



Mykotoxine in der Tierernährung – Gefahr erkannt?

Gefahr gebannt?

Prof. Dr. Sven Dänicke

Institut für Tierernährung, Friedrich-Loeffler-Institut (FLI), Braunschweig

Einleitung

Ubiquitäre Arten der Pilzgattung *Fusarium* bilden ein breites Spektrum an Metaboliten des Sekundärstoffwechsels, wobei eine Reihe dieser Metaboliten als *Fusarium*-Mykotoxine anzusehen sind, da sie bei Mensch und Tier toxische Effekte ausüben können. Besondere Bedeutung kommt dabei den *Fusarium*-Toxinen Deoxynivalenol (DON) und Zearalenon (ZON) zu, da sie unter den klimatischen Bedingungen in Deutschland - selbst bei Berücksichtigung pflanzenbaulicher Minimierungsstrategien - in Konzentrationen auf Futterpflanzen vorkommen können, die geeignet sind, die Tiergesundheit zu beeinträchtigen.

DON inhibiert die Proteinsynthese auf zellulärer Ebene, während ZON vorwiegend über eine kompetitive Bindung an Östrogenrezeptoren eine östrogene Wirkung entfalten kann und den endokrinen Disruptoren zugeordnet wird. Klinisch manifestiert sich eine DON-Intoxikation beim Schwein in einem Futterverzehrsrückgang, während eine ZON-Intoxikation zu Hyperöstrogenismus und Fertilitätsstörungen führt.

Aus den genannten Gründen hat die Kommission der Europäischen Union Richtwerte für Mykotoxine in zur Verfütterung an Tiere bestimmten Erzeugnissen empfohlen. Entsprechend dieser Richtlinie sollten Ergänzungs- und Alleinfuttermittel für Schweine als die empfindlichste Nutztierart nicht mehr als 0,9 mg DON/kg enthalten, sowie Ergänzungs- und Alleinfuttermittel für Ferkel und Jungsauen nicht mehr als 0,1 mg ZON/kg und für Sauen und Mastschweine nicht mehr als 0,25 mg ZON /kg (bei einem Feuchtegehalt von 12%) enthalten. Die Einhaltung dieser Richtwerte soll sicherstellen, dass es unter praxisüblichen Bedingungen nicht zu Beeinträchtigungen der Leistung und Tiergesundheit kommt.

Die Festlegung von Höchstgehalten (rechtlich bindend) oder Richtwerten für kritische Konzentrationen von unerwünschten Stoffen (z.B. Mykotoxine) in Futtermitteln erfolgt prinzipiell unter Berücksichtigung der Anforderungen, die an die Futtermittelsicherheit gestellt werden und betreffen die Lebensmittelsicherheit, den Schutz der Gesundheit von Mensch und Tier sowie der Umwelt. Die Gewichtung dieser Aspekte bei der Festlegung solcher Werte hängt unter anderem ab vom Vorkommen des betrachteten unerwünschten

nachgewiesen (Abb. 2). Aus quantitativer Sicht sind für das Schwein vor allem ZON und α -ZOL bedeutsam. Dabei ist die Metabolisierung von ZON zu α -ZOL mit einem Anstieg der Toxizität verbunden, da die Bindungsaffinität von α -ZOL an Östrogenrezeptoren im Uterus des Schweins im Vergleich zu ZON etwa 19-fach stärker ist.

