



Das Lebensministerium



## Futtermittelhygiene

Schriftenreihe der Sächsischen Landesanstalt für Landwirtschaft

Heft 28/2007

Freistaat  Sachsen

Sächsische Landesanstalt für Landwirtschaft

## Vorwort

Im vorliegenden Heft der Schriftenreihe werden die Ergebnisse von zwei Projekten vorgestellt, die sich mit futtermittelhygienischen Aspekten befassen und von Wissenschaftlern der Universität Leipzig erarbeitet wurden. Die Untersuchungen erfolgten im Auftrag der Sächsischen Landesanstalt für Landwirtschaft und wurden mit Mitteln des Freistaates Sachsen gefördert.

Die ersten beiden Beiträge widmen sich der Bedeutung und der möglichen Reduzierung von *Clostridium botulinum* im Kreislauf Boden - Pflanze - Futtermittel - Tier - Kot - Boden in Milchviehbeständen. Hierzu wurden im Zeitraum von 2004 bis 2006 durch das Institut für Bakteriologie und Mykologie der Veterinärmedizinischen Fakultät an der Universität Leipzig verschiedene Untersuchungen im Labor und in Milchviehbetrieben des Freistaates Sachsen durchgeführt. *C. botulinum* erwies sich als ein wesentlicher Vertreter der Gattung *Clostridium* in den sächsischen Rinderbeständen. Die immunologischen Untersuchungen belegen, dass *C. botulinum* in der Haltungsumwelt vorkommen kann und auch, dass die Tiere mit einer Antikörperantwort reagieren. Die vertieften Untersuchungen zum Kreislauf von *C. botulinum* in einem sächsischen Bestand ließen jedoch keine überdurchschnittliche Verbreitung erkennen. Die Ergebnisse der Literatur, dass Fäkalien für den Eintrag von Clostridien in den Boden die größte Bedeutung besitzen, wurden bestätigt. Bei bedarfs- und wiederkäuergerechter Fütterung und Einhaltung futtermittelhygienischer Standards sind die Milchrinder in der Lage, *C. botulinum* und seine Toxine über unspezifische und spezifische Abwehr zu kompensieren.

Im dritten Beitrag der Schriftenreihe wird über Untersuchungen zur Mykotoxinanreicherung in tierischem Gewebe von Milchrindern bzw. in der Rohmilch berichtet und die Beziehung einer Mykotoxinbelastung zu spezifischen Ernährungsschäden der Tiere hinterfragt. Die Untersuchungen wurden durch die Medizinische Tierklinik der Universität Leipzig im Jahr 2004 durchgeführt. Es gibt im Vergleich zum Monogaster nur wenige gesicherte Kenntnisse über die Auswirkungen der Verfütterung fusarientoxinhaltiger Futtermittel an Milchkühe. Es wird davon ausgegangen, dass in den Vormägen ein beachtlicher Teil der aufgenommenen Mykotoxinmengen abgebaut wird. Bei Störungen des Pansenstoffwechsels, welche im hohen Leistungsbereich häufig provoziert werden, muss mit einem verminderten Entgiftungspotenzial gerechnet werden. Bisher fehlen sowohl klare toxinspezifische Restriktionen als auch verlässliche Indikatoren, welche am Tier eine erhöhte Belastung mit Mykotoxinen anzeigen. In den vorliegenden Untersuchungen wurde die Indikatorreignung von Milchproben oder Gallenflüssigkeit für die Diagnose der Mykotoxinbelastungen von Milchrindern hinterfragt. Außerdem wurde der Zusammenhang zwischen der Labmagenverlagerung und einer möglichen Intoxikation mit Mykotoxinen durch vergleichende Untersuchung von gesunden und erkrankten Kühen untersucht. Eine Beziehung von positiven DON-/ZON-Nachweisen in den Indikatormedien zur Labmagenverlagerung wurde letztlich jedoch nicht belegt. Die Hypothese, dass eine Vielzahl der Ernährungsschäden in Beziehung zu einer Mykotoxinbelastung steht, konnte vorerst nicht gestützt werden.

