Aus der klinischen Abteilung für Interne Medizin Kleintiere, Universitätsklinik für Kleintiere, Department für Kleintiere und Pferde

Departmentsprecher Prof. J. Thalhammer
Fach: Dermatologie

PCR-Nachweis von nicht deklarierten Antigenen in kommerziellen Eliminationsdiäten für Hunde

Diplomarbeit

Zur Erlangung der Würde einer
MAGISTRA MEDICINAE VETERINARIAE
der Veterinärmedizinischen Universität Wien
Vorgelegt von K. WIDMANN
Wien Mai 2014

Betreut von Fr. Dr. Horvath- Ungerböck Dipl. ECVD

Klinische Abteilung für Interne Medizin Kleintiere, Universitätsklinik für Kleintiere, Department für Kleintiere und Pferde Veterinärplatz 1 1210 Wien

Danksagung

Zunächst möchte ich mich an dieser Stelle bei all denjenigen bedanken, die mich während der Anfertigung meiner Diplomarbeit unterstützt und motiviert haben.

Bedanken möchte ich mich besonders bei Frau Dr. Horvath-Ungerböck, die meine Arbeit und somit auch mich betreut hat. Nicht nur, dass sie immer wieder durch kritisches Hinterfragen wertvolle Hinweise gab, auch Ihre moralische Unterstützung und Motivation waren sehr wertvoll. Vielen Dank für Ihre Geduld und Mühen.

Daneben gilt mein Dank auch meinem Freund Michael, der in zahlreichen Stunden die Arbeit Korrektur gelesen hat.

Nicht zuletzt möchte ich meiner Familie herzlich danken. Die emotionale Unterstützung war für mich wie ein Fels in der Brandung!

Mein ganz besonderer Dank aber richtet sich an meine Eltern, die mich nicht nur finanziell sondern auch emotional sehr unterstützt haben! Ohne Euch wäre ich nicht an meinem Ziel angelangt!

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	
1.1. Futtermittelunverträglichkeit beim Hund	6
2. Literaturübersicht	8
2.1. Äthiopathogenese	8
2.2. Orale Toleranz	9
2.3. Futtermittelallergene	10
2.4. Klinik	11
2.4.1. Gastrointestinale Symptome	11
2.4,2. Dermatologische Symptome	12
2.5. Diagnostik	17
2.5.1 Eliminationsdiät	17
2.5.2 Provokation	22
2.5.2.1 Probleme bei der Eliminationsdiät mit kommerziellen Futtermitteln	22
2.6. Ziel der Studie	23
3. Material und Methode	24
3.1. Material	24
3.1.1. Futtermittel	24
3.2. Methoden	28
3.2.1. DNA-Extraktion	28
3.2.2. Messung der DNA-Konzentration und Herstellung von Arbeitsverdünnungen	29
3.2.3. Real-time PCR	30
3.2.4. Auswertung des PCR-Laufs	32
4. Ergebnisse	33
5. Diskussion	34
6. Zusammenfassung	38
7. Summary	39
8. Literatur	40

Abkürzungsverzeichnis

AGES
Agentur für Gesundheit und Ernährungssicherheit
AS
Aminosäure
GIT
Gastrointestinaltrakt
IgA
Immunglobulin A

IgE Immunglobulin E

PCR Polymerase Chain Reaction

1. EINLEITUNG

1.1. FUTTERMITTELUNVERTRÄGLICHKEIT BEIM HUND

Die Sammelbezeichnung "Futtermittelunverträglichkeit" wird für unerwünschte und unvorhersehbare Effekte verwendet, die durch aufgenommene Futtermittel verursacht werden, die Reaktionen können in zwei Gruppen unterteilt werden: Futtermittelallergie und Futtermittelintoleranz.

Eine Allergie ist eine hypersensitive Reaktion, ausgelöst durch eine spezifische immunologische Antwort auf ein Allergen und kann sowohl durch Antikörper als auch durch Immunzellen bestimmt sein. Ist Immunglobulin E (IgE) vorhanden, so handelt es sich um eine IgE-mediierte Allergie. Ist bei der hypersensitiven Reaktion kein immunologischer Mechanismus vorhanden, liegt eine Futtermittelintoleranz vor (HALLIWELL, 2006). Hierzu zählen sowohl die Futtermittelvergiftung, Laktoseintoleranz, als auch pharmakologische und metabolische Reaktionen (HILLIER u. GRIFFIN, 2001). Somit gibt es eine klare Unterscheidung zwischen immunologischer und nicht immunologischen Reaktionen auf die Futteraufnahme (VERLINDEN et al., 2006).

Die häufigsten Symptome in Zusammenhang mit dieser Erkrankung sind Haut- und Verdauungsprobleme (VERLINDEN et al., 2006). Eine sichere Diagnose kann nur mit Hilfe einer Eliminationsdiät und einer anschließenden Provokation gestellt werden.

Da die Pathogenese in den meisten Fällen jedoch unbekannt bzw. schwer zu ergründen ist, sollte der Begriff "adverse food reactions" verwendet werden, im deutschen Sprachraum als Futtermittelunverträglichkeit bezeichnet (HILLIER u. GRIFFIN, 2001; KENNIS, 2006). Unter diesen Begriff sind alle unerwünschten Reaktionen im Zusammenhang mit der Futteraufnahme zusammengefasst (HILLIER u. GRIFFIN, 2001).

Ein Hund kann in jedem Alter eine Futtermittelunverträglichkeit entwickeln. Das Auftreten der ersten Symptome wird häufig schon vor dem Erreichen des ersten Lebensjahres bemerkt. Bestimmte Hunderassen zeigen aber eine gewisse Disposition in Bezug auf Futtermittelunverträglichkeiten wie z.B. Boxer, Cocker- und Springer-Spaniel, Dalmatiner, Deutscher Schäferhund, Retriever, Dachshund und Highland White Terrier (VERLINDEN et al.. 2006). Futtermittelunverträglichkeit kann sich beim Hund durch gastrointestinale und/oder dermatologische Symptomen äußern, bei letzteren hauptsächlich durch Juckreiz. Die Diagnose wird mit Hilfe einer strikten Eliminationsdiät erstellt. Wichtig ist, dass eine neuen Protein- bzw. Kohlenhydratquelle gefüttert wird.

Wenn es während der Diät zu keiner Verbesserung der Symptome kommt, liegt dies oft auch an der Konsequenz der Patientenbesitzer. Die Besitzer halten die Eliminationsdiät nicht ein, oft bekommt der Hund zusätzlich noch andere Proteinquellen. Es kann aber auch sein, dass der Hund an mehr als einer Allergie leidet. In einer Studie von White aus dem Jahre 1986 waren von 30 futtermittelallergischen Hunde sieben zusätzlich allergisch gegen Flohspeichel, Umweltallergene, intestinale Parasiten oder Insulin (WHITE, 1986). Im Zeitraum von März 2003 bis März 2004 wurden in North Carolina State University 42 Hunde als Futtermittelallergiker diagnostiziert. Die klinische Symptomatik beruhte lediglich bei 21 dieser Hunde (45,0 %) ausschließlich auf der Futtermittelallergie. Neunzehn Hunde (40,0 %) wiesen eine zusätzliche Umweltallergie auf, vier Hunde (8,0 %) eine zusätzliche Flohspeichelallergie. Alle drei Formen der Allergie zeigten drei der futtermittelallergischen Hunde (6,0 %) (JACKSON et al., 2005). Auch Zusatzstoffe (Farb-, u. Konservierungsstoffe) können als Haptene (unvollständige Antigene) wirken und so als Ursache für die Aufrechterhaltung der Symptome verantwortlich sein.

Die Eliminationsdiät könnte aber auch erfolglos sein, weil das Futter doch noch andere Bestandteile enthält, als auf der Deklaration angegeben sind. In der Praxis kommt es öfters vor, dass Hunde ein kommerzielles Futter nicht vertragen, obwohl sie die exakt selben Zutaten hausgemacht tolerieren.

Unsere Hypothese lautete, dass kommerzielle Eliminationsdiäten mit Proteinen verunreinigt sein können, die auf der Packung nicht deklariert sind.

2. LITERATURÜBERSICHT

2.1. ÄTHIOPATHOGENESE

Die tatsächliche Pathogenese der Futtermittelunverträglichkeit beim Hund ist bis heute noch nicht geklärt (GASCHEN et al., 2011).

Der Gastrointestinal Trakt (GIT) des Hundes ist, wie beim Menschen auch, die größte Oberfläche des Körpers, die der Umwelt und ihren Reizen ausgesetzt ist (VERLINDEN et al., 2006). Das lokale Immunsystem des Darms wird durch die täglich aufgenommene Menge von Antigenen (AG) über die Nahrung konfrontiert (ROUDEBUSH et al., 2000). Der GIT ist in der Lage zwischen wichtigen Nährstoffen und potentiell gefährlichen Substanzen (z.B. Bakterien, Viren, Parasiten) zu unterscheiden und demzufolge mit einer Toleranz oder immunologischen Abwehr zu reagieren (ROUDEBUSH et al., 2000; BETHLEHEM et al., 2012).