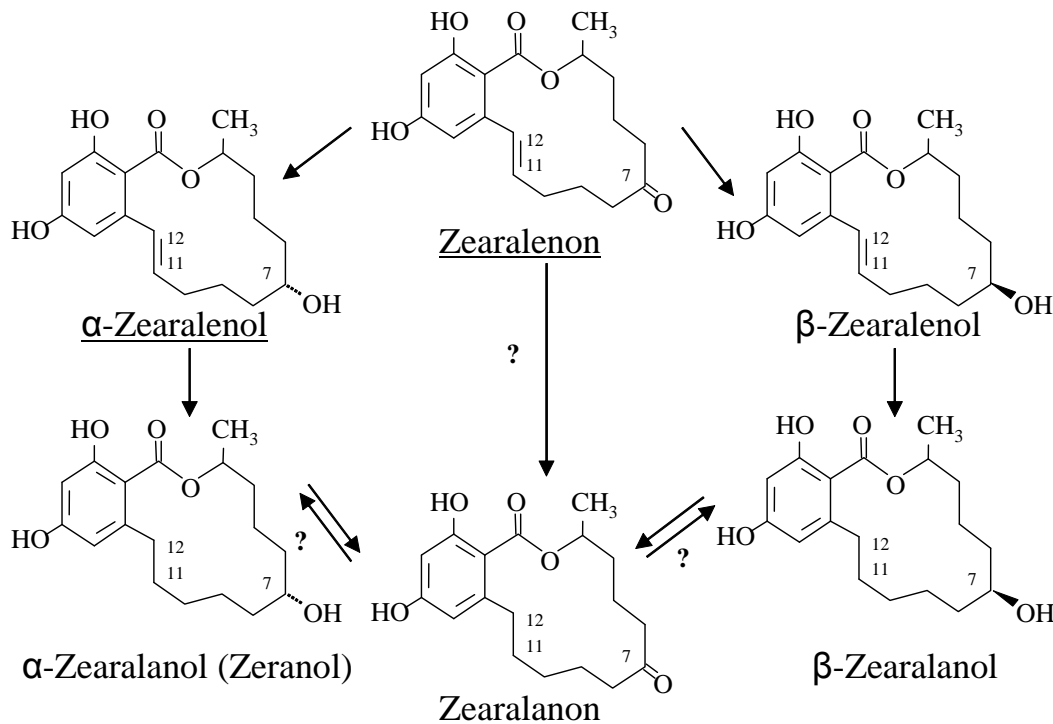


Abb. 2. Nachgewiesene und mögliche Bildungswege der Metaboliten von Zearalenon

Die Interpretation beobachteter metabolischer Toxineffekte kann erleichtert werden, wenn die systemisch verfügbare Toxinkonzentration bekannt ist, die aus einer bestimmten Toxinkonzentration im Futter resultiert. Dies setzt Kenntnisse über den Anteil des Toxins voraus, der aus der Futtermatrix freigesetzt, absorbiert und letztlich systemisch verfügbar ist. Toxine aus natürlich kontaminierten Futtermitteln müssen zunächst unter den Bedingungen des Verdauungstraktes aus der Futtermatrix freigesetzt werden, bevor eine Absorption erfolgen kann. Es gibt Hinweise, dass sowohl DON als auch ZON in natürlich kontaminierten Futtermitteln in variablen Anteilen an pflanzliche Bestandteile gebunden vorliegen, woraus sich theoretisch eine verminderte Bioverfügbarkeit ergeben kann.

Unter Verwendung pharmakokinetischer Methoden und Modelle wurde die Bioverfügbarkeit von DON aus natürlich kontaminierten Weizenkörnern bestimmt. Dazu war es erforderlich, DON einerseits intravenös und andererseits oral zu verabreichen. Da intravenös applizierte Pharmaka oder Toxine *per Definition* zu 100 % systemisch verfügbar sind, lässt sich aus dem Verhältnis der korrespondierenden Flächen unter den Kurven der Konzentrations-Zeit-

Verläufe nach oraler und intravenöser Applikation die Bioverfügbarkeit abschätzen (Abb. 3). Es zeigte sich, dass DON aus natürlich kontaminiertem Weizen zu annähernd 100 % bioverfügbar war. Weiterhin ließ sich aus den Untersuchungen ableiten, dass die Plasma-Eliminationshalbwertszeit ($t_{1/2}$) nach oraler DON-Exposition etwa 6 h betrug. Andererseits ist zu berücksichtigen, dass die DON-Kinetik selbst bei gleicher Dosis und annähernd gleicher Körpermasse zum Teil erheblichen individuellen Schwankungen unterliegt, was insbesondere bei der Beurteilung von DON-Konzentrationen im Blut von Schweinen im Rahmen der klinischen Diagnostik zu berücksichtigen ist (Abb. 3).