Dr. Uwe Bergfeld

Leiter des Fachbereiches Tierische Erzeugung

## Inhaltsverzeichnis

<b>Untersuchungen zur Beeinflussung der Toxinexpression von <i>Clostridium botulinum</i> Typ B und C unter <i>in-vitro</i>-Bedingungen</b>	<b>3</b>
<i>Prof. Dr. sc. Monika Krüger, Dr. Brigitta Kleessen, Dr. Anke Große-Herrenthey, Dr. Wieland Schrödl</i>	
<i>Universität Leipzig, Veterinärmedizinische Fakultät, Institut für Bakteriologie und Mykologie</i>	
<i>An den Tierkliniken 29, 04103 Leipzig</i>	
<b>Untersuchungen zu Vorkommen und Verbreitung von <i>Clostridium botulinum</i> in Rinderbeständen des Freistaates Sachsen</b>	<b>14</b>
<i>Dr. Wieland Schrödl, Dr. Brigitta Kleessen, Dr. Anke Große-Herrenthey, Prof. Dr. sc. Monika Krüger</i>	
<i>Universität Leipzig, Veterinärmedizinische Fakultät, Institut für Bakteriologie und Mykologie</i>	
<i>An den Tierkliniken 29, 04103 Leipzig</i>	
<b>Mykotoxinscreening in Blut, Galle und Milch bei gesunden und kranken Kühen</b>	<b>35</b>
<i>Dr. Ahmad Alkaassem, Prof. Dr. habil. Manfred Füll</i>	
<i>Universität Leipzig, Veterinärmedizinische Fakultät, Medizinische Tierklinik</i>	
<i>An den Tierkliniken 11, 04103 Leipzig</i>	
<i>PD Dr. habil. Sven Dänicke</i>	
<i>Bundesforschungsanstalt für Landwirtschaft, Institut für Tierernährung</i>	
<i>Bundesallee 50, 38116 Braunschweig</i>	

## **Untersuchungen zur Beeinflussung der Toxinexpression von *Clostridium botulinum* Typ B und C unter *in-vitro*-Bedingungen**

### **Zusammenfassung**

Es wurden Untersuchungen zur Beeinflussung der Toxinexpression bei *C. botulinum* Typ B- und Typ C-Stämmen durchgeführt. Es konnte gezeigt werden, dass die Prebiotica Lactulose und Topinambur die Toxinexpression eines proteolytischen Typ B-Stammes und eines saccharolytischen Typ C-Stammes nach bis 10-tägiger anaerober Kultivierung unter anaeroben Bedingungen in einer 10-%igen statischen Kotanreicherungskultur eines klinisch gesunden Rindes reduzieren. Der Effekt war bei  $10^3$  /ml zugesetzten Sporen deutlicher als bei  $10^4$ /ml. Für Zellulose konnte in den Konzentrationen 0,05 Prozent und/oder 0,5 Prozent ein hemmender Effekt auf die Toxinbildung von *C. botulinum* Typ B festgestellt werden. Eine 1-Prozent-Zellulosekonzentration hatte keinen Einfluss. Hinsichtlich *C. botulinum* Typ C waren keine deutlichen Effekte festzustellen. Ammoniumchlorid reduzierte die BotNT-Expression nur bei dem Typ B- Stamm. Der Typ C-Stamm wurde demgegenüber durch Ammoniumchlorid in der Toxinexpression verstärkt.

### **Einleitung und Zielstellung**

Die Neurotoxinexpression (BotNT) von *C. botulinum* unterliegt zahlreichen Einflussfaktoren.