Es gibt vier Mechanismen, die für diese Aufgaben von großer Bedeutung sind (VERLINDEN et al., 2006):

- Intakte Darmschranke
- Regulation der Immunantwort
- Elimination von AG
- Toleranz von AG

Eine Beeinträchtigung dieser Abwehrmechanismen kann eine Futtermittelunverträglichkeit zur Folge haben, bzw. eine Prädisposition liefern (GUILFORD, 1996b; VERLINDEN et al., 2006).

Es gibt einige Risikofaktoren, die diese Entwicklung begünstigen können (ROUDEBUSH et al., 2000):

- Krankheiten, die zu einer Erhöhung der Permeabilität der Darmschleimhaut führen (z.B.: virale Enteritis)
- Selektiver Immunglobulin A (IgA)-Mangel
- Schlechtverdauliche Proteine
- Bestimmte Futter oder Futterzutaten
- Das gleichzeitige Vorliegen anderer Allergien
- Bestimmte Rassen
- Alter (jünger als ein Jahr)

2.2. ORALE TOLERANZ

Bei der oralen Toleranz handelt es sich um einen Status der immunologischen Unempfindlichkeit gegenüber potentiellen Allergenen (KENNIS, 2006). Sie ist nicht mit einer mangelnden Immunreaktion gleich zu stellen, eher handelt es sich hierbei um eine aktive, permanente und spezifische Immunantwort, die nicht in einer Elimination des AG, sondern in einer Toleranz endet (GUILFORD, 1996).

Diese Toleranz ist für das Leben sehr wichtig, jedoch nicht angeboren. Sie muss sich erst in den ersten Lebenstagen des Welpen entwickeln. Wenn die Hündin ihre Welpen absetzt, müssen sie in der Lage sein, eine orale Toleranz zu entwickeln. Es ist bewiesen, dass die Welpen erst ab einem Alter von sechs Wochen dazu imstande sind. Wenn die Welpen vor der sechsten Lebenswoche neue Nahrung aufnehmen, sind sie höchst wahrscheinlich nicht in der Lage eine orale Toleranz zu entwickeln und die Wahrscheinlichkeit einer Futtermittelunverträglichkeit nimmt zu (VERLINDEN et al., 2006).

2.3. FUTTERMITTELALLERGENE

Alle Proteine im Hundefutter sind fremd für den Organismus des Hundes und wirken somit als potentielle AG. Doch nur ein Bruchteil der Proteine wirkt allergen. Die Fähigkeit eines Proteins, eine allergische Reaktion auszulösen, hängt von der Durchlässigkeit des Darmes für dieses Protein sowie von der Immunogenität des Proteins ab. Die Beurteilung der allergenen Immunität wird durch die Fähigkeit eines Proteins bestimmt, nach der Bindung an zwei IgE-Moleküle auf der Zelloberfläche einer Mastzelle eine Histamin-Freisetzung sowie eine IgE-Produktion auszulösen (VERLINDEN et al., 2006).

Viele Futtermittelunverträglichkeiten sind Reaktionen auf Proteine in kommerziellem Hundefutter, die während der Herstellung hitzebehandelt wurden. Die Allergenität wird bestimmt durch seine Primärstruktur (z. B Aminosäurensequenz), Sekundärstruktur (Helix, Faltblatt) und seine Tertiärstruktur (dreidimensionale Struktur). Dabei kann die Antigenität während der Hitzebehandlung zunehmen, indem die Tertiärstruktur des Proteins verändert wird und dadurch vorher versteckte allergene Determinanten aufgedeckt werden (CAVE, 2006). Die Allergenität des Proteins kann dadurch sowohl gesteigert, als auch gemildert werden. Hierdurch erklärt sich vielleicht auch die scheinbar höhere Allergenität von Proteinen im Dosenfutter verglichen mit frischem Futter (VERLINDEN et al., 2006). Bei der Konservierung von gereinigtem Futter, das Kasein, Stärke, Saccharose und Maisöl enthält, zeigte sich, dass sich im Endprodukt neue AGe fanden und diese eine viel höhere Antigenität als das ungekochte Ausgangsmaterial aufwiesen. Vielleicht erklärt sich daraus der durchaus größere Erfolg von selbstgekochten Eliminationsdiäten im Vergleich zu kommerziellen Eliminationsdiäten (CAVE, 2006).

Studien, die mit Hilfe einer Eliminationsdiät und anschließender sequentiellen Provokationen die verantwortlichen Allergene beim Hund analysiert haben, zeigen, dass bei der Futtermittelunverträglichkeit des Hundes vor allem Rind, Milchprodukte und Weizen das auslösende Protein war. Über 65 % der adversen Reaktionen können auf diese Proteine zurückgeführt werden. Circa 25 % der Unverträglichkeiten werden durch Huhn, Ei, Lamm, Fisch oder Soja verursacht- (WALTON, 1967; CARLOTTI et al., 1990; JEFFERS et al., 1991; KUNKLE u. HORNER, 1992; HARVEY, 1993; ELWOOD et al., 1994; PATERSON, 1995; JEFFERS et al., 1996; MUELLER u.

TSOHALIS, 1998; KENNIS, 2006). Die Inzidenz einer Allergie ist abhängig davon, wie häufig das jeweilige Protein in der Region verfüttert wird. In einer an der Veterinärmedizinischen Universität Wien (Dermatologie) durchgeführten Studie (nicht publiziert) zeigten Hunde auf Käse, Zerealien, Schwein, Rind, Pferd, Milch, Lamm, Huhn, Reis, Brot, Fisch, Truthahn und Kartoffel positive Reaktionen (Erfahrung aus der 1. Med. Klinik/Dermatologie, unveröffentlichte Daten).

Welche Rolle Kohlenhydrate bei Unverträglichkeiten beim Hund spielen, ist bis heute noch nicht genau erklärt. Wenn Kohlenhydrate eine Reaktion auslösen, ist es wahrscheinlich, dass ein Protein innerhalb des Kohlenhydrates der Auslöser dafür ist (VERLINDEN, 2006).

2.4. KLINIK

Futtermittelunverträglichkeiten äußern sich beim Hund als gastrointestinale und/oder dermatologische Symptome. Die Symptome können in jedem Alter auftreten und sind nicht saisonal. Ab diesen Zeitpunkt löst jede Provokation Symptome aus.

2.4.1. Gastrointestinale Symptome

Jeder Abschnitt des GIT kann von der Unverträglichkeit betroffen sein (ROUDEBUSH et al., 2000). Die Symptome sind unspezifisch und umfassen Erbrechen, Durchfall, Meläna, abdominale Schmerzen, Hämatemesis, reduzierter Appetit, Wachstumsstörungen oder Gewichtsverlust (HALL, 1994). Oft wird eine erhöhte Kotabsatzfrequenz, also mehr als drei Mal pro Tag. beobachtet und kann somit einen Hinweis auf Futterunverträglichkeit geben (PATERSON, 1995; LOEFFLER et al., 2004). Obwohl es keine Geschlechts-, Rasse- oder Altersprädispositionen für das Auftreten gastrointestinaler Symptome gibt, scheinen der Deutsche Schäferhund, der Irish Setter und der Shar Pei öfters betroffen zu sein (VERLINDEN et al., 2006; GASCHEN et al., 2011).

2.4.2. Dermatologische Symptome

Es gibt keine pathognomischen Hautveränderungen der Futtermittelunverträglichkeit des Hundes (ROUDEBUSH et al., 2000). Das häufigsten vorkommende dermatologische Symptom Zusammenhang mit Futtermittelunverträglichkeiten ist der Juckreiz. Normalerweise ist der Juckreiz konstant und nicht saisonal, kann aber in der Intensität wechseln (ROUDEBUSH et al., 2000; VERLINDEN et al., 2006). luckreiz kann generalisiert oder auf bestimmte Körperregionen begrenzt sein wie z.B. Ohren, Gesicht, Pfoten, Achseln, inguinal oder Perinealregion (WALTON, 1967: WHITE, 1986: HARVEY, 1993; ROSSER, 1993; DENIS u. PARADIS, 1994; LOEFFLER et al., 2004). Dabei kann eine Vielzahl von primären und sekundären Läsionen auftreten, wie z.B. Papeln, Erythem, epidermale Schuppenkränze, Exkoriationen oder Hyperpigmentierung. Bei manchen Tieren treten einzig eine Otitis externa (ein- oder beidseitig) oder eine rezidivierende Pyodermie als Symptome auf (HARVEY, 1993; ROSSER, 1993; VERLINDEN et al., 2006).