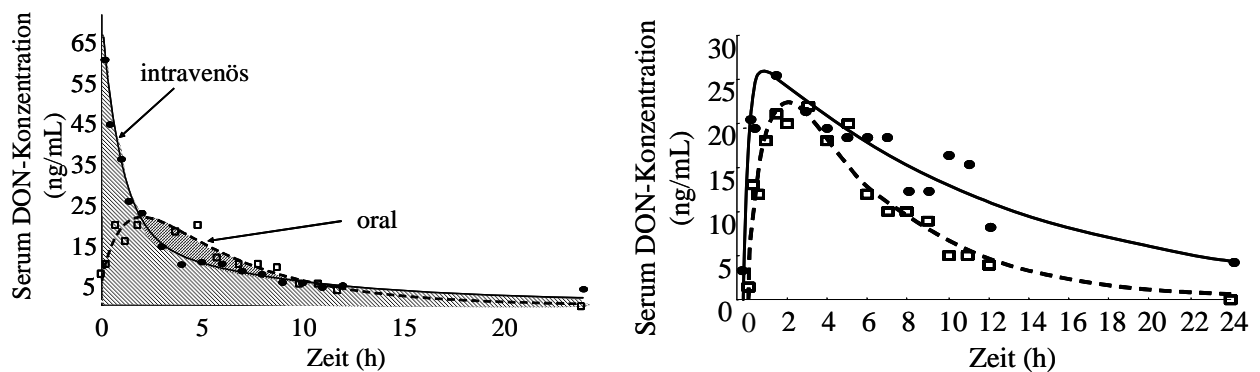


Abb. 3. Deoxynivalenol(DON)-Konzentration im Serum von Schweinen (~40 kg Körpermasse) nach intravenöser und oraler DON-Gabe (links) sowie Variation der Serumkonzentration von DON nach oraler Exposition von 2 Schweinen bei annähernd gleicher Dosis und gleicher Körpermasse (rechts)

Vergleichbare Untersuchungen zur Bioverfügbarkeit von ZON liegen für das Schwein gegenwärtig nicht vor, doch deuten methodische Vorarbeiten an, dass auch ZON aus natürlich kontaminierten Futtermitteln in erheblichem Ausmaß absorbiert wird. Im Hinblick auf die Beurteilung von ZON-Rückständen in physiologischen Matrixes sind gegenüber DON einige Besonderheiten zu berücksichtigen. Diese betreffen hauptsächlich die größere Bedeutung der Metaboliten (insbesondere α -ZOL) und die ausgeprägte enterohepatische Rezirkulation.

Analytik

Für die DON- und ZON-Bestimmung in Futtermitteln wurde früher meist Gaschromatographie (GC) mit Elektroneneinfangdetektor (ECD) oder massenspektrometrischem Detektor (MS) eingesetzt. Heute wird zunehmend die Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (HPLC) mit Ultraviolett-Detektion (UV), Dioden Array Detektion (DAD), Fluoreszenz- oder MS-Detektion verwendet. Zur Probenaufbereitung werden die Futtermittel mit Wasser oder

einem Gemisch aus Wasser und organischem Lösungsmittel extrahiert, und die Extrakte werden entweder mittels Festphasenextraktion oder unter Verwendung von Immunoaffinitätssäulchen (IAC) aufgereinigt. Die Nachweisgrenzen variieren methodenabhängig zwischen 0,001 und 0,1 mg/kg. Mit modernen HPLC-MS-Methoden lässt sich die Nachweisgrenze noch deutlich verringern (<0,001 mg/kg), was aber für eine Risikoabschätzung der DON-Kontamination von Futtermitteln oder physiologischen Substraten häufig nicht erforderlich ist.

In physiologischen Substraten, wie Galle und Blutserum, müssen neben den Muttersubstanzen DON und ZON auch die erwähnten Metabolite und darüber hinaus auch deren mögliche Konjugate, mit z.B. Glukuronsäure, bestimmt werden, da diese sich hinsichtlich ihrer Toxizität zum Teil recht deutlich voneinander unterscheiden können.

Neben den angeführten Analysemethoden für DON und ZON werden häufig auch Enzyme-Linked-Immunosorbent-Assays (ELISA) angewendet. Sie eignen sich hauptsächlich für Screening-Zwecke; eine quantitative Bestimmung ist aufgrund von Kreuzreaktionen (z.B. mit acetylierten DON-Verbindungen) zu ungenau. Proben, die im ELISA positiv detektiert wurden, sollten mit einer anderen Methode bestätigt werden. Die Notwendigkeit der Anwendung anderer (spezifischer) Analysemethoden ergibt sich zwingend dann, wenn physiologische Substrate mittels ELISA analysiert werden. Diese Tests sind in der Regel für pflanzliche Lebens- bzw. Futtermittel entwickelt worden und Kreuzreaktionen mit Metaboliten, denen eine besondere toxische Bedeutung zukommt (z.B. α -ZOL, siehe oben), oder mit weiteren Bestandteilen der Matrix tierischer Gewebe dürfte eine größere Bedeutung zukommen. Außerdem kommen DON, ZON und ihre Metaboliten in physiologischen Substraten – im Gegensatz zu Futtermitteln - in der Regel (außer bei Harn und Kot) nur in sehr niedrigen Konzentrationen vor. Das stellt besonders hohe Anforderungen an die analytischen Methoden.