Die Toxinproduktion wird durch komplexe Medien wie fleisch- und kaseinhaltige Nährmedien, Glukose und Tryptophan beeinflusst (PATTERSON-CURTIS & JOHNSON, 1989). Den Einfluss dieser komplexen Medien auf die Toxinbildung zu definieren, fällt demgegenüber äußerst schwer (BARKER, 1981). PATTERSON-CURTIS & JOHNSON (1989) stellten fest, dass die Expression von Proteasen und Neurotoxin bei einem Typ A- und einem Typ B-Stamm von der jeweiligen Kohlenstoff- und Stickstoffversorgung abhängt. Die Autoren fanden, dass die Proteasekonzentration in einem Minimalmedium während des Wachstums zunimmt und beim Erreichen der statischen Wachstumsphase wieder sinkt. Hohe Argininkonzentrationen reduzieren ebenfalls den intrazellulären Proteasespiegel, hohe Glukosekonzentrationen stabilisieren demgegenüber die Proteasekonzentration. Produkte des Argininstoffwechsels bis zum  $\text{NH}_4\text{Cl}$  sind ebenfalls in der Lage, die Proteasebildung zu hemmen. Die Toxinproduktion folgt im Wesentlichen dem gleichen Muster. So reduziert die Zugabe hoher  $\text{NH}_4\text{Cl}$  -Konzentrationen zum Medium die Toxinkonzentration im Medium von 10,000 MLD 50/ml (Kontrolle) auf 100 MLD 50/ml (Versuchsmedium).

MAAS et al. (1989) konnten durch eine erhöhte Lactatkonzentration im Medium (1,92 - 2,40 Prozent) eine verzögerte Toxinbildung im Medium feststellen. Bei niedrigem pH-Wert, also im weniger dissoziierten Zustand des Lactats, war der Effekt ausgeprägter. SHARKEY et al. (2005) untersuchten den Einfluss von verschiedenen Kohlenhydraten (1 Prozent) und aromatischen Aminosäuren (10 mM) auf die Toxinexpression von *C. botulinum* Typ E. Ihre Untersuchungen basierten auf den Halbwertszeiten bakterieller mRNA, die einem schnellen Zerfall unterliegt. Bakterielle mRNA besitzt eine Halbwertszeit von 1,3 min bei 37 °C. Die Untersucher konnten

eine Verlängerung der Verdopplungszeit der ribosomalen RNA in der exponentiellen Wachstumsphase des Erregers feststellen. Sie lag für Fruktose bei 5,1 h gegenüber 1,8 h bei Glukose und Tryptophan und 1,9 h bei Glukose und Tyrosin.

Das Ziel unserer Untersuchungen bestand darin, den Einfluss von fruktosehaltigen Prebiotica (Lactulose und Topinamburpulver), von Zellulose und Ammoniumchlorid auf die Toxinexpression der *C. botulinum*-Toxovare B und C zu überprüfen. Dazu wurden *in vitro* Experimente unter Zusatz von definierten Sporenkonzentrationen (ca.  $10^3$  und  $10^4$  Sporen/ml) von *C. botulinum* B und *C. botulinum* C durchgeführt. Durch Zusatz der Kohlenhydrate Topinambur, Lactulose, Cellulose bzw. Ammoniumchlorid in praxisrelevanten Konzentrationen wurde untersucht, ob die Toxinexpression der oben genannten *C. botulinum*-Toxovare beeinflusst werden kann.

### Untersuchungsmaterial und Methoden

Kotmaterial einer gesunden Kuh wurde unter standardisierten Bedingungen verwendet. In Vorversuchen konnte gezeigt werden, dass Kotanreicherungen von dieser Kuh nicht zum Nachweis von BotNT führten. Die Kuh wurde mit ca. 4 kg Heu, 10 kg Silage, ca. 1,2 kg Grünmehlpellets und 1,2 kg Kraftfutter wiederkäuergerecht gefüttert. Eine größere Kotmenge wurde portioniert und bei -20 °C asserviert. Die Kotflora wies in den untersuchten Parametern folgende Zusammensetzung auf (Angaben in KBE/g Feuchtmasse):

aerobe Gesamtkeimzahl	$2,1 \times 10^5$
Gram-negative aerobe Keimzahl	$3,0 \times 10^3$
anaerobe Gesamtkeimzahl	$1,9 \times 10^5$
Laktobazillen	$1,4 \times 10^4$
Bifidobakterien	$<10^3$
Bacteroides	$3,0 \times 10^3$
<i>C. perfringens</i>	$<10^3$
Sulfitreduzierende Clostridienzahl (MPN in DRCM)	$1,0 \times 10^5$

Für die BotNT-Anreicherungen wurde erhitzter Kot (80 °C/10 min) als 10%ige Suspension in RCM verwendet. Diesem wurden *C. botulinum*-Sporen in einer Konzentration von  $10^3$  sowie  $10^4$ /ml der Toxovare B und C zugesetzt. Als Kontrolle dienten Kotanreicherungen ohne Zusatz von *C. botulinum*-Sporen. Die Inkubation erfolgte über 10 d bei 37 °C unter anaeroben Bedingungen. Die Probenentnahmen zur BotNT-Bestimmung in den Kulturüberständen der Anreicherungskulturen erfolgten nach 3 d, 7 d und 10 d anaerober Inkubationen bei 37 °C.