In einer Studie, die an der Dermatologie der Veterinärmedizinischen Universität Wien durchgeführt wurde, wurde bei 112 Hunden eine Futtermittelunverträglichkeit bestätigt: Von diesen Hunden zeigten 89.3% nicht-saisonalen Juckreiz, gefolgt von gastrointestinalen Symptomen (50.9%) und ein oder beidseitiger Otitis externa (49.1%). Es wurden bisher noch nicht berichtete Rasseprädispositionen für die Hundepopulation in Österreich und Altersgruppen gefunden. Das Alter bei Beginn der Sympotmatik lag zwischen zwei Monaten und 11 Jahren. Es gab 35 verschiendene Hundrassen. Der Deutsche Schäferhund und West Highland White Terrier waren signifikant über-repräsentiert (p<0.001 bzw. <0.01), Mischlinge waren signifikant unter-repräsentiert (p<0.01) (Erfahrung aus der I. Med. Klink/Dermatologie, unveröffentlichte Daten)"



Abb. 1: hgr Pruritus und Erythem (C. Favrot" Clinical signs and diagnosis of canine atopic dermatitis" _letzter Zugriff: 14.05.2014)



Abb. 2: Leckderamtitis (C. Favrot" Clinical signs and diagnosis of canine atopic dermatitis" _letzter Zugriff: 14.05.2014)

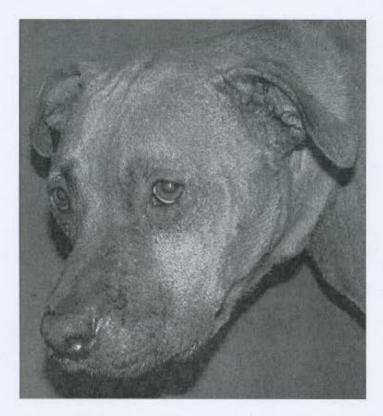


Abb. 3: chronische faciale Dermatitis und Otitis bei einem Futtermittelallergiker (Jackson, H. A. (2009). Food allergy in dogs-clinical signs and diagnosis. European Journal of Companion Animal Practice, 19(3), 230-233)_letzter Zugriff: 14.05.2014)



Abb.4: ventrales interdigitales Erythem mit Pododermatitis (Jackson, H. A. (2009). Food allergy in dogsclinical signs and diagnosis. European Journal of Companion Animal Practice, 19(3), 230-233)_letzter Zugriff: 14.05.2014)



Abb. 5 Lichenfikation und Erythem der Achsel, Extremität und Sternum des *selben Hundes wie in Abb.* 4(Jackson, H. A. (2009). Food allergy in dogs-clinical signs and diagnosis. European Journal of Companion Animal Practice, 19(3), 230-233), letzter Zugriff: 14.05.2014)

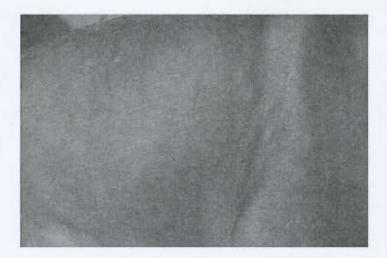


Abb. 6 Multifokale Alopezie und Pappeln am Rumpf eines Junghundes mit Futtermittelallergie (Jackson, H. A. (2009). Food allergy in dogs-clinical signs and diagnosis. European Journal of Companion Animal Practice, 19(3), 230-233_letzter Zugriff: 14.05.2014)

Klinisch ähnelt die Futtermittelunverträglichkeit anderen Hautkrankheiten, so dass viele Differenzialdiagnosen berücksichtigt werden sollten (VERLINDEN et al., 2006). Dazu zählen:

- Ektoparasiten (v.a. ein Befall mit Sarkoptesmilben)
- Immunologisch bedingte Krankheiten (Canine atopische Dermatitis (CAD), Kontaktallergie, Arzneimittelreaktionen, Autoimmunkrankheit, Zink-Mangel, Mangel an essentiellen Fettsäuren)
- Andere Hautkrankheiten bzw. Erkrankungen mit Symptomen der Haut (prim. Pyodermie, Seborrhoe, granulomatöse Sebadenitis, Hypothyreose, Leishmaniose, bakterielle Otitis)

Symptome einer atopischen Dermatitis und einer Futtermittelunverträglichkeit sind in der Praxis nicht zu unterscheiden (AUGUST, 1985; CARLOTTI et al., 1990; HARVEY, 1993; ROSSER, 1993; DEBOER u. HILLER, 2001; VERLINDEN et al., 2006). Deshalb ist es in der dermatologischen Praxis umso wichtiger, Futtermittelunverträglichkeiten durch genaue diagnostische Allergieaufarbeitung zu erkennen.

2.5. DIAGNOSTIK

Der Goldstandard, um eine Futtermittelallergie zu diagnostizieren ist ein mehrstufiges Verfahren. Dies besteht aus einer Eliminationsdiät, die über 8-12 Wochen gefüttert werden muss. Wenn es während dieser Zeit zu einer deutlichen Verbesserung der Symptome kommt, wird anschließend eine Provokation mit dem gewohnten Futter des Hundes durchgeführt (ACKERMANN, 1988; MUELLER et al., 1989; CARLOTTI et al., 1990; JEFFERS et al., 1991; FADOK, 1994).

Wenn es durch die neuerliche Gabe des bekannten und schon gefütterten Futters wieder zum Aufflammen der Symptome und nach wiederholter Eliminationsdiät wieder zum Verschwinden der Symptome kommt, kann die Diagnose Futtermittelunverträglichkeit gestellt werden. Wenn die Notwendigkeit besteht, können zusätzlich Provokationstests für die einzelnen Futterinhaltsstoffe und deren allergieauslösenden Komponenten gemacht werden (JEFFERS et al, 1996; VERLINDEN et al., 2006).

Andere allergologische Tests wie Intradermaltest (Patch Test) oder serologische Tests haben sich bisher als sehr unzuverlässig in der Diagnose der Futtermittelunverträglichkeit herausgestellt (WILHELM u. FAVROT, 2005; BETHLEHEM et al., 2012).

2.5.1. Eliminationsdiät

Der Hund muss als Eliminationsdiät eine Protein- und Kohlenhydratquelle erhalten, die er noch nie zuvor gefressen hat. Die richtige Auswahl dieser Zutaten ist abhängig von der Genauigkeit der Futteranamnese (KENNIS, 2006; VERLINDEN et al., 2006). Es sollte daher eine vollständige Liste aller Futtermittel, die der Hund regulär bekommt, aufgestellt werden. Diese Liste sämtliche kommerziellen Futtermittel, also alle oder Supplemente, Medikamente. Kauspielzeug menschlichen Nahrungsmittel enthalten. Auch andere Futterquellen, zu denen der Hund Zugang hat, z.B. Katzenfutter sollten aufgeführt werden (ROUDEBUSH et al., 2000). Eine so genaue Aufstellung der Futtermittel ist in der Realität kaum zu erwarten (FOSTER et al., 2003).

Folgende Kriterien sollte eine ideale Eliminationsdiät enthalten (ROUDEBUSH u. SCHICK, 1994; ROUDEBUSH et al., 2000; VERLINDEN et al., 2006):

- Begrenzte Anzahl an Zutaten
- Neuartige Proteinquellen
- Niedriger Proteingehalt im Vergleich zu herkömmlichem Futter
- Hohe Proteinverdaulichkeit (>87,0%) oder Verwendung von Proteinhydrolysat
- Vermeidung von Zusatzstoffen oder vasoaktiven Aminen

Der Energiegehalt sollte dem aktuellen Bedarf des Tieres entsprechen. Während der Eliminationsdiät ist es wichtig, dass der Hund nichts anderes zu sich nimmt als die Diät und Wasser. Hinsichtlich der Belohnungen muss darauf geachtet werden, dass sie nur aus denselben Zutaten bestehen wie die Eliminationsdiät.

"hypoallergene" Leckerlis. Tabletten mit Dies gilt auch für Geschmacksstoffen sollten gemieden oder durch eine nicht mit Geschmacksstoffen versehene Variante ersetzt werden (KENNIS, 2006). Eine besondere Aufgabe in Bezug auf die Eliminationsdiät ist es, die Besitzer dahin zu motivieren, sich genau an die Vorgaben zu halten. Die Besitzer-Compliance spielt eine sehr große Rolle, um eine sichere Diagnose der Futtermittelunverträglichkeit zu erhalten. Für eine fehlende Compliance gibt es verschiedenste Gründe, z.B. Kosten, Zubereitungszeit, Ablehnung der Diätbestandteile, Unvermögen die Aufnahme anderer Futtermittel zu verhindern, Aufflammen der Symptome (KENNIS, 2006).

Der Vorteil von selbstgekochten Eliminationsdiäten ist, dass alle gefütterten Komponenten sicher bekannt sind. Zusätzlich hat die Besitzerin oder der Besitzer das Gefühl, sich aktiv einbringen zu können. Die Zusammenstellung kann individuell nach der Futteranamnese des Tieres vorgenommen und leicht an die jeweiligen Bedürfnisse des Hundes angepasst werden. Es gilt zu bedenken, dass der Nährstoffgehalt in einer selbstgekochten Eliminationsdiät unzureichend ist. Vor allem fehlen Kalzium, Spurenelemente und Vitamine. Das Füttern einer nicht ausgewogenen selbstgekochten Eliminationsdiät über einen kurzen

Zeitraum führt bei einem erwachsenen gesunden Hund zu keinerlei Mangelerscheinungen (KENNIS, 2006). Leiden die Hunde allerdings unter einer metabolischen Erkrankung, so muss dies bei der Zusammenstellung der Eliminationsdiät beachtet werden (KENNIS, 2006).

