	EUKANUBA Puppy + Junior all Breeds
46	E_070656	EUKANUBA Puppy + Junior Medium
47	E_070657	EUKANUBA Adult Medium
48	E_070658	EUKANUBA Intestinal
49	E_070659	EUKANUBA Dermatosis FP
50	E_070660	EUKANUBA Restricted Calorie
51	E_070661	EUKANUBA Sensitive Skin
52	E_070662	EUKANUBA Sensitive Digestion
53	E_070663	HAPPY DOG Junior Croq
54	E_070689	CHAPPI Complete Gefl,Gem,Getr
55	E_070690	RUPP Brocken + Rind
56	E_070691	AS SCHLECKER Aktiv Crox

57	E_070692	PURINA BENEFUL Rd,Getr,Vit,Gem
58	E_070693	SCIENCE PLAN Minidogs Junior Ultrasensible
59	E_070694	SCIENCE PLAN Minidogs Sensible
60	E_070695	SCIENCE PLAN Maxi Sensible
61	E_070696	SCIENCE PLAN Yorkshire Terrier
62	E_070697	SCIENCE PLAN German Shepard
63	E_070698	SCIENCE PLAN Puppy Chicken
64	E_070699	SCIENCE PLAN Adult Large Breed
65	E_070700	SCIENCE PLAN Mature Adult Chicken
66	E_070701	NATURES BEST Puppy Large
67	E_070702	NATURES BEST Adult Large
68	E_070703	BIOMILL Junior Sensible
69	E_070704	BIOMILL Adult Mini
70	E_070705	BIOMILL Senior
71	E_070706	EUKANUBA Puppy + Junior Large
72	E_070707	EUKANUBA Adult Small
73	E_070708	EUKANUBA Puppy Intestinal
74	E_070709	EUKANUBA Excess Weight
75	E_070710	PERRO Junior Welpen,kl.R.
76	E_070711	DM DEIN BESTES Rd,Gem,Mais

### 3.4. Ergebnisse

#### 3.4.1. ELISA Ergebnisse

Tab. 7 : Übersicht über die ELISA Ergebnisse

Probennr.	Identifikationsnr.	DON	ZEA	FUM	OTA	AF
1	E_070611	193,1	50,8	71,4	n.d.	n.d.
2	E_070612	164,6	51,1	54,2	n.d.	n.d.
3	E_070613	> 250	264,9	n.q.	n.d.	n.d.
4	E_070614	118,3	37,1	n.q.	n.d.	n.d.
5	E_070615	148,5	n.q.	n.q.	n.d.	n.d.
6	E_070616	114,5	n.q.	n.q.	n.d.	n.d.
7	E_070617	192,1	n.q.	285,3	n.d.	n.d.
8	E_070618	179,5	n.q.	n.q.	n.d.	n.d.
9	E_070619	> 250	29,5	108,8	n.d.	n.d.
10	E_070620	148,1	n.q.	n.q.	n.d.	n.d.
11	E_070621	n.d.	n.q.	n.d.	n.d.	n.d.
12	E_070622	39,8	n.q.	n.q.	n.d.	n.d.
13	E_070623	172,7	n.q.	n.q.	n.d.	n.d.
14	E_070624	203,2	n.q.	n.d.	n.d.	n.d.
15	E_070625	> 250	43,0	n.q.	n.d.	n.d.
16	E_070626	187,0	n.q.	n.q.	n.d.	n.d.
17	E_070627	> 250	89,9	124,6	n.d.	n.d.
18	E_070628	45,8	38,2	n.d.	n.d.	n.d.
19	E_070629	> 250	60,7	192,7	n.d.	n.d.
20	E_070630	> 250	70,8	61,7	n.d.	n.d.
21	E_070631	132,9	27,2	n.q.	n.d.	n.d.
22	E_070632	n.q.	n.q.	n.d.	n.d.	n.d.
23	E_070633	85,9	n.q.	n.d.	n.d.	n.d.
24	E_070634	160,6	n.q.	n.q.	n.d.	n.d.
25	E_070635	132,0	n.q.	103,1	n.d.	n.q.

26	E_070636	59,9	n.q.	n.d.	n.d.	n.d.
27	E_070637	183,3	32,8	n.q.	n.d.	n.d.
28	E_070638	149,0	n.q.	105,3	n.d.	n.d.
29	E_070639	122,6	41,1	n.q.	n.d.	n.d.
30	E_070640	140,7	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
31	E_070641	166,9	74,8	96,5	n.d.	n.q.
32	E_070642	103,7	68,3	81,2	n.d.	n.d.
33	E_070643	138,9	n.q.	n.q.	n.d.	n.q.
34	E_070644	> 250	41,5	289,6	n.d.	n.d.
35	E_070645	> 250	27,4	n.d.	n.d.	n.d.
36	E_070646	105,7	n.q.	n.d.	n.d.	n.d.
37	E_070647	> 250	179,4	147,0	n.d.	n.q.
38	E_070648	> 250	61,4	568,5	n.d.	n.q.
39	E_070649	157,2	47,8	87,3	n.d.	n.d.
40	E_070650	148,2	n.q.	n.q.	n.d.	n.d.
41	E_070651	> 250	108,0	357,0	n.d.	n.d.
42	E_070652	> 250	118,5	384,9	n.d.	n.d.
43	E_070653	109,5	n.q.	62,6	n.d.	n.q.
44	E_070654	88,2	n.q.	118,8	n.d.	n.q.
45	E_070655	102,0	n.q.	n.d.	n.d.	n.d.
46	E_070656	114,0	n.q.	n.q.	n.d.	n.d.
47	E_070657	> 250	n.q.	75,4	n.d.	n.d.
48	E_070658	80,2	n.q.	n.q.	n.d.	n.d.
49	E_070659	27,8	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
50	E_070660	77,6	n.q.	n.q.	n.d.	n.d.
51	E_070661	> 250	n.q.	n.q.	n.d.	n.d.
52	E_070662	104,7	n.q.	132,3	n.d.	n.d.
53	E_070663	134,1	n.q.	n.q.	n.d.	n.q.
54	E_070689	> 250	29,2	83,1	n.d.	n.d.
55	E_070690	165,0	48,4	111,3	n.d.	n.d.
56	E_070691	97,1	n.q.	n.d.	n.d.	n.d.
57	E_070692	68,6	28,4	93,7	n.d.	n.d.

58	E_070693	91,8	n.q.	n.q.	n.d.	n.d.
59	E_070694	63,4	n.q.	n.q.	n.d.	n.d.
60	E_070695	84,2	126,4	211,6	n.d.	n.d.
61	E_070696	134,6	122,9	146,2	n.d.	n.d.
62	E_070697	93,2	39,7	n.q.	n.d.	n.d.
63	E_070698	> 250	86,0	195,4	n.d.	n.d.
64	E_070699	> 250	203,2	n.q.	n.d.	n.d.
65	E_070700	161,9	n.q.	n.q.	n.d.	n.d.
66	E_070701	> 250	298,3	487,1	n.q.	n.d.
67	E_070702	> 250	176,7	n.q.	n.d.	n.d.
68	E_070703	46,8	n.q.	n.d.	n.d.	n.d.
69	E_070704	166,5	64,9	365,8	n.d.	n.d.
70	E_070705	121,5	n.q.	n.q.	2,1	n.d.
71	E_070706	166,5	32,1	n.q.	3,1	n.d.
72	E_070707	> 250	n.q.	n.q.	4,1	n.d.
73	E_070708	76,8	28,0	n.q.	4,7	n.d.
74	E_070709	138,5	n.q.	n.q.	n.q.	n.d.
75	E_070710	110,0	n.q.	n.q.	n.d.	n.d.
76	E_070711	148,6	33,3	126,6	n.d.	n.d.
<hr/>						
<b>MW</b>		<b>123,5</b>	<b>80,1</b>	<b>177,6</b>	<b>3,5</b>	-
<b>MD</b>		<b>127,3</b>	<b>50,9</b>	<b>121,7</b>	<b>3,6</b>	-
<b>SD</b>		<b>43,5</b>	<b>67,6</b>	<b>134,1</b>	<b>1,2</b>	-

n.d. nicht detektierbar  
n.q. nicht quantifizierbar

MW, MD und SD für DON (n=56) ohne Werte >250

#### **3.4.1.1. DON**

Insgesamt wurden 76 Futtermittel untersucht. Davon erwiesen sich 74 (97 %) Proben als positiv. Nur zwei Proben gelten als negativ (< 25 µg DON/kg Futter).

Da die ELISA Testkits der Fa. NEOGEN® nur für Konzentrationen bis 250 µg DON/kg Futter ausgerichtet sind, werden alle Konzentrationen über diesem Wert mit > 250 angegeben. Insgesamt wiesen 20 Proben eine Konzentration > 250 µg DON/kg Futter auf.

Der Mittelwert (MW) aller positiven Proben ohne die Proben, deren Werte >250 sind beträgt 123.5 µg DON/kg Futter, der Medianwert (MD) 127.3 µg DON/kg Futter und die Standardabweichung (SD) 43.5 µg DON/kg Futter.

Die Nachweisgrenze lag bei 10 µg DON/kg Futter, die Quantifizierungsgrenze bei 25 µg DON/kg Futter.

#### **3.4.1.2. ZEA**

Von den 76 untersuchten Futtermitteln erwiesen sich 36 Proben (47 %) als positiv. 40 Proben (53 %) waren negativ (<25 µg ZEA/kg Futter).

Die höchste Konzentration, die in einer Probe gefunden wurde, war 298 µg ZEA/kg Futter. Der Mittelwert (MW) aller positiven Proben beträgt 80.1 µg ZEA/kg Futter, der Medianwert (MD) 50.9 µg ZEA/kg Futter und die Standardabweichung (SD) beträgt 67.6 µg ZEA/kg Futter.

Die Nachweisgrenze lag bei 10 µg ZEA/kg Futter, die Quantifizierungsgrenze bei 25 µg ZEA/kg Futter.

#### **3.4.1.3. FUM**

Insgesamt waren 32 Futterproben (42 %) Fumonisin positiv. In den restlichen 44 Proben (58 %) konnte Fumonisin in Konzentrationen unter 50 µg/kg Futter nachgewiesen werden. Diese Proben gelten daher als negativ.

Die höchste nachgewiesene Konzentration lag bei 568 µg FUM/kg Futter, der Mittelwert (MW) aller positiven Proben beläuft sich auf 177.6 µg FUM/kg Futter, der Medianwert (MD) beträgt 121.7 µg FUM/kg Futter, die Standardabweichung liegt bei 134.1 µg FUM/kg Futter.

Die Nachweisgrenze sowie die Quantifizierungsgrenze lagen bei 50 µg FUM/kg Futter.

#### **3.4.1.4 OTA**

Vier der untersuchten Trockenfutter (5 %) konnten als positiv bewertet werden ( $>2 \mu\text{g/kg}$  Futter). Die restlichen Proben (95 %) wiesen OTA Konzentrationen unter  $2 \mu\text{g/kg}$  Futter auf.

Die höchste nachgewiesene Konzentration lag bei  $4.7 \mu\text{g OTA/kg}$  Futter. Der Mittelwert (MW) aller positiven Proben beträgt  $3.5 \mu\text{g OTA/kg}$  Futter, der Medianwert (MD) liegt bei  $3.6 \mu\text{g OTA/kg}$  Futter und die Standardabweichung (SD) beträgt  $1.2 \mu\text{g/kg}$  Futter.

Die Nachweisgrenze lag bei  $1 \mu\text{g OTA/kg}$  Futter, die Quantifizierungsgrenze bei  $2 \mu\text{g OTA/kg}$  Futter.

#### **3.4.1.5. AF**

In keiner der 76 untersuchten Hundefutterproben konnte Aflatoxin nachgewiesen werden.

Die Nachweisgrenze lag bei  $0.5 \mu\text{g AF/kg}$  Futter, die Quantifizierungsgrenze bei  $1 \mu\text{g AF/kg}$  Futter.

### 3.4.1.6. Vergleich der ELISA Ergebnisse

Tab. 8 : Vergleich der ELISA Ergebnisse

Toxine	Proben anzahl	positive Proben	max. Konz. µg/kg	% positive Proben
DON	76	74	>250	97
ZEA	76	36	298	47
FUM	76	32	568	42
OTA	76	4	4,7	5
AF	76	0	0	0

Vergleich ELISA Ergebnisse

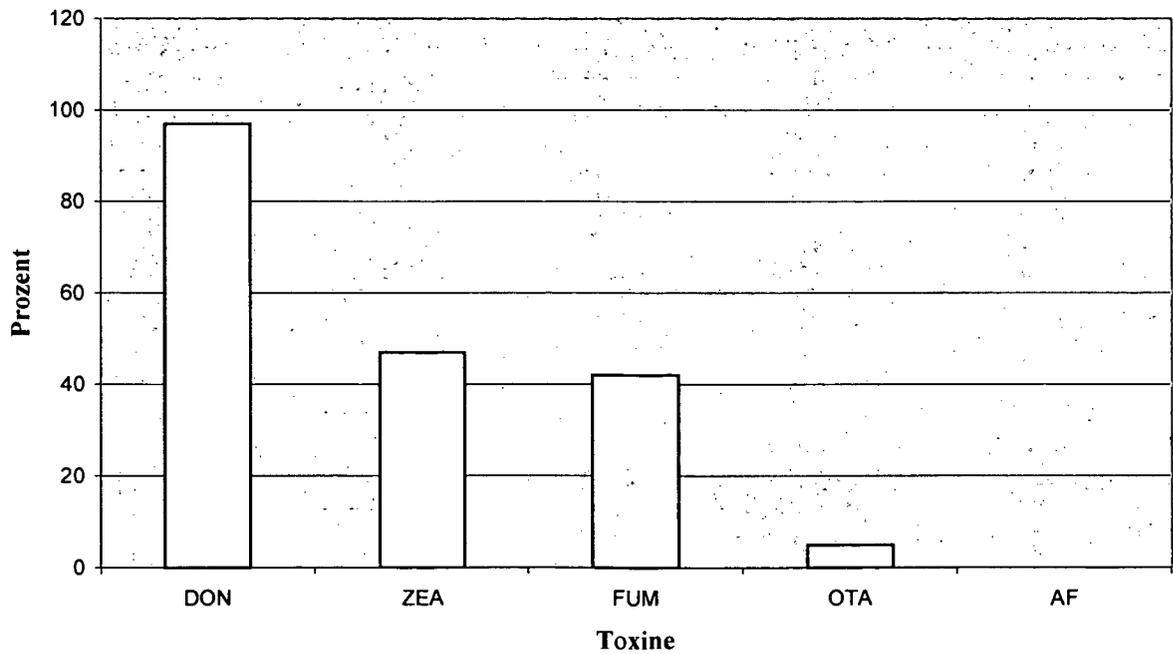


Diagramm 1 : prozentueller Anteil der im ELISA Verfahren mykotoxinpositiven Proben

### 3.4.1.7. ELISA Mehrfachkontaminationen

Tab. 9 : Übersicht über die ELISA Mehrfachkontaminationen

Toxine	Proben anzahl	positive Proben	% positive Proben
DON + ZEA	76	36	47
DON + FUM	76	32	42
DON + ZEA + FUM	76	25	33
ZEA + FUM	76	25	33
DON + OTA	76	4	5
ZEA + OTA	76	2	3

Die Fusarientoxine DON, ZEA und FUM sind in einem hohen Maß vergesellschaftet. Dreiunddreißig bis siebenundvierzig Prozent aller Proben sind mit mindestens 2 oder mehreren Toxinen belastet.

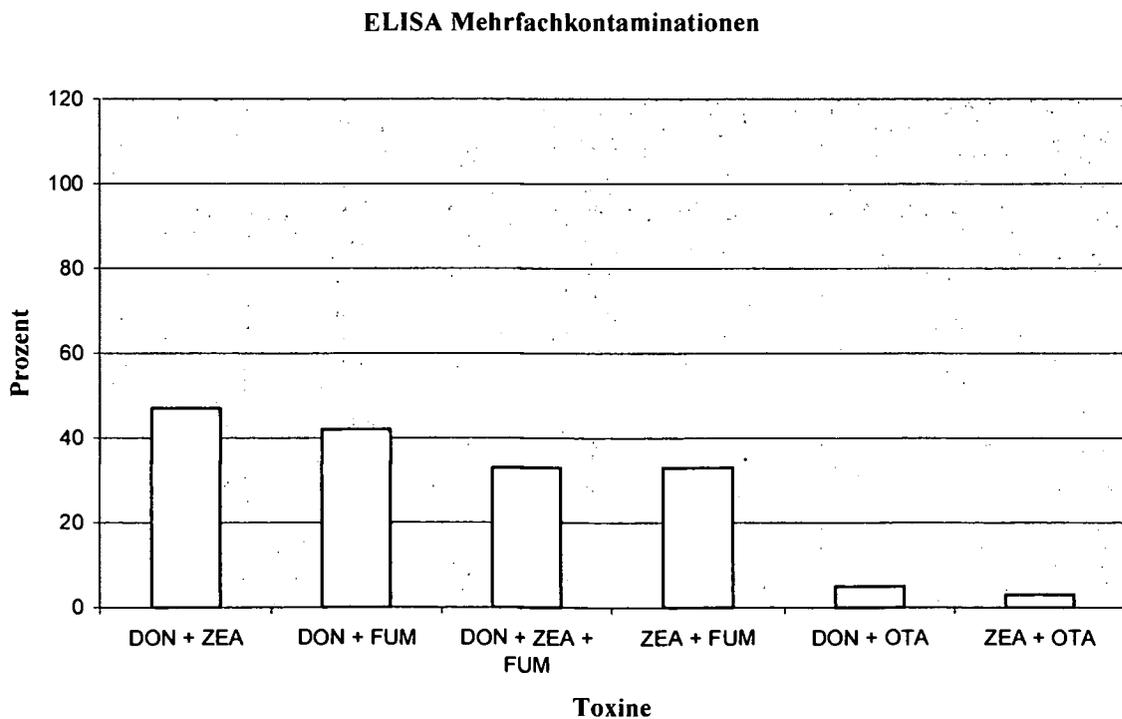


Diagramm 2 : prozentueller Anteil der Mehrfachkontaminationen der Toxine im ELISA Verfahren

### 3.4.2. HPLC Ergebnisse

#### 3.4.2.1. Validierung der HPLC – Methode

##### Richtigkeit/Wiederfindungsrate (WFR) der HPLC-Methode für die Bestimmung des DON im Hundetrockenfutter

In Tabelle 9 wird die Wiederfindungsrate (WFR) für DON in den Futtermittelproben dargestellt.

Bei der Validierung wurde DON in der Konzentration von 500 ng/g Futter zur negativen Futtermittelprobe Nummer 12 jeweils 2 Mal vor und nach dem Clean up mit den Immunoaffinitätssäulchen hinzugefügt und doppelt gemessen.

Bei der Zugabe von 500 ng DON/g Futter vor dem Clean up wurde ein Mittelwert von 481,4 ng/g Futter und eine Wiederfindungsrate von 96,3 %, nach dem Clean up ein Mittelwert von 517,9 ng/g Futter und eine Wiederfindungsrate von 103,8 % ermittelt.

Insgesamt ergibt sich ein durchschnittlicher Mittelwert aller Wiederfindungsraten von 100,05 % (siehe Tabelle 9).

**Tab. 10** : Wiederfindungsraten von DON im Hundetrockenfutter

Probe	hinzugefügte Menge	DON hinzugefügt	nachgewiesene Menge ng/g	MW Konz.	WFR %	MW WFR %	
Nr. 12	500 ng/g		386,54		77,3		
			368,94		73,8		
			vor Clean up	597,55		119,5	
			572,62		114,5		
				481,4 ± 120,4		96,3	
				491,02		98,2	
				501,55		100,3	
		nach Clean up		524,32		104,9	
			554,77		111,0		
				517,9 ± 28,2		103,8	
						100,1	

### **Richtigkeit/Wiederfindungsrate (WFR) der HPLC-Methode für die Bestimmung des ZEA im Hundetrockenfutter**

In Tabelle 10 wird die Wiederfindungsrate (WFR) für ZEA in den Futtermittelproben dargestellt.

Bei der Validierung wurden 2 Konzentrationen von 100 ng ZEA/g Futter und 300 ng ZEA/g Futter zur negativen Futtermittelprobe Nummer 10 jeweils 2 Mal vor dem Clean up und 1 Mal nach dem Clean up mit den Immunoaffinitätssäulchen hinzugefügt. Die Proben wurden wiederum doppelt gemessen.

Bei der Zugabe von 100 ng ZEA/g Futter vor dem Clean up wurde ein Mittelwert von 127.5 ng/g Futter und eine Wiederfindungsrate von 127.4 %, nach dem Clean up ein Mittelwert von 127.7 ng/g Futter und eine Wiederfindungsrate von 127.9 % ermittelt.

Im Bereich von 300 ng ZEA/g Futter vor dem Clean up ergab sich ein Mittelwert von 368.1 ng/g Futter und eine Wiederfindungsrate von 122.7 %, nach dem Clean up ein Mittelwert von 316.4 ng/g Futter und eine Wiederfindungsrate von 105.5 %.

Insgesamt ergibt sich ein durchschnittlicher Mittelwert aller Wiederfindungsraten von 120.9 % (siehe Tabelle 10).

Tab. 11 : Wiederfindungsrate von ZEA im Hundetrockenfutter

Probe	hinzugefügte Menge	ZEA hinzugefügt	nachgewiesene Menge ng/g	MW Konz.	WFR %	MW WFR %
			125,31		125,1	
			126,49		126,5	
		vor Clean up	126,01		126,0	
	100 ng/g		132,13		132,1	
				127,5 ± 3,1		127,4
		nach Clean up	127,86		127,9	
				127,9		127,9
<b>Nr. 10</b>			351,37		117,1	
			360,62		120,2	
		vor Clean up	373,38		124,5	
	300 ng/g		387,19		129,1	
				368,1 ± 15,6		122,7
		nach Clean up	319,33		106,4	
			313,51		104,5	
				316,4 ± 4,1		105,5
						120,9

### 3.4.2.2. HPLC Ergebnisse der Mykotoxine DON und ZEA

Insgesamt wurden 29 Futtermittel nach dem ELISA Verfahren mittels HPLC auf die DON Kontamination untersucht.

Davon erwiesen sich 24 Proben (83 %) als positiv ( $>25 \mu\text{g DON/kg Futter}$ ). Die höchste nachgewiesene Konzentration in einer Probe betrug  $1386.1 \mu\text{g DON/kg Futter}$ .

Die Nachweisgrenze der HPLC Anlage lag bei  $5 \mu\text{g DON/kg Futter}$ , das Quantifizierungslimit bei  $25 \mu\text{g DON/kg Futter}$ .

Die unterlegten DON Ergebnisse in der Tabelle wurden nicht in die Berechnung des Mittelwertes miteinbezogen, da von diesen Proben nur die Hälfte der Lösung aus den Mikrowells in die HPLC Anlage injiziert wurde.

Weiters wurden 22 Futtermittel nach dem ELISA mittels HPLC auf deren ZEA Gehalt getestet. Davon erwiesen sich 15 Proben (68 %) als positiv ( $>20 \mu\text{g ZEA/kg Futter}$ ). Die höchste nachgewiesene Konzentration war  $549 \mu\text{g ZEA/kg Futter}$ .

Die Nachweisgrenze der HPLC Anlage lag bei  $3 \mu\text{g/kg}$ , die Quantifizierungsgrenze bei  $20 \mu\text{g/kg}$ .

Der durchschnittliche Mittelwert der ZEA Wiederfindungsraten lag bei 120.9 %. Daher wurden die ZEA HPLC Endergebnisse um 21% nach unten korrigiert.