Um eine mögliche dosisabhängige Wirkung einschätzen zu können, wurden die zu untersuchenden Substrate in praxisnahen Konzentrationen eingesetzt:

- a) Topinambur 0,05 und 0,5 Prozent
- b) Lactulose 0,05 und 0,5 Prozent

- c) Cellulose 0,05, 0,5 und 1 Prozent
- d) Ammoniumchlorid 3,5 und 7 Prozent.

Der Nachweis der BotNT erfolgte wie von SCHRÖDL et al. (2007) beschrieben mittels ELISA-Test in den Kotkulturanreicherungen.

### Ergebnisse

#### Einfluss von Topinambur auf die Bildung von BotNT in Kotkulturanreicherungen unter Zusatz von *C. botulinum*-Sporen

Abbildung 1 zeigt den Einfluss von Topinambur auf die Bildung von BotNT-B in den Kotkulturanreicherungen mit Sporenzusatz. In den Kulturüberständen der Kontrollansätze (ohne Topinamburzusatz) wurden positive BotNT-B-Werte nach 7 und 10 d Inkubation gemessen, nicht jedoch nach 3 d Inkubation. Bei Zusatz der höheren *C. botulinum* B-Sporenzahl ( $1,15 \times 10^4$ ) wurde im Vergleich zu der um eine Zehnerpotenz niedrigeren Sporenkonzentration ( $1,6 \times 10^3$ ) doppelt soviel BotNT-B festgestellt. Unter Zusatz von Topinambur kam es nach 7 d Inkubation bei allen Ansätzen mit Sporenzusatz zur Unterdrückung der BotNT-B-Bildung. Auch nach 10 d Inkubation wurde in den Ansätzen mit  $10^3$  *C. botulinum* B-Sporen unter Topinambur kein BotNT-B nachgewiesen. Im Gegensatz dazu wurde bei 0,5 Prozent Topinambur im Kulturmedium und mit  $10^4$  *C. botulinum* B-Sporen/ml keine Hemmung von BotNT-B im Vergleich zur Kontrolle (10 d) festgestellt. Die niedrigere Topinamburkonzentration (0,05 Prozent) zeigte jedoch einen Hemmeffekt.