Bei jungen Hunden, die sich noch im Wachstum befinden, sollte eine so unausgewogene Eliminationsdiät nicht länger als drei Wochen gefüttert werden. Eine Fehlversorgung von Mineralstoffen kann bei jungen Hunden eine Knochenschädigungen verursachen (VERLINDEN et al., 2006). Daher ist bei großwüchsigen Welpen eine Supplementierung zumindest mit Kalzium und Phosphor notwendig (ROUDEBUSH u. COWELL, 1992).

Die Zubereitung einer selbstgekochten Eliminationsdiät kann zeitintensiv und bei großen Rassen auch sehr teuer sein (VERLINDEN et al., 2006). Auch das Beschaffen der gewünschten Proteinquelle kann eine Herausforderung sein (KENNIS, 2006).

Die am häufigsten für eine selbstgekochte Eliminationsdiät verwendeten Proteine sind Wild- oder Kaninchen (WHITE, 1986; ROUDEBUSH u. COWELL, 1992; HARVEY, 1993; DENIS u. PARADIS, 1994). Aber auch Strauß und Pferd können eine Alternative sein (KENNIS, 2006). Als Kohlenhydratquellen werden sehr oft Kartoffeln vorgeschlagen; besser geeignet sind Süßkartoffeln, Hirse und die sogenannten "Pseudogetreide" Amarant, Quinoa, Buchweizen. Tofu, sollte nur in sehr hartnäckigen Fällen verwendet werden. Zur Erhöhung des Energiegehaltes und damit Senkung des Eiweißgehaltes kann Pflanzenöl eingesetzt werden. Wahrscheinlichkeit einer Reaktion auf Pflanzenöl ist gering, trotzdem sollte sicherheitshalber eines gewählt werden, welches in kommerziellen Futtermitteln nicht verwendet wird, wie Sonnenblumenöl, Distelöl, Kürbiskernöl. Auf eine zusätzliche Gabe von Mineralergänzungen sollte verzichtet werden, da diese häufig Hefe oder andere Proteinquellen enthalten.

Als Alternative zur selbstgekochten Eliminationsdiät können auch kommerzielle Diäten eigesetzt werden. Dabei werden auch hier Futter gewählt, die aus Eiweiß- und Kohlenhydratquellen bestehen, die der Hund noch nie zuvor bekommen hat.

Kommerzielle Eliminationsdiäten sind vor allem bei großen Hunden eine günstigere Variante, als selber zu kochen. Auch eignen sich diese Diäten gut für Hunde, die eine selbstgekochte Eliminationsdiät nicht vertragen, wenn die Besitzer keine Provokation machen möchten oder wenn der Hund auf mehrere Futtermittelkomponenten reagiert (VERLINDEN et al., 2006). Ein Problem dabei ist, dass auf die Deklaration bzw. die Angaben des Herstellers vertraut werden muss und dass in den meisten Futtermitteln mehr als zwei Zutaten verwendet werden (Fette, Ballaststoffe, Gemüse...).

Das Prinzip der hydrolysierten Diäten ist die Reduktion der Allergenität der enthaltenen Proteine (CAVE, 2006; VERLINDEN et al., 2006). Der Vorgang des Hydrolysierens des Proteins hat zum einen den Zweck, dass das Immunsystem eines sensibilisierten Hundes keine allergenen Muster mehr erkennen kann und zum anderen, vor einer Sensibilisierung zu schützen. der dreidimensionalen Formation der Proteine. Die Zerstörung Veränderung der Struktur der Aminosäuren und die Spaltung der bewirkt nicht erkennen Peptidbindungen (Hydrolyse) ein Proteinstruktur durch das Immunsystem (CAVE, 2006). hydrolysierten Futtermittel sind nur über Tierärztinnen oder Tierärzte zu beziehen. Wie bei der selbstgekochten Eliminationsdiät ist es auch bei kommerziellen hydrolysierten Eliminationsdiäten sinnvoll ein Futter auszuwählen, das eine Proteinquelle enthält die der Hund noch nie aufgenommen hat. Ein klarer Vorteil dieser Diäten ist ihre Ausgewogenheit und Vollständigkeit im Bezug auf die Nährstoffversorgung (VERLINDEN et al., 2006). Die Akzeptanz dieser Diäten ist mit der Akzeptanz von Diäten mit einer neuen Proteinquelle zu vergleichen (CAVE, 2006). Nachdem die Anzahl der verwendeten Proteinquellen in kommerziellen Futtermitteln ständig zunimmt, sind hydrolysierte Diäten eine gute Alternative für Management und Diagnose von Futtermittelunverträglichkeiten (CAVE, 2006).

Die Diäten werden mit unterschiedlichen Proteinquellen und unterschiedlichem Hydrolysierungsgrad angeboten. Beide Eigenschaften bestimmt die Wirksamkeit einer solchen Diät (VERLINDEN et al 2006).

Die Dauer der Eliminationsdiät sollte mindestens 8 -12 Wochen betragen, wobei es sich auch nach dem Patienten richtet (ROSSER, 1993). Es kann auch vorkommen, dass Hunde 13 Wochen benötigen (DENIS u. PARADIS,

1994), eine Länge von 8 Wochen scheint aber eine adäquate Lösung zu sein (KENNIS, 2006).

2.5.2. Provokation

Nach einer erfolgreichen Eliminationsdiät werden nach und nach neue Zutaten eingebracht. Bei selbstgekochtem Futter als erstes ein Mineralfutter, dann Gemüse und andere Fleischsorten, oder ein kommerzielles Futter.

Unter Provokation versteht man die Wiedereinführung des Futters, das der Hund vor Beginn der Eliminationsdiät bekommen hat. Dieses löst bei Vorliegen einer Futtermittelunverträglichkeit nach wenigen Stunden bis einigen Tagen erneut klinische Symptome aus, die bei einer erneuten Eliminationsdiät wieder zurückgehen. Solch ein Verlauf bestätigt die Diagnose der Futtermittelallergie (VERLINDEN et al., 2006). Nach White soll die Provokation zwei Wochen lang durchgeführt werden (WHITE, 1986).

2.5.2.1. Probleme bei der Eliminationsdiät mit kommerziellen Futtermitteln

Nicht immer bringt eine Eliminationsdiät mit einem kommerziellen Futtermittel das gewünschte Ergebnis. Es kann vorkommen, dass Zutaten die, wenn sie selbst gekocht werden problemlos vertragen werden, in einem kommerziellen Futtermittel Symptome auslösen. Eine Erklärung wäre, dass sich die Tertiärstruktur der Proteine durch die Behandlung mit Hitze verändert und dadurch vorher versteckte Determinanten aufgedeckt werden (CAVE, 2006) und sich dadurch die Allergenität verändert. Eine Besonderheit beim gemeinsamen Erhitzten von Proteinen Kohlenhydraten ist die sog. Maillard Reaktion. Diese läuft bei hohen Temperaturen zwischen bestimmten Aminosäuren (AS) und reduzierenden Zuckern ab (VERLINDEN et al., 2006). Es entstehen Melanoide, die dem Futter eine bräunliche Farbe verleihen (CAVE, 2006). Die Allergenität kann dadurch sowohl erhöht als auch vermindert werden (VERLINDEN et al., 2006).

Die Kontamination des Futtermittels mit nicht deklarierten Proteinen kann eine weitere Ursache sein. Im Jahre 2011 wurde eine Studie veröffentlicht, die sich mit dieser Thematik auseinandersetzt. Von R. RICCI et al. (2011) wurden 12 Trockenfutter auf Verunreinigungen mit Antigenen von

Säugetier, Geflügel und Fisch untersucht, die nicht auf der Verpackung deklariert waren. Zu den Resultaten gelangte man durch mikroskopische Analyse und mit Hilfe einer Polymerase Chain Reaction (PCR). Ergebnis dieser Studie war, dass nur in zwei der zwölf Proben tatsächlich die auf der Verpackung gelisteten Proteinquellen zu finden waren. In den anderen 10 Proben fand man zusätzlich nicht auf der Verpackung angegebene Proteinquellen.

2.6. ZIEL DER STUDIE

Ziel dieser Studie war es, zu untersuchen wie zuverlässig die Deklaration der Proteinquellen auf den jeweiligen Futtermitteln ist und ob sich auch noch andere, nicht deklarierte Proteinquellen im Futter finden lassen.

3. MATERIAL UND METHODE

3.1. MATERIAL

Bei dieser Studie wurden zwölf unterschiedliche kommerzielle Futtermittel getestet, die als geeignet für Hunde mit Futtermittelunverträglichkeiten beworben werden.