Tab. 12 : Vergleich der HPLC Ergebnisse für DON und ZEA

Proben nummer	DON in $\mu\text{g/kg}$		ZEA	ZEA korrigiert	ZEA MW
		DON MW		in $\mu\text{g/kg}$	
3	437,1		85,1	70,3	
	541,1	489,1	82,6	68,3	69,3
4	-		125,5	103,7	
	239,9	239,9	124,2	102,6	103,2
8	179,6		35,9	29,7	
	195,7	187,7	37,6	31,1	30,4
9	228,6		58,1	48,0	
	220,6	224,6	61,2	50,6	49,3
10	20,4		n.d.	-	-
	22	21,2	n.d.	-	-
11	200,2		n.d.	-	-
	198,7	199,5	n.d.	-	-
12	n.d.				
	n.d.	-			

15	642,3				
	653,6	648,0			
17	631,8		161,3	133,3	
	697,5	664,7	162,2	134,0	133,7
18	9,3				
	7,2	9,3			
19	286,5				
	368,7	327,6			
20	355,9		106,5	88,0	
	357,9	356,9	104,3	86,2	87,1
22	111,2				
	60,7	111,2			
30			n.d.	-	-
			n.d.	-	-
31			24,06	n.q.	
			23,44	n.q.	n.q.
34	296,5				
	279,1	287,8			
35	210,8				
	200,1	205,5			
37	191,4		323,9	267,7	
	166,5	179,0	323,5	267,4	267,5
38	579,1				
	581,3	580,2			
41	731,6		343,2	283,6	
	729,5	730,6	361,6	298,8	291,2
42	848,2		270,4	223,5	
	853,1	850,7	262,9	217,3	220,4
45			n.d.	-	-
			n.d.	-	-
47	215,3				
	182,7	199,0			
48			n.d.	-	-
			n.d.	-	-
49	10,3		n.d.	-	-
	21,2	21,2	n.d.	-	-
51	267,2				
	278,8	273,0			
54	655,3				
	677	666,2			
60			195,0	161,2	
			202,2	167,1	164,1
61			151,4	125,1	
			146,5	121,1	123,1
63	673,3		116,9	96,6	
	661,6	667,5	122,6	101,3	99,0

64	788,2 1386,1	1087,2	517,8 530,0	427,9 438,0	433,0
66	684,9 692,4	688,7	664,3 650,2	549,0 537,4	543,2
67	871,9 879,4	875,7	396,8 404,0	327,9 333,9	330,9
68	10,6 16	13,3			
72	337,3 343	340,2			
<b>MW</b>	<b>408,7</b>			<b>185,3</b>	
<b>MD</b>	<b>307,7</b>			<b>128,4</b>	
<b>SD</b>	<b>327,0</b>			<b>151,5</b>	

n.d. nicht detektierbar  
n.q. nicht quantifizierbar

### Vergleich der HPLC Ergebnisse I

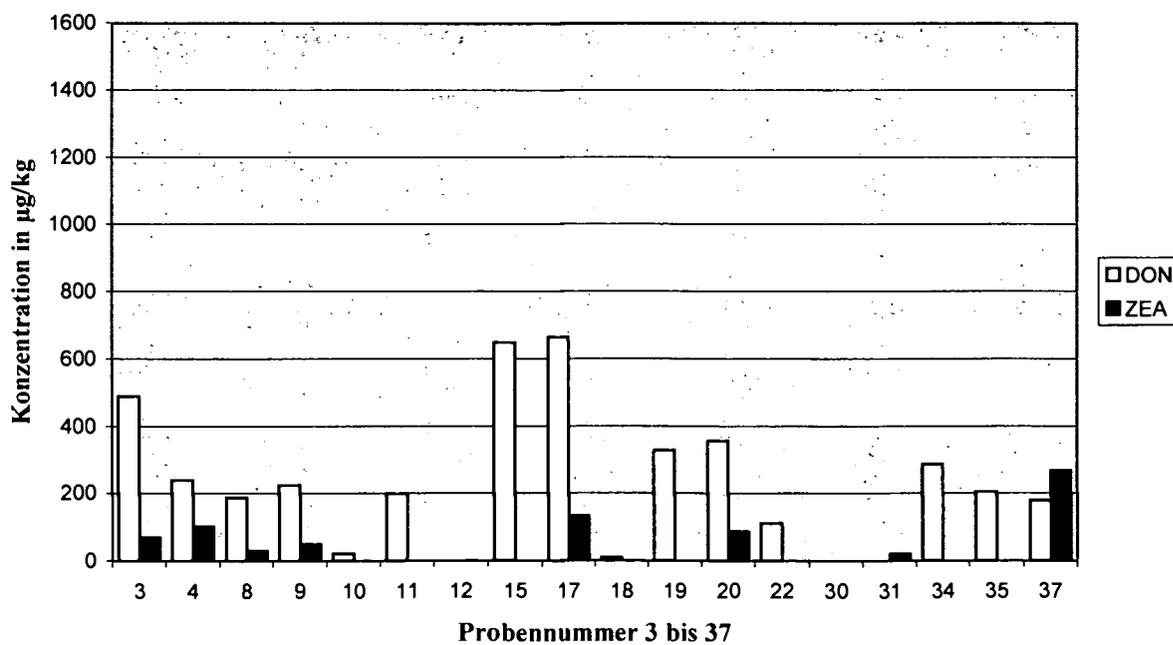


Diagramm 3 : Vergleich der Mittelwerte der HPLC Ergebnisse für DON und ZEA der Proben 3 bis 37

## Vergleich der HPLC Ergebnisse II

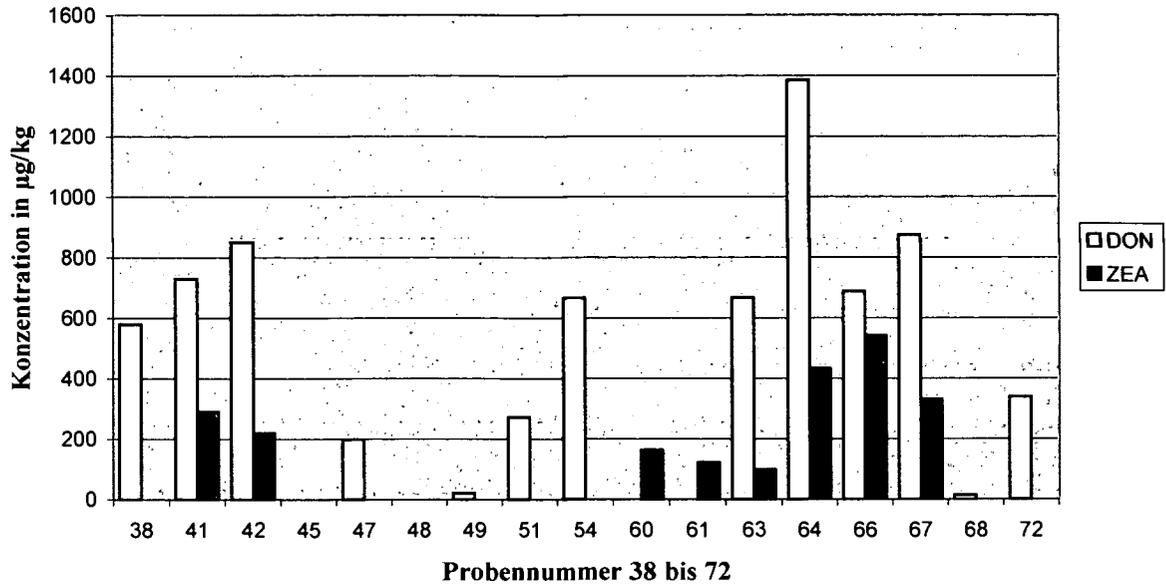


Diagramm 4 : Vergleich der Mittelwerte der HPLC Ergebnisse für DON und ZEA der Proben 38 bis 72

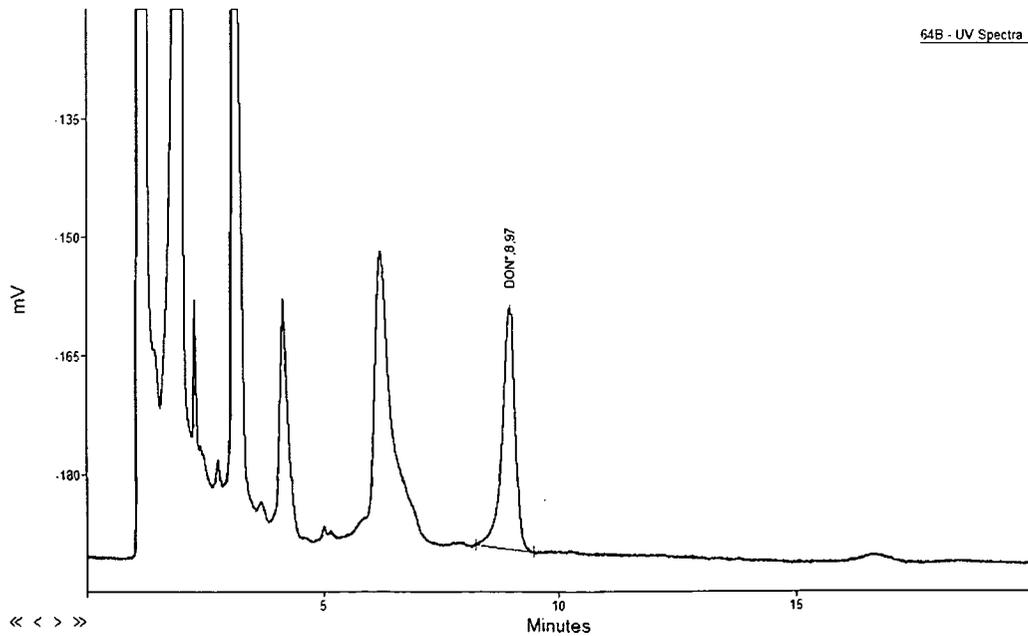
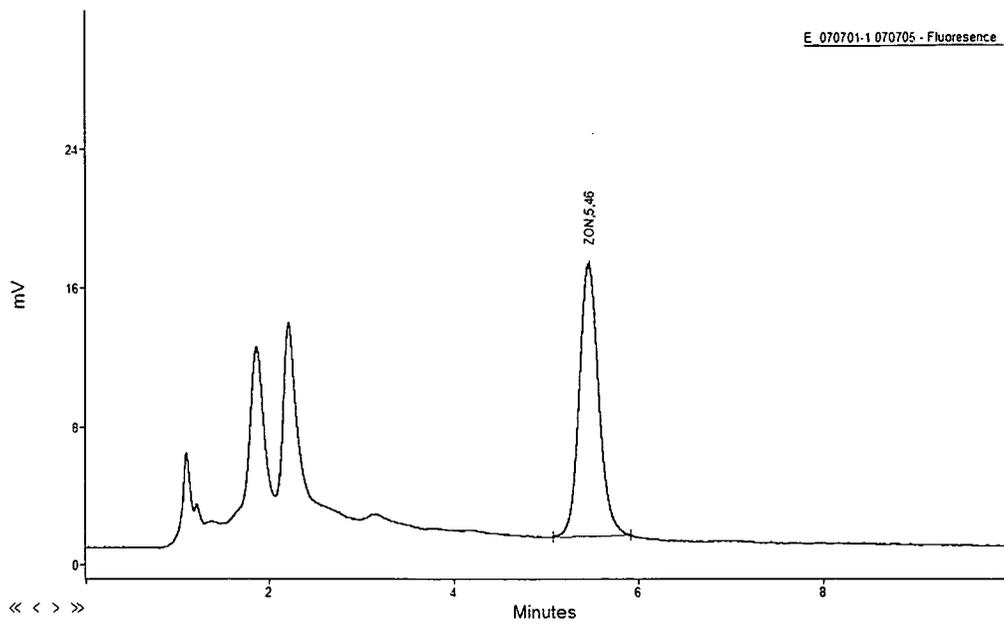


Abb. 5 : HPLC-Chromatogramm der Probe 64 mit einer Konzentration von 1386 µg DON/kg Futter



**Abb. 6 :** HPLC-Chromatogramm der Probe 66 mit einer Konzentration von 549  $\mu\text{g}$  ZEA/kg Futter

### 3.4.2.3. HPLC Ergebnisse der FUM

Drei der 76 Proben wurden am Institut für Biologie der Universität Bydgoszcz mittels HPLC auf das Vorkommen von Fumonisinen getestet. Zwei dieser Proben konnten Fumonisin positiv, 1 Probe negativ ( $FB_1 < 10 \mu\text{g/kg}$  Futter,  $FB_2 + FB_3 < 5 \mu\text{g/kg}$  Futter) getestet werden.

**Tab. 13 :** Übersicht über die FUM HPLC Ergebnisse

Proben nummer	FB1	FB2	FB3
38	n.d.	n.d.	n.d.
64	56,3	18,8	12,3
67	69,6	31,9	17,6
<b>MW</b>	<b>63,0</b>	<b>25,4</b>	<b>15,0</b>
<b>MD</b>	<b>63,0</b>	<b>25,4</b>	<b>15,0</b>
<b>SD</b>	<b>9,4</b>	<b>9,3</b>	<b>3,7</b>

### 3.4.2.4. Vergleich der HPLC Ergebnisse

**Tab. 14 :** Vergleich der HPLC Ergebnisse

Toxine	Proben anzahl	positive Proben	max. Konz. $\mu\text{g/kg}$	% positive Proben
<b>DON</b>	29	24	1386	83
<b>ZEA</b>	22	15	549	68
<b>FUM</b>	3	2	119	67

## Vergleich HPLC Ergebnisse

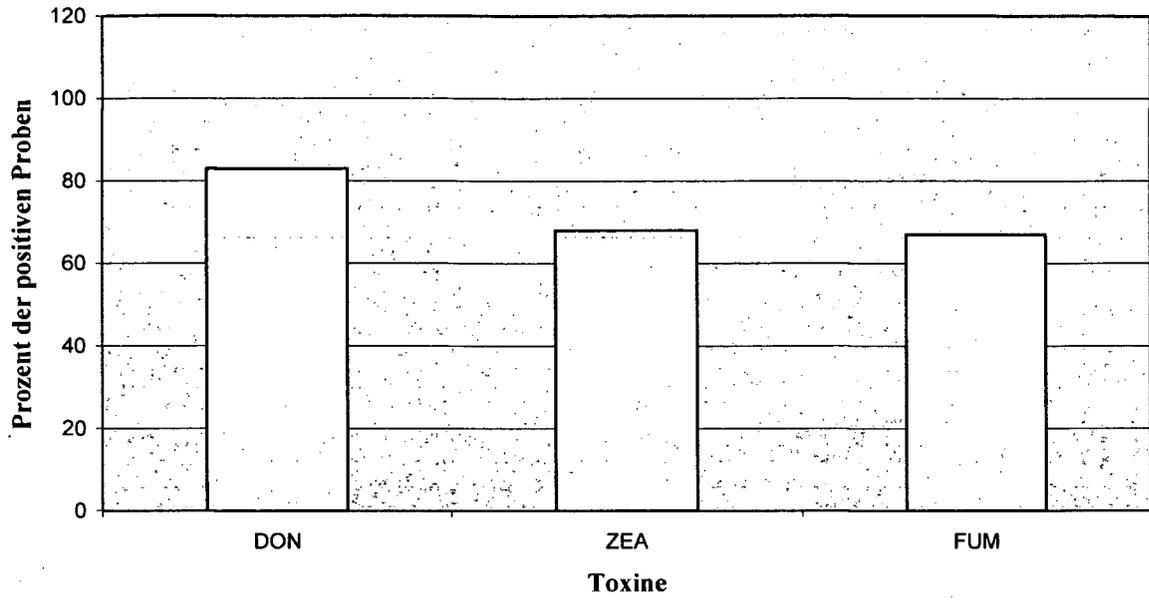


Diagramm 5 : prozentueller Anteil der im HPLC Verfahren mykotoxinpositiven Proben

### 3.4.2.6. HPLC Mehrfachkontaminationen

Tab. 15 : Übersicht über die HPLC Mehrfachkontaminationen

Toxine	Proben anzahl	positive Proben	% positive Proben
DON + ZEA	16	13	81
DON + ZEA + FUM	2	2	100

#### HPLC Mehrfachkontaminationen

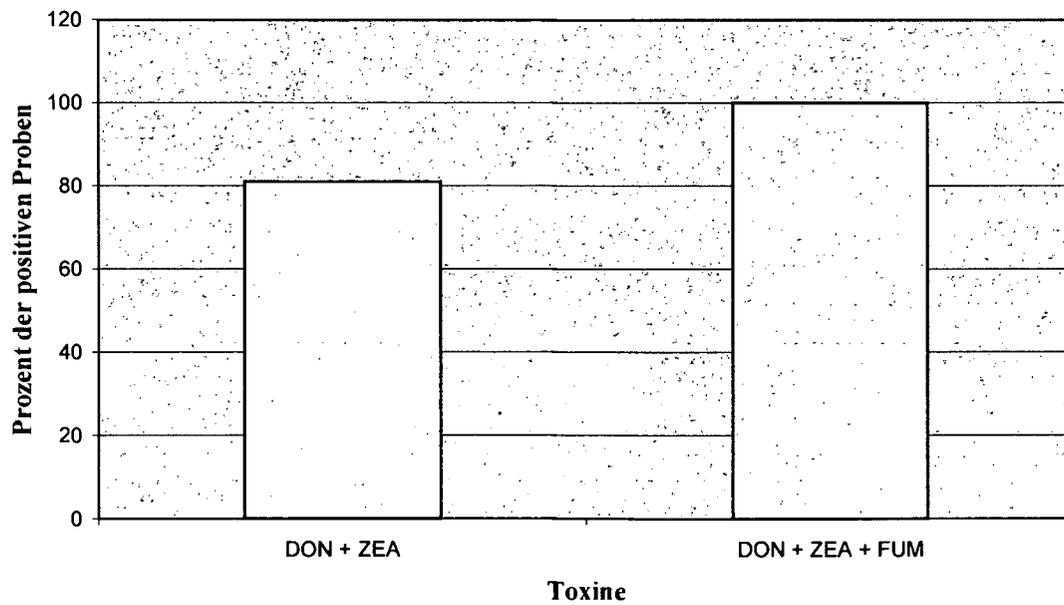


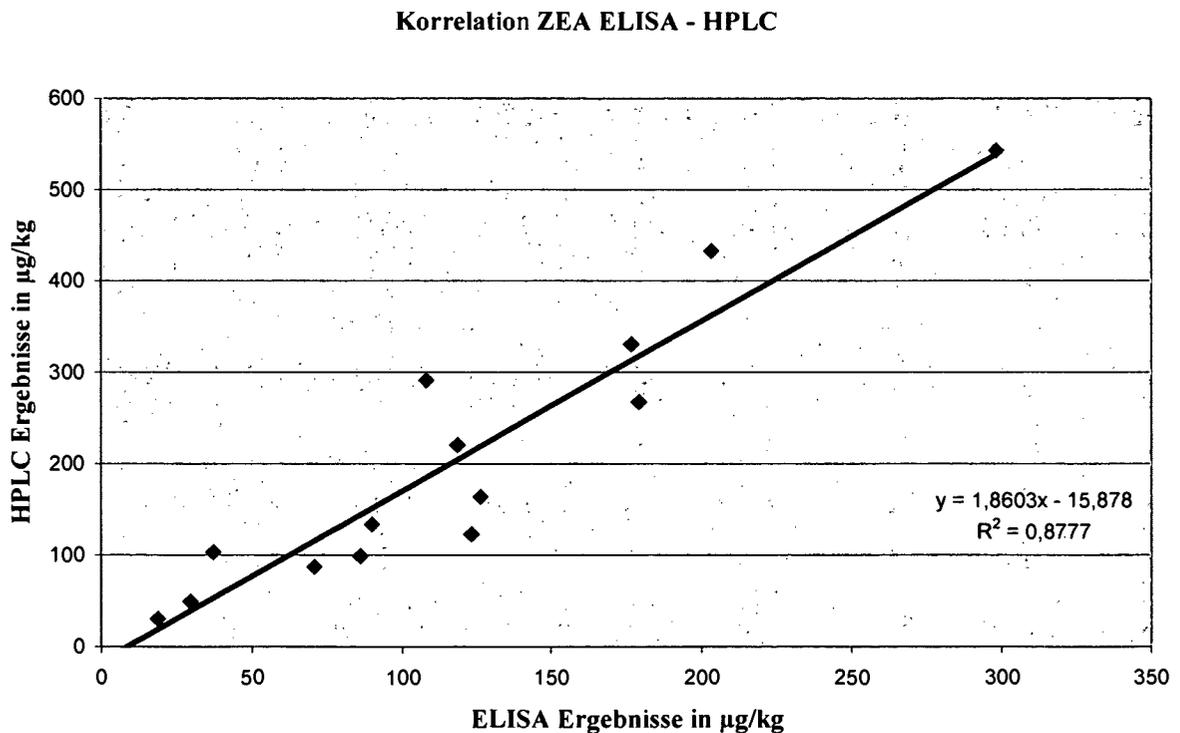
Diagramm 6 : prozentueller Anteil der Mehrfachkontaminationen der Toxine im HPLC Verfahren

### 3.4.3. Korrelation ELISA – HPLC

Um zu überprüfen inwiefern die Ergebnisse der ELISA Untersuchung mit denen der HPLC Untersuchung übereinstimmen wurde ein Diagramm mit einer Korrelationsgerade erstellt und das Bestimmtheitsmaß  $R^2$  ermittelt.

Die Korrelation zwischen den ELISA und HPLC Ergebnissen bei DON zu ermitteln ist nicht möglich gewesen, da der DON ELISA Testkit nur Konzentrationen bis 250  $\mu\text{g}/\text{kg}$  Futter auswerten konnte. Konzentrationen, die diesen Wert überstiegen wurden mit  $> 250$  angezeigt.

Das Bestimmtheitsmaß bei ZEA beträgt 0.8777, auf das für FUM wurde wegen der geringen Probenanzahl verzichtet.



**Diagramm 7 :** Darstellung der Korrelation der ELISA mit den HPLC Ergebnissen inklusive der Korrelationsgerade und dem Bestimmtheitsmaß ( $R^2$ )

## 4. DISKUSSION

Im Rahmen dieser Dissertation wurden 76 Hundetrockenfuttermittel auf das Vorkommen der Mykotoxine Deoxynivalenol, Zearalenon, Fumonisine, Ochratoxin A und Aflatoxine untersucht.

### 4.1. Analytische Verfahren zur Bestimmung von DON, ZEA, FUM, OTA und AF

Im Rahmen dieser Dissertation wurden 2 unterschiedliche analytische Verfahren zur Bestimmung der Mykotoxine verwendet. Die Futtermittel wurden mittels einem kompetitiven ELISA und teilweise mittels einer HPLC Methode untersucht.

Die verwendeten Veratox® Testkits wurden von der Firma Neogen für Hundefutter für die Mykotoxine Aflatoxin und Deoxynivalenol in einer Untersuchung validiert.

Fertigfutter wurden auf das Vorkommen dieser Toxine untersucht. 21 dieser Proben, die negativ waren wurden jeweils mit 10 µg/kg und 25 µg/kg AF und DON gespickt und anschließend wurden die Konzentrationen mittels ELISA gemessen. Die Wiederfindungsrate von Aflatoxin lag bei 96 %, die von Deoxynivalenol bei 92 % (NEOGEN, Technical Product Information, 2006).

1998 wurde von unterschiedlichen Labors eine vergleichende Studie über DON und ZEA Gehalte in Mais und Weizen durchgeführt. Verglichen wurden die Methoden GC, HPLC, TLC und ELISA. Bei DON lieferten die ELISA-Kits signifikant höhere Konzentrationen als die HPLC und GC Methoden. Die Ursache dafür war, dass die Proben zusätzlich noch 15-acetyl-Deoxynivalenol enthielten, das von den ELISAs nicht vom gewöhnlichen DON unterschieden werden konnte. Bei den ZEA Ergebnisse gab es keine signifikanten Unterschiede zwischen der ELISA und HPLC Methode (JOSEPHS et al., 2001).

Eine vergleichende Untersuchung des direkten und indirekten ELISAs für DON in Mais und Weizen ergab, dass der direkte ELISA sensitiver und zeitsparender ist und weniger Interferenzen hat als der indirekte ELISA. Die gemessenen Ergebnisse stimmen mit den Ergebnissen anderer Methoden (TLC, RIA) gut überein. Außerdem weist er geeignete Wiederfindungsraten (100 %, 102 %) und hohe Spezifität auf und es ist keine Probenvorreinigung nötig (XU et al., 1988).