#### BotNT-B (REE)

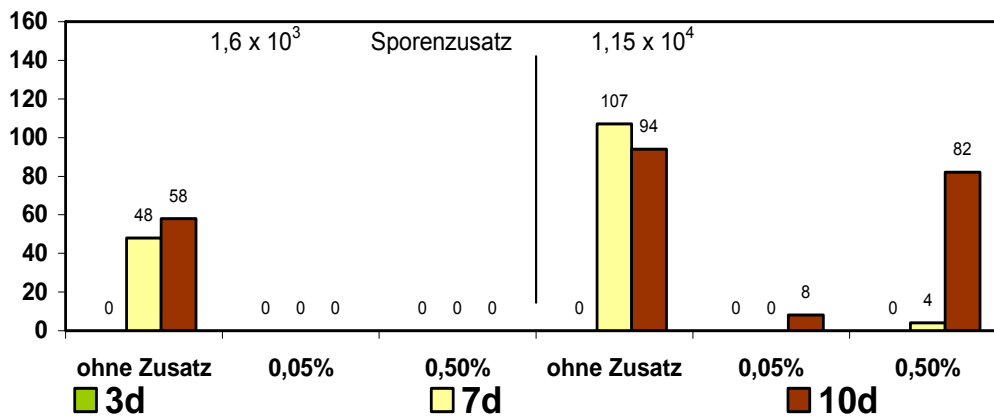
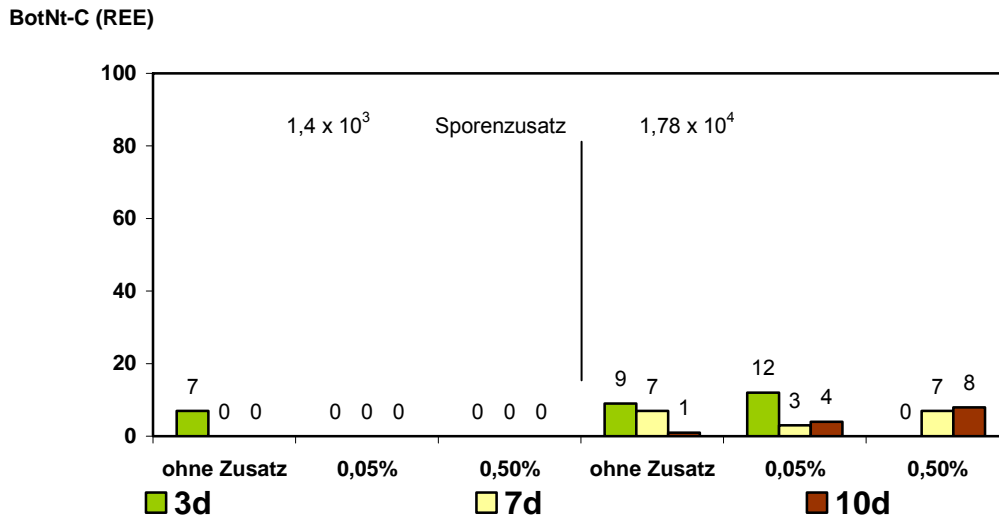


Abbildung 1: Einfluss von Topinambur auf die BotNT-Expression von *C. botulinum* B in Kotkulturanreicherung aus Rinderkot (erhitzt 10 min bei 80 °C) in RCM

Die Wirkung von Topinambur auf die BotNT-C-Expression nach Zusatz von *C. botulinum* C-Sporen zeigt die Abb. 2. Insgesamt gesehen wurden nur sehr geringe Mengen an BotNT-C gebildet, was sich bereits bei den Kontrollansätzen sowohl bei Zusatz von  $10^3$  als auch bei  $10^4$  *C. botulinum* C-Sporen/ml zeigte. Die überwiegend fraglichen BotNT Werte (<10 REE) lassen keine Wertung eines Topinambureffektes zu.



**Abbildung 2: Einfluss von Topinambur auf die BotNT-Expression von *C. botulinum* C in Kotkulturanreicherung aus Rinderkot (erhitzt 10 min bei 80 °C) in RCM**

Einfluss von Lactulose auf die Bildung von BotNT in Kotkulturanreicherungen unter Zusatz von *C. botulinum*-Sporen

Den Einfluss von Lactulose auf die Bildung von BotNT-B in den Kulturanreicherungen nach Sporenzusatz zeigt die Abb. 3. Auch hier wird deutlich, dass der BotNT B-Nachweis sowohl am 7. als auch am 10. Inkubationstag in den positiven Kontrollproben unter Zusatz von  $10^4$  *C. botulinum* B-Sporen etwa doppelt so hoch war als in den Anreicherungen mit  $10^3$  Sporen. Unter dem Einfluss von Lactulose konnte mit Ausnahme des  $10^4$ -Sporenansatzes mit 0,05 Prozent Lactulose im Anreicherungsmedium eine Hemmung der Toxinbildung festgestellt werden. Bei diesem Ansatz wurde nach 10 Tagen Inkubation ein hochgradiger BotNT-B-Wert gemessen, der sogar geringfügig höher als im positiven Kontrollansatz ohne Lactulose war.