3.1.1. Futtermittel

Tab. 1. Bezeichnung, Zusammensetzung und Hersteller der getesteten Futtermittel

Nr.	Bezeichnung	Alleinfutter/ Ergänzungsfutter	Zusammensetzung	Hersteller inkl. Firmensitz
	Hypoallergenic Trockenfutter	Alleinfutter	Reis, Soja (hydrolysiert), Tierfett, Mineralstoffe, Geflügelleber (hydrolysiert), Rübentrockenschnitzel Sojaöl, Fructo- Oligosaccharide, Fischöl, Borretschöl, Tagetesblütenmehl (Quelle für Lutein).	ROYAL CANIN Österreich GmbH Wolfgang Pauli-Gasse 3 1140 Wien
2	z/d Trockenfutter	Alleinfutter	Getrocknete Kartoffeln, Hühnerleberhydrolysat, Kartoffelstärke, Pflanzenöl, Cellulosepulver, Calciumsulphat, Dicalciumphosphat, Salz, Calciumcarbonat, DL-Methionin, Taurin, Vitamine und Spurenelemente. Enthält EU-zugelassene Antioxidantien.	Hills Lübecker Straße 128 22087 Hamburg
3	Hypoallergenic Rabbit & Rice Trockenfutter	Alleinfutter	Kaninchen, Reis	Trovet Deutschland GmbH Steegerstr. 3741334 Nettetal

4	Hypoallergenic Venison & Potato (Single Protein & KH) Trockenfutter	Alleinfutter	Kartoffel (100 %), Hirsch (100 %), Öle und Fette, Mineralstoffe und natürliche Antioxidans.	Trovet Deutschland GmbH Steegerstr. 3741334 Nettetal
5	Horse&Potato(Single Protein & KH) Trockenfutter	Alleinfutter	Kartoffel 70 %, gekochtes Pferdefleisch 19 %, Sonnenblumenöl, Leinsamenöl, Calciumcarbonat, Natriumchloride, Aloe Vera 0,03 %, Rosmarin	Exclusion DORADO S.R.L. Via Romea, 10 - Monsole di Cona 30010 (Venedig) Italien
6	Venison & Potato (Single Protein & KH) Trockenfutter	Alleinfutter	Kartoffel: 71 %, getrocknetes Hirschfleisch: 20 %, Sonnenblumenöl, Leinsamenöl, Calciumcarbonat, Natriumchloride, Aloe Vera: 0,03 %, Rosmarin	Exclusion DORADO S.R.L. Via Romea, 10 - Monsole di Cona 30010 (Venedig) Italien
7	Dog Sana Pferd (Single P & KH) Trockenfutter	Alleinfutter	Gemüse (Kartoffel, Pastinake), Fleisch und tierische Nebenerzeugnisse (Pferdefleischmehl), Öle und Fette, pflanzliche Nebenerzeugnisse (Cellulose, Chicoréewurzel (0,1 %), Mineralstoffe	Vet-Concept GmbH & Co. KG Dieselstr. 4 54343 Föhren Deutschland

8	Sensitiv Diet Kaninchen (Single P & KH) Trockenfutter	Alleinfutter	Gemüse (Kartoffel), Fleisc h und tierische Nebenerze ugnisse (Kaninchenfleischmehl) (29,5 %), Getreide (Dinkel), Öle und Fette, pflanzliche Neben- erzeugnisse (Rüben- melasseschnitzel), Mineralstoffe	Vet-Concept GmbH & Co. KG Dieselstr. 4 54343 Föhren Deutschland
9	Terra Canis Pferd Dose	Alleinfutter	Muskelfleisch vom Pferd (30%), Pferdeherz (30%), Topinambur (36%), Leinöl, Lachsöl, Seealge (Verhältnis Fleisch: Gemüse: übrige Rohstoffe = 60%: 36%: 4%)	Terra Canis GmbH Bismarckstr. 2 80803 München/ Germany
10	Pet-Fit Pferd & Kartoffel (Single Protein & KH) Dosenfleisch	Alleinfutter	60% Pferdefleisch, 15 % Pferdeherz, Mineralstoffe	Pet-Fit Vertriebs- leiter Josef KITZLER Rathaus- platz 31/c/2 3610 Weißen- kirchen
iii ista ista	Lunderland Dosenfleisch Pferd	Einzel-Futtermittel	100% Pferdekehlkopf	Lunderland Tierfutter GmbH. Altmärker Str. 1 29410 Salzwedel OT Brietz
12	Hermann's Reinfleisch-Dosen Pferd	Ergänzungs- Futtermittel	Pferd (Nackenfleisch, Brustfleisch, Beinfleisch, Rücken, Bauch), Brühe	Herrmann GmbH Am Ölfeld 6 85617 Assling

Von den zwölf Futtermitteln wurden sechs bei der Tierärztin oder beim Tierarzt (Futter Nr. 1, 2, 3, 4, 7, 8) vier übers Internet (Futter Nr. 5, 6, 11, 12), eines im Zoofachhandel (Futter Nr. 9) und eines direkt bei der österreichischen Vertretung (Futter Nr. 10) der Futtersorte erworben. Sämtliche Futtermittel wurden im April 2013 erworben.

Alle Futtermittel werden als "geeignet für Eliminationsdiäten" angeboten. Zwei Futtersorten sind hydrolysierte Diätfutter (Futter Nr. 1, 2), die nur über die Tierärztin oder den Tierarzt zu beziehen sind, vier sind Feuchtfutterdosen (Futter Nr. 9, 10, 11, 12) und sechs sind nicht hydrolysierte Trockenfutter(TF) (Futter Nr. 3, 4, 5, 6, 7, 8).

Die nicht hydrolysierten Trockenfutter und Feuchtfutterdosen bestehen jeweils aus einer Protein- und einer Kohlenhydratquelle, wobei beides auf der Verpackung deklariert ist.

3.2. METHODEN

Die TF wurden in kleinere 1 kg Einheiten verpackt und durchnummeriert. Besonderes Augenmerk wurde auf eine sehr sorgfältige Verpackung mit Handschuhen gelegt, um eine Kontamination zu vermeiden. Für jede Futterprobe wurden frische Handschuhe verwendet.

Für die Feuchtfutterproben wurden die Originalverpackungen verwendet, alle Etiketten wurden entfernt. Bezeichnung und Zusammensetzung der Proben waren somit für das analysierende Labor verblindet.

Die fertigen Proben wurden am selben Tag an die Agentur für Gesundheit und Ernährungssicherheit (AGES) weitergeleitet. Dort wurden die Proben mit Hilfe von PCR auf die gängigsten Proteinquellen (Huhn, Pute, Rind, Schaf, Schwein) für Hundefuttermittel untersucht.

3.2.1. DNA-EXTRAKTION

Jede Probe wurde doppelt extrahiert und gemessen.

2 g der homogenisierten Probe wurde mit 10 ml CTAB-Extraktionspuffer (2 % CTAB + 0,02 M EDTA + 0,1M Tris + 1,4 M NaCl + HCl eingestellt auf pH 8,0) und 40 μ l Proteinase K (Merck 1.07393.0010; 600mAnson-U/ml) vermischt. Diese Mischung wurde unter konstantem Schütteln über Nacht bei 45–50 °C inkubiert.

Nach der Zentrifugation wurde 1 ml des Überstandes in ein 2 ml Röhrchen verbracht, welches bereits 50 μ l Chloroformlösung enthielt (Chloroform + i-Amylalkohol: 24 + 1). Nach kräftigem Vortexen und Zentrifugieren (10 min, 13000 rpm) wurde ein Volumenanteil der oberen (wässrigen) Phase in ein 2 ml Röhrchen verbracht zu zwei Volumenanteilen Fällungspuffer (0,5 % CTAB + 0,04 M NaCl). Die Mischung wurde für 60 min bei Raumtemperatur inkubiert. Der flüssige Überstand wurde vollständig verworfen und das Pellet wurde in 450 μ l NaCl (1,2 M) + 50 μ l 10xRNAse Puffer (3 M NaCl + 100 mM Tris + 50 mM EDTA + HCl eingestellt auf pH 7,4) + 5 μ l RNAse (z.B. Roche 1119915) aufgelöst. Die RNA in der Probe wurde durch Schütteln für 10 min bei 56 °C hydrolysiert.

Nach dem Abkühlen wurden 500 µl Phenol/Chloroform/i-Amylalkohol (z.B. AppliChem A0944.0250) hinzugefügt, das Gemisch kräftig gevortext und zentrifugiert (10 min, 13000 rpm). Ein Volumenanteil der oberen (wässrigen) Phase wurde in ein 1,5 ml Röhrchen verbracht zu 0,6

Volumenanteilen i-Propanol. Nach dem Mischen wurden die Röhrchen für 60—90 min in den Gefrierschrank verbracht, damit die DNA ausfallen konnte. Der flüssige Überstand wurde vollständig verworfen und das Pellet ein Mal in 70%igem Ethanol gewaschen.

Das DNA Pellet wird entweder über Nacht bei Raumtemperatur oder in einer Vakuum-Zentrifuge getrocknet und dann in $100~\mu l$ Wasser gegeben (oder TE Puffer, wenn die DNA über längere Zeit aufbewahrt und/oder mehrmals aufgetaut und wieder eingefroren werden soll).