GUNSEN und YAROGLU (2002) führte eine Untersuchung über den Aflatoxingehalt im Hundefutter mittels ELISA Tests durch. Zuerst wurden die Proben mit einer Rida® Aflatoxin Säule vorgereinigt und dann mittels ELISA Ridascreen® Total Aflatoxin die Aflatoxinkonzentration gemessen. Das Detektionslimit lag bei 1.75 µg/kg.

SONGSEMSAKUL et al. (2007) untersuchten Hundefutter auf das Vorkommen von DON und OTA mittels ELISA. Das Detektionslimit für DON lag bei 18.5 µg/kg, für OTA bei 1.9 µg/kg. Die Proben, die mehr als 1000 µg/kg DON enthielten wurden anschließend mit einer HPLC-MS Methode analysiert und verifiziert. Die HPLC-MS Ergebnisse waren vergleichbar mit den ELISA Ergebnissen.

NURYONO et al. (2005) führten eine Untersuchung von indonesischem Mais auf das Vorkommen von ZEA mit ELISA und HPLC durch. Die Toxine wurden mit Methanol:Wasser (70:30) aus den Proben extrahiert. Die gelösten Toxine wurden auf den Ridascreen® zearalenone Kit übertragen und die Absorption wurde bei 450 nm gemessen. Spikeversuche mit nicht kontaminiertem Mais in den Konzentrationen von 200 – 750 µg/kg ergaben eine Wiederfindungsrate von 87.8 %.

Auch bei dieser Untersuchung wurden ELISA positive Proben mit einer HPLC Methode verifiziert. Hierbei wurden die Proben zuerst mit Immunoaffinitätsäulchen vorgereinigt. Die gebundenen Toxine wurden mit Methanol und Wasser von den Säulchen gelöst und in die HPLC Anlage injiziert. Als analytische Säule wurde eine C18 reversed-phase Säule verwendet. Blanke Maisproben wurden wiederum mit ZON in den Konzentrationen von 200 – 750 µg/kg gespickt und gemessen. Eine Wiederfindungsrate von 100.2 % wurde ermittelt. Das Detektionslimit lag bei 3 µg/kg. Eine vergleichende Analyse von ELISA und HPLC von 25 positiven Proben ergab eine Korrelation von 0.9258.

ELISA-Kits können sehr gut für Fumonisin Screenings verwendet werden. Obwohl die enthaltenen Antikörper gegen Fumonisin B<sub>1</sub> gerichtet sind, haben sie dennoch signifikante, aber geringere Kreuzreaktionen mit Fumonisin B<sub>2</sub> und B<sub>3</sub>. Die Leistung der ELISAs wird generell durch Vergleiche mit HPLC Ergebnissen beurteilt und hängt von den verwendeten Antikörpern ab (KULISEK und HAZEBROEK, 2000, USLEBER et al., 1994, SYDENHAM et al., 1996a, 1996b).

Ergebnisse von Vergleichsstudien zeigen, dass die Korrelation zwischen den Ergebnissen von HPLC und ELISA für natürlich kontaminierte Proben zwischen 0.51 bis 0.97 liegt. Solche Vergleiche zeigen einen Trend, dass die „Total Fumonisin“ Konzentrationen gemessen mit ELISAs höher sind als jene, die mit einer HPLC Methode bestimmt werden. Mögliche Gründe dafür können die unterschiedliche Aufarbeitung der Proben (Lösungsmittel, Extraktionszeit, Mixintensität) sein oder aber auch den Fumonisinen ähnliche Verbindungen, die für den ELISA, aber nicht in der HPLC detektierbar sind (PESTKA et al., 1994, USLEBER et al., 1994, SYDENHAM et al., 1996a).

ELISAs wurden auch für die Detektion von Ochratoxin A in Schweinenieren, Tier- und Humanseren, Zerealien und Mischfutter entwickelt. Die Ergebnisse müssen aber häufig mit anderen Methoden bestätigt werden, da die Antikörper oft Kreuzreaktionen mit Verbindungen zeigen, die dem OTA ähnlich sind (IPCS, INCHEM, 2001c).

In dieser Studie wurden bei der HPLC Untersuchung die Proben mittels Immunoaffinitätssäulen (IAC – Immunoaffinity Columns) vorgereinigt. Das Prinzip der IAC ist eine Antigen-Antikörper-Reaktion. Die Säulen enthalten eine Gel-Suspension, an der monoklonale Antikörper spezifisch für die jeweiligen Toxine kovalent gebunden sind. Wenn ein Toxin in der Probe enthalten ist, wird dieses von den monoklonalen Antikörpern gebunden. Alle anderen Substanzen werden hingegen nicht gebunden und verlassen das Säulchen. Das gebundene Toxin wird anschließend mit Methanol aus dem Antigen-Antikörper-Komplex herausgelöst. Der Vorteil dieses Verfahrens ist, dass die Matrix fast vollständig entfernt werden kann.

Die eingedampften Toxine werden in mobiler Phase gelöst und auf die Säule aufgetragen. Die mobile Phase bestand für DON aus Methanol:Wasser:Acetonitril (9:82:9) und für ZEA aus Methanol:Wasser (65:35). Für die DON Analytik wurde eine Synergy polar reversed phase Säule von Phenomenex verwendet. Für die ZEA Analytik eine C18 reversed phase Bischoff Chromatographie Säule verwendet.

Natürlich kontaminierte Erzeugnisse sind generell schwieriger zu extrahieren als gespikete Proben. TRENHOLM et al. (1985) brauchten 16 Minuten um DON aus einer natürlich kontaminierten Probe komplett zu extrahieren. Im Vergleich dazu dauerte es für eine gespikete Probe nur drei Minuten. Ähnliches berichteten auch BENNETT und RICHARD (1993), die 1 Stunde brauchten, um die meisten Fumonisine aus einer natürlich kontaminierten Probe zu extrahieren.

Die Verfahren, die hauptsächlich für die Probenextraktion angewendet werden sind Flüssig-Flüssig-Teilung, Zugabe von Metallsalzen, Solidphasenextraktion, Säulenchromatographie, Gelpermeations - chromatographie, Immunoaffinitätssäulenchromatographie und multifunktionelle Clean-up Säulen.

Immunoaffinitätssäulen sind hoch spezifisch für die Clean-up Methode und weisen eine hohe Selektivität gegenüber den anderen Methoden, wie Flüssig-flüssig-Teilung und Solidphasenextraktion auf (GILBERT und ANKLAM, 2002, LARSEN et al., 2004).

IACs sind stabiler bei der Anwendung in verschiedenen Matrixen. Sie bieten die Möglichkeit große Mengen an Probenextrakten zu konzentrieren, eine hohe Sensitivität zu erreichen und erfordern im Umgang weniger Können und Erfahrung (GILBERT und ANKLAM, 2002).

BINDER et al. (2007) führten eine zweijährige Studie über die Mykotoxinbelastung von über 9000 Getreideproben und Futtermitteln mittels HPLC Methoden durch. Für die Bestimmung der Toxine Deoxynivalenol, Zearalenon und Aflatoxin B<sub>1</sub> wurden die Proben jeweils mit Mycosep®, für Ochratoxin A mit Ochra Star® Immunoaffinitätssäulen und zur Bestimmung der Fumonisine mit Multisep® Säulen vorgereinigt. Die Wiederfindungsrate und das Quantifizierungslimit lagen für DON bei 72 % und 50 µg/kg, für ZEA bei 100 % und 25 µg/kg, für Fumonisine bei 75 % und 70 – 90 µg/kg, für AFB<sub>1</sub> bei 80 % und 1 µg/kg und für OTA bei 85 % und 2 µg/kg.

RAZZAZI et al. (2001) verwendeten in ihrer Studie über OTA Gehalte in Heimtiernahrung und Hunde- und Katzennieren Ochraprep® Immunoaffinitätssäulen zur Vorreinigung. Das Detektionslimit der HPLC Analyse lag bei 0.1 µg/kg OTA.

Auch PÜHRINGER (2003) führte eine Untersuchung über OTA Gehalte in Katzenfuttermitteln und Katzennieren mittels einer HPLC Methode durch. Die Vorreinigung wurde mit RIDA® Ochratoxin A Säulen durchgeführt. Die Nachweisgrenze lag ebenfalls bei 0.1 µg/kg OTA, die Wiederfindungsrate bei 88 %.

SHARMA und MARQUEZ (2001) führten eine Untersuchung über den Aflatoxingehalt bei Hunde- und Katzenfuttermitteln durch. Die Proben wurden mit einer EAS1-EXTRACT™ Säule vorgereinigt und anschließend mittels HPLC die Gehalte gemessen. Die Detektionslimits lagen bei 3 – 7 ng/g. Die mittlere Wiederfindungsrate für AFB<sub>1</sub> lag bei 83 %.

Diese Resultate sind übereinstimmend mit den Resultaten von SCUDAMORE et al. (1998a, 1998b). Sie berichteten über Wiederfindungsraten für AFB<sub>1</sub> von 99 % bei Maisglutenproben, 81 % bei Maisprodukten und 84 % bei Reiskleiproben. Weiters erhielten sie bei ihrer HPLC Untersuchung für OTA Wiederfindungsraten von 78 – 90 %, für ZEA 79 – 89 %, für DON 72 – 80 % und für FB<sub>1</sub> 95 %.

Eine vergleichende Studie mehrerer Labors von OchraTest™ und OCHRAPREP® Säulen zur Bestimmung des Ochratoxin A Gehaltes in Weizen ergab eine durchschnittliche Wiederfindungsrate von 93 % für OchraTest™ und 91 % für OCHRAPREP®. Die Standardabweichung zwischen den einzelnen Labors war bei Verwendung der OchraTest™ Säulen höher, als bei den OCHRAPREP® Säulen (SCUDAMORE und MacDONALD, 1998).

Eine Studie mehrerer Labors bezog sich auf die Bestimmung von Deoxynivalenol in Weizenproben. Die Vorreinigung erfolgte mit multifunktionellen Clean-up Säulen und danach wurde eine HPLC Analyse angeschlossen. Die mobile Phase bestand aus Acetonitril:Methanol:Wasser (5:5:90) und der UV Detektor wurde auf eine Wellenlänge von 220 nm eingestellt. Die Detektiergrenze lag bei 0.05 mg/kg und die Wiederfindung bei 100 % (SUGITA-KONSIHI et al., 2006).

Um die Wiederfindungsrate zu ermitteln wurde im Rahmen dieser Arbeit DON in der Konzentration von 500 ng/g zu einer negativen Futtermittelprobe jeweils 2 Mal vor und nach dem Clean up mit den Immunoaffinitätssäulen hinzugefügt.

Bei der Zugabe von DON vor dem Clean up wurde eine Wiederfindungsrate von 96.3 %, nach dem Clean up von 103.8 % ermittelt.

Insgesamt ergibt sich ein durchschnittlicher Mittelwert aller Wiederfindungsraten von 100.05 %.

Bei der Validierung der HPLC Methode für ZEA wurden 2 Konzentrationen von 100 ng ZEA/g und 300 ng ZEA/g zu einer negativen Futtermittelprobe jeweils 2 Mal vor dem Clean up und 1 Mal nach dem Clean up mit den Immunoaffinitätssäulen hinzugefügt. Bei der Zugabe von ZEA vor dem Clean up wurde eine Wiederfindungsrate von 127.4 %, nach dem Clean up eine Wiederfindungsrate von 127.9 % ermittelt. Im Bereich von 300 ng ZEA/g vor dem Clean up ergab sich eine Wiederfindungsrate von 122.7 %, nach dem Clean up Wiederfindungsrate von 105.5 %.

Insgesamt ergibt sich ein durchschnittlicher Mittelwert aller Wiederfindungsraten von 120.9 %.

In meiner Untersuchung konnte für DON keine Korrelation zwischen ELISA und HPLC Analyse errechnet werden, da der ELISA Testkit Werte über 250 µg/kg nicht mehr angezeigt hat. Das Bestimmtheitsmaß für ZON (n = 22) beträgt 0.8777. Bei FUM wurde auf Grund der geringen Werte auf eine Berechnung der Korrelation verzichtet.

ELISA Methoden wurden für ein schnelles Screening oder eine schnelle Bestimmung von Mykotoxinen entwickelt. Sie sind selektiv, sensitiv, schnell, einfach hand zuhaben und das Clean up ist, wenn es überhaupt nötig ist, ein minimaler Aufwand. Wenn keine chromatographischen Instrumente zur Verfügung stehen sind ELISAs eine interessante Alternative für die Mykotoxindeterminierung.

Sie existieren in vielen verschiedenen Formen: Mikrowells, Röhrchen, Tassen, Karten und Teststreifen. Sie sind sensitiv, spezifisch, schnell, einfach handzuhaben und sollte ein Clean-up notwendig sein, ist dieses sehr einfach.

Zu den Leistungskriterien eines ELISAs zählen die Sensitivität für die Toxindetektion, Genauigkeit der Resultate, Präzision der Analyse und Reproduzierbarkeit.

Die Sensitivität eine ELISAs wird durch die Affinität der spezifischen Antikörper für das Mykotoxin, Experimentierfehler, z.B. Pipettierfehler, die Temperatur, das Detektionslevel des verwendeten Enzyms und die Inkubationszeit eingeschränkt.

Die Leistungscharakteristika der Spezifität und die Genauigkeit eines ELISA sind abhängig von den Kreuzreaktionen der Antikörper mit anderen mykotoxinähnlichen Metaboliten, nicht spezifischen Adsorptionen der Immunreagenzien zur soliden Phase, der Interferenz von Probenextrakten und dem Vorhandensein von Lipiden in den Probeextrakten (CANDLISH, 1991).

Im Vergleich zur HPLC Methode ist der ELISA Testkit eine nützliche und brauchbare Methode für das Screening von vielen Proben in einer relativ kurzen Zeit. Weitere Analysen z.B. mit einer HPLC Anlage sollten durchgeführt werden, um den genauen Gehalt der Toxine in den positiven Proben zu bestimmen.

Der Vorteil der Verwendung einer HPLC Anlage besteht in der niedrigen Nachweisgrenze, der hohen Sensitivität und der Reproduzierbarkeit.

Sie ist die am häufigsten verwendete chromatographische Methode für eine Vielzahl von Mykotoxinen (SCOTT et al., 1994, GILBERT 2002).

High Performance Liquid Chromatographie mit einer mobilen Phase von Methanol:Wasser (65:35) ist eine geeignete Methode für die Quantifizierung genauer ZEA Gehalte, sowie die HPLC Methode mit einer mobilen Phase von Acetonitril:Methanol:Wasser (9:9:82) eine geeignete Methode für die Bestimmung der DON Gehalte im Hundetrockenfutter ist.

## 4.2. Deoxynivalenol

Zwei Proben (3 %) der 76 mit ELISA untersuchten Hundetrockenfutter konnten als Deoxynivalenol negativ ( $< 25 \mu\text{g/kg}$ ) getestet werden. Die restlichen 74 Proben (97 %) wiesen Konzentrationen  $> 25 \mu\text{g/kg}$  auf.

Bei der anschließend durchgeführten HPLC Untersuchung von 29 Proben konnten 22 Proben (83 %) als positiv ( $> 25 \mu\text{g/kg}$ ) bewertet werden. Die höchste nachgewiesene Konzentration lag bei  $1386 \mu\text{g/kg}$ .

SONGSERMSAKUL et al. (2007) führten eine Untersuchung von DON in trockenem und feuchtem Hundefutter mittels ELISA durch. Insgesamt wurden 29 Trockenfutter und 11 Feuchtfutter untersucht. Alle 29 Trockenfutter waren mit DON in den Konzentrationen von  $22 - 1837 \mu\text{g/kg}$  kontaminiert. Drei Feuchtfutterproben wiesen Konzentrationen von  $95 - 170 \mu\text{g/kg}$  auf.

In einer weltweiten Untersuchung von Getreide wurde DON in 57 % der Weizenproben, 40 % der Maisproben, 68 % der Haferproben, 59 % der Gersteproben, 59 % der Roggenproben und 27 % der Reisproben analysiert. Aber auch in Weizen und Maisprodukten wie Mehl, Brot und Frühstückszerealien konnte DON nachgewiesen werden. Die Konzentrationen reichten bis zu  $30 \text{ mg/kg}$  (IPCS INCHEM, 2001a).

In Deutschland wurde eine Untersuchung von Getreide und Getreideprodukten auf das Vorkommen von 16 unterschiedlichen *Fusarium* Toxinen durchgeführt. 220 Proben wurden von 2000 bis 2001 gesammelt und getestet. Alle untersuchten Maisproben, Maisnebenprodukte, Maispflanzen und Maissilagen waren mit DON kontaminiert. Die höchsten nachgewiesenen Konzentrationen reichten bis  $3820 \mu\text{g/kg}$  in Mais,  $6682 \mu\text{g/kg}$  in Maisnebenprodukten und  $3944 \mu\text{g/kg}$  in Maissilagen. Weizen und Hafer waren zu 95 % bzw. zu 71 % mit DON kontaminiert (SCHOLLENBERGER et al., 2006).

Eine weltweite Untersuchung von Lebens- und Futtermitteln ergab, dass in Nordeuropa ungefähr 70 % der getesteten Proben DON mit einer Maximalkonzentration von  $5510 \mu\text{g/kg}$  enthalten. In den Proben aus Zentraleuropa lag der höchste nachgewiesene Wert bei  $8020 \mu\text{g/kg}$ . Hier waren 66 % der Proben mit DON kontaminiert. In Südeuropa und dem Mittelmeerbereich konnte in 52 % der Proben DON mit Konzentrationen bis zu  $3036 \mu\text{g/kg}$  nachgewiesen werden (BINDER et al., 2007).

Die Europäische Union hat einen Richtwert von maximal  $5 \text{ mg DON/kg}$  Heimtierfutter erstellt.

Fütterungsversuche bei Hunden zeigen, dass bereits eine Aufnahme von  $4 \text{ mg DON/kg}$  Futter zu ersten klinischen Symptomen wie Futterverweigerung und Gewichtsabnahme führen. Die Konzentrationen von  $8$  und  $10 \text{ mg DON/kg}$  Futter lösen Erbrechen aus (HUGHES et al., 1999, LEUNG und SMITH, 2006).

BÖHM und RAZZAZI-FAZELI (2003) konnten bei Verabreichung von 0.35 mg DON/kg KGW keine klinischen Symptome bei Ferkeln auslösen. Hingegen trat bei einem Fütterungsversuch von FORSYTH et al. (1977) bereits ab einer Dosis von 0.1 mg DON/kg KGW Erbrechen auf. Die niedrigste Dosis beim Schwein, die zu Erbrechen führte lag bei oraler Gabe bei 0.05 – 0.2 mg/kg KGW (SCF, 1999).

Aus den Angaben der Literatur über Deoxynivalenol fällt auf, dass sehr viel Getreide und sehr viele Getreideprodukte mit zum Teil sehr hohen Mengen an DON kontaminiert sind. Auch in der Untersuchung des Hundefutters von SONGSERMSAKUL et al. (2007) waren 100 % der Trockenfutterproben mit DON kontaminiert. Diese Angaben stimmen mit den Ergebnissen dieser Studie überein.

### 4.3. Zearalenon

Von 76 untersuchten Futterproben konnten 36 Proben (47 %) als positiv ( $> 25 \mu\text{g/kg}$ ) bewertet werden mit einer Höchstkonzentration von  $298 \mu\text{g/kg}$ . 22 der 76 Proben wurden weiter mit einer HPLC Methode untersucht. Bei der HPLC Untersuchung waren 15 Proben (68 %) Zearalenon positiv ( $> 20 \mu\text{g/kg}$ ). Die höchste nachgewiesene Konzentration lag bei  $549 \mu\text{g/kg}$ .

ZWIERZCHOWSKI et al. (2004) untersuchten 57 unterschiedliche Hundefutter (Standardfutter und Diätfutter) in Polen auf das Vorkommen von Zearalenon und dessen Derivate. ZEA wurde in 48 Proben (85.96 %) gefunden, mit einer mittleren Konzentration von  $36.18 \mu\text{g/kg}$ . Die höchste Konzentration im Standardfutter war  $299.5 \mu\text{g/kg}$ , im Diätfutter  $158 \mu\text{g/kg}$ .

Erst 2005 führten NURYONO et al. (2005) eine ELISA Untersuchung auf das Vorkommen von ZEA in indonesischen maishaltigen Lebens- und Futtermitteln durch. Die Resultate ergaben, dass 32 der 89 untersuchten Proben mit Zearalenon in den Konzentrationen von  $5.5 \mu\text{g/kg}$  bis  $526 \mu\text{g/kg}$  kontaminiert sind. In der Gruppe der selbstgemachten Lebensmitteln wies nur eine Probe Konzentrationen  $> 50 \mu\text{g/kg}$  auf. Die Kategorie des Geflügelfutters wies den höchsten Prozentsatz ( $> 85.7 \%$ ) an kontaminierten Proben auf. 32 Proben wurden mit einer HPLC Methode weiteruntersucht. 25 dieser Proben wiesen eine Zearalenon Kontamination von 6.9 bis  $589 \mu\text{g/kg}$  auf.

PLACINTA et al. (1999) berichteten über die weltweite Kontamination von Weizen, Hafer, Gerste, Roggen und Tierfutter in Bulgarien, Finnland, Deutschland, Niederlande, Norwegen und Polen mit Zearalenon. Die nachgewiesenen Konzentrationen reichten von 0 bis  $8000 \mu\text{g ZEA/kg}$ .

BINDER et al. (2007) führten erst kürzlich eine weltweite Untersuchung von Lebensmitteln, Futter und Futterinhaltsstoffen auf das Vorkommen der Mykotoxine DON, T-2 Toxin, ZEA, FB<sub>1</sub>, FB<sub>2</sub>, FB<sub>3</sub>, OTA und AFB<sub>1</sub> durch. 1507 Proben stammten aus dem europäischen und mediterranen Markt, 1291 aus der asiatisch-pazifischen Region. Über die Hälfte der europäischen Proben waren mit Mykotoxinen kontaminiert, wobei DON, ZEA und T-2 Toxin die häufigsten nachgewiesenen Toxine waren. Hingegen waren die asiatischen und pazifischen Proben hauptsächlich mit DON, ZEA, Fumonisin und Aflatoxinen kontaminiert. Von ihnen war ungefähr ein Drittel der Proben Mykotoxin positiv.

66 % der europäischen Proben waren mit DON kontaminiert. Der Mittelwert der Konzentrationen lag bei 571 µg/kg, die höchste nachgewiesene Konzentration bei 8020 µg/kg. Zearalenon konnte in fast der Hälfte der Proben nachgewiesen werden, wobei die höchste Zearalenon Konzentration von 1392 µg/kg in einem Maiskolben gefunden wurde. Ochratoxin A, Aflatoxin B<sub>1</sub> und Fumonisine konnten nur in 15, 8 und 1 Proben nachgewiesen werden.

1988 veröffentlichten TANAKA et al. (1988) einen Überblick über das Vorkommen von Zearalenon in 19 verschiedenen Ländern (inklusive Deutschland, Italien, Polen und England). Sie berichteten von einer Kontamination von Weizen, Gerste, Mais, Hafer, Sorghum, Roggen und Reis mit ZEA.

SCHOLLENBERGER et al. (2006) führten in Deutschland eine Untersuchung von Getreide und Getreideprodukten auf das Vorkommen von 16 unterschiedlichen *Fusarium* Toxinen durch. 220 Proben wurden von 2000 bis 2001 gesammelt und getestet. Alle untersuchten Maispflanzen und Maissilagen und 92 % der Maisprodukte waren mit Zearalenon kontaminiert. Die Konzentrationen reichten bis zu 533 µg/kg und 1790 µg/kg in den Maispflanzen und Maissilagen und 1362 µg/kg in den Maisprodukten. Weizen und Hafer waren zu 63 % bzw. 24 % mit ZEA kontaminiert.