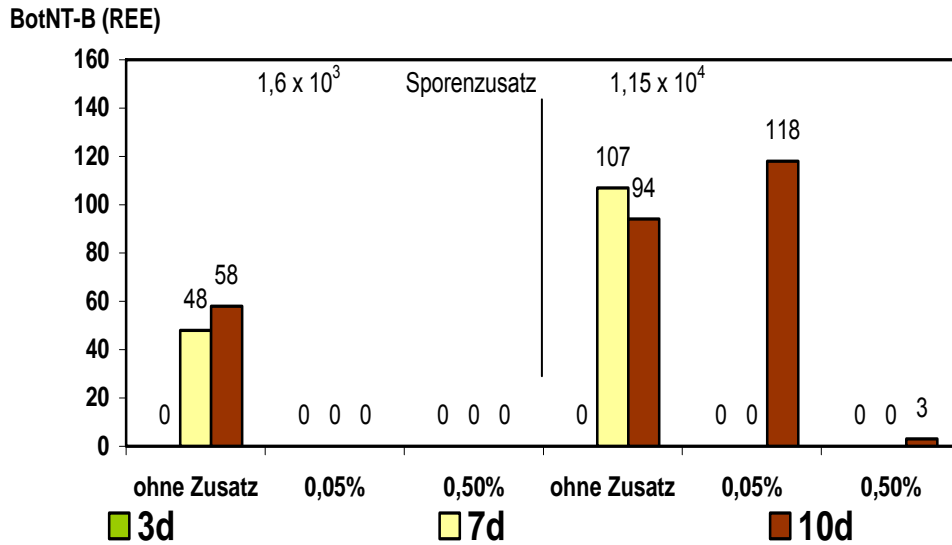


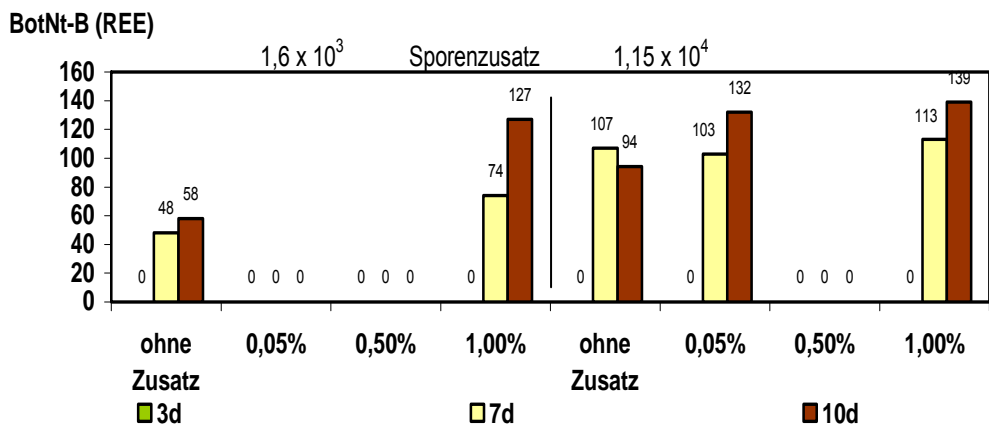
Abbildung 3: Einfluss von Lactulose auf die BotNT-Expression von *C. botulinum* B in Kotkulturanreicherung aus Rinderkot (erhitzt 10 min bei 80 °C) in RCM

Ähnlich wie in den Untersuchungen mit Topinambur konnten auch unter Lactulose nur fragliche BotNT C-Werte in den Kulturüberständen nach Zusatz von *C. botulinum* C-Sporen festgestellt werden.

Einfluss von Zellulose auf die Bildung von BotNT in Kotkulturanreicherungen unter Zusatz von *C. botulinum*-Sporen

Abbildung 4 gibt Auskunft über die Wirkung von Zellulose auf die Bildung von BotNT-B in den Kotkulturanreicherungen nach Zusatz von  $10^3$  bzw.  $10^4$  *C. botulinum* B-Sporen/ml. Bemerkenswert ist, dass bei der geringeren Sporenkonzentration 0,05 bzw. 0,5 Prozent Zellulose im Anreicherungsmedium am 7. und 10. Inkubationstag eine Hemmung der BotNT-B-Expression bewirkte. Im Gegensatz dazu hatte jedoch 1 Prozent Cellulose im Medium eine stimulierende Wirkung auf BotNT-B im Kulturüberstand. Vergleicht man dazu die Wirkung von Zellulose in den Anreicherungen mit  $10^4$  Sporen/ml, so wird deutlich, dass bei 0,05 Prozent und 1 Prozent Zellulose im Medium die hochgradigen BotNT-B-Werte am 7. Inkubationstag denen des Kontrollansatzes ohne Zellulose ähnelten. Am 10. Inkubationstag zeigte sich in beiden Zellulosekonzentrationen eine weitere Stimulierung von BotNT-B im Kulturüberstand. Unklar ist jedoch der fehlende BotNT-B Nachweis in den Kulturüberständen mit 0,5 Prozent Zellulose und  $10^4$  Sporen.