3.2.2. Messung der DNA-Konzentration und Herstellung von Arbeitsverdünnungen

Die DNA Konzentration in der Probe wurde mit einem UV-Photometer bei 260 nm gemessen. Unter der Voraussetzung, dass der Strahlengang 1 cm lang ist, entspricht $10D_{260nm}$ 50 μ l doppelsträngiger DNA/ml. Für die folgende real-time PCR wurde die DNA mit Wasser auf eine Konzentration von 5 μ g/ml verdünnt.

3.2.3. REAL-TIME PCR

Zur Bestimmung eines cut-off Treshold-Cyle (Ct) für jede Speziesspezifische PCR wurde ein cut-off Standard in Doppelbestimmung zusammen mit den Proben gemessen. Dieser Standard beinhaltete 4 995 ng DNA einer nicht-Zielspezies (z.B. Heringsperma-DNA) und 5 ng (=0,1 %) der DNA der nachzuweisenden Tierart.

Die Real-time PCR wurde in einem ABI7500 Real Time PCR System durchgeführt.

Das Reaktionsgemisch zu 25 µl besteht aus 12,5 µl QuantiTect™ Multiplex PCR noROX Master Mix (Qiagen Cat. No. 204745), 5 µl Probe-DNA, sowie Primer und Sonden in den Konzentrationen wie in Tab. 2 angegeben. Das fehlende Volumen wurde mit Wasser ergänzt.

Die Bedingungen des PCR-Laufs sind wie folgt (nach den Empfehlungen des Herstellers des Mastermixes): 15 min initiale Denaturierung bei 95 °C gefolgt von 45 Zyklen von je 60 sec bei 94°C und 60 sec bei 60 °C mit Messung.

Tab 2: Primer und Sonden für die real-time PCR

Tierart	Name von Primer & Sonde	Konz, (μMo 1/l)	Sequenz (5' → 3')	Amplikon Größe (bp)	Literatur	
Huhn	Gallus1 F Gallus1 R	0,2	CAG CTG GCC TGC CGG CCC AGT GGA ATG TGG TAT TCA	76	Köppel R: Eur Food Res Technol DOI 10.1007/s00217- 008-0837-7	
	Gallus1 TMP	0,08	FAM-TCT GCC ACT CCT CTG CAC CCA GT-BHQ1			
Truthahn	MG- ProlR-F	0,2	CAA AGA AAG CAG GGA AAA GGA	83	Köppel R: Eur Food Res Technol DOI 10.1007/s00217-	
	MG- ProlR-R	0,2	TGC ACT CTC GTT GTT AAA AAGH GA			
	MG- ProlR- Cy5	0,08	Cy5-CTG GGA AAG TTA CTG TGT AGC CTC AGA ACG-BHQ2		008-0837-7	
Rind	Rd1 F	0,2	GTA GGT GCA CAG TAC GTT CTG AAG	96	Köppel R: Eur Food Res Technol DOI 10.1007/s00217- 008-0837-7	
	Rd1 R	0,2	GGC CAG ACT GGG CAC ATG			
	Rd1TMP	0,08	FAM-GAA CCT CAT TCT GGG GCC CCG-BHQ1		000-0037-7	
Schwein	Sus1 F1	0,2	CGA GAG GCT GCC GTA AAG G	80	Köppel R: Eur Food Res Technol DOI 10.1007/s00217- 008-0837-7	
	Sus1 R	0,2	TGC AAG GAA CAC GGC TAA GTG			
	Sus1 TMP	0,08	Cy5-TCT GAC GTG ACT CCC CGA CCT GG-BHQ1			
Schaf	Sheep1 F	0,3	TTTCGCCTTTCACTTTATT TTECC	101	Eur Food Res Technol (2009)	
	Sheep1	0,3	GAATTCCTGTGGGGTTGTT GG		230: 125-133	
	Sheep1 Pr	0,02	CY5-CGC AGC CCT CGC CAT AGT TCA CCT-BHQ2			

BHQ1 and BHQ2: Black hole quencher (Sigma Aldrich)

3.2.4. Auswertung des PCR-Laufs

Der Schwellenwert wurde manuell so eingestellt, dass er den linearen Anstieg der Amplifizierungskurve auf halber Höhe schneidet (bei logarithmischer Darstellung). Der niedrigste auf diese Weise erhaltene Ct, reduziert um 3 bis 4 Zyklen, ergibt den Zyklus für das manuelle Setzen der Baseline.

Der Ct Wert, der sich von den cut-off Standards ergibt, wurde für die weitere Beurteilung herangezogen:

Ct_{Probe} Wert oberhalb Ct_{cut-off} + 1 wurde beurteilt als "Tierart nicht nachweisbar (Nachweisgrenze 0,1 %)"

Ct_{Probe} Wert unterhalb Ct_{cut-off} + 1 aber oberhalb Ct_{cut-off} – 1 wurde beurteilt als "Tierart nachweisbar (an der Nachweisgrenze 0,1 %)"

 Ct_{Probe} values unterhalb $Ct_{cut\text{-}off}$ - 1 wurde beurteilt als "Tierart nachweisbar (Nachweisgrenze 0,1 %)"

4. ERGEBNISSE

Die Ergebnisse der Nachweisbarkeit der DNA von Huhn, Pute, Rind, Schaf und Schwein in den untersuchten Futtermitteln sind in Tabelle 3 dargestellt. Lediglich in den beiden hydrolysierten Diäten (Proben 1 und 2) und in Probe 9 (Feuchtalleinfutter mit der Proteinquelle Pferd) wurde nur DNA von auf der Packung deklarierten Proteinquelle gefunden.

Tab. 3: Ergebnisse PCR

	Huhn	Pute	Rind	Schaf	Schwein
Probe1	nachweisbar (NG = 0,1%)	n.n	n.n	n.n	n.n
Probe2	nachweisbar (NG = 0,1%)	n.n	n.n	n.n	n.n
Probe3	nachweisbar (NG = 0,1%)				
Probe4	nachweisbar (NG = 0,1%)	n.n	nachweisbar (NG = 0,1%)	nachweisbar (NG = 0,1%)	Nachweisbar (NG = 0,1%)
Probe5	n.n	n.n	nachweisbar (NG = 0,1%)	nachweisbar (NG = 0,1%)	nachweisbar (NG = 0,1%)
Probe6	n.n	n.n	nachweisbar (NG = 0,1%)	nachweisbar (NG = 0,1%)	nachweisbar (NG = 0,1%)
Probe7	n.n	n.n	nachweisbar (NG = 0,1%)	n.n	nachweisbar (NG= 0,1%)
Probe8	n.n	nachweisbar (NG = 0,1%)	n.n	n.n	n.n
Probe9	n.n	n.n	n.n	n.n	n.n
Probe10	n.n	n.n	nachweisbar (NG = 0,1%)	n.n	n.n
Probe11	n.n	n.n	nachweisbar (NG = 0,1%)	n.n	nachweisbar (NG = 0,1%)
Probe12	n.n	n.n	nachweisbar (NG = 0,1%)	n.n	n.n

Verwendete Abkürzungen:

n.n ... nicht nachweisbar

NG ... Nachweisgrenze

5. DISKUSSION

Ziel dieser Studie war es, kommerzielle Futtermittel dahingehend zu untersuchen, ob Spuren anderer Proteinquellen als auf der Verpackung angegeben zu finden sind. Wir wollten zeigen, ob die Zusammensetzung bzw. Deklaration der Futtermittel mit den tatsächlichen Inhaltsstoffen übereinstimmen. Die Studie soll eine Aussage liefern, ob kommerzielle Eliminationsdiäten als Alternative zur selbstgekochten Eliminationsdiät dienen können, da Futtermittelunverträglichkeiten immer häufiger werden und damit eine Notwenigkeit entsteht, diese Diäten den Hundebesitzerinnen und Hundebesitzern zu empfehlen.

Die Studie zeigte, dass in neun der zwölf hypoallergenen Futtersorten Verunreinigungen nachweisbar waren. Die einzigen zwei hydrolysierten Diäten, die beim Tierarzt erworben worden sind, sind frei von Verunreinigungen, zumindest hinsichtlich Huhn, Pute, Rind Schwein und Schaf.

Eine ähnliche Studie wurde im Jahr 2011 von R. Ricci et al. durchgeführt. In dieser Studie wurden 12 Futtermittel, die als für Allergiker geeignet beschrieben sind, auf das Vorhandensein von nicht deklarierten AG tierischen Ursprungs getestet. Von den 12 Futtermitteln waren 11 als Single Protein Futtermittel deklariert und zusätzlich gab es ein hydrolysiertes Futter. Getestet wurde auf Geflügel, Säugetier und Fisch AG. Die Proben wurden mit zwei unterschiedlichen Untersuchungsmethoden bearbeitet. Als ersten Untersuchungsgang verwendete man eine mikroskopische Analyse, anschließend wurden die Proben mit PCR auf DNA- Spuren von oben schon erwähnten tierischen Proteinen getestet. Die Ergebnisse wurden dann mit den Angaben auf der Verpackung verglichen.