Fütterungsversuche mit Zearalenon bei Hunden ergaben, dass bereits Konzentrationen von 25 bis 50 µg/kg KGW zu pathologischen Veränderungen an den Reproduktionsorganen, Immunsuppression und Veränderungen der Leberenzyme führen (GAJECKA et al., 2004b, 2007).

Schweine, denen 2 µg/kg KGW (= 50 µg/kg Futter) verabreicht wurde, zeigten erst im Laufe der 3. Woche erste klinische Symptome wie Rötung und Schwellung der Vulva. Bei Verabreichung von 10 µg/kg KGW (= 250 µg/kg Futter) kommt es bereits nach ein paar Tagen zu deutlichen östrogenen Erscheinungen und pathologischen Veränderungen an den Reproduktionsorganen (BAUER et al., 1987).

Der maximale Gehalt von Zearalenon im Futter für Haustiere ist in der Europäischen Union nicht geregelt. In Japan darf dieser den gesetzlich festgelegten Grenzwert von 1 mg/kg Futter nicht überschreiten.

Zearalenon ist eine sehr stabile Verbindung, die durch Lagerung, Mahlen, diversen Produktionsschritten und Kochen kaum zerstört werden kann. Dies könnte ein möglicher

Grund für die relativ häufige Kontamination unserer untersuchten Hundetrockenfutter sein. Nicht zu vergessen ist, dass Fusarientoxine in unseren Breitengraden optimale Bedingungen für das Wachstum und zur Produktion von Fusarientoxinen vorfinden.

Die Verwendung von nicht kontrolliertem Getreide für die Hundefutterproduktion könnte also eine weitere Ursache sein.

#### 4.4. Fumonisine

32 der 76 mit ELISA untersuchten Hundefutter (42 %) wiesen positive Fumonisin-Gehalte ( $> 50 \mu\text{g}/\text{kg}$ ) auf. Die höchste nachgewiesene Konzentration lag bei  $568 \mu\text{g}/\text{kg}$ . Drei dieser positiven Proben wurden weiter mit einer HPLC Methode untersucht. Hier lag die maximale Konzentration bei  $119.7 \mu\text{g}/\text{kg}$ .

Ergebnisse von Vergleichsstudien zeigen, dass die Korrelation zwischen den Ergebnissen von HPLC und ELISA für natürlich kontaminierte Proben zwischen 0.51 bis 0.97 liegt. Solche Vergleiche zeigen generell einen Trend, dass die „Total Fumonisin“ Konzentrationen gemessen mit ELISAs höher sind als jene, die mit einer HPLC Methode bestimmt werden. Mögliche Gründe dafür können die unterschiedliche Aufarbeitung der Proben (Lösungsmittel, Extraktionszeit, Mixintensität) sein oder aber auch den Fumonisinen ähnliche Verbindungen, die für den ELISA, aber nicht in der HPLC detektierbar sind (PESTKA et al., 1994, USLEBER et al., 1994, SYDENHAM et al, 1996a).

SCUDAMORE et al. (1997) untersuchten Hunde- und Katzenfutter und Futter für Wildvögel auf deren Fumonisin Kontamination. Fumonisine wurden in 30 % der 20 untersuchten Proben mit einem Höchstwert von  $750 \mu\text{g}/\text{kg}$  in einem Katzenfutter gefunden. Von diesen 20 Proben fielen 9 Proben auf Hundefutter. Nur 1 Hundefutterprobe wies einen positiven Fumonisingehalt auf.

Die Getreidesorte, die am häufigsten mit Fumonisinen kontaminiert ist, ist Mais.

DOKO und VISCONTI (1994) führten eine Untersuchung über den Fumonisin-Gehalt in Mais und Maisprodukten ( $n = 62$ ) in Italien durch. 94 % aller Proben wurden Fumonisin positiv getestet. Von den untersuchten Maisproben waren alle positiv, mit Konzentrationen bis zu  $5310 \mu\text{g}/\text{kg}$ . Die Maisprodukte wiesen Konzentrationen bis zu  $6100 \mu\text{g}/\text{kg}$  auf.

MURPHY et al. (1993) untersuchten 4 Jahre lang Mais und Maisprodukte in den USA. Mehr als die Hälfte der Proben enthielten Fumonisine.  $\text{FB}_1$  und  $\text{FB}_2$  Konzentrationen reichten von 0 –  $38 \text{ mg}/\text{kg}$  und von 0 –  $12 \text{ mg}/\text{kg}$ .

Auch in der Schweiz wurden Maisprodukte auf das Vorkommen von Fumonisinen getestet. Von 120 untersuchten Proben konnten 44 (36.7 %)  $\text{FB}_1$  positiv bewertet werden. Die

Konzentrationen reichten von 55 – 790 µg/kg. Die höchsten Konzentrationen wurden in Mais grit gefunden, gefolgt von Geflügelfutter (PITTET et al., 1992).

Erst kürzlich führten SILVA et al. (2007) Untersuchungen von portugiesischem Mais und Maisprodukten durch. Insgesamt wurden 67 Proben auf das Vorhandensein von Fumonisin getestet. In 15 Proben konnten Fumonisine nachgewiesen werden mit Konzentrationen von 113 bis 2026 µg/kg. Zwei dieser Proben wiesen höhere Fumonisin Konzentrationen auf, als das europäische Gesetz erlaubt.

Ab der Aufnahme von 1 mg Fumonisin/kg Futter kommt es bereits bei Schweinen zu subklinischen Veränderungen, wie Erhöhung vereinzelter Enzymwerte im Blut und Proliferation des pulmonalen Bindegewebes (ZOMBORSZKY-KOVÁCS et al., 2002a). Studien berichten, dass die Verabreichung von 16 mg FUM/kg KGW zum Tod der Schweine führt (COLVIN et al., 1993, HASCHEK et al., 2001).

Bei Pferden kann eine Leukoenzephalomalazie bereits ab Konzentrationen < 5 mg/kg Futter verursacht werden (HASCHEK et al., 2002).

Die hohen Konzentrationen von Fumonisin in den verarbeiteten und erhitzten Maisprodukten weisen auf die hohe Stabilität der Fumonisine gegenüber thermischen und physikalischen Einflüssen hin.

Hundefutter werden thermischen Behandlungen unterzogen. Die hohe Stabilität der Fumonisine gegenüber diversen Herstellungsprozessen könnte eine mögliche Erklärung dafür sein, dass bei dieser Untersuchung noch in 42 % der untersuchten Hundetrockenfutter Fumonisine nachgewiesen werden konnten.

Bis heute existieren keine Fütterungsversuche mit Fumonisin bei Hunden. Weiters existiert nur ein Richtwert bezüglich der Gehalte von Fumonisin im Futter für Haustiere. Dieser Richtwert beträgt 5 mg Fumonisin/kg Futter.

Wie aber Studien bei Schweinen und Pferden zeigen können Konzentrationen unter 1 mg/kg bzw. 5 mg/kg Futter subklinische Erkrankungen bzw. schwerwiegende Krankheiten auslösen. Schweine werden als die am empfindlichsten Tiere gegenüber Mykotoxinen angesehen. Hunde sind den Schweinen sehr ähnlich und mindestens genauso empfindlich, wenn nicht noch empfindlicher. Deshalb stellt sich hier die Frage ob dieser Richtwert nicht zu hoch angesetzt wurde.

#### 4.5. OTA

Von den 76 untersuchten Hundetrockenfuttermitteln konnten vier Proben (5%) als positiv bewertet werden. Die höchste nachgewiesene Konzentration betrug 4.7 µg OTA/kg.

SZECZECH et al (1973) beschrieben, dass es bei der Aufnahme von 0.2 – 3 mg OTA/kg Futter zu klinischen Erscheinungen bei Hunden kommt.

LITTLE et al. (1991) berichteten von einem klinischen Fall eines deutschen Schäferhundes mit einer skrotalen Dermatitis, akuter Leberentzündung und Cholestasis. Es wurde festgestellt, dass das aufgenommene Futter feucht und schimmelig war. Bei einer genaueren Untersuchung des Futters konnte *P. viridicatum* und neben anderen Mykotoxinen auch noch OTA in einer Konzentration von 100 µg/kg nachgewiesen werden.

SCUDAMORE et al. (1997) untersuchten Futtermittel für Katzen, Hunde und Wildvögel auf deren OTA Gehalt. In 10 % der Proben konnte OTA in niedrigen Konzentrationen nachgewiesen werden. Der höchste Gehalt war 7 µg/kg und wurde in einem Vogelfutter gefunden. Zwei Hundefutterproben enthielten geringe Mengen an OTA (1.3 µg/kg).

Auch RAZZAZI et al. (2001) untersuchten Trocken- und Feuchtfuttermittel für Hunde und Katzen. Von 2 Hundetrockenfuttern war eines mit weniger als 0.1 µg/kg und das andere mit 13.12 µg/kg belastet. Ebenso konnten beim Feuchtfutter 5 Proben als OTA negativ und 5 Proben als positiv bewertet werden.

PÜHRINGER (2003) testete 55 Katzenfuttermittel auf den OTA Gehalt. Von diesen 55 Katzenfuttermitteln entfielen 45 auf Feuchtfuttermittel und 10 auf Trockenfuttermittel. Von den insgesamt untersuchten Futtermitteln wiesen 14 einen positiven Gehalt im Bereich von 0.11 bis 2.17 µg OTA/kg auf. Sieben Feuchtfutter waren von 0.65 bis 2.33 µg OTA/kg kontaminiert und sieben von zehn Trockenfutter wiesen einen Gehalt von 0.31 bis 2.41 µg OTA/kg auf.

JORGENSEN et al. (1996) konnten einen Zusammenhang zwischen der OTA Kontamination des Getreides und dem OTA Gehalt der Nieren und Fleischproben bei Schlachtschweinen feststellen. Weiters wies er auch gleich auf die Wichtigkeit der klimatischen Bedingungen bei der Bildung von Mykotoxinen hin.

BAUER und GAREIS (1987) untersuchten über 5 Jahre Zerealien und Mischfutter auf das Vorkommen von OTA. OTA konnte in 984 Proben in 13 % nachgewiesen werden. Die Konzentrationen reichten von 0.1 bis 206 µg/kg.

In Italien untersuchten BERETTA et al. (2002) Babynahrung auf den OTA Gehalt. Insgesamt wurden 238 Proben, die auf unterschiedlichen Getreidesorten basierten untersucht. In 16.8 % der Proben (20) konnte OTA nachgewiesen werden. Davon enthielten 4 Proben OTA Konzentrationen über 0.5 µg/kg, dem maximal erlaubten Wert in Italien.

WOLFF und GAREIS (1999) führten von 1996 bis 1999 die weltweit größte Studie mit 7000 Proben über Ochratoxin A durch. 4004 Proben (57.2 %) konnten Ochratoxin A positiv bewertet werden. In 68.6 % der Getreideprodukte und in 50 % der getesteten Bier- und Weinproben wurde OTA gefunden. OTA Gehalte über 3 µg/kg wurden in 1.4 %, über 5 µg/kg in 0.8 % der Proben festgestellt.

Nicht nur pflanzliche, sondern auch tierische Produkte können eine OTA Kontamination aufweisen.

Die Verteilung von OTA im Körper erfolgt über Blut > Niere > Leber > Muskel > Fett. Die höchsten OTA Konzentrationen bei Schweinen können in der Niere und der Leber nachgewiesen werden (CURTUI et al., 2001).

JORGENSEN et al. (2002) fanden Konzentrationen von 0 – 2.9 µg/kg im Schweinefleisch.

CHIAVARO et al. (2002) konnten in den meisten Schinkenproben OTA Werte von weniger als 1.0 µg/kg nachweisen. Die höchste Konzentration betrug 2.3 µg/kg.

Die Organe oder das Muskelfleisch der Ruminantier enthalten keine OTA Rückstände, da OTA in den Vormägen mikrobiell zum OTα abgebaut wird.

Die meisten Hundefutter sind zusammengesetzt aus Fleisch und tierischen Nebenerzeugnissen, mindestens 4 % Getreide (Mais, Weizen), Ölen und Fetten, pflanzlichen Nebenerzeugnissen, pflanzlichen Eiweißextrakten, Mineralstoffen, Gemüse, Zucker und Fischen. Somit kann durch die Zugabe der Fleischprodukte oder der Getreideprodukte eine Kontamination mit OTA entstehen.

Ein möglicher Grund für die geringe Belastung in unseren Hundefutterproben könnte sein, dass das Getreide schon sehr streng aufgrund der äußerst toxischen Wirkung des Ochratoxin A auf eine Kontamination kontrolliert wird.

In dieser Studie wurde ausschließlich Hundetrockenfutter untersucht. Es besteht natürlich die Möglichkeit, dass bei der Untersuchung von Feuchtfutter eine weitaus größere Belastung mit OTA nachgewiesen werden kann.

#### **4.6. Aflatoxine**

In dieser Untersuchung konnten in keinem der 76 Hundetrockenfutter Aflatoxine nachgewiesen werden.

Hunde weisen wie Katzen, Schweine, Hasen und Enten eine hohe Anfälligkeit gegenüber Aflatoxinen auf. Der LD 50 Wert liegt bei 0.5 – 1 mg/kg KGW (NEWBERNE und BUTLER, 1969). Bei jungen Hunden kommt es sogar schon bei Verabreichung von 0.02 mg/kg KGW zu erheblichen Erkrankungen (KETTERER et al., 1975).

In der Geschichte treten immer wieder Berichte von Todesfällen bei Hunden in Zusammenhang mit Aflatoxinen auf, die verschimmelte Nahrung aufgenommen hatten. Drei Hunde starben nach dem Verzehr von schimmeligem Brot, das 6.7 mg Aflatoxin/kg Futter enthielt (KETTERER et al., 1975).

1984 kam es zu plötzlichen Todesfällen von Hunden in Südafrika. Die Untersuchung des Futters ergab eine Mykotoxinkontamination mit Aflatoxinen von 100 – 300 µg/kg (BASTIANELLO et al., 1987).

Erst 2006 wurde von 2 Todesfällen bei Hunden berichtet, die aflatoxinhaltiges Futter verzehrt hatten (STENSKE et al., 2006).

SCUDAMORE et al. (1997) führten eine Untersuchung über den Gehalt an Aflatoxinen im Hunde- und Katzenfutter und Futter für Wildvögel in England durch. Geringe Mengen an Aflatoxin B<sub>1</sub> enthielt ein Katzenfutter, eine Konzentration von 370 µg/kg wurde in Erdnüssen für Wildvögel gefunden.

SHARMA und MÁRQUEZ (2001) untersuchten 35 Hunde- und Katzenfutterproben in Mexiko. In 79 % der 19 untersuchten Hundefutter und in allen 16 Katzenfutterproben konnte Aflatoxin B<sub>1</sub> nachgewiesen werden. 6 Proben wiesen sehr hohe Aflatoxinkonzentrationen bis 59.7 µg/kg auf. Im Katzenfutter konnten höhere Gehalte an AFB<sub>1</sub> nachgewiesen werden als im Hundefutter.

Hunde-, Katzen- und Vogelfutter wurde auch in Brasilien auf Aflatoxine untersucht. AF wurde in 12 % der 100 untersuchten Proben in Konzentrationen zwischen 15 und 374 µg/kg gefunden. Fünf dieser 12 positiven Proben enthielten über 50 µg/kg Aflatoxin, überschritten somit das maximale Limit für Aflatoxin im Tierfutter in Brasilien. Alle Proben, die Erdnüsse enthielten konnten positiv auf Aflatoxin B<sub>1</sub> getestet werden (MAIA und BASTOS de SIQUEIRA, 2002).

Auch in der Türkei wurden 18 Hundefutter mittels ELISA auf das Vorkommen von Aflatoxinen getestet. Die nachgewiesenen Konzentrationen reichten von <1.75 bis 20 µg/kg. Drei dieser getesteten Proben überschritten das türkische Toleranzlimit von 10 µg/kg Aflatoxin in Lebensmitteln und Futtermitteln (GUNSEN und YAROGLU, 2002).

Aflatoxine werden nur unter bestimmten klimatischen Bedingungen, hauptsächlich in tropischen und subtropischen Gebieten gebildet. In unseren Breitengraden spielen sie deshalb nur eine untergeordnete Rolle. Dies könnte ein Grund dafür sein, dass in dieser Untersuchung kein Aflatoxin im Hundefutter nachgewiesen werden konnte. Eine weitere Möglichkeit ist, dass aufgrund der zahlreichen Todesfälle in der Geschichte das Toxizitätspotential der Aflatoxine ernst genommen wird und deshalb sehr strenge Getreidekontrollen durchgeführt werden. Dennoch sollte man die Gefahr der Aflatoxinkontamination vor allem durch importiertes Getreide und Erdnussprodukte nicht unterschätzen.

Zusammenfassend kann man feststellen, dass das Hundetrockenfutter hauptsächlich mit den Toxinen kontaminiert ist, die auch in unseren Breiten eine Rolle spielen und von Bedeutung sind. Fast das gesamte Hundetrockenfutter ist mit DON und nahezu die Hälfte aller Proben mit ZEA und Fumonisin kontaminiert.

Kein einziges Hundefutter war mit Aflatoxinen kontaminiert und die 4 Proben, in denen OTA nachgewiesen wurde, wiesen niedrige Konzentrationen auf.

Das Vorhandensein von Mais, Getreide und Getreideprodukten im Hundefutter ist möglicherweise die Hauptquelle der Mykotoxinkontamination.

Auf den Hundefutterverpackungen gibt es keine Informationen bezüglich der genauen Zusammensetzung (Getreide, innere Organe,...). Somit könnten alle diese Zutaten die Ursache der Kontamination sein. Dem Futtermittelgesetz zufolge müssen die Inhaltsstoffe beim Tierfutter in absteigender Reihenfolge angeführt sein (halboffene Deklaration). Ein möglicher Zusammenhang zwischen Toxinkontamination und Getreidgehalt könnte demnach nur berechnet werden, wenn der genaue prozentuelle Getreideanteil bekannt ist.

Bekannt ist aber, dass Trockenfutter mehr Getreideanteil besitzen als Feuchtfutter. Diverse Studien bewiesen, dass Trockenfutter stärker mit Mykotoxinen kontaminiert sind als Feuchtfutter, und lassen somit wieder darauf schließen, dass das Getreide die Ursache der Mykotoxinkontamination ist (RAZZAZI et al., 2001, PÜHRINGER, 2003, SONGSERMSAKUL et al., 2007).

Das Ausbrechen einer Krankheit oder die Beeinträchtigung des Gesundheitszustandes eines Tieres hängt von vielen Faktoren, wie zum Beispiel Alter, Geschlecht, Umgebung, Stress und Immunstatus ab. Natürlich kontaminiertes Futter enthält meistens nicht nur eines, sondern mehrere Toxine, die untereinander additive, potenzierende oder antagonistische Wirkungen haben können.

Im Europäischen Raum gibt es einen gesetzlich geregelten Grenzwert für das Auftreten von Mykotoxinen im Heimtierfutter. Dieser gilt für Aflatoxin B<sub>1</sub> und liegt bei 0.01 mg/kg Futter. Richtwerte von 5 mg/kg Futter existieren für Deoxynivalenol und Fumonisine. Für Zearalenon und Ochratoxin A gibt es keine Grenz- oder Richtwerte im Heimtierfutter.

Die Belastungen der Fusarientoxine DON und ZEA übersteigen in Einzelfällen die österreichischen Empfehlungen für Mast- und Zuchtschweine, nicht aber die EU Richtlinien, welche für Tierarten mit der größten Toleranz festgelegt wurden. Unserer Meinung nach sind sie inakzeptabel hoch für Haustiere ausgelegt.

Die gesundheitsrelevanten akuten Kurzzeitwirkungen sind ähnlich den Wirkungen beim Schwein, über die chronischen Langzeitwirkungen der Fusarientoxine beim langlebigen Hund ist man auf Hypothesen angewiesen.

Auf Grund dessen sind die derzeitigen Grenz- und Richtwerte nicht geeignet, weil eine Kombination verschiedener Mykotoxine ein nicht abschätzbares Risiko für die Gesundheit der Hunde darstellt. Daher sollten für Hundefutter Mykotoxingrenzwerte wie für Lebensmittel gelten.

Erwünschenswert und sinnvoll wären strengere Kontrollen auf Mykotoxine der Rohstoffe, die für die Tierfutterproduktion verwendet werden. Die Durchführung von Mykotoxin-Schnelltests bei dem Getreide und den Getreideprodukten, die zur Herstellung des Hundefutters verwendet werden ist eine schnelle und sichere Methode zum Ausschluss einer möglichen Mykotoxinkontamination.

ELISA Testkits, die relativ kostengünstig und einfach durchzuführen sind, sind für die orientierende Analyse von Mykotoxinen in Hundetrockenfuttern geeignet und können für die Kontrolle in den Hersteller- und Zulieferbetrieben empfohlen werden.

Generell sollte der Sicherheit des Tierfutters mehr Beachtung geschenkt werden.

## 5. ZUSAMMENFASSUNG

Im Rahmen einer Studie wurden insgesamt 76 Hundetrockenfuttermittel auf das Vorkommen der Mykotoxine Deoxynivalenol (DON), Zearalenon (ZEA), Fumonisine (FUM), Aflatoxine (AF) und Ochratoxin A (OTA) untersucht. Die Hundetrockenfutter unterschiedlicher Marken und Hersteller wurden in Ost-Österreich in verschiedenen Supermärkten, Drogerien und Fachmärkten für Heimtierfutter ausgewählt und gekauft.

Die quantitative Analyse der Proben (n = 76) wurde mit ELISA Testkits der Firma Neogen (Veratox®) durchgeführt. Die Detektionslimits für AF, OTA und FUM lagen bei 0,5, 1 und 50 µg/kg. Jene für DON und ZEA bei 10 µg/kg.

Im Anschluss daran wurde eine HPLC (High Performance Liquid Chromatograph) Methode in Kombination mit Immunoaffinitätssäulen durchgeführt. Die Immunoaffinitätssäulen dienten der Vorreinigung der Probenmatrix. Untersucht wurden negative Proben, Proben mit mittleren Konzentrationen und Proben mit sehr hohen Konzentrationen. Das Detektionslimit der HPLC Anlage war für ZEA 3 µg/kg, für DON 5 µg/kg und die Quantifizierungsgrenze lag für ZEA bei 20 µg/kg und für DON bei 25 µg/kg.

Die Ergebnisse zeigten, dass die meisten der fertig gekauften Hundetrockenfutter mit Mykotoxinen kontaminiert sind, die in Österreich und Europa eine Rolle spielen. DON war das Mykotoxin, das am häufigsten und mit den höchsten Konzentrationen nachgewiesen werden konnte.

Bei der ELISA Untersuchung konnten 74 von 76 getesteten Proben (97 %) als DON positiv bewertet werden. 36 Hundefutterproben (47 %) wurden ZEA positiv getestet mit Konzentrationen bis zu 298 µg/kg. Weiters konnten in 32 Proben (42 %) Fumonisine mit Werten bis zu 568 µg/kg nachgewiesen werden. Vier Proben zeigten eine Kontamination mit OTA, wobei der höchste Wert bei 4,7 µg/kg lag. In keiner der 76 Hundefutter konnten Aflatoxine nachgewiesen werden.

Die HPLC Untersuchung ergab, dass 24 von 29 getesteten Proben (83 %) DON Konzentrationen bis zu 1386 µg/kg aufwiesen. In 15 der 22 auf ZEA getesteten Hundefutter (68 %) konnten Konzentrationen bis 549 µg/kg nachgewiesen werden. Ein Vergleich der beiden Untersuchungsmethoden ergab ein Bestimmtheitsmaß ( $R^2$ ) von 0,88 für ZEA.

Drei Proben wurden auf FUM untersucht. Der höchste ermittelte Wert lag hier bei 119 µg/kg.

Keines der untersuchten Hundetrockenfutter überschritt den Grenzwert von 0,01 mg/kg für AFB<sub>1</sub> und die Richtwerte von 5 mg/kg für DON und FUM. Für die anderen untersuchten Mykotoxine existieren keine Grenz- oder Richtwerte für Heimtierfutter.