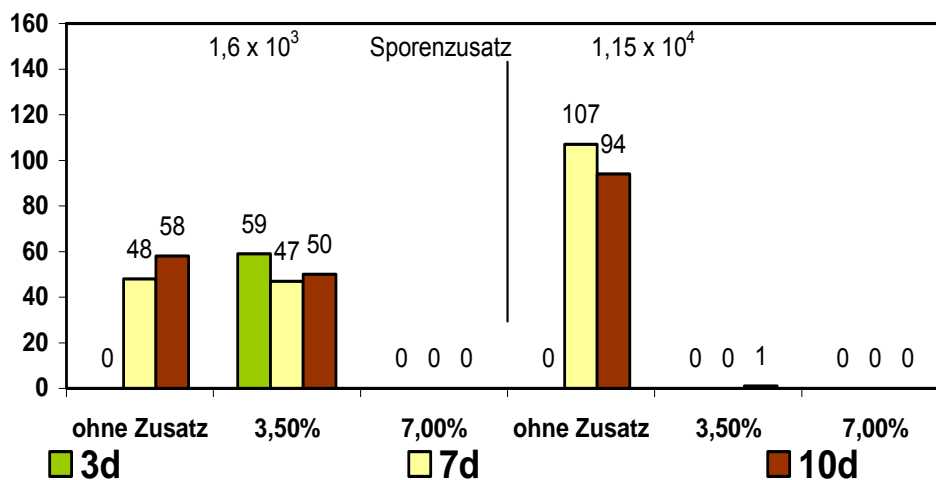
**Abbildung 4: Einfluss von Zellulose auf die BotNT-Expression von *C. botulinum* B in Kotkulturanreicherung aus Rinderkot (erhitzt 10 min bei 80 °C) in RCM**

Die BotNT-C-Werte in den Kulturüberständen nach Zusatz von *C. botulinum* C-Sporen und Zellulose im Anreicherungsmedium wiesen generell sehr geringe Werte in den Kotkulturüberständen aus. Bei  $10^4$  Sporen/ml im Ansatz bewirkte jedoch der Zusatz von 0,5 und 1 Prozent Zellulose am 7. Inkubationstag eine geringfügige Stimulierung von BotNT-C im Kulturüberstand.

Einfluss von Ammoniumchlorid auf die Bildung von BotNT in Kotkulturanreicherungen unter Zusatz von *C. botulinum*-Sporen

Die Ergebnisse gehen aus den Abbildungen 5 und 6 hervor. Der Zusatz von 3,5 Prozent Ammoniumchlorid im Anreicherungsmedium bewirkte bei den Ansätzen mit  $10^3$  *C. botulinum* B-Sporen/ml nach 7 und 10 Tagen Inkubation BotNT-B-Werte, die denen des positiven Kontrollansatzes entsprachen. Interessant ist jedoch, dass bereits am 3. Inkubationstag unter 3,5 Prozent Ammoniumchlorid ähnliche Werte gemessen wurden, nicht jedoch beim Kontrollansatz. Bei den Ansätzen mit 7 Prozent Ammoniumchlorid trat eine Hemmung der BotNT-B-Bildung auf. Bei den Untersuchungen mit  $10^4$  *C. botulinum* B-Sporen/ml hatten auch 3,5 Prozent Ammoniumchlorid im Medium einen hemmenden Effekt auf BotNT-B (Abb. 5).