Die Ergebnisse zeigten deutliche Abweichungen zwischen den Angaben auf den Verpackungen und den tatsächlichen Werten. Nur bei zwei Futtermitteln (eine davon war die hydrolysierte) stimmten die Ergebnisse mit den deklarierten Angaben überein. In 10 der 12 getesteten Futtermittel fand man Rückstände tierischen Ursprungs, die nicht auf der Verpackung angegeben waren. Laut den Ergebnissen der Studie sind hydrolysierte Eliminationsdiäten durchaus empfehlenswert für Hunde mit Futtermittelunverträglichkeiten.

Eine Untersuchung mittels PCR ist eine sehr sensitive Methode, bei der auch schon geringe Mengen der Allergene nachgewiesen werden können. Beim Menschen weiß man, dass das Molekulargewicht der allergieauslösenden Nahrungsmittelproteine zwischen 10,00 und 70,00 kDa liegt (VERLINDEN et al., 2006). Der kleinste in der Literatur beschriebene Wert zur Auslösung einer IgE-Bindung liegt zwischen 0.97 kDa und 1,4 kDa (CAVE, 2006). Nun liegt natürlich ein Unterschied zwischen Molekularmenge und Menge an Allergie auslösenden AG vor. Die Literatur liefert hauptsächlich Angaben zur Molekulargröße.

Bei der Studie wurden nur 12 Futtermittel verwendet, die häufig in Österreich für Hunde mit Futterunverträglichkeiten empfohlen oder von BesitzerInnen bei Ernährungsberatern (persönliche Nachfrage bei Dr. Handl) angefragt werden. Es kann daher selbstverständlich keine Aussage über ähnliche, nicht getestete Produkte gemacht werden.

Von den einzelnen Futtermitteln wurde jeweils nur ein Produkt einer Charge verwendet, es könnte sein, dass nur diese Charge von Verunreinigungen betroffen ist. Doch selbst wenn nicht jede Charge betroffen ist, kann in der Praxis ein Hundebesitzer nicht sicherstellen, während einer 8-12-wöchigen Diät ausschließlich Produkte einer Charge zu füttern.

Die Verunreinigung der Diäten mit nicht deklarierten Proteinen kann theoretisch in jedem Schritt der Herstellung passieren. Große Firmen haben die Möglichkeit, hypoallergene Diäten auf eigenen Fertigungsstraßen zu produzieren, um etwaige Kontamination zu verhindern. Kleinere Firmen haben diese Möglichkeit wahrscheinlich nicht. Auch eine sorgfältige Reinigung der Produktionsstraßen kann eine Verschleppung offenbar nicht ganz verhindern.

Eine Verunreinigung bzw. Verschleppung könnte beim Umfüllen der Proben passiert sein. Es wurde zwar sehr genau darauf geachtet, keine Kontamination zu verursachen, für jede einzelne Probe wurden frische Handschuhe verwendet. Jedoch kann man die Möglichkeit nicht ganz ausschließen. Für ein sauberes Umfüllen spricht jedoch, dass die gefunden Verunreinigungen nicht mit der Reihenfolge der Probenahme in Einklang

stehen, und dass auch in den Dosen, welche vor der Analyse nicht geöffnet worden waren, Verunreinigungen gefunden wurde

Die Ergebnisse der Studie, zusammen mit denen von R. RICCI 2011 et al. können erklären, warum kommerzielle Futtermittel während der Eliminationsdiät nicht vertragen werden, obwohl sie selbstgekocht vertragen werden. Wie unsere Studienergebnisse gezeigt haben, sind in manchen Futtermitteln mehrere Proteinquellen enthalten, obwohl nur eine auf der Packung angegeben ist. So wurden in Probe 3 fünf nicht deklarierte Proteine nachgewiesen, in Probe 4 sind vier nicht deklarierte Proteine gefunden worden, Probe 11 und 7 enthielten zwei nicht deklarierte Proteine. In Probe 6 und 5 wurden drei nicht auf der Packung gekennzeichnete Proteine gefunden. In den Proben 12, 10 und 8 wurde jeweils nur ein nicht deklariertes Protein entdeckt. Die Proben 1 und 2 und 9 enthielten nur die auf der Packung angegebenen Proteine.

Insgesamt wurde in den 12 Proben Rind acht Mal nachgewiesen, Schwein sechs Mal, Schaf und Huhn wurden vier Mal gefunden und Pute zwei Mal.

Für Hunde mit einer Futtermittelunverträglichkeit sind selbst gekochte Diäten noch immer die beste Wahl. Ist es dem Besitzer aber nicht möglich selber zu kochen, so können anhand der Ergebnisse Futter ausgewählt werden, die als Alternative geeignet sind. Es ist aber immer darauf zu achten wogegen der Hund allergisch ist bzw. welche Proteinquelle er noch nie gefressen hat.

Beim Hund besitzt scheinbar kein Futtermittel eine signifikant höhere Allergenität als alle anderen, auch wenn verschiedenste Studien Rindfleisch, Geflügel, Getreide, Kuhmilch, Soja, Eier und Fisch als häufige Futtermittelallergene deklariert haben (KENNIS, 2006).

Beim Hund sind die Futtermittel, die häufig gefüttert werden, diejenigen die häufig Probleme machen. Oft ist die auslösende Komponente eine Grundzutat des kommerziellen Futters (AUGUST, 1985). Die Annahme, dass hauptsächlich diejenigen Futtermittel eine Allergie verursachen, die bereits über einen längeren Zeitraum verfüttert wurden, bestätigen laut August (1985) die Angaben in einer Studie von WALTON (1977), in der 68 % der Hunde, die an einer Futtermittelallergie litten, das Futter bereits über einen

Zeitraum von mehr als zwei Jahren bekamen, bevor sich erste Symptome manifestierten.

Bei Hunden und Katzen gibt es eine Menge potentieller Futtermittelallergene. Aufgrund der vielen Inhaltsstoffe in kommerziellen Tierfuttern ist es jedoch schwierig, das ursächliche Futterallergen zu ermitteln. Jede beliebige Futterkomponente ist ein potentielles Allergen, jedoch treten in der Regel Reaktionen auf Proteine auf. Reaktionen auf Zucker oder Mineralien sind dagegen sehr selten (TODAY, 1980).

Auch regionale Unterschiede können beim Hund eine Rolle spielen. So ist in England, wo sehr häufig Hammel- oder Lammfleisch verfüttert wird, eine Hypersensibilität gegen Hammel- oder Lammfleisch weit verbreitet (REEDY, 1994).

In der Veterinärmedizin wurden Anhand von Studien an Hunden verschiedene Futtermittelallergene identifiziert. Laut DAVOL 2001 ergaben verschiedene Studien zur Identifizierung der am häufigsten vorkommenden Futtermittelallergenen beim Hund (253 Hunde) folgendes Ergebnis: In 68% der Fälle waren Rindfleisch, Molkereiprodukte und Weizen Auslöser für Allergien und in 25 % der Fälle wurden Geflügel, Hühnereier, Lamm und Soja mit Futtermittelallergien in Zusammenhang gebracht.

Laut den Studienergebnissen von DAVOL 2001kann man sagen, dass die in dieser Studie untersuchten Proteine zu den häufigsten allergieauslösenden Proteinen in kommerziellen Hundefuttern zählen.

6. Zusammenfassung

In dieser Studie wurden 12 als hypoallergen deklarierte kommerzielle Futtermittel anhand einer PCR Analyse auf das Vorhandensein von nicht auf der Packung deklarierten Proteinen untersucht. Bei den ausgewählten Futtermitteln handelt es sich um zwei hydrolysierte Trockenfutter, vier Feuchtfutterdosen und sechs nicht hydrolysierte Trockenfutter. Die Trockenfutter bestehen jeweils aus einer Proteinquelle und einer Kohlenhydratquelle. Bei den Feuchtfuttern handelt es sich um zwei Alleinfutter und zwei Ergänzungsfuttermittel (Reinfleischdosen).

Untersucht wurden die Proben mittels real-time PCR auf das Vorhandensein von häufig in Hundefutter verarbeiteten Proteinen: Huhn, Pute, Rind, Schaf und Schwein. Drei der zwölf Proben enthielten nur die auf der Packung deklarierten Proteine, nämlich die beiden hydrolysierten Diäten und ein Dosen-Alleinfutter. Acht Proben wurden positiv auf Rind getestet. In sechs Proben wurden Antigene vom Schwein gefunden, die nicht auf der Verpackung angegeben sind. Vier der zwölf Proben enthalten Schafproteine und zwei der Proben sind jeweils positiv getestet auf Pute und Huhn. In einer Probe wurden sogar alle fünf Tierarten nachgewiesen, in einer weiteren vier und in je zwei Proben drei nicht deklarierte Tierarten.

Anhand dieser sowie publizierter Ergebnisse aus der Literatur kann ausgesagt werden, dass kommerzielle, als "hypoallergen" bezeichnete Futtermittel häufig mit Fremdproteinen kontaminiert sind und daher nicht bedenkenlos für Hunde mit Futtermittelunverträglichkeiten empfohlen werden können.