Diese Studie zeigte, dass die meisten Hundetrockenfutter mindestens mit einem Mykotoxin belastet sind, zum Teil in sehr hohen Konzentrationen (ELISA ZEA 298 µg/kg, FUM 568 µg/kg, HPLC DON 1386 µg/kg, ZEA 549 µg/kg).

Schlüsselwörter: Mykotoxine, Hundefutter, ELISA, HPLC

## 6. SUMMARY

The mycotoxin survey was undertaken to evaluate the levels of deoxynivalenole (DON), zearalenone (ZEA), fumonisins (FUM), aflatoxins (AF) and ochratoxin A (OTA) in dry dog foods. We bought 76 different dry dog foods from several producers, which were purchased from markets, supermarkets and special petfood markets in Austria.

Quantitative analysis was carried out on all samples (n=76) by the ELISA technique with the use of commercial kits (Veratox®, Neogen). The detection limits for AF, OTA and FUM were 0.5, 1 and 50 ppb. Those for DON and ZEA were 10 ppb.

Then the ELISA results were partially confirmed using a HPLC method in combination with an immuno-affinity column for clean-up. The HPLC detection limit for ZON was 3 ppb, for DON 5 ppb, limit of quantitation was 20 ppb for ZON and 25 ppb for DON.

The survey indicated that most of the bought dog foods are contaminated with the mycotoxins DON, ZEA and FUM, which play an important role in Austria and Europe. DON was the mycotoxin with the highest incidence and highest concentrations. 97 % (74 samples) of all samples tested of DON with ELISA were positive. There were 36 samples (47 %) with ZON contamination in the range of 0 – 298 ppb. 32 samples (42 %) were contaminated with FUM in concentrations up to 568 ppb.

4 samples (5 %) showed a contamination with OTA. The concentrations of these positive samples were neglectable (4.7 ppb). None of the samples could be tested positive for AF.

Using the HPLC method 24 of 29 tested samples (83 %) for DON were positive with concentrations up to 1386 ppb. 15 out of 22 samples (68 %) were tested positive for ZEA. The concentrations ranged from 0 – 549 ppb. A comparison of both methods revealed a correlation coefficient of 0.88 for ZEA.

Three samples showed concentrations up to 119 ppb FUM.

This study showed that most of the Austrian dog foods are contaminated with at least one mycotoxin especially DON, ZEA and FUM. Some samples showed high concentrations. Regulations and limitations about the concentrations of mycotoxins in dog foods within the EU are not existing.

Keywords: mycotoxins, petfoods for dogs, ELISA, HPLC

## 7. LITERATURVERZEICHNIS

ABOUZIED, M.M., HORVATH, A.D., PODLESNY, P.M., REGINA, N.P., METHODIEV, V.D., KAMENOVA-TOZEVA, N.D., NIAGOLOVA, N.D., STEIN, A.D., PETROPOULOS, E.A., GANEV, V.S. (2002): Ochratoxin A concentrations in food and feed from a region with Balkan Endemic Nephropathy. *Food Additives and Contaminants*, 19, 755 – 764

ADEJUMO, T.O., HETTWER, U., KARLOVSKY, P. (2007): Survey of maize from South-Western Nigeria for zearalenone,  $\alpha$  - and  $\beta$  -zearalenols, fumonisin B<sub>1</sub> and enniatins produced by *Fusarium* species. *Food Additives and Contaminants*, 24, 993 – 1000

ALBERTS, J.F., GELDERBLUM, W.C.A., THIEL, P.G., MARASAS, W.F.O., VanSCHALKWYK, D.J., BEHREND, Y. (1990): Effects of temperature and incubation period on production of fumonisin B<sub>1</sub> by *Fusarium moniliforme*. *Applied and Environmental Microbiology*, 56, 1729 – 1733

ALVA. Arbeitsgemeinschaft Landwirtschaftlicher Versuchsanstalten. Richtwerte für Mykotoxine im Futter. <http://www.ages.at/ages/ernaehrungssicherheit/rueckstaende-kontaminanten/mykotoxine/mykotoxine-hoechst-und-richtwerte/>

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

ASPLIN, F.D. und CARNAGHAN, R.B.A. (1961): The toxicity of certain groundnut meals for poultry with special reference to their effect on ducklings and chickens. *Veterinary Record*, 73, 1215 – 1219

BAILEY, W.S. und GROTH, A.H. (1959): The relationship of Hepatitis X of dogs and moldy corn poisoning of swine. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 134, 514 – 516

BASALAN, M., HISMIOGULLARI, S.E., HISMIOGULLARI, A.A., FILAZI, A. (2004): Fungi and aflatoxin B<sub>1</sub> in horse and dog feeds in Western Turkey. *Revue de Médecine Vétérinaire*, 156, 248 – 252

BASTIANELLO, S.S., NESBIT, J.W., WILLIAMS, M.C., LANGE, L. (1987): pathological findings in a natural outbreak of aflatoxicosis in dogs. *Onderstepoort Journal of Veterinary Research*, 54, 635 – 640

BAUER, J. und GAREIS, M. (1987): Ochratoxin A in der Nahrungsmittelkette. *Journal of Veterinary Medicine B*, 34, 613 – 627

- BAUER, J., HEINRITZI, K., GAREIS, M., GEDEK, B. (1987): Veränderungen am Genitaltrakt des weiblichen Schweines nach Verfütterung praxisrelevanter Zearalenonmengen. *Tierärztliche Praxis*, 15, 33 – 36
- BAYMANN, P., BAKER, J.L., DOSTER, M.A., MICHAILIDES, T.J., MAHONEY, N.E. (2002): Ochratoxin Production by the *Aspergillus ochraceus* Group and *Aspergillus alliaceus*. *Applied and Environmental Microbiology*, 68, 2326 – 2329
- BENNETT, G.A. und RICHARD, J.L. (1994): Liquid chromatographic method for analysis of the naphthalene dicarboxaldehyde derivative of fumonisins. *Journal of the Association of Analytical Chemists International*, 77, 501 – 506
- BENNETT, J.W. und KLICH, M. (2003): Mycotoxins. *Clinical Microbiology Reviews*, 16, 497 – 516
- BERETTA, B., De DOMENICO, R., GAIASCHI, A., BALLABIO, C., GALLI, C.L., GIGLIOTTI, C., RESTANI, P. (2002): Ochratoxin A in cereal-based baby foods: occurrence and safety evaluation. *Food Additives and Contaminants*, 19, 70 – 75
- BERGER, T., ESBENSHADE, K.L., DIEKMAN, M.A., HOAGLAND, T., TUIITE, J. (1981): Influence of prepubertal consumption of zearalenone on sexual development of boars. *Journal of Animal Science*, 53, 1559 – 1564
- BERGSJO, B., LANGSETH, W., NAFSTAD, I., HØGSET, J., LARSEN, H.J.S. (1993): The effects of naturally Deoxynivalenol-contaminated oats on the clinical condition, blood parameters, performance and carcass composition of growing pigs. *Veterinary Research Communications*, 17, 283 – 294
- BIEHL, M.L., PRELUSKY, D.B., KORITZ, G.D., HARTIN, K.E., BUCK, W.B., TRENHOLM, H.L. (1993): Biliary excretion and enterohepatic cycling of zearalenone in immature pigs. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 121, 152 – 159
- BILY, A.C., REID, L.M., SAVARD, M.E., REDDY, R., BLACKWELL, B.A., CAMPBELL, C.M., KRANTIS, A., DURST, T., PHILOGENE, B.J.R., ARNASON, J.T., REGNAUT-ROGER, C. (2004): Analysis of the *Fusarium Graminearum* mycotoxins in different biological matrices by LC/MS. *Mycopathologia*, 157, 117 – 126
- BINDER, E.M. (2007): Managing the risk of micotoxins in modern feed production. *Animal Feed Science and Technology*, 133, 149 – 166
- BINDER, E.M., TAN, L.M., CHIN, L.J., HANDL, J., RICHARD, J. (2007): Worldwide occurrence of mycotoxins in commodities, feeds and feed ingredients. *Animal Feed Science and Technology*, 137, 265 – 282

- BINGHAM, A.K., PHILLIPS, T.D., BAUER, J.E. (2003): Potential for dietary protection against the effects of aflatoxins in animals. *Journal of the Veterinary Medical Association*, 222, 591 – 596
- BINGHAM, A.K., HUEBNER, H.J., PHILLIPS, T.D., BAUER, J.E. (2004): Identification and reduction of urinary aflatoxin metabolites in dogs. *Food and Chemical Toxicology*, 42, 1851 – 1858
- BLANEY, B.J., BLOOMFIELD, R.C., MOORE, C.J. (1984): Zearalenone intoxication of pigs. *Australian Veterinary Journal*, 61, 24 – 27
- BLOT, William J. (1994): Esophageal cancer trends and risk factors. *Seminars in Oncology*, 4, 403 – 410
- BÖHM, J. (2006): Effects of mycotoxins in domestic pet species. In: *Recent Advances in Pet Nutrition*, LAUE, D.K. (Eds.), Nottingham University Press, 169 – 192
- BÖHM, J. und RAZZAZI-FAZELI, E. (2003): Fütterungseinfluss von Deoxynivalenol-belastetem Weizen bei Ferkeln. *Mycotoxin Research*, 19, 176 – 179
- BÖHM, J. und RAZZAZI-FAZELI, E. (2005): Effects of mycotoxins on domestic pet species. *The Mycotoxin Blue Book*, edited by Duarte Diaz, 77 – 92
- BUCCI, T.J., HANSEN, D.K., LaBORDE, J.B. (1996): Leukoencephalomalacia and hemorrhage in the brain of rabbits gavaged with mycotoxin fumonisin B<sub>1</sub>. *Natural Toxins*, 4, 51 – 52
- BUENO, D.J., SILVA, J.O., OLIVER, G. (2001): Mycoflora in commercial pet foods. *Journal of Food Protection*, 64, 741 – 743
- BULLERMAN, L.B. und TSAI, W-Y., (1994): Incidence and levels of *Fusarium moniliforme*, *Fusarium proliferatum* and fumonisins in corn and corn-based foods and feeds. *Journal of Food Protection*, 57, 541 – 546
- CALDWELL, R.W. und TUIITE, J. (1970): Zearalenone production in field corn in Indiana. *Phytopathology*, 60, 1615 – 1625
- CANADIAN FEEDS ACT AND REGULATIONS. 1983. Section 19, (1)i <http://laws.justice.gc.ca/en/showtdm/cr/SOR-83-593//?showtoc=&instrumentnumber=SOR-83-593>
- CANDLISH, A.A.G. (1991): The determination of mycotoxins in animal feeds by biological methods. In: Smith, J.E., Anderson, R.A. (Eds.), *Mycotoxins and Animal Foods*. CRC Press, Boca Raton, FL, 223 – 246

- CAST (Council of Agricultural Science and Technology) REPORT (2003): Mycotoxins: risk in plant, animal and human systems. Task Force Report 139
- CASTEEL, S.W., TURK, J.R., ROTTINGHAUS, G.E. (1994): Chronic effects of dietary fumonisin on the heart and pulmonary vasculature of swine. *Fundamental and Applied Toxicology*, 23, 518 – 524
- CASTELLA, G., BRAGULAT, M.R., CABANES, F.J. (1999): Surveillance of fumonisins in maize-based feeds and cereals from Spain. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 47, 4707 – 4710
- CHAFFEE, V.W., EDDS, G.T., HIMES, J.A., Neal, F.C. (1969): Aflatoxicosis in dogs. *American Journal of Veterinary Research*, 30, 1737 – 1749
- CHANG, K., KURTZ, H.J., MIROCHA, C.J. (1979): Effects of the mycotoxin Zearalenone on swine reproduction. *American Journal of Veterinary Research*, 40, 1260 – 1267
- CHENG, S.J., JIANG, Y.Z., LI, M.H., LO, H.Z. (1985): A mutagenic metabolite produced by *Fusarium moniliforme* isolated from Linxian County, China. *Carcinogenesis*, 6, 903 – 905
- CHIAVARO, E., LEPIANI, A., COLLA, F., BETTONI, P., PARI, E., SPOTTI, E. (2002): Ochratoxin A determination in ham by immunoaffinity clean-up and a quick fluorometric method. *Food Additives and Contaminants*, 19, 575 – 581
- CHRISTENSEN, C.M. (1979): Zearalenone. In: W. Shimoda (Ed.) Conference on mycotoxins in animal feeds and grains related to animal health, 35 – 45 , Food and Drug Administration, Rockville, MD.
- CHRISTENSEN, C.M., NELSON, G.H., MIROCHA, C.J. (1965): Effect on the white rat uterus of a toxic substance isolated from *Fusarium*. *Applied Microbiology*, 13, 653 – 659
- CHRISTENSEN, C.M., MIROCHA, C.J., NELSON, G.H., QUAST, J.F. (1972) : Effect on young swine of consumption of rations containing corn invaded by *Fusarium roseum*. *Applied Microbiology*, 23, 202
- CHU, F.S. und LI, G.Y. (1994): Simultaneous occurrence of Fumonisin B<sub>1</sub> and other mycotoxins in moldy corn collected from the people's Republic of China in regions with high incidences of esophageal cancer. *Applied and Environmental Microbiology*, 60, 847 – 852
- CHULZE, S.N., RAMIREZ, M.L., FARNOCHI, M.C., PASCALE, M., VISCONTI, A., MARCH, G. (1996): *Fusarium* and Fumonisin occurrence in Argentinian corn at different ear maturity stages. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 44, 2797 – 2801
- COLLINS, T.F.X., SHACKLEFORD, M.E., SPRANDO, R.L., BLACK, T.N., LaBORDE, J.B., HANSEN, D.K., EPPLEY, R.M., TRUCKSESS, M.W., HOWARD, P.C., BRYANT,

- M.A., RUGGLES, D.I., OLEJNIK, N., RORIE, J.I. (1998a): Effects of Fumonisin B<sub>1</sub> in pregnant rats. *Food and Chemical Toxicology*, 36, 397 – 408
- COLLINS, T.F.X., SHACKLEFORD, M.E., SPRANDO, R.L., BLACK, T.N., LaBORDE, J.B., HANSEN, D.K., EPPLEY, R.M., TRUCKSESS, M.W., HOWARD, P.C., BRYANT, M.A., RUGGLES, D.I., OLEJNIK, N., RORIE, J.I. (1998a): Effects of Fumonisin B<sub>1</sub> in pregnant rats. Part 2. *Food and Chemical Toxicology*, 36, 637 – 685
- COLVIN, B.M., COOLEY, A.J., BEAVER, R.W. (1993): Fumonisin toxicosis in swine: clinical and pathologic findings. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigations*, 5, 232 – 241
- CONSTABLE, P.D., SMITH, G.W., ROTTINGHAUS, G.E., HASCHEK, W.M. (2000): Ingestion of fumonisin B<sub>1</sub>-containing culture material decreases cardiac contractility and mechanical efficiency in swine. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 162, 151 – 160
- CONKOVA, E., LACIAKOVA, A., PASTOROVA, B., SEIDEL, H., KOVAC, G. (2001): The effect of zearalenone on some enzymatic parameters in rabbits. *Toxicology Letters*. 121, 145 – 149
- CURTUI, V.G., GAREIS, M., USLEBER, E., MÄRTLBAUER, E. (2001): Survey of Romanian slaughtered pigs for the occurrence of mycotoxins ochratoxins A and B, and zearalenone. *Food Additives and Contaminants*, 18, 730 – 738
- DÄNICKE, S., VALENTA, H., DÖLL, S. (2004): On the toxikokinetics and the metabolism of deoxynivalenol (DON) in the pig. *Archives of Animal Nutrition*, 58, 169 – 180
- DÄNICKE, S., SWIECH, E., BURACZEWSKA, L., UEBERSCHÄR, K.H. (2005): Kinetics and metabolism of zearalenone in young female pigs. *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition*, 89, 268 – 276
- DeBOSSCHERE, H., DUCATELLE, R., VERMEIRSCH, H., SIMOENS, P., CORYN, M. (2002a): Estrogen- $\alpha$  and progesterone receptor expression in cystic endometrial hyperplasia and pyometra in the bitch. *Animal Reproduction Science*, 70, 251 – 259
- DeBOSSCHERE, H., DUCATELLE, R., TSHAMALA, M., CORYN, M. (2002b): Changes in sex hormone receptors during administration of progesterone to prevent estrus in the bitch. *Theriogenology*, 58, 1209 – 1217
- DIEKMANN, M.A. und GREEN, M.L. (1992): Mycotoxins and Reproduction in domestic livestock. *Journal of Animal Science*, 70, 1615 – 1627
- DIERHEIMER, G. und CREPPY, E.E. (1991): Mechanism of action of Ochratoxin A. *IARC: Mycotoxins, Endemic Nephropathy and Urinary Tract Tumors*, 171 – 186
- DOKO, M.B. und VISCONTI, A. (1994): Occurrence of fumonisins B<sub>1</sub> and B<sub>2</sub> in corn and corn-based human foodstuffs in Italy. *Food Additives and Contaminants*, 11, 433 – 439

- DOKO, M.B., CANET, C., BROWN, N., SYDENHAM, E.W., MPUCHANE, S., SIAME, B.A. (1996): Natural co-occurrence of fumonisins and zearalenone in cereals and cereal-based foods from Eastern and Southern Africa. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 44, 3240 – 3242
- DÖLL, S., DÄNICKE, S., ÜBERSCHÄR, H.C., VALENTA, H., SCHNURRBUSCH, U., GANTER, M., KLOBASA, F., FLACHOWSKY, G. (2003a): Effects of graded levels of *Fusarium* toxin contaminated maize in diets for female weaned piglets. *Archives of Animal Nutrition*, 57, 311 – 334
- DÖLL, S., DÄNICKE, S., SCHNURRBUSCH, U. (2003b): The effect of increasing concentrations of *Fusarium* Toxins in the diets for piglets on histological parameters of the uterus. *Mycotoxin Research*, 19, 73 – 76
- DOMIJAN, A.M., PERAICA, M., JURJEVI, Z., IVIC, D., CVJETKOVIC, B. (2005a): Fumonisin B<sub>1</sub>, fumonisin B<sub>2</sub>, zearalenone and ochratoxin A contamination of maize in Croatia. *Food Additives and Contaminants*, 22, 677 – 680
- DOMIJAN, A.M., PERAICA, M., CVJETKOVIC, B., TURCIN, S., JURJEVIC, Z., IVIC, D. (2005b): Mould contamination and co-occurrence of mycotoxins in maize grain in Croatia. *Acta Pharmacologica*, 55, 349 – 356
- DROCHNER, W., GÖTZ, S., SCHOLLENBERGER, M., LAUBER, U., PIEPHO, H.-P., KLOBASA, F., WEILER, U. (2003): Einfluß niedriger DON-Belastungen auf den IgA-Blutspiegel beim wachsenden Schwein. Abstract des 25. Mykotoxin-Workshops, 19.- 21. Mai 2003, Giessen, S.12
- EDDS, G.T. (1973): Acute Aflatoxicosis: a review. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 162, 304 – 309
- EDWARDS, S., CANTLEY, T.C., DAY, B.N. (1987a): The effect of zearalenone on reproduction in swine. II. The effect of puberty attainment and postweaning rebreeding performance. *Theriogenology*, 28, 51 – 58
- EDWARDS, S., CANTLEY, T.C., ROTTINGHAUS, G.E., OSWEILER, G.D., DAY, B.N. (1987b): The effects of zearalenone on reproduction in swine. I. The relationship between ingested zearalenone dose and anestrus in non-pregnant, sexually mature gilts. *Theriogenology*, 28, 43 – 49
- EHC (ENVIRONMENTAL HEALTH CRITERIA) 219 (2000): Fumonisin B<sub>1</sub>. WHO (World Health Organisation, 2000, Genf
- ENONGENE, E.N., SHARMA, R.P, BHANDARI, N., VOSS, K.A., RILEY, R.T. (2000): Disruption of sphingolipid metabolism in small intestines, liver and kidney of mice dosed subcutaneously with fumonisin B<sub>1</sub>. *Food and Chemical Toxicology*, 38, 793 – 799

- ERIKSEN, G.S. (2003): Metabolism and Toxicity of Trichothecenes. Dissertation, Universität Uppsala, Schweden
- ETIENNE, M. und JEMMALI, M. (1982) : Effects of zearalenone (F2) on estrous activity and reproduction in gilts. *Journal of Animal Science*, 55, 1 – 10
- ERIKSEN, G.S. und PETTERSSON, H. (2004): Toxicological evaluation of trichothecenes in animal feed. *Animal Feed Science and Technology*, 114, 205 – 239
- EUROPEAN COMMISSION, EC (2004): Opinion on the scientific panel on contaminants in the food chain in a request from the commission related to zearalenone as undesirable substance in animal feed. *The EFSA Journal*, 89, 1 – 35
- (EFSA) EUROPEAN FOOD SAFETY AUTHORITY (2004a): Opinion of the Scientific Panel on Contaminants in Food Chain on a request from the Commission related to ochratoxin A (OTA) as undesirable substance in animal feed. *The EFSA Journal*, 101, 1 – 36 <http://www.efsa.eu.int>
- (EFSA) EUROPEAN FOOD SAFETY AUTHORITY (2004b): Opinion on the Scientific Panel on Contaminants in the Food Chain on a request from the Commission related to Aflatoxin B1 as undesirable substance in animal feed. *The EFSA Journal*, 39, 1 – 27 <http://www.esfa.eu.int>
- (EFSA) EUROPEAN FOOD SAFETY AUTHORITY (2005): Opinion of the Scientific Panel on Contaminants in Food Chain on a request from the Commission related to fumonisins as undesirable substance in animal feed. *The EFSA Journal*, 235, 1 – 32 <http://www.efsa.eu.int>
- EUROPEAN UNION (EU). COMMISSION DIRECTIVE 2003/100/EC of 31 October 2003 amending Annex I to Directive 2002/32/EC of the European Parliament and of the Council on undesirable substances in animal feed. *Official Journal of European Communities* 2003, L285, 33 – 37
- EUROPEAN UNION (EU). COMMISSION RECOMMENDATION 2006/576/EC of 17 August 2006 on the presence of deoxynivalenol, zearalenone, ochratoxin A, T-2 and HT-2 and fumonisins in products intended for animal feeding. *Official Journal of European Communities* 2003, L229, 7 – 9
- FACT SHEET AFLATOXINE (2003), Labor Spiez. <http://www.labor-spiez.ch/de/dok/fa/pdf/Aflatoxine.pdf>
- FAO (Food and Agriculture Organization of the United Nations) FOOD AND NUTRITION PAPER 81- Worldwide Regulations for Mycotoxins in Food and Feed in 2003; FAO: Rome, Italy, 2004; <http://www.fao.org/docrep/007/y5499e/y5499e00.htm>