Vergleichende Untersuchungen von Blut-, Milch- und Galleproben auf DON-Rückstände zwischen HPLC-, GC-MS-, HPLC-MS- sowie ELISA-Methoden zeigten gute Übereinstimmungen zwischen den 3 erstgenannten Methoden, während die ELISA-Methode zu falsch positiven - und biologisch nicht interpretierbaren - Ergebnissen führte.

Beurteilung der Rückstände von DON und ZON sowie deren Metaboliten in physiologischen Substraten des Schweins

Aus praktischer und forensischer Sicht stellt sich häufig die Frage, inwieweit dem Nachweis von Mykotoxinen in physiologischen Substraten vom Schwein eine Bedeutung für das Auftreten mehr oder weniger ausgeprägter toxischer Effekte zukommt bzw. ob es nutzbare Korrelationen zwischen den Toxinkonzentrationen und den toxischen Effekten gibt. Aus methodischer Sicht sind hierbei Dosis-Wirkungsstudien notwendig, welche die Toxinkonzentrationen im Futter den Toxinkonzentrationen in den physiologischen Substraten gegenüberstellen. Wie bereits angedeutet, ist dabei zu berücksichtigen, dass sich DON und ZON hinsichtlich ihres kinetischen Verhaltens im Organismus deutlich voneinander unterscheiden. So bewirkt die erwähnte ausgeprägte enterohepatische Rezirkulation von ZON und seinen Metaboliten deren konsekutive Anreicherung – auch von geringsten Futterkonzentrationen – in der Galle, während für DON dieser Weg offensichtlich eine geringere Rolle spielt und es stattdessen prominent systemisch zirkuliert, bevor es renal eliminiert wird. Zwischen der oralen Aufnahme an DON und den Rückständen von DON und de-epoxy-DON im Blut sowie zwischen der ZON-Aufnahme und den Rückständen von ZON und dessen Metaboliten in der Galle konnten lineare Beziehungen nachgewiesen werden (Abb. 4 und 5).