7. SUMMARY

In this study, 12 as hypoallergenic declared commercial foods were analyzed by PCR for the presence of non declared proteins. The selected foods were two hydrolyzed dry foods, four wet foods and six non-hydrolyzed dry foods. The dry foods consists of a single protein source and one carbohydrate source, respectively.

Samples were analysed for the most commonly processed dog food proteins (chicken, turkey, beef, mutton and pork) by real time PCR.

Three of the twelve samples contained only the declared proteins. Eight samples were tested positive for beef. In six samples pig antigens were found which are not indicated on the label. Four of the twelve samples included sheep proteins, and two of the samples are positive tested for turkey and chicken.

Based on the results, we suspect that many commercial hypoallergenic dog foods get contaminated during the production process and therefore cannot be recommended to restriction diets in dogs.

8. LITERATUR

Ackermann L. (1988): Food hypersensitivity: A rare, but manageable disorder. Vet Med 83, 1142

August, J. R. (1985): "Dietary hypersensitivity in dogs: cutaneous manifestations, diagnosis, and management." Compend Contin Educ Vet (USA)

Bethlehem, Simone, Jennifer Bexley, and Ralf S. Mueller (2012): Patch testing and allergen-specific serum IgE and IgG antibodies in the diagnosis of canine adverse food reactions. Vet Immunol Immunopathol **145** (3), 582-589.

Carlotti, Didier N., Isabelle Remy, and Christine Prost (1990): Food allergy in dogs and cats. A review and report of 43 cases. Vet Dermatol 1(2), 55-62.

Cave, N. J. (2006): Hydrolyzed protein diets for dogs and cats. Vet Clin North Am Small Anim Pract, **36**(6), 1251-1268.

Davol P.A. (2001): Allergic and non-allergic food reactions causing skin diseases. Canine dermatology series (pdavol@labbies.com)

Denis S. and Paradis M. (1994): L'allergie alimentaire chez le chien et le chat. 2. Étude rétrospective [Food allergies in dogs and cats. Part 2: retrospective study.]Med Vet Quebec, **24**: 15-20

DeBoer DJ, Hillier A. The ACVD task force on canine atopic dermatitis (XVI) (2001): laboratory evaluation of dogs with atopic dermatitis with serum-based "allergy" tests. Vet Immunol Immunopathol; **81**: 277-87.

Elwood CM, Rutgers HC, Batt RM (1994): Gastroscopic food sensitivity testing in 17 dogs. J Small Anim Pract, **35**(4), 199-203.

Fadok VA. (1994):

Diagnosing and managing the food-allergic dog. Compend Contin Educ Vet. **16**, 1541-4.

Favrot: Clinical signs and diagnosis of canine atopic dermatitis", http://www.dog-health-handbook.com/support-files/dog-skin-allergies.pdf, letzter Zugriff: .04.07.14

Foster, A. P., Knowles, T. G., Moore, A. H., Cousins, P. D. G., Day, M. J., u. Hall, E. J. (2003): Serum IgE and IgG responses to food antigens in normal and atopic dogs, and dogs with gastrointestinal disease. Vet Immunol Immunopathol, 92(3), 113-124.

Gaschen, F. P., & Merchant, S. R. (2011): Adverse food reactions in dogs and cats. Vet Clin North Am Small Anim Pract, **41**(2), 361-379.

Guilford, W. Grant (1996): Gastrointestinal immune system. Strombeck's small animal gastroenterology, 20-39.

Hall, E. J. (1994): Gastrointestinal aspects of food allergy: a review. J Small Anim Pract, **35**(3), 145-152.

Halliwell, R. (2006): Revised nomenclature for veterinary allergy. Vet Immunol Immunopathol, **114** (3), 207-208.

Harvey, R. G. (1993): Food allergy and dietary intolerance in dogs: a report of 25 cases. J Small Anim Pract, 34(4), 175-179.

Hill, P. (1999): Diagnosing cutaneous food allergies in dogs and cats-some practical considerations. In Practice, **21**(6), 287-294.

Hillier, A., & Griffin, C. E. (2001). The ACVD task force on canine atopic dermatitis (X): is there a relationship between canine atopic dermatitis and cutaneous adverse food reactions?. Vet Immunol Immunopathol, **81**(3), 227-231.

Jackson, H. A., Murphy, K. M., Tater, K. C., Olivry, T., Hummel, J. B., & Itensen, J. (2005): The pattern of allergen hypersensitivity (dietary or environmental) of dogs with non-seasonal atopic dermatitis cannot be differentiated on the basis of historical or clinical information: a prospective evaluation 2003-2004. Vet Dermatol, 16, 200.

Jackson, H. A. (2009). Food allergy in dogs-clinical signs and diagnosis. J Comp Anim Pract, 19(3), 230-233.

Jeffers, J. G., Shanley, K. J., & Meyer, E. K. (1991): Diagnostic testing of dogs for food hypersensitivity. J Am Vet Med Assoc, **198**(2), 245-250.

Jeffers, J. G., Meyer, E. K., & Sosis, E. J. (1996): Responses of dogs with food allergies to single-ingredient dietary provocation. J Am Vet Med Assoc, **209**(3), 608-611.

Kennis, R. A. (2006): Food allergies: update of pathogenesis, diagnoses, and management. Vet Clin North Am Small Anim Pract, **36**(1), 175-184.

Kunkle, G., & Horner, S. (1992): Validity of skin testing for diagnosis of food allergy in dogs. J Am Vet Med Assoc, **200**(5), 677-680.

Köppel, R., Ruf, J., Zimmerli, F., & Breitenmoser, A. (2008). Multiplex real-time PCR for the detection and quantification of DNA from beef, pork, chicken and turkey. European Food Research and Technology, **227**(4), 1199-1203.

Loeffler, A., Lloyd, D. H., Bond, R., Kim, J. Y., & Pfeiffer, D. U. (2004): Dietary trials with a commercial chicken hydrolysate diet in 63 pruritic dogs. Vet Rec, **154**(17), 519-521.

Mueller, R., & Tsohalis, J. (1998): Evaluation of serum allergen-specific IgE for the diagnosis of food adverse reactions in the dog. Vet Dermatol 167-71. (United Kingdom).

Muller, G. H., Kirk, R. W., & Scott, D. W. (1989): Food hypersensitivity. Small Animal Dermatology, 470-474.

Paterson, S. (1995): Food hypersensitivity in 20 dogs with skin and gastrointestinal signs. J Small Anim Pract, **36(**12), 529-534.

Picco, F., Zini, E., Nett, C., Naegeli, C., Bigler, B., Rüfenacht, S. & Favrot, C. (2008): A prospective study on canine atopic dermatitis and food-induced allergic dermatitis in Switzerland. Vet Dermatol, **19**(3), 150-155.

Ricci, R., Granato, A., Palagiano, C., Vascellari, M., Boscarato, M., Andrighetto, I., & Mutinelli, F. (2011): Detection of food antigens in dog foods used as elimination diets. 15. Tagung der ESVCN, 2011

Reedy, L. M. (1994): Food hypersensitivity to lamb in a cat. Journal of the American Veterinary Medical Association, **204**(7), 1039-1040.

Rosser Jr, E. J. (1993): Diagnosis of food allergy in dogs. J Am Vet Med Assoc, **203**(2), 259-262.

Roudebush, P., & Cowell, C. S. (1992): Results of a hypoallergenic diet survey of veterinarians in North America with a nutritional evaluation of homemade diet prescriptions. Vet Dermatol, **3**(1), 23-28.

Roudebush, P., & Schick, R. O. (1994): Evalution of a Commerical Canned Lamb and Rice Diet for the Management of Adverse Reactions to Food in Dogs*. Vet Dermatol, **5**(2), 63-67.

Roudebush, P., Guilford, W. G., & Shanley, K. J. (2000): Adverse reactions to food. Small animal clinical nutrition. 4th ed. Topeka, KS, US: Mark Morris Institute, 431-453.

Scott, D., Miller, W., & Griffin, C. M. (2001): KIRK'S Small animal dermatology. WB Saunders, Philadelphia, PA, USA, 121-122.

Thoday, K. L. (1980): Canine pruritus: an approach to diagnosis. Stages III and IV. Allergy and idiopathy*. J Small Anim Pract, **21**(9), 483-493.

Verlinden, A., Hesta, M., Millet, S., & Janssens, G. P. J. (2006): Food allergy in dogs and cats: a review. Crit Rev Food Sci Nutr, **46**(3), 259-273.

Walton, G. S. (1967): Skin responses in the dog and cat to ingested allergens. Observations on one hundred confirmed cases. Vet Rec, **81**(27), 709-713.

White, S. D. (1986): Food hypersensitivity in 30 dogs. J Am Vet Med Assoc, **188**(7), 695-698.

Wilhelm, S., & Favrot, C. (2005): [Food hypersensitivity dermatitis in the dog: diagnostic possibilities]. Schweiz Arch Tierheilkd, **147**(4), 165-171.