- FARNWORTH, E.R. und TRENHOLM, H.L. (1983): The metabolism of the mycotoxin zearalenone and its effects on the reproductive tracts of young male and female pigs. *Canadian Journal of Animal Science*, 63, 967 – 975
- FAZEKAS, B., BAJMÓCY, E., GLÁVITS, R., FENYVESI, A., TANYI, J. (1998): Fumonisin B<sub>1</sub> contamination of maize and experimental acute fumonisin toxicosis in pigs. *Journal of Veterinary Medicine*, B 45, 171 – 181
- FINCHAM, J.E., MARASAS, W.F.O., TALJAARD, J.J.F., KRIEK, N.P.J., BADENHORST, C.J., GELDERBLOM, W.C.A., SEIER, J.V., SMUTS, C.M., FABER, M., WEIGHT, M.J., SLAZUS, W., WOODROOF, C.W., VanWYK, M.J., KRUGER, M., THIEL, P.G. (1992): Atherogenic effects in a non-human primate of *Fusarium moniliforme* cultures added to a carbohydrate diet. *Atherosclerosis*, 94, 13 – 25
- FLOWERS, B., CANTLEY, T., DAY, B.N. (1987): A comparison of effects of zearalenone and estradiol benzoate on reproductive function during the estrous cycle in gilts. *Journal of Animal Science*, 65, 1576 – 1584
- FOREMAN, J.H., CONSTABLE, P.D., WAGGONER, A.L., LEVY, M., EPPLEY, R.M., SMITH, G.W., TUMBLESON, M.E., HASCHEK, W.M. (2004): Neurologic abnormalities and cerebrospinal fluid changes in horses administered fumonisin B<sub>1</sub> intravenously, *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 18, 223 – 230
- FORSYTH, D.M., YOSHIZAWA, T., MOROOKA, N., TUIITE, J. (1977): Emetic and Refusal Activity of Deoxynivalenol to Swine *Applied and Environmental Microbiology*, 1977, 547 – 552
- FRANCESCHI, S., BIDOLI, E., BARON, A.E., LaVECCHIA, C. (1990): Maize and risk of cancers of the oral cavity, pharynx and esophagus in northeastern Italy. *Journal of National Cancer Institute*, 82, 1407 – 1411
- FRIEND, D.W., TRENHOLM, H.L., THOMPSON, B.K., FISER, P.S., HARTIN, K.E. (1986): Effect of feeding diets containing Deoxynivalenol (Vomitoxin)- contaminated wheat or corn on the feed consumption, weight gain, organ weight and sexual development of male and female pigs. *Canadian Journal of Animal Science*, 66, 765 – 775
- FUCHS, R. und PERAICA, M. (2005): Ochratoxin A in human kidney diseases. *Food Additives and Contaminants*, Supplement 1, 53 – 57
- GAJECKA, M., JAKIMIUK, E., POLAK, M., OTROCKA-DOMAGALA, I., JANOWSKI, T., ZWIERZCHOWSKI, W., OBREMSKI, K., ZIELONKA, L., APOZNANSKI, J., GAJECKI, M. (2004a): Zearalenone applied *per os* provides adverse effects in structure of chosen parts of bitch reproductive system. *Polish Journal of Veterinary Sciences*, 7, 59 – 66
- GAJECKA, M., JAKIMIUK, E., SKORSKA-WYSZYNSKA, E., ZIELONKA, L., POLAK, M., PALUSZEWSKI, A., RYBARCZYK, L., GAJECKI, M. (2004b): Influence of

zearalenone micotoxycosis on selected immunological, haematological and biochemical indexes of blood plasma in bitches. *Polish Journal of Veterinary Sciences*, 7, 175 – 180

GAJECKA, M., JANOWSKI, T., JAKIMIUK, E., POLAK, M., PODHALICZ-DZIEGIELEWSKA, M., ROTKIEWICZ, T., OTROCKA-DOMAGALA, I., OBREMSKI, K., ZIELONKA, L., GAJECKI, M. (2007): Histopathological and immunohistochemical examinations, and changes in proliferation activity of the uterus in bitches following zearalenone micotoxycosis. *Polish Journal of Veterinary Sciences*, 10, 143 – 151

GAJECKI, M., PRZYBYLOWICZ, M., ZIELONKA, L., ZWIERZCHOWSKI, W., OBREMSKI, K., SKORSKA-WYSZYNSKA, E., GAJECKA, M., POLAK, M., JAKIMIUK, E. (2004): Preliminary result of monitoring research on zearalenone presence in blood of woman with neoplastic lesions in reproductive system. *Polish Journal of Veterinary Medicine*, 7, 153 – 156

GALTIER, P., ALVINERIE, M., CHARPENTEAU, J.L. (1981): The pharmacokinetic profiles of ochratoxin A in pigs, rabbits and chickens. *Food and Cosmetics Toxicology*, 19, 735 – 738 (Abstract)

GAREIS, M., REUBEL, G., KRÖNIG, T., PORZIG, R. (1987): Ein Fall von infektiösem Welpensterben bei Afghanen in Verbindung mit der Verfütterung von Ochratoxin A – haltigem Milchpulver. *Tierärztliche Umschau*, 42, 77 – 80

GELDERBLOM, W.C.A., JASKIEWICZ, K., MARASAS W.F.O., THIEL, P.G., HORAK, R.M., VLEGGGAAR, R., KRIEK, N.P.J. (1988): Fumonisin – novel mycotoxins with cancer-promoting activity produced by *Fusarium moniliforme*. *Applied and Environmental Microbiology*, 54, 1806 – 1811

GELDERBLOM, W.C.A., KRIEK, N.P.J., MARASAS, W.F.O., FARBER, E. (1992): The cancer-initiating potential of fumonisin-B-mycotoxins. *Carcinogenesis*, 13, 433 – 437

GERSTEL aktuell (2006): Bevor Lebensmittel krank machen: Schnell Gewissheit über geringste Aflatoxinbelastungen, 18 – 20 [http://www.gerstel.de/aktuell\\_35\\_18\\_20.pdf](http://www.gerstel.de/aktuell_35_18_20.pdf)

GILBERT, J. und ANKLAM, E. (2002): Validation of analytical methods for determining mycotoxins in foodstuffs. *Trends in Analytical Chemistry*, 21, 468 – 486

GOYARTS, Tanja (2006): Effects of the *Fusarium* toxin deoxynivalenol (DON) on protein synthesis, immunological parameters and DON-kinetics in the pig. Dissertation. Tierärztliche Hochschule Hannover

GREENE, C.E., BARSANTI, J.A., JONES, BD (1977): Disseminated intravascular coagulation complicating aflatoxicosis in dogs. *The Cornell Veterinarian*, 67, 29 – 49

GROSSO, F., SAID, S., MABROUK, I., FREMY, J.M., CASTEGNARO, M., JEMMALI, M., DRAGACCI, A. (2003): New data on the occurrence of ochratoxin A in human sera from

- patients affected or not by renal diseases in Tunisia. *Food and Chemical Toxicology*, 41, 1133 – 1140
- GUMPRECHT, L.A., BEASLEY, V.R., WEIGEL, R.M., PARKER, H.M., TUMBLESON, M.E., BACON, C.W., MEREDITH, F.I., HASCHEK, W.M. (1998): Development of fumonisin-induced hepatotoxicity and pulmonary edema in orally dosed swine: Morphological and biochemical alterations. *Toxicologic Pathology*, 26, 777 – 788
- GUMPRECHT, L.A., SMITH, G.W., CONSTABLE, P.C., HASCHEK, W.M. (2001): Species and organ specificity of fumonisin-induced endothelial alterations: potential role in porcine pulmonary edema. *Toxicology*, 160, 71 – 79
- GUNSEN, U. und YAROGLU, T. (2002): Aflatoxin in dog and horse feeds in Turkey. *Veterinary and Human Toxicology*, 44, 113 – 114
- HÄGGBLUM, PER (1984) : Production of Ochratoxin A in Barley by *Aspergillus ochraceus* and *Penicillium viridicatum*: Effect of Fungal Growth, Time, Temperature, and Inoculum Size. *Applied and Environmental Microbiology*, 43, 1205 – 1207
- HAMMER, P., BLÜTHGEN, A., WALTE, H.G. (1996): Carry-over of fumonisin B<sub>1</sub> into the milk of lactating cows. *Milchwissenschaft*, 51, 691 – 695
- HARRISON, L.R., COLVIN, B.M., GREENE, J.T., NEWMAN, L.E., COLE, J.R. (1990): Pulmonary edema and hydrothorax in swine produced by fumonisin B<sub>1</sub>, a toxic metabolite of *Fusarium moniliforme*. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigations*, 2, 217 – 221
- HASCHEK, W.M., GUMPRECHT, L.A., SMITH, G.W., PARKER, H.M., BEASLEY, V.R., TUMBLESON, M.E. (1996): Effects of Fumonisin in swine. In: *Advances in swine biomedical research*, TUMBLESON, M.E. (Eds), Plenum Press, New York, 99 – 112
- HASCHEK, W.M., GUMPRECHT, L.A., SMITH, G., TUMBLESON, M.E., CONSTABLE, P.D. (2001): Fumonisin toxicosis in swine: an overview of porcine pulmonary edema and current perspectives. *Environmental Health Perspectives*, 109, Suppl. 2, 251 – 257
- HASCHEK, W.M., VOSS, K.A., BEASLEY, V.R. (2002): Selected mycotoxins affecting animal and human health. In: *Handbook of Toxicologic Pathology*, 2<sup>nd</sup> ed., Haschek, W.M., ROUSSEX, C.G., WALLIG, M.A. (Eds.). Academic Press New York, 645 – 698
- HENKE, S.E., GALLARDO, V.C., MARTINEZ, B., BALLEY, R. (2001): Survey of aflatoxin concentrations in wild bird seed purchased in Texas. *J Wildl Dis*, 37, 831 – 835
- HOCHSTEINER, W. und SCHUH, M. (2001): Zum Vorkommen der Fusarientoxine Desoxynivalenol und Zearalenon in österreichischen Futtermitteln im Zeitraum von 1995 bis 1999. *Deutsche Tierärztliche Wochenschrift*, 108, 19 – 23

- HOFFMANN, B. und SCHULER, G. (2000): Receptor blockers – general aspects with respect to their use in domestic animal reproduction. *Animal Reproduction Science*, 60-61, 295 – 312
- HOFFMANN, B., RIESENBECK, A., KLEIN, R. (1996): Reproductive endocrinology of bitches. *Animal Reproduction Science*, 42, 275 – 288
- HOPMANS, E.C. und MURPHY, P.A. (1993): Detection of fumonisins B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>, and B<sub>3</sub> and hydrolyzed fumonisin B<sub>1</sub> in corn-containing foods. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 41, 1655 – 1658
- HUGHES, D.M., GAHL, M.J., GRAHAM, C.H., GRIEB, S.L. (1999): Overt Signs of Toxicity to Dogs and Cats of Dietary Deoxynivalenol. *Journal of Animal Science*, 77, 693 – 700
- HULT, K., TEILING, A., GATENBECK, S., (1976): Degradation of Ochratoxin A by a Ruminant. *Applied and Environmental Microbiology*, 1976, 443 – 444
- HUSSEIN, S., BRASEL, J.M. (2001): Toxicity, metabolism and impact of mycotoxins on humans and animals. *Toxicology*, 167, 101 – 134
- IPCS (International Programme on Chemical Safety) INCHEM (2000): Zearalenone WHO Food Additives Series 44 <http://www.inchem.org/documents/jecfa/jecmono/v44jec14.htm>
- IPCS (International Programme on Chemical Safety) INCHEM (2001a): Deoxynivalenol JECFA (Joint Expert Committee on Food Additives), 47, 2001 <http://www.inchem.org/documents/jecfa/jecmono/v47je05.htm>
- IPCS (International Programme on Chemical Safety) INCHEM (2001b): Fumonisin JECFA (Joint Expert Committee on Food Additives), 47, 2001 <http://www.inchem.org/documents/jecfa/jecmono/v47je03.htm>
- IPCS (International Programme on Chemical Safety) INCHEM (2001c): Ochratoxin A JECFA (Joint Expert Committee on Food Additives), 47, 2001 <http://www.inchem.org/documents/jecfa/jecmono/v47je04.htm>
- IPCS (International Programme on Chemical Safety) INCHEM (2001d): Aflatoxin M<sub>1</sub> JECFA (Joint Expert Committee on Food Additives), 47, 2001 <http://www.inchem.org/documents/jecfa/jecmono/v47je04.htm>
- JACKSON, L.S., HLYWKA, J.J., SENTHIL, K.R., BULLERMAN, L.B., MUSSER, S.M. (1996a): Effects of time, temperature, and ph on the stability of fumonisin B<sub>1</sub> in an aqueous model system. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 44, 906 – 912

- JACKSON, L.S., HLYWKA, J.J., SENTHIL, K.R., BULLERMAN, L.B. (1996b): Effects of thermal processing on the stability of fumonisin B<sub>2</sub> in aqueous system. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 44, 1984 – 1987 (Fumonisin in Food)
- JACKSON, L.S., KATTA, S.K., FINGERHUT, D.D., DeVRIES, J.W., BULLERMAN, L.B. (1997): Effects of baking and frying on the fumonisin B<sub>1</sub> content of corn-based foods. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 45, 4800 – 4805
- JECFA (JOINT FAO/WHO EXPERT COMMITTEE ON FOOD ADDITIVES) (2001): 56. Report, Genf. [http://whqlibdoc.who.int/trs/WHO\\_TRS\\_906.pdf](http://whqlibdoc.who.int/trs/WHO_TRS_906.pdf)
- JORGENSEN, K. und PETERSEN, A. (2002): Content of ochratoxin A in paired kidney and meat samples from Danish slaughter pigs. *Food Additives and Contaminants*, 19, 562 – 567
- JORGENSEN, K., RASMUSSEN, G., THORUP, I. (1996): Ochratoxin A in Danish cereals 1986-1992 and daily intake by the Danish population. *Food Additives and Contaminants*, 13, 95 – 104
- JOSEPHS, R.D., SCHUHMACHER, R., KRASKA, R. (2001): International interlaboratory study for the determination of the *Fusarium* mycotoxins zearalenone and deoxynivalenol in agricultural commodities. *Food Additives and Contaminants*, 18, 417 – 430
- KELLERMAN, T.S., MARASAS, W.F.O., PIENAAR, J.G., NAUDE, T.W. (1972): A mycotoxicosis of equidae caused by *Fusarium moniliforme* Sheldon. A preliminary communication. *Onderstepoort Journal of Veterinary Research*, 39, 205 – 208
- KELLERMAN, T.S., MARASAS, W.F.O., THIEL, P.G., GELDERBLUM, W.C.A., CAWOOD, M., COETZER, J.A.W. (1990): Leukoencephalomalacia in two horses induced by oral dosing of fumonisin B<sub>1</sub>. *Onderstepoort Journal of Veterinary Research*, 57, 269 – 275
- KETTERER, P.J., WILLIAMS, E.S., BLANEY, B.J., CONNOLE, M.D. (1975): Canine Aflatoxicosis. *Australian Veterinary Journal*, 51, 355 – 357
- KIESSLING, K.H. und PETTERSSON, H. (1978): Metabolism of Zearalenone in rat liver. *Acta pharmacologica et toxicologica*, 43, 285 – 290
- KIESSLING, K.H., PETTERSSON, H., SANDHOLM, K., OLSEN, M. (1984): Metabolism of Aflatoxin, Ochratoxin, Zearalenon and Three Trichothecenes by Intact Rumen Fluid, Rumen Protozoa and Rumen Bacteria. *Applied and Environmental Microbiology*, 1984, 1070 – 1073
- KING, S.B. und SCOTT, G.E. (1981): Genotypic differences in maize to kernel infection by *Fusarium moniliforme*. *Phytopathology*, 71, 1245 – 1247
- KOLLARCZIK, B. (1990): Transformation von Mykotoxinen durch die Darmflora des Schweines. Dissertation, Tierärztliche Fakultät München

- KRIEK, N.P.J., KELLERMAN, T.S., MARASAS, W.F.O. (1981): A comparative study of the toxicity of *Fusarium verticilloides* (= *F. moniliforme*) to horses, primates, pigs, sheep and rats. Onderstepoort Journal of Veterinary Research, 48, 129 – 131
- KROGH, Palle (1976): Epidemiology of mycotoxic porcine nephropathy. Nordisk Veterinaermedicin, 28, 452 – 458
- KROGH, P. und ELLINGER, F. (1977): Mycotoxic Nephropathy. Veterinary Science Communications, 1, 51 – 63
- KUIPER, G.J.M., LEMMEN, J.G., CARLSSON, B., CORTON, J.C., SAFE, S.H., van der SAAG, P.T., van der BURG, B., GUSTAFSSON, J.A. (1998): Interaction of estrogenic chemicals and phytoestrogens with estrogen receptor  $\beta$ . Endocrinology, 139, 4252 – 4263
- KUIPER-GOODMAN, T., SCOTT, P.M., WATANABE, H. (1987): Risk assessment of the mycotoxin Zearalenone. Regulatory Toxicology and Pharmacology, 7, 253 – 306
- KULISEK, E.S. und HAZEBROEK, J.P. (2000): Comparison of extraction buffers for the detection of fumonisin B<sub>1</sub> in corn by immunoassay and high-performance liquid chromatography. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 48, 65 – 69
- KUMAGAI, S. (1985): Ochratoxin A: Plasma concentration and excretion into bile and urine in albumin-deficient rats. Food and Chemical Toxicology, 23, 941 – 943 (Abstract)
- KUMAGAI, S. und AIBARA, K. (1982): Intestinal absorption and secretion of ochratoxin A in mice. Toxicology and Applied Pharmacology, 64, 94 – 102 (Abstract)
- KURTZ, H.J., NAIRN, M.E., NELSON, G.H., CHRISTENSEN, C.M., MIROCHA, C.J. (1969): Histological changes in the genital tracts of swine fed estrogenic mycotoxin. American Journal of Veterinary Research, 30, 551 – 556
- LaBORDE, J.B., TERRY, K.K., HOWARD, P.C., CHEN, J.J., COLLINS, T.F.X., SHACKLEFORD, M.E., HANSEN, D.K. (1997) : Lack of embryotoxicity of Fumonisin B<sub>1</sub> in New Zealand White Rabbits. Fundamental and Applied Toxicology, 40, 120 – 128
- LARSEN, J.C., HUNT, J., PERRIN, I., RUCKENBAUER, P. (2004): Workshop on trichothecenes with a focus on DON: summary report. Toxicology Letters, 153, 1 – 22
- LAUBER, U., DILLENBURGER, T., DROCHNER, W. (2001): Distinct effects of equal levels of Fusarium toxins (Deoxynivalenol) in growing pigs. Possible reasons. Mycotoxin Research, 17, 53 – 57
- LEUNG, M.C.K und SMITH, T.K. (2006): Effects of feeding a blend of grains naturally contaminated with Fusarium mycotoxins on feed intake and body weight of mature Beagle

dogs. In: Alltech's 22nd International Feed Industry Symposium Lexington, Kentucky (April 23-26, 2006) <http://www.gate2biotech.com/alltechs-nd-international-feed-industry/>

LEUNG, M.C.K., DIAZ-LLANO, G., SMITH, T.K. (2006): Mycotoxins in Pet Food: A review on worldwide prevalence and preventative strategies. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54, 9623 – 9635

LEW, H. (1993): Die aktuelle Mykotoxinsituation in der heimischen Landwirtschaft. Veröff. Bundesanstalt für Agrarbiologie Linz/Donau, 21, 5 – 26

LI, F.Q., LUO, X.Y. und YOSHIZAWA, T. (1999): Mycotoxines (Trichothecenes, Zearalenon and Fumonisin) in Cereals Associated with Human Red-Mold Intoxications Stored Since 1989 and 1991 in China. *Natural Toxins*, 7, 93 – 97

LI, J-Y., ERSHOW, A.G., CHEN, Z-J., WACHOLDER, S., LI, G-Y., GUO, W., LI, B., BLOT, W.J. (1989): A case-control study of cancer of the esophagus and gastric cardia in Linxian. *International Journal of Cancer*, 43, 755 – 761

LI, S., MARQUARDT, R.R., FROHLICH, A.A., VITTI, T.G., CROW, G. (1997): Pharmacokinetics of Ochratoxin A and Its Metabolites in Rats. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 145, 82 – 90

LI, F.Q., LI, Y.W., LUO, X.Y., YOSHIZAWA, T. (2002): Fusarium toxins in wheat from an area in Henan Province, PR China, with a previous human red mold intoxication episode. *Food Additives and Contaminants*, 19, 163 – 167

LIGGETT, A.D., und COLVIN, B.M. (1986): Canine Aflatoxicosis: a continuing problem. *Veterinary Human Toxicology*, 28, 428 – 430

LITTLE, C.J.L., McNEIL, P.E., ROBB, J. (1991): Hepatopathy and dermatitis in a dog associated with ingestion of mycotoxins. *Journal of Small Animal Practice*, 32, 23 – 26

LUSKY, K., GÖBEL, R., TESCH, D., TENNER, G., HAIDER, W., KRÜGER, M., LIPPERT, A. (1998): Tiergesundheit und Rückstandsverhalten beim Schwein bei gleichzeitiger Aufnahme der Mykotoxine Ochratoxin A (OTA) und Deoxynivalenol (DON) über das Futter im 90 Tage Test. *Tierärztliche Umschau*, 53, 623 – 630

MAAROUFI, K., ACHOUR, A., HAMMAMI, M., EL MAY, M., BETBEDER, A.M., ELLOUZ, F., CREEPY, E.E., BACHA, H. (1995): Ochratoxin in human blood in relation to nephropathy in Tunisia. *Human and Experimental Toxicology*, 14, 609 – 614

MAAROUFI, K., CHEKIR, L., CREEPY, E.E., ELLOUZ, F., BACHA, H. (1996): Zearalenone induces modifications of haematological and biochemical parameters in rats. *Toxicon*, 55, 535 – 540

- MADHYASTA, M.S., MARQUARDT, R.R., FROHLICH, A.A. (1992): Hydrolysis of ochratoxin A by the microbial activity of digesta in the gastrointestinal tract of rats. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 23, 468 – 472
- MAIA, P.P. und BASTOS de SIQUEIRA, M.E.P. (2002) : Occurrence of aflatoxins B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>, G<sub>1</sub> and G<sub>2</sub> in some Brazilian pet foods. *Food Additives and Contaminants*, 19, 1180 – 1183
- MARASAS, W.F.O. (1991): Toxigenic Fusaria. In: Smith, J.E., Anderson, R.A. (Eds.), *Mycotoxins and Animal Foods*. CRC Press, Boca Raton, FL, 119 – 139
- MARASAS, W.F.O., KELLERMAN, T.S., PIENAAR, J.G., NAUDÉ, T.W. (1976): Leukoencephalomalacia: a mycotoxicosis of equidae caused by *Fusarium moniliforme* Sheldon. *Onderstepoort Journal of Veterinary Research*, 43, 113 – 122
- MARASAS, W.F.O., WEHNER, F.C., Van RENSBURG, S.J., Van SCHALKWYK, D.J. (1981): Mycoflora of corn produced in human esophageal cancer areas in Transkei, South Africa. *Phytopathology*, 71, 792 – 796
- MARASAS, W.F.O., KELLERMAN, T.S., GELDERBLUM, W.C.A., COETZER, J.A.W., THIEL, P.G., VAN DER LUGT, J.J. (1988): Leukoencephalomalacia in a horse induced by fumonisin B<sub>1</sub> isolated from *Fusarium moniliforme*. *Onderstepoort Journal of Veterinary Research*, 55, 197 – 203
- MARTINEZ-LARRANAGA, M.R., ANADON, A., DIAZ, M.J., FERNANDEZ-CRUZ, M.L., MARTINEZ, M.A., FREJO, M.T., MARTINEZ, M., FERNANDEZ, R., ANTON, R.M., MORALES, M.E., TAFUR, M. (1999): Toxicokinetics and oral bioavailability of Fumonisin B<sub>1</sub>. *Veterinary and Human Toxicology*, 41, 357 – 362
- McNUTT, S.H., PURWIN, P., MURRAY, C. (1928): Vulvovaginitis in Swine. *Journal of the American Veterinary and Medical Association*, 73, 484 – 492
- MIROCHA, J.C., CHRISTENSEN, C.M., NELSON, G.H. (1971): F-2 (zearalenone) estrogenic mycotoxin from *Fusarium*, In: *Microbial toxins*, vol. VII, KADIS S., CIEGLER A. und AJL S.J. (eds), Academic Press, New York, 107 – 138
- MIROCHA, C.J., PATHRE, S.V., ROBISON, T.S. (1981): Comparative metabolism of zearalenone and transmission into bovine milk. *Food and Cosmetics Toxicology*, 19, 25 – 30
- MOSS, Maurice (1996): Mode of formation of ochratoxin A. *Food Additives and Contaminants*, 13, Supplement, 5 – 9
- MURPHY, P.A., RICE, L.G., ROSS, P.F. (1993): Fumonisin B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>, and B<sub>3</sub> content of Iowa, Wisconsin, and Illinois corn and corn screenings. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 41, 263 – 266
- NEOGEN Technical Product Information (2006). Von Neogen direkt bezogen