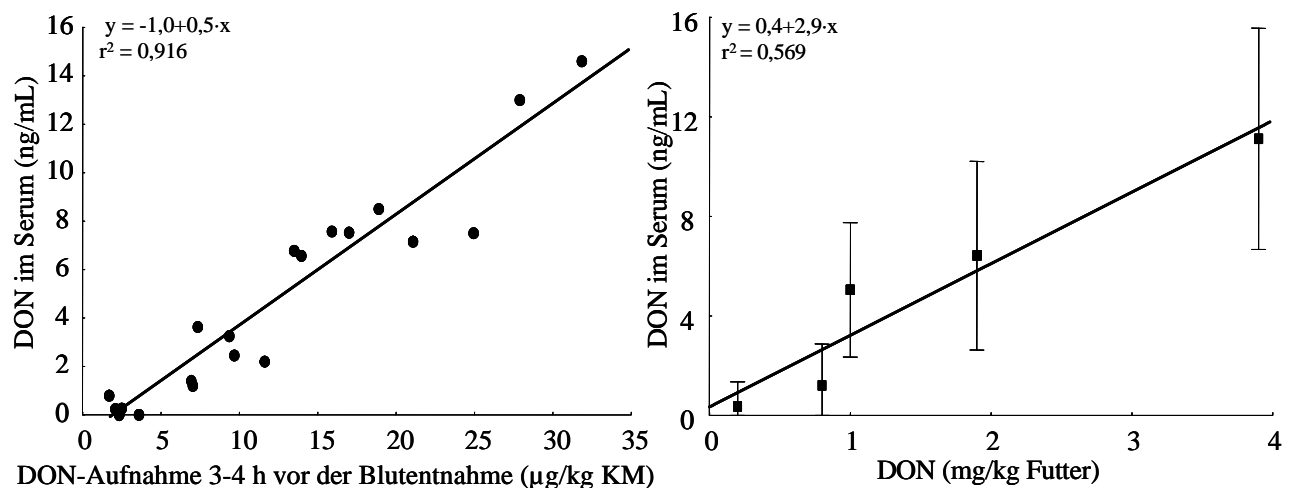


Abb. 4. Deoxynivalenol(DON)-Konzentration im Serum von kontrolliert gefütterten Ferkeln: In Abhängigkeit von der DON-Aufnahme je kg Körpermasse (LM) (**links**) sowie von der DON-Konzentration des Futters (**rechts**)

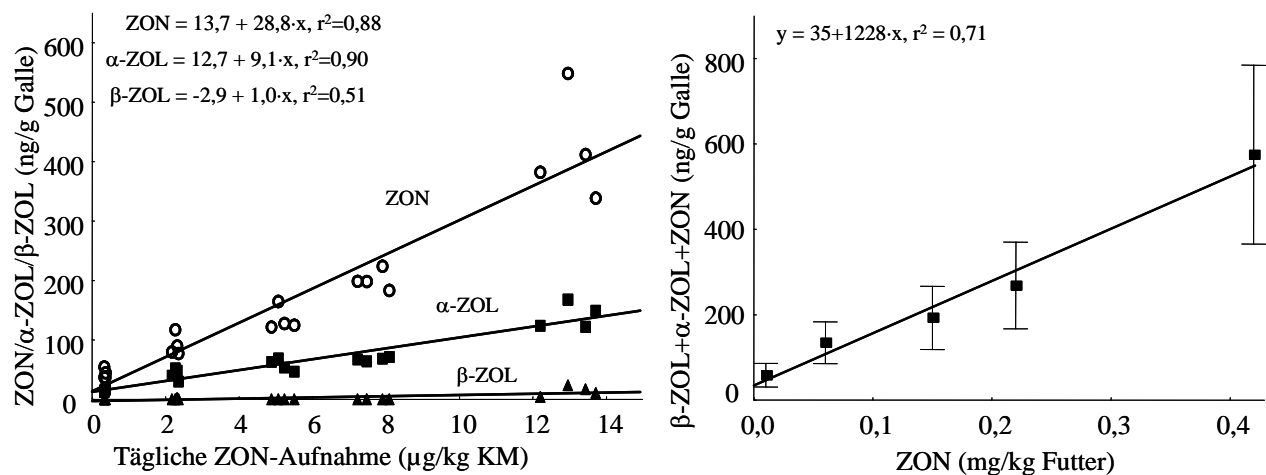


Abb. 5. Konzentration von Zearalenon (ZON) sowie den Metaboliten α -Zearalenol (ZOL) sowie β -ZOL in der Galle von Ferkeln in Abhängigkeit von der ZON-Aufnahme je kg Körpermasse (LM) (**links**) sowie von der ZON-Konzentration des Futters (**rechts**). Der mittlere Anteil von ZON, α -ZOL und β -ZOL an der Summe aller 3 Metaboliten beträgt 72 %, 26 % und 2 %

Aus praktischer Sicht ist jedoch bedeutsam, inwieweit sich Beziehungen zwischen der Toxinkonzentration im Futter und der Toxinkonzentration in Blut bzw. Galle herstellen lassen. Auch hier ließ sich eine signifikante Linearität zeigen. Die Anwendbarkeit dieser Beziehungen für praktische Belange wird jedoch stark eingeschränkt durch die hohe Variabilität der entsprechenden Konzentrationen sowohl von DON im Serum als auch von ZON und seinen Metaboliten in der Galle, die zu den jeweiligen Toxinkonzentrationen im Futter gehören, die von praktischem Interesse sind (Abb. 4 und 5). Mit Blick auf die erwähnten europäischen Richtwerte für die kritischen Toxinkonzentrationen ist festzustellen, dass in diesem Konzentrationsbereich eine sichere Differenzierung zwischen "Toxin-frei" gefütterten Tieren und solchen, die eine Ration erhielten, deren Toxinkonzentration sich um die genannten Richtwerte bewegt, nicht möglich ist. Dies resultiert auch aus der Tatsache, dass praktische Futtermischungen nie ganz frei sind von DON und ZON.

Daher lassen sich auch bei quasi "Toxin-frei" gefütterten Kontrolltieren regelmäßig positive DON- und ZON-Befunde in Serum und Galle nachweisen. Außerdem sind bei der Beurteilung der DON-Befunde im Blut die Kinetik sowie die tierindividuelle Variation zu berücksichtigen (Abb. 3). Aus dem kinetischen Profil lässt sich ableiten, dass die DON-Konzentration im Blut nach der Fütterung bis zu einem Maximum rasch ansteigt und dann allmählich abfällt (Abb. 3). Das bedeutet, dass der Zeitpunkt der Blutentnahme nach der Fütterung zur Variation der Befunde beiträgt. Dieses Problem ist insbesondere bei *ad libitum*

gefütterten Tieren von Bedeutung, bei denen eine Standardisierung des Blutentnahmezeitpunktes praktisch nicht möglich ist.

Hinzu kommt die erwähnte tierindividuelle Variation, die bei vergleichbarer Körpermasse und Toxindosis zu gleichen Zeitpunkten der Blutentnahme zu deutlichen Unterschieden in der DON-Konzentration im Blut führen kann (vgl. Abb. 3).

Da einerseits zwischen der DON-Konzentration im Futter und dem Leistungsrückgang bei Schweinen lineare negative Beziehungen bestehen und andererseits lineare positive Beziehungen zwischen der Futter-DON-Konzentration und der DON-Konzentration im Blut, ist von diagnostischem Interesse, ob auch zwischen der DON-Konzentration im Blut und dem Leistungsrückgang (oder anderen Parametern) diagnostisch verwertbare Beziehungen bestehen. Aus den in Abb. 6 dargestellten Zusammenhängen wird deutlich, dass sich eindeutige Beziehungen zwischen dem Leistungsrückgang einzelner Individuen und den korrespondierenden Konzentrationen an DON im Blut nicht herstellen lassen. Selbst bei der überwiegenden Zahl der Ferkel der am höchsten exponierten Gruppe (3,9 mg DON/kg Futter) ist eine eindeutige Zuordnung anhand der DON-Konzentrationen im Blut nicht möglich.

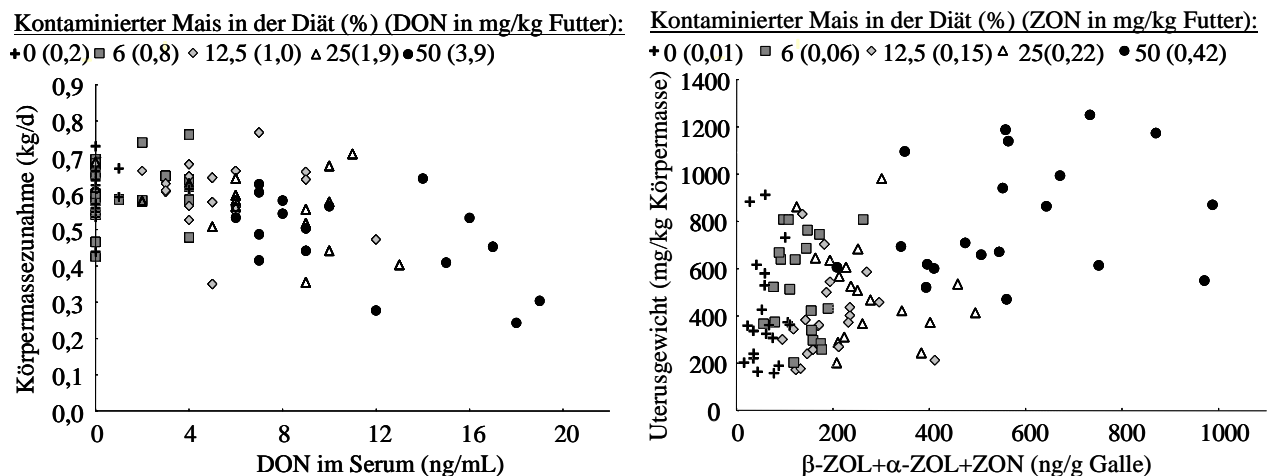


Abb. 6. Individuelle Körpermassezunahmen von Ferkeln in Abhängigkeit der Deoxynivalenol(DON)-Konzentration im Serum (**links**) sowie individuelle Uterusgewicht in Abhängigkeit der Konzentration von Zearalenon (ZON) sowie den Metaboliten α -Zearalenol (ZOL) sowie β -ZOL in der Galle (**rechts**) (20)