- NELSON, G.H., CHRISTENSEN, C.M., MIROCHA, C.J. (1973): *Fusarium* and estrogenism in swine. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 163, 1276 – 1277
- NEWBERNE, J.W., BAILEY, W.S., SEIBOLD, H.R. (1955): Notes on a recent outbreak and experimental reproduction of Hepatitis X in dogs. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 127, 59 – 62
- NEWBERNE, P M., RUSSO, R., WOGAN, G.N. (1966): Acute toxicity of Aflatoxin B<sub>1</sub> in the dog. *Veterinary Pathology*, 3, 331 – 340
- NEWBERNE, P.M. und BUTLER, W.H. (1969): Acute and chronic effects of aflatoxin on the liver of domestic and laboratory animals: a review. *Cancer Research*, 29, 236 – 250
- NEWBERNE, Paul M. (1973): Chronic Aflatoxicosis. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 163, 1262 – 1267
- NORRED, W.P. und VOSS, K.A. (1994): Toxicity and role of fumonisins in animal disease and human esophageal cancer. *Journal of Food Protection*, 57, 522 – 527
- NURYONO, N., NOVIANDI, C.T., BÖHM, J., RAZZAZI-FAZELI, E. (2005): A limited survey of zearalenone in Indonesian maize-based food and feed by ELISA and high performance liquid chromatography. *Food Control*, 16, 65 – 71
- OLSEN, M., MALMLÖF, K., PETTERSSON, H., SANDHOLM, K., KIESSLING, K.H. (1985): Plasma and Urinary Levels of Zearalenone and  $\alpha$ -Zearalenone in a Prepubertal Gilt Fed Zearalenone. *Acta pharmacologica et toxicologica*, 56, 239 – 243
- OSWEILER, G.D. (1992): Mycotoxins. In: *Diseases of Swine*. LEMAN, A.D. et al. (Eds.), 735 – 743
- OSWEILER, G.D., ROSS, P.F., WILSON, T.M., NELSON, P.E., WITTE, S.T., CARSON, T.L., CARSON, T.L., RICE, L.G., NELSON, H.A. (1992): Characterization of an epizootic of pulmonary edema in swine associated with fumonisin in corn screenings. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigations*, 4, 53 – 59
- ÖZCELIK, N., KOSAR, A., SOYSAL, D. (2001): Ochratoxin A in human serum samples collected in Isparta-Turkey from healthy individuals and individuals suffering from different urinary disorders. *Toxicology Letters*, 121, 9 – 13
- PESTKA, J.J. (2003): Deoxynivalenol-induced IgA production and IgA nephropathy-aberrant mucosal immune response with systemin repercussions. *Toxicology Letters* 140-141, 287 – 295

- PESTKA, J.J. und ZHOU, H.R. (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 and Chemical Toxicology*, 40, 1623 – 1631
- PESTKA, J.J., AZCONA-OLIVERA, J.I., PLATTNER, R.D., MINERVINI, F., DOKO, M.B., VISCONTI, A. (1994): Comparative assessment of fumonisin in grain-based foods by ELISA, GC-MS, and HPLC. *Journal of Food Protection*, 57, 169 – 172
- PETKOVA-BOCHAROVA, T. und CASTEGNARO, M. (1985): Ochratoxin A contamination of cereals in an area of high incidence of Balkan endemic nephropathy in Bulgaria. *Food Additives and Contaminants*, 2, 267 – 270 (Abstract)
- PETZINGER, E. und ZIEGLER, K. (2000): Ochratoxin A from a toxicological perspective. *Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics*, 23, 91 – 98
- PFOHL-LESZKOWICZ, A. und MANDERVILLE, R.A. (2007): Ochratoxin A. An overview on toxicity and carcinogenicity in animals and humans. *Molecular Nutrition and Food Research*, 51, 61 – 99
- PFOHL-LESZKOWICZ, A., PETKOVA-BOCHAROVA, T., CHERNOZEMSKY, I.N., CASTEGNARO, M. (2002): Balkan endemic nephropathy and associated urinary tract tumours: a review on aetiological causes and the potential role of mycotoxins. *Food Additives and Contaminants*, 19, 282 – 302
- PILLAY, D., CHUTURGOON, A., NEVINES, E., MANICKUM, T., DEPPE, W., DUTTON, M. (2002): The quantitative analysis of zearalenone and its derivatives in plasma of patients with breast and cervical cancer. *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine*, 40, 946 – 951
- PITT, J.I., HOCKING, A.D., BHUDHASAMAI, K., MISCAMBE, B.F., WHEELER, K.A., TANBOON-EK, P. (1993): The normal mycoflora of commodities from Thailand: 1. Nuts and oilseeds. *International Journal of Food Microbiology*, 20, 211 – 226
- PITTET, A., PARISOD, V., SCHELLENBERG, M. (1992): Occurrence of fumonisins B<sub>1</sub> and B<sub>2</sub> in corn-based products from the Swiss market. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 40, 1352 – 1354
- PLACINTA, C.M., D'MELLO, J.P.F., MACDONALD, A.M.C. (1999): A review of worldwide contamination of cereal grains and animal feed with *Fusarium* mycotoxins. *Animal Feed Science and Technology*, 78, 21 – 37
- POLING, S.M. und PLATTNER, R.D. (1999): Rapid purification of fumonisins and their hydrolysis products with solid-phase extraction columns. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 47, 2344 – 2349

- PRELUSKY, D.B., HARTIN, K.E., TRENHOLM, H.L., MILLER, J.D. (1988): Pharmacokinetic fate of <sup>14</sup>C-labelled Deoxynivalenol in Swine. *Fundamental and Applied Toxicology*, 10, 276 – 286
- PRELUSKY, D.B., GERDES, R.G., UNDERHILL, K.L., ROTTER, B.A., JUI, P.Y., TRENHOLM, H.L. (1994a): Effects of Low Level Dietary Deoxynivalenol on Haematological and Clinical Parameters of the Pig. *Natural Toxins*, 2, 97 – 104
- PRELUSKY, D.B., TRENHOLM, H.L., SAVARD, M.E. (1994b): Pharmacokinetic fate of <sup>14</sup>C-labelled Fumonisin B<sub>1</sub> in swine. *Natural Toxins*, 2, 73 – 80
- PRELUSKY, D.B., SAVARD, M.E., TRENHOLM, H.L. (1995): Pilot study on the plasma pharmacokinetics of Fumonisin B<sub>1</sub> in cows following a single dose of oral gavage or intravenous administration. *Natural Toxins*, 3, 389 – 394
- PRELUSKY, D.B., MILLER, J.D., TRENHOLM, H.L. (1996): Disposition of <sup>14</sup>C-derived residues of pigs fed radiolabelled fumonisin B<sub>1</sub>. *Food Additives and Contaminants*, 13, 155 – 162
- PÜHRINGER, Sandra, (2003), Dissertation: Untersuchungen zum Vorkommen von Ochratoxin A in Katzennieren und Katzenfuttermitteln. Dissertation VU Wien
- PUNTARIC, D., BOSNIR, SMIT, Z., SKES, I., BAKLAIC (2001): Ochratoxin A in Corn and Wheat: Geographical Association with Endemic Nephropathy. *Croatian Medical Journal*, 42, 175 – 180
- PUSCHNER, Birgit (2002): Mycotoxins. *The Veterinary Clinics of Small Animal Practice* 32, 409 – 419
- RAINEY, M.R., TUBBS, R.C., BENNETT, L.W., COX, N.M. (1990): Prepubertal exposure to dietary zearalenone alters hypothalamo-hypophysial function but does not impair postpubertal reproductive function of gilts. *Journal of Animal Science*, 68, 2015 – 2022
- RAZZAZI-FAZELI, E., BÖHM, J., GRAJEWSKI, J., SZCZEPANIAK, K., KÜBBERHEISS, A.J., IBEN, C.H., (2001): Residues of ochratoxin A in pet foods, canine and feline kidneys. *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition*, 85, 212 – 216
- RAZZAZI-FAZELI, E., BÖHM, J., ADLER, A., ZENTEK, J. (2003): Fusarientoxine und ihre Bedeutung in der Nutztierfütterung: eine Übersicht. *Wiener Tierärztliche Monatsschrift* 90, 202 – 210
- RHEEDER, J.P., MARASAS, W.F.O., THIEL, P.G., SYDENHAM, E.W., SHEPHARD, G.S., VanSCHALKWYK, D.J. (1992): *Fusarium moniliforme* and fumonisins in corn in relation to human esophageal cancer in Transkei. *Phytopathology*, 82, 353 – 357

- RICE, L.G. und ROSS, P.F. (1994): Methods for Detection and Quantitation of Fumonisin in Corn, Cereal Products and Animal Excreta. *Journal of Food Protection*, 57, 536 – 540
- RILEY, R.T. (1998): Mechanistic interaction of mycotoxins: theoretical considerations. In: Sinha, K.K. und Bhatnagar, D. (Eds.) *Mycotoxins in Agriculture and Food Safety*. Marcel Dekker, New York, 227 – 253
- RINGOT, D., CHANGO, A., SCHNEIDER, Y.-J., LARONDELLE, Y. (2006): Toxicokinetics and toxicodynamics of ochratoxin A, an update. *Chemico-Biological Interactions*, 159, 18 – 46
- RODRIGUES, B.Á. und RODRIGUES, J.L. (2003) : Influence of reproductive status on in vitro oocyte maturation in dogs. *Theriogenology*, 60, 59 – 66
- ROSS, P.F., LEDET, A.E., OWENS, D.L., RICE, L.G., NELSON, H.A., OSWEILER, G.D., WILSON, T.M. (1993): Experimental equine leukoencephalomalacia, toxic hepatitis, and encephalopathy caused by corn naturally contaminated with fumonisins. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, 5, 69 – 74
- ROTTER, B.A., THOMPSON, B.K., LESSARD, M. (1995): Effects of deoxynivalenol-contaminated diet on performance and blood parameters in growing pigs. *Canadian Journal of Animal Science*, 75, 297 – 302
- SANCHIS, V., ABADIAS, M., ONCINS, L., SALA, N., VINAS, I., CANELA, R. (1995) : Fumonisin B1 and B2 and toxigenic *Fusarium* strains in feeds from the Spanish market. *International Journal of Food Microbiology*, 27, 37 – 44
- (SCF) SCIENTIFIC COMMITTEE ON FOOD OF THE EUROPEAN COMMISSION (1999): Opinion on *Fusarium* toxins. Part 1: Deoxynivalenol (DON), expressed on 2 December 1999 [http://europa.eu.int/comm/food/fs/sc/scf/out44\\_en.pdf](http://europa.eu.int/comm/food/fs/sc/scf/out44_en.pdf)
- SCHILTER, B., MARIN-KUAN, M., DELATOUR, T., NESTLER, S., MANTLE, P., CAVIN, C. (2005): Ochratoxin A: Potential epigenetic mechanism of toxicity and carcinogenicity. *Food Additives and Contaminants, Supplement 1*, 88 – 93
- SCHOLLENBERGER, M., MÜLLER, H.M., RÜFLE, M., SUCHY, S., PLANK, S., DROCHNER, W. (2006): Natural occurrence of 16 *Fusarium* toxins in grains and feedstuffs of plant origin from Germany. *Mycopathologia*, 161, 43 – 52
- SCHWADORF, K. (1995): Pilzbesatz und Mykotoxine in Futtermitteln. Dissertation, Universität Hohenheim
- SCOTT, P.M. (1993): Fumonisin. *International Journal of Microbiology*, 18, 257 – 270
- SCOTT, P.M. (1997): Multi-year monitoring of Canadian grains and grain based foods for trichothecenes and zearalenone. *Food Additives and Contaminants*, 14, 333 – 339

- SCOTT, P.M., DELGADO, T., PRELUSKY, D.B., TRENHOLM, H.L., MILLER, J.D. (1994): Determination of fumonisins in milk. *Journal of Environmental Science and Health*, B29, 989 – 998
- SCUDAMORE, K.A. und MacDONALD, S.J. (1998): A collaborative study of an HPLC method for determination of ochratoxin A in wheat using immunoaffinity column clean-up. *Food Additives and Contaminants*, 15, 401 – 410
- SCUDAMORE, K.A., HETMANSKI, M.T., NAWAZ, S., NAYLOR, J., RAINBIRD, S. (1997): Determination of mycotoxins in pet foods sold for domestic pets and wild birds using linked-column immunoassay clean-up and HPLC. *Food Additives and Contaminants*, 14, 175 – 186
- SCUDAMORE, K.A., NAWAZ, S., HETMANSKI, M.T. (1998a): Mycotoxins in ingredients of animal feeding stuffs: II. Determination of mycotoxins in maize and maize products. *Food Additives and Contaminants*, 15, 30 – 55
- SCUDAMORE, K.A., NAWAZ, S., HETMANSKI, M.T., RAINBIRD, S.C. (1998b): Mycotoxins in ingredients of animal feeding stuffs: III. Determination of mycotoxins in rice bran. *Food Additives and Contaminants*, 15, 185 – 194
- SEIBOLD, H.R. (1953): Hepatitis X in Dogs. *Veterinary Medicine*, 48, 242 – 243
- SEIBOLD, H.R. und BAILEY, W.S. (1952): An Epizootic of Hepatitis in the dog. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 121, 201 – 206
- SHARMA, M. und MÀRQUEZ, C. (2001): Determination of aflatoxins in domestic pet foods (dog and cat) using immunoaffinity column and HPLC. *Animal Feed Science and Technology* 93, 109 – 114
- SHARMA, V.D., WILSON, R.F., WILLIAMS, L.E. (1974): Reproductive performance of female swine fed corn naturally molded or inoculated with *Fusarium roseum*, Ohio isolates B and C. *Journal of Animal Science*, 38, 598 – 602
- SHEPHARD, G.S. und SNIJMAN, P.W. (1999): Elimination and excretion of a single dose of the mycotoxin Fumonisin B<sub>2</sub> in a non-human primate. *Food and Chemical Toxicology*, 37, 111 – 116
- SHEPHARD, G.S., THIEL, P.G., SYDENHAM, E.W. (1992): Initial studies on the toxicokinetics of Fumonisin B<sub>1</sub> in rats. *Food and Chemical Toxicology*, 30, 277 – 279
- SHEPHARD, G.S., THIEL, P.G., SYDENHAM, E.W., ALBERTS, J.F. (1994): Biliary excretion of the mycotoxin Fumonisin B<sub>1</sub> in rats. *Food and Chemical Toxicology*, 32, 489 – 491

- SHEPHARD, G.S., THIEL, P.G., SYDENHAM, E.W., SAVARD, M.E. (1995): Fate of a single dose of <sup>14</sup>C-labelled Fumonisin B<sub>1</sub> in vervet monkeys. *Natural Toxins*, 3, 145 – 150
- SHIER, W.T. (1998): Estrogenic mycotoxins. *Revue de Médecine Vétérinaire*, 149, 599 – 604
- SILVA, L.J.G., LINO, C.M., PENA, A., MOLTO, J.C. (2007): Occurrence of fumonisins B<sub>1</sub> and B<sub>2</sub> in Portuguese maize and maize-based foods intended for human consumption. *Food Additives and Contaminants*, 24, 381 – 190
- SMITH, G.W., CONSTABLE, P.D., BACON, C.W., MEREDITH, F.I., HASCHEK, W.M. (1996a): Cardiovascular effects of fumonisins in swine. *Fundamental and Applied Toxicology*, 31, 169 – 172
- SMITH, G.W., CONSTABLE, P.D., HASCHEK, W.M. (1996b): Cardiovascular response to short-term fumonisin exposure in swine. *Fundamental and Applied Toxicology*, 33, 140 – 148
- SMITH, G.W., CONSTABLE, P.D., TUMBLESON, M.E., ROTTINGHAUS, G.E., HASCHEK, W.M. (1999): Sequence of cardiovascular changes leading to pulmonary edema in swine fed culture material containing fumonisin. *American Journal of Veterinary Research*, 60, 1292 – 1300
- SMITH, G.W., CONSTABLE, P.D., FOREMAN, J.H., EPPLEY, R.M., WAGGONER, A.L., TUMBLESON, M.E., HASCHEK, W.M. (2002): Cardiovascular changes associated with intravenous administration of fumonisin B<sub>1</sub> in horses. *American Journal of Veterinary Research*, 63, 538 – 545
- SONGSERMSAKUL, P., RAZZAZI-FAZELI, E., BÖHM, J., ZENTEK, J. (2007): Occurrence of deoxynivalenol (DON) and ochratoxin A (OTA) in dog foods. *Mycotoxin Research*, 23, 65 – 67
- SPINDELBOCK, Bernd-Ulrich (2004): Untersuchung zum Vorkommen und zur Häufigkeit von Deoxynivalenol in Lebensmitteln. Dissertation, Tierärztliche Fakultät München
- SPOTTI, M., CALONI, F., FRACCHIOLLA, L., POMPA, G., VIGO, D., MAFFEO, G. (2001): Fumonisin B<sub>1</sub> carry-over into milk in the isolated perfused bovine udder. *Veterinary and Human Toxicology*, 43, 109 – 111
- SREEMANNARAYANA, O., FROHLICH, A.A., VITTI, T.G., MARQUARDT, R.R., ABRAMSON, D., PHILLIPS, G.D. (1988): Studies of the tolerance and disposition of ochratoxin A in young calves. *Journal of Animal Science*, 66, 1703 – 1711
- STACK, M.E. und EPPLEY, R.M. (1992): Liquid chromatographic determination of fumonisins B<sub>1</sub> and B<sub>2</sub> in corn and corn products. *Journal of AOAC International*, 75, 834 – 837

- STENSKE, K.A., SMITH, J.R., NEWMAN, S.J., NEWMAN, L.B., KIRK, C.A. (2006): Aflatoxicosis in dogs and dealing with suspected contaminated commercial foods. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 11, 1686 – 1691
- STOEV, S.D., VITANOV, S., ANGUELOV, G., PETKOVA-BORACHOVA, T., CREEPY, E.E. (2001): Experimental Mycotoxic Nephropathy in Pigs Provoked by a Diet Containing Ochratoxin A and Penicillic Acid. *Veterinary Research Communications*, 25, 205 – 223
- STOJKOVIC, R., HULT, K., GAMULIN, S., PLESTINA, R. (1984): High affinity binding of ochratoxin A to plasma constituents. *Biochemistry International*, 9, 33 – 38
- SUGITA-KONSIHI, Y., TANAKA, T., TABATA, S., NAKAJIMA, M., NOUNO, M., NAKAIE, Y., CHONAN, T., AOYAGI, M., KIBUNE, N., MIZUNO, K., ISHIKURO, E., KANAMARU, N., MINAMISAWA, M., AITA, N., KUSHIRO, M., TANAKA, K., TAKATORI, K. (2006): Validation of an HPLC analytical method coupled to a multifunctional clean-up column for the determination of deoxynivalenol. *Mycopathologia*, 161, 239 – 243
- SYDENHAM, E.W., GELDERBLOM, W.C.A., THIEL, P.G., MARASAS, W.F.O. (1990): Evidence for the natural occurrence of fumonisin B<sub>1</sub>, a mycotoxin produced by *Fusarium moniliforme*, in corn. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 38, 285 – 290
- SYDENHAM, E.W., SHEPHARD, G.S., THIEL, P.G., MARASAS, W.F.O., STOCKENSTROM, S. (1991): Fumonisin contamination of commercial corn-based human foodstuffs. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 39, 2014 – 2018
- SYDENHAM, E.W., SHEPHARD, G.S., THIEL, P.G., MARASAS, W.F.O., RHEEDER, J.P., SANHUEZA, C.E.P., GONZALEZ, H.H.L., RESNIK, S.L. (1993): Fumonisin in Argentinian field-trial corn. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 41, 891 – 895
- SYDENHAM, E.W., STOCKENSTRÖM, S., THIEL, P.G., RHEEDER, J.P., DOKO, M.B., BIRD, C., MILLER, B.M. (1996a): Polyclonal antibody-based ELISA and HPLC methods for the determination of fumonisins in corn: A comparative study. *Journal of Food Protection*, 59, 893 – 897
- SYDENHAM, E.W., SHEPHARD, G.S., THIEL, P.G., BIRD, C., MILLER, B.M. (1996b): Determination of fumonisins in corn: Evaluation of competitive immunoassay and HPLC techniques. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 44, 159 – 164
- SZCZECH, G.M., CARLTON, W.W., TUIITE, J. (1973a) : Ochratoxicosis in Beagle Dogs, I. Clinical and Clinicopathological Features. *Veterinary Pathology*, 10, 135 – 154
- SZCZECH, G.M., CARLTON, W.W., TUIITE, J. (1973b) : Ochratoxicosis in Beagle Dogs, II. Pathology. *Veterinary Pathology*, 10, 219 – 231

TANAKA, T., HASEGAWA, A., YAMAMOTO, S., LEE, U.-S., SUGIURA, Y., UENO, Y. (1988): Worldwide contamination of cereals by the Fusarium Mycotoxins Nivalenol, Deoxynivalenol and Zearalenon, 1. Survey of 19 Countries. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 36, 979 – 983

TAPIA, M.O. und SEAWRIGHT, A.A. (1984): Experimental ochratoxicosis A in pigs. *Australian Veterinary Journal*, 61, 219 – 222

TAPIA, M.O. und SEAWRIGHT, A.A. (1985): Experimental combined aflatoxin B<sub>1</sub> and ochratoxin A intoxication in pigs. *Australian Veterinary Journal*, 62, 33 – 37

THIEL, P.G., SHEPHARD, G.S., SYDENHAM, E.W., MARASAS, W.F.O., NELSON, P.E., WILSON, T.M. (1991): Levels of fumonisins B<sub>1</sub> and B<sub>2</sub> in feeds associated with confirmed cases of Equine Leukoencephalomalacia. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 39, 109 – 111

TRENHOLM, H.L., HAMILTON, R.M.G., FRIEND, D.W., THOMPSON, B.K., HARTIN, K.E. (1984): Freeding trials with vomitoxin (deoxynivalenol)-contaminated wheat: Effects on swine, poultry, and dairy cattle. *Journal of the American Veterinary Association*, 185, 527 – 531

TRENHOLM, H.L., WARNER, R.M., PRELUSKY, D.B. (1985): Assessment of extraction procedures in the analysis of naturally contaminated grain products for deoxynivalenol (vomitoxin). *Journal of the Association of Analytical Chemists*, 68, 645 – 649

U.S. FOOD AND DRUG ADMINISTRATION (FDA). Guidance for Industry: Fumonisin Levels in Human Foods and Animal Feeds; Washington, DC, Nov 6, 2001 <http://www.cfsan.fda.gov/~dms/fumongu2.html>

USLEBER, E., STRAKA, M., TERPLAN, G. (1994): Enzyme immunoassay for fumonisin B<sub>1</sub> applied to corn-based food. *Journal of Agricultural Food Chemistry*, 42, 1392 – 1396

VAN DER MERWE, K.J., STEYN, P.S., FOURIE, L., SCOTT, B., THERON, J.J. (1965): Ochratoxin A, a Toxic Metabolite produced by *Aspergillus ochraceus* Wilh. *Nature*, 205, 1112 – 1113

VÁNYI, A., SZÉKY, A. (1980): Fusariotoxicoses 6. The effect of F-2 toxin (zearalenone) on the spermatogenesis of male swine. *Magyar Állatorvosok Lapja*, 35, 242 – 246

VARGA, J., KEVEI, E., RINYU, E., TÉREN, J., KOZAKIEWICZ, Z. (1996): Ochratoxin Production by *Aspergillus* Species. *Applied and Environmental Microbiology*, 62, 4461 – 4464

VARGAS, L.A., PREIS, R.A., CASTRO, L., SILVA, C.M.G. (2001): Co-occurrence of aflatoxins B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>, G<sub>1</sub>, G<sub>2</sub>, zearalenone and fumonisin B<sub>1</sub> in Brazilian corn. *Food Additives and Contaminants*, 18, 981 – 986