Berücksichtigt man weiterhin den Östrogen-ähnlichen Effekt von ZON auf das Uterusgewicht von Ferkeln, dann lassen sich auch für die Beziehungen zwischen der Konzentration von ZON und seinen Metaboliten in der Galle und dem Uterusgewicht ähnliche Schlussfolgerungen ableiten. Auch hier ist eine tierindividuelle Zuordnung im Prinzip nicht möglich. Bei der Beurteilung möglicher Effekte von ZON auf das Uterusgewicht ist zudem zu

berücksichtigen, dass dieses Merkmal grundsätzlich durch eine hohe interindividuelle Variation gekennzeichnet ist und nicht zwangsläufig Schlussfolgerungen hinsichtlich der Fertilität zulässt.

Im Hinblick auf die verschiedenen Kategorien "Ferkel", "Mastschwein" und "Jungsau" ist weiterhin zu beachten, dass Unterschiede im Metabolisierungsprofil bestehen, was insbesondere für α -ZOL zu beachten ist. Wie bereits erwähnt, stellt die Reduktion von ZON zu α -ZOL eine erhebliche Erhöhung des östrogenen Potenzials dar.

Schlussfolgerungen

Die Beurteilung einer Belastung von Schweinen mit DON und ZON, anhand der Toxinkonzentration im Blut (Serum bzw. Plasma) bzw. in der Galle, ist für praxisrelevante Toxinkonzentrationen im Futter, die kleiner als die EU-Richtwerte für kritische DON- und ZON-Konzentrationen sind, als kritisch einzuschätzen. Ein Rückschluss von der gemessenen Toxinkonzentration in den physiologischen Substraten auf die Überschreitung von kritischen Konzentrationen der Toxine im Futter ist daher nur bedingt und nur bei sehr hohen Konzentrationen möglich. Weitere Einschränkungen ergeben sich aus der Toxin-spezifischen Toxikokinetik. So lässt sich beispielsweise eine länger zurückliegende einmalige höhere DON-Exposition schon 1 bis 2 Tage später nicht mehr im Blut nachweisen, wohingegen auch geringe ZON-Konzentrationen (<Richtwerte) im Futter über längere Zeiträume zu einer Akkumulation in der Galle führen. Letzteres kann aber nicht als Indikator einer ZON-Intoxikation gewertet werden, sondern spiegelt die natürliche Hintergrundbelastung wider.

Eine Festlegung von Grenzwerten für DON und de-epoxy-DON im Blut, sowie für ZON und dessen Metaboliten in der Galle erscheint aus den genannten Gründen nicht sinnvoll und ist auf Grund der Datenlage (insbesondere ungenügende Beziehungen zwischen den Toxinkonzentrationen in den physiologischen Substraten und den klinischen Erscheinungen) auch nicht möglich.

Prof. Dr. Sven Dänicke

Institut für Tierernährung, Friedrich-Loeffler-Institut (FLI), Bundesforschungsinstitut für Tiergesundheit, Bundesallee 50, 38116 Braunschweig; e-mail: sven.daenicke@fli.bund.de

Auszug aus der anschließenden Diskussion mit dem Autor:

Frage 1: Kann es sein, dass beim ELISA Test nicht toxische DON-Varianten erfasst werden?

Antwort: Ja, das ist so. Man sollte auf jeden Fall bei hohen ELISA-Werten das Ergebnis über HPLC absichern.

Frage 2: Wird mit Mykotoxinen belastetes Getreide durch intensive Reinigung verbessert?

Antwort: Die Getreidereinigung bringt positive Effekte. Das sieht man auch daran, dass Mühlenstäube eine hohe Belastung haben. Max. 20-25% kann man durch Getreidereinigung an toxischer Belastung reduzieren.

Literatur

Dänicke, S., Döll, S., Goyarts, T., Valenta, H., Ueberschär, K.H. & Flachowsky, G. (2008) On the evaluation of the occurrence of the Fusarium-toxins deoxynivalenol (DON), zearalenone (ZON) and their metabolites in physiological substrates of the pig. Tierärztliche Praxis, 36: 35-47.