- VESONDER, R.F., CIEGLER, A., JENSEN, A.H. (1973): Isolation of the emetic principle from *Fusarium*-infected corn. *Applied Microbiology*, 26, 1008 – 1010
- VISCONTI, A., DOKO, M.B., BOTTALICO, C., SCHURER, B., BOENKE, A. (1994): Stability of fumonisins (FB<sub>1</sub> and FB<sub>2</sub>) in solution. *Food Additives and Contaminants*, 11, 427 – 431
- VISCONTI, A., BOENKE, A., DOKO, B., SOLFRIZZO, M., PASCALE, M. (1995): Occurrence of fumonisins in Europe and the BCR – Measurements and Testing Projects. *Natural Toxins*, 3, 269 – 274
- VOSS, K.A., BACON, C.W., NORRED, W.P., CHAPIN, R.E., CHAMBERLAIN, W.J., PLATTNER, R.D., MEREDITH, F.I. (1996a): Studies on the reproductive effects of *Fusarium moniliforme* culture material in rats and the biodistribution of [<sup>14</sup>C] Fumonisin B<sub>1</sub> in pregnant rats, *Natural Toxins*, 4, 24 – 33
- VOSS, K.A., RILEY, R.T., BACON, C.W., CHAMBERLAIN, W.J., NORRED, W.P. (1996b): Subchronic toxic effects of *Fusarium moniliforme* and fumonisin B<sub>1</sub> in rats and mice. *Natural Toxins*, 4, 16 – 23
- VUDATHALA, D.K., PRELUSKY, D.B., AYROUD, M., TRENHOLM, H.L., MILLER, J.D. (1994): Pharmacokinetic fate and pathological effects of <sup>14</sup>C-Fumonisin B<sub>1</sub> in laying hens. *Natural Toxins*, 2, 81 – 88
- WEIDENBÖRNER, MARTIN (2001): *Encyclopedia of Food Mycotoxins*, S.11 – 16
- WHO-IPCS (World Health Organization – International Program on Chemical Safety) (2000): Fumonisin B<sub>1</sub>. *Environmental Health Criteria* 219. World Health Organization <http://www.inchem.org/documents/ehc/ehc/ehc219.htm>.
- WILSON, B.J. und MARONPOT, R.R. (1971): Causative fungus agent of leukoencephalomalacia in equine animals. *The Veterinary Record*, 484 – 486
- WOGAN, G.N., EDWARDS, G.S., SHANK, R.C. (1967): Excretion and Tissue Distribution of Radioactivity from Aflatoxin B<sub>1</sub>-<sup>14</sup>C in Rats. *Cancer Research*, 27, 1729 – 1736
- WOLFF, J. und GAREIS, M. (1999): Ochratoxin A in Lebensmitteln und Belastung des Verbrauchers. Ein Bericht über eine bundesweite Studie. *Forschungsreport*, 2, 14 – 18 [http://www.bmvel-forschung.de/FORSCHUNGSREPORTRESSORT/DDD/T1\\_99\\_1255.pdf](http://www.bmvel-forschung.de/FORSCHUNGSREPORTRESSORT/DDD/T1_99_1255.pdf)
- WOLFF-HALL, C.E. (1999): Stability of Deoxynivalenol in heat-treated foods. *Journal of Food Protection*, 62, 962 – 964

- XU, Y.C., ZHANG, G.S., CHU, F.S. (1988): Enzyme-linked immunosorbent assay for deoxynivalenol in corn and wheat. *Journal of the Association of Analytical Chemists*, 71, 945 – 949
- YANG, C.S. (1980): Research on esophageal cancer in China: a review. *Cancer Research*, 40, 2633 – 2644
- YOSHIZAWA, T. (1991): Natural occurrence of mycotoxins in small grain cereals (wheat, barley, rye, oats, sorghum, millet, rice). In: Smith, J.E.; Henderson, R.S. (Eds.), *Mycotoxins and Animal Foods*. CRC Press, Boca Raton, FL, 301 – 324
- YOSHIZAWA, T. und YAMASHITA, LUO, Y. (1994): Fumonisin occurrence in corn from high- and low risk areas for human esophageal cancer in China. *Applied and Environmental Microbiology*, 60, 1626 – 1629
- YOUNG, L.G., VESONDER, R.F., FUNNELL, H.S., SIMONS, I., WILCOCK, B. (1981): Moldy corn in diets of swine. *Journal of Animal Science*, 52, 1312 – 1318
- YOUNG, L.G., MCGIRR, L., VALLI, V.E., LUMSDEN, J.H., LUN, A. (1983): Vomitoxin in corn fed to young pigs. *Journal of Animal Science*, 57, 655 – 664
- ZEPNIK, H., VÖLKELE, W., DEKANT, W. (2003): Toxicokinetics of the mycotoxin ochratoxin A in F344 rats after oral administration. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 192, 36 – 44
- ZINEDINE, A., SORIANO, J.M., MOLTÓ, J.C., MANES, J. (2007): Review on the toxicity, occurrence, metabolism, detoxification, regulations and intake of zearalenone: An oestrogenic mycotoxin. *Food and Chemical Toxicology*, 45, 1 – 18
- ZOMBORSZKY-KOVÁCS, M., KOVÁCS, F., HORN, P., VETÉSI, F., REPA, I., TORNAYOS, G., TÓTH, Á. (2002a): Investigations into the time- and dose-dependent effect of fumonisin B<sub>1</sub> in order to determine tolerable limit values in pigs. *Livestock Production Science*, 76, 251 – 256
- ZOMBORSZKY-KOVÁCS, M., VETÉSI, F., HORN, P., REPA, I., KOVÁCS, F. (2002b): Effects of prolonged exposure to low-dose fumonisin B<sub>1</sub> in pigs. *Journal of Veterinary medicine B*, 49, 197 – 201
- ZWIERZCHOWSKI, W., GAJECKI, M., OBREMSKI, K., ZIELONKA, L., BARANOWSKI, M. (2004): The occurrence of zearalenone and its derivatives in standard and therapeutic feeds for companion animals. *Polish Journal of Veterinary Sciences*, 7, 289 – 293

## 8. ANHANG

### 8.1. Übersicht über die Probennummerierung

Probennummer	Bezeichnung	Ablaufdatum	Chargennummer
1	PEDIGREE PAL Junior Complete Huhn+Reis	19.01.2007	
2	PEDIGREE PAL Adult Complete Geflügel	12.04.2007	KHU05 100034
3	PURINA – MATZINGER Vollkornflocken mit Gemüse	Dez.07	DENW100078 6346 0695 DJ12:18
4	PURINA – MATZINGER 5 Korn Flocken kernig-kraftig	Nov.07	DENW100078 6326 0695 DJ10:26
5	SELECT GOLD Adult Pute	12.02.2007	F
6	SELECT GOLD Adult Chicken	29.06.2007	F
7	PEDIGREE PAL Adult Mini Geflügel, Gemüse, Reis	Jul.07	MN119 P5298 L5 GB888E0001
8	RUPP Hundeflocken +Fleisch+Gemüse	Jän.08	L31
9	RUPP Vollkorn Hundeflocken +Gemüse	17.08.2008	L008
10	BERO Hunde Vollnahrung	21.09.2007	B.Nr.AT9002 Art.Nr.BK01
11	BERO Vollkorn Hundeflocken	21.11.2007	B.Nr.AT9002 Art.Nr.BK01
12	NUTRO CHOICE Adult Lamm+Reis	13.12.2007	CHPF0024 1H-61153-80
13	PERFECT FIT In Home	10.02.2008	DENW100400 D22:27 L2
14	HAPPY DOG Natur Croq Original	08.06.2007	
15	SCHLECKER Genießer Menü	11.07.2008	011 DEBW 127001
16	HOFER Maximus	21.08.2008	052 DEBW 127001
17	LIDL Optidog High Premium	26.01.2009	397487 FNNL93128 MORH AT08.03

18	FROLIC Complete	15.06.2008	21141512 DENI 361001
19	PURINA ONE Adult Huhn+Reis	Apr.08	IT000001VE 62840923H 02:13
20	QUALITY LINE Mix Menü	20.06.2008	3541723
21	QUALITY FIRST Verwöhn Menü	23.08.2008	L0009
22	RISO BELL	12.08.2008	
23	PREMIUM BELCANDO Senior Light	Mai.07	123. HV001-D05-02
24	BOZITA		
25	MARKUS MÜHLE Natur Nah Futter		
26	ANIFIT Flocken	Dez.07	348 DENW 100045
27	ROYAL CANIN Minidogs Mature	20.06.2007	186280T 185.1
28	ROYAL CANIN Minidogs Junior	15.06.2007	0929P06 FR59-517-01
29	ROYAL CANIN Minidogs Adult	19.10.2007	0431P06 FR59-517-01 (06291031)
30	ROYAL CANIN Medium Mature	24.07.2007	0416P06 FR59-517-01 (06205008)
31	ROYAL CANIN Medium Junior	14.10.2007	2326P06 FR59-517-01 (06287092)
32	ROYAL CANIN Medium Sensible	17.10.2007	1034P06 FR59-517-01 (06290028)
33	ROYAL CANIN Maxi Babydog ultrasensibel	15.10.2007	1649P06 FR59-517-01 (06288038)
34	ROYAL CANIN Maxi Junior	03.10.2007	1931P06 FR59-517-01 (06276025)
35	ROYAL CANIN Maxi Adult	21.08.2007	0827P06 FR59-517-01 (06233021)
36	ROYAL CANIN Maxi Sensible	12.05.2007	0415P06 FR59-517-01 (06131061)
37	ROYAL CANIN Labrador Retriever	08.11.2007	1919P06 FR59-517-01 (06312056)
38	SCIENCE PLAN Puppy Lamb & Rice	Jän. 08	S 0729 9670B (060214)

39	SCIENCE PLAN Adult Chicken	Jän.07	S 1319 9674B (060201)
40	SCIENCE PLAN Senior Large Breed	Aug.07	S 1339 9427B (060210)
41	SCIENCE PLAN NATURES BEST Puppy Mini/Medium	Feb.08	S 2319 4975B (060283)
42	SCIENCE PLAN NATURES BEST Adult Mini/Medium	Feb.08	S 0539 4973B (060281)
43	BIOMILL Junior Medium	14.12.2007	CHPF 02/37
44	BIOMILL Adult Medium	11.01.2008	CHPF 02/41
45	EUKANUBA Puppy + Junior all Breeds	04.07.2007	60634702A2 NL19222A
46	EUKANUBA Puppy + Junior Medium	01.11.2007	61824702A1 NL19222A
47	EUKANUBA Adult Medium	23.05.2007	60234702A5 NL19222A
48	EUKANUBA Intestinal	29.02.2008	63044702C2 NL19222B
49	EUKANUBA Dermatosis FP	28.02.2008	63014702C4 NL19222B C312
50	EUKANUBA Restricted Calorie	13.01.2008	62564702C1 NL19222B C305
51	EUKANUBA Sensitive Skin	28.01.2008	62714702C4 NL19222A C320
52	EUKANUBA Sensitive Digestion	29.02.2008	63024702C5 NL19222A
53	HAPPY DOG Junior Croq	04.09.2007	
54	CHAPPI Complete Geflügel,Gemüse,Getreide		
55	RUPP Brocken + Rind	30.04.2008	303 14:47
56	AS SCHLECKER Aktiv Crox	26.07.2008	389121 NL93128 01:08:02/029
57	PURINA BENEFUL Rind, Getreide, Vitamine, Gemüse	Mär.08	QB296A0203 6258093111 08:24
58	SCIENCE PLAN Minidogs Junior Ultrasensible	05.07.2007	0916P06 FR59-517-01 (06180065)
59	SCIENCE PLAN Minidogs Sensible	10.06.2007	1510P06 FR59-517-01 (06161003)

60	SCIENCE PLAN Maxi Sensible	12.05.2007	0415P06 FR59-517-01 (06131061)
61	SCIENCE PLAN Yorkshire Terrier	12.12.2007	0517P06 FR59-517-01 (06346010)
62	SCIENCE PLAN German Shepard	19.07.2007	1415P06 FR59-517-01 (06200029)
63	SCIENCE PLAN Puppy Chicken	Feb.08	S 0839 9673B (060209)
64	SCIENCE PLAN Adult Large Breed	Dez.07	S 0929 9675B (060203)
65	SCIENCE PLAN Mature Adult Chicken	Okt.07	S 1539 9677B (060196)
66	SCIENCE PLAN NATURES BEST Puppy Large	Feb.08	S 1919 4976B (060282)
67	SCIENCE PLAN NATURES BEST Adult Large	Feb.08	S 1229 4974B (060780)
68	BIOMILL Junior Sensible	06.12.2007	CHPF 02/36
69	BIOMILL Adult Mini	18.04.2008	CHPF 02/03
70	BIOMILL Senior	12.01.2008	CHPF 02/41
71	EUKANUBA Puppy + Junior Large	13.07.2007	60724702A5 NL19222A
72	EUKANUBA Adult Small	15.12.2007	62274702A3 NL19222B
73	EUKANUBA Puppy Intestinal	05.03.2008	63094702C2 NL19222B
74	EUKANUBA Excess Weight	03.12.2007	62154702A4 NL19222B
75	PERRO Junior Welpen, kleine Rassen	13.09.2007	
76	DM DEIN BESTES Rind, Gemüse, Mais	11.07.2008	383964 NL.93128 10:03:33

## 8.2. Übersicht über die Ergebnisse aller Proben (ELISA und HPLC)

Pr. nr.	Identif. nr.	Bezeichnung	ELISA					HPLC				
			DON	ZEA	FUM	OTA	AF	DON A	DON B	ZON A	ZON B	FUM
1	E_070611	PEDIGREE PAL Junior Complete Huhn+Reis	193,1	50,8	71,4	n.d.	n.d.					
2	E_070612	PEDIGREE PAL Adult Complete Geflügel	164,6	51,1	54,2	n.d.	n.d.					
3	E_070613	PURINA - MATZINGER Vollkornflocken mit Gemüse	> 250	264,9	n.q.	n.d.	n.d.	541,1	437,1	70,3	68,3	
4	E_070614	PURINA - MATZINGER 5 Korn Flocken kernig-kräftig	118,3	37,1	n.q.	n.d.	n.d.	-	239,9	103,7	102,6	
5	E_070615	SELECT GOLD Adult Pute	148,5	n.q.	n.q.	n.d.	n.d.					
6	E_070616	SELECT GOLD Adult Chicken	114,5	n.q.	n.q.	n.d.	n.d.					
7	E_070617	PEDIGREE PAL Adult Mini Gefl., Gem., Reis	192,1	n.q.	285,3	n.d.	n.d.					
8	E_070618	RUPP Hundeflocken +Fleisch+Gem	179,5	n.q.	n.q.	n.d.	n.d.	179,6	195,7	29,7	31,1	
9	E_070619	RUPP Vollkorn Hundeflocken +Gem	> 250	29,5	108,8	n.d.	n.d.	228,6	220,6	48,0	50,6	
10	E_070620	BERO Hunde Vollnahrung	148,1	n.q.	n.q.	n.d.	n.d.	31,5	33,5	n.d.	n.d.	
11	E_070621	BERO Vollkorn Hundeflocken	n.d.	n.q.	n.d.	n.d.	n.d.	198,7	200,2	n.d.	n.d.	
12	E_070622	NUTRO CHOICE Adult Lamm+Reis	39,8	n.q.	n.q.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.			
13	E_070623	PERFECT FIT In Home	172,7	n.q.	n.q.	n.d.	n.d.					
14	E_070624	HAPPY DOG Natur Croq Original	203,2	n.q.	n.d.	n.d.	n.d.					
15	E_070625	SCHLECKER Genießer Menü	> 250	43,0	n.q.	n.d.	n.d.	642,3	653,6			

16	E_070626	HOFER Maximus	187,0	n.q.	n.q.	n.d.	n.d.					
17	E_070627	LIDL Optidog High Premium	> 250	89,9	124,6	n.d.	n.d.	631,8	697,5	133,3	134,0	
18	E_070628	FROLIC Complete	45,8	38,2	n.d.	n.d.	n.d.	9,3	-			
19	E_070629	PURINA One Adult Huhn+Reis	> 250	60,7	192,7	n.d.	n.d.	286,5	368,7			
20	E_070630	QUALITY LINE Mix Menü	> 250	70,8	61,7	n.d.	n.d.	355,9	357,9	88,0	86,2	
21	E_070631	QUALITY FIRST Verwöhn Menü	132,9	27,2	n.q.	n.d.	n.d.					
22	E_070632	RisoBell	n.q.	n.q.	n.d.	n.d.	n.d.	111,2	-			
23	E_070633	Premium Belcando Senior Light	85,9	n.q.	n.d.	n.d.	n.d.					
24	E_070634	BOZITA	160,6	n.q.	n.q.	n.d.	n.d.					
25	E_070635	MARKUS MÜHLE Natur Nah Futter	132,0	n.q.	103,1	n.d.	n.q.					
26	E_070636	ANIFIT Flocken	59,9	n.q.	n.d.	n.d.	n.d.					
27	E_070637	ROYAL CANIN Minidogs Mature	183,3	32,8	n.q.	n.d.	n.d.					
28	E_070638	ROYAL CANIN Minidogs Junior	149,0	n.q.	105,3	n.d.	n.d.					
29	E_070639	ROYAL CANIN Minidogs Adult	122,6	41,1	n.q.	n.d.	n.d.					
30	E_070640	ROYAL CANIN Medium Mature	140,7	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.			n.d.	n.d.	
31	E_070641	ROYAL CANIN Medium Junior	166,9	74,8	96,5	n.d.	n.q.			n.q.	n.q.	
32	E_070642	ROYAL CANIN Medium Sensible	103,7	68,3	81,2	n.d.	n.d.					
33	E_070643	ROYAL CANIN Maxi Babydog ultrasensibel	138,9	n.q.	n.q.	n.d.	n.q.					
34	E_070644	ROYAL CANIN Maxi Junior	> 250	41,5	289,6	n.d.	n.d.	296,5	279,1			

35	E_070645	ROYAL CANIN Maxi Adult	> 250	27,4	n.d.	n.d.	n.d.	210,8	200,1			
36	E_070646	ROYAL CANIN Maxi Sensible	105,7	n.q.	n.d.	n.d.	n.d.					
37	E_070647	ROYAL CANIN Labrador Retriever	> 250	179,4	147,0	n.d.	n.q.	191,4	166,5	267,7	267,4	
38	E_070648	SCIENCE PLAN Puppy Lamb & Rice	> 250	61,4	568,5	n.d.	n.q.	579,1	581,3			n.q.
39	E_070649	SCIENCE PLAN Adult Chicken	157,2	47,8	87,3	n.d.	n.d.					
40	E_070650	SCIENCE PLAN Senior Large Breed	148,2	n.q.	n.q.	n.d.	n.d.					
41	E_070651	NATURES BEST Puppy Mini/Medium	> 250	108,0	357,0	n.d.	n.d.	731,6	729,5	283,6	298,8	
42	E_070652	NATURES BEST Adult Mini/Medium	> 250	118,5	384,9	n.d.	n.d.	848,2	853,1	223,5	217,3	
43	E_070653	BIOMILL Junior Medium	109,5	n.q.	62,6	n.d.	n.q.					
44	E_070654	BIOMILL Adult Medium	88,2	n.q.	118,8	n.d.	n.q.					
45	E_070655	EUKANUBA Puppy + Junior all Breeds	102,0	n.q.	n.d.	n.d.	n.d.			n.d.	n.d.	
46	E_070656	EUKANUBA Puppy + Junior Medium	114,0	n.q.	n.q.	n.d.	n.d.					
47	E_070657	EUKANUBA Adult Medium	> 250	n.q.	75,4	n.d.	n.d.	215,3	182,7			
48	E_070658	EUKANUBA Intestinal	80,2	n.q.	n.q.	n.d.	n.d.			n.d.	n.d.	
49	E_070659	EUKANUBA Dermatosis FP	27,8	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	-	21,2	n.d.	n.d.	
50	E_070660	EUKANUBA Restricted Calorie	77,6	n.q.	n.q.	n.d.	n.d.					
51	E_070661	EUKANUBA Sensitive Skin	> 250	n.q.	n.q.	n.d.	n.d.	267,2	278,8			
52	E_070662	EUKANUBA Sensitive Digestion	104,7	n.q.	132,3	n.d.	n.d.					
53	E_070663	HAPPY DOG Junior Croq	134,1	n.q.	n.q.	n.d.	n.q.					

54	E_070689	CHAPPI Complete Gefl,Gem,Getr	> 250	29,2	83,1	n.d.	n.d.	655,3	677,0			
55	E_070690	RUPP Brocken + Rind	165,0	48,4	111,3	n.d.	n.d.					
56	E_070691	AS SCHLECKER Aktiv Crox	97,1	n.q.	n.d.	n.d.	n.d.					
57	E_070692	PURINA BENEFUL Rd,Getr,Vit,Gem	68,6	28,4	93,7	n.d.	n.d.					
58	E_070693	SCIENCE PLAN Minidogs Junior Ultrasensible	91,8	n.q.	n.q.	n.d.	n.d.					
59	E_070694	SCIENCE PLAN Minidogs Sensible	63,4	n.q.	n.q.	n.d.	n.d.					
60	E_070695	SCIENCE PLAN Maxi Sensible	84,2	126,4	211,6	n.d.	n.d.			161,2	167,1	
61	E_070696	SCIENCE PLAN Yorkshire Terrier	134,6	122,9	146,2	n.d.	n.d.			125,1	121,1	
62	E_070697	SCIENCE PLAN German Shepard	93,2	39,7	n.q.	n.d.	n.d.					
63	E_070698	SCIENCE PLAN Puppy Chicken	> 250	86,0	195,4	n.d.	n.d.	673,3	661,6	96,6	101,3	
64	E_070699	SCIENCE PLAN Adult Large Breed	> 250	203,2	n.q.	n.d.	n.d.	-	1386,1	427,9	438,0	87,4
65	E_070700	SCIENCE PLAN Mature Adult Chicken	161,9	n.q.	n.q.	n.d.	n.d.					
66	E_070701	NATURES BEST Puppy Large	> 250	298,3	487,1	n.q.	n.d.	684,9	692,4	549,0	537,4	
67	E_070702	NATURES BEST Adult Large	> 250	176,7	n.q.	n.d.	n.d.	871,9	879,4	327,9	333,9	119,4
68	E_070703	BIOMILL Junior Sensible	46,8	n.q.	n.d.	n.d.	n.d.	10,6	16,0			
69	E_070704	BIOMILL Adult Mini	166,5	64,9	365,8	n.d.	n.d.					
70	E_070705	BIOMILL Senior	121,5	n.q.	n.q.	2,1	n.d.					
71	E_070706	EUKANUBA Puppy + Junior Large	166,5	32,1	n.q.	3,1	n.d.					
72	E_070707	EUKANUBA Adult Small	> 250	n.q.	n.q.	4,1	n.d.	337,3	343,0			

73	E_070708	EUKANUBA Puppy Intestinal	76,8	28,0	n.q.	4,7	n.d.					
74	E_070709	EUKANUBA Excess Weight	138,5	n.q.	n.q.	n.q.	n.d.					
75	E_070710	PERRO Junior Welpen,kl.R.	110,0	n.q.	n.q.	n.d.	n.d.					
76	E_070711	DM DEIN BESTES Rd,Gem,Mais	148,6	33,3	126,6	n.d.	n.d.					
	<b>MW</b>		<b>123,5</b>	<b>80,1</b>	<b>177,6</b>	<b>3,5</b>	-	<b>391,6</b>	<b>436,6</b>	<b>195,7</b>	<b>197,0</b>	<b>103,4</b>
	<b>MD</b>		<b>127,3</b>	<b>50,9</b>	<b>121,7</b>	<b>3,6</b>	-	<b>296,5</b>	<b>350,4</b>	<b>133,3</b>	<b>134,0</b>	<b>103,4</b>
	<b>SD</b>		<b>43,5</b>	<b>67,6</b>	<b>134,1</b>	<b>1,2</b>	-	<b>267,7</b>	<b>325,0</b>	<b>150,0</b>	<b>150,0</b>	<b>22,6</b>