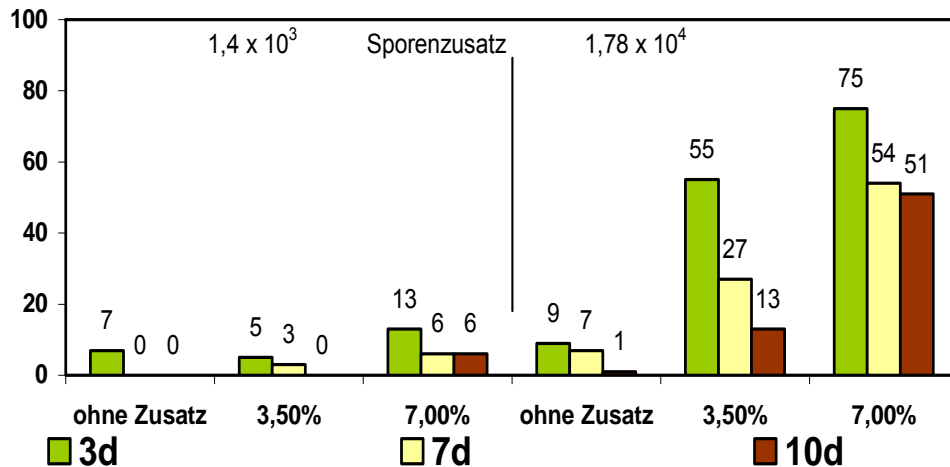
### BotNT-B (REE)



**Abbildung 5: Einfluss von Ammoniumchlorid auf die BotNT-Expression von *C. botulinum* B in Kotkulturanreicherung aus Rinderkot (erhitzt 10 min bei 80 °C) in RCM**

Abbildung 6 zeigt die Ergebnisse der BotNT-Anreicherung nach Zusatz von *C. botulinum* C-Sporen und Ammoniumchlorid im Anreicherungsmedium. Interessant ist, dass bei allen Ansätzen bereits am 3. Inkubationstag BotNT C-Signale messbar waren. Hervorzuheben ist jedoch der stark stimulierende Effekt von sowohl 3,5 als auch 7 Prozent Ammoniumchlorid auf die Bildung von BotNT-C in den Ansätzen mit  $10^4$  Sporen im Vergleich zu dem positiven Kontrollansatz ohne Ammoniumchlorid. In den Ansätzen mit 3,5 Prozent Ammoniumchlorid kam es nach 7 und 10 d Inkubation zur Abnahme von BotNT-C im Kulturüberstand, bei 7 Prozent Ammoniumchlorid wurden weiterhin hochgradige BotNT-C-Werte gemessen.

### BotNt-C (REE)



**Abbildung 6:** Einfluss von Ammoniumchlorid auf die BotNT-Expression von *C. botulinum* C in Kotkulturanreicherung aus Rinderkot (erhitzt 10 min bei 80 °C) in RCM

### Diskussion

Nachgewiesene Belastungen von Rinderproduktionsbetrieben mit BotNT stellen die Frage nach Möglichkeiten zur Wiederherstellung der Homöostase der Magen-Darm-Flora. Die von BotNT ausgehenden Schädigungen betreffen neben den prinzipiellen Wirkungen am peripheren Nervensystem auch direkt das enterische Nervensystem des MDT der Tiere. Ausgehend von Publikationen zum Bindungsverhalten der *C. botulinum*-Progenitor-Toxinkomplexe (FUJINAGA et al. 2004) der Toxovare A, B, C und D über Hämagglutinine an galactosehaltige Rezeptoren sowie den Untersuchungen von SHARKY et al. (2005) zur Verlängerung der Verdopplungszeiten der Toxin-mRNA von *C. botulinum* unter Fruktoseeinfluss wurde das Disaccharid Lactulose, das aus Galactose und Fruktose besteht, in die Untersuchungen einbezogen. Weiterhin wurde der Einfluss von Zellulose auf die Toxinexpression untersucht.

PATTERSON-CURTIS & JOHNSON stellten in ihren Untersuchungen bereits 1989 fest, dass Arginin sowie Produkte des Argininstoffwechsels bis hin zum Ammoniumchlorid in der Lage sind, bei proteolytischen Toxovaren die Toxinexpression zu reduzieren. Zu diesem Zweck wurde in vitro zunächst ein Modellsystem etabliert, in dem definierte Sporenmengen von hochtoxischen *C. botulinum*-Referenzstämmen der Toxovare B und C zu Kot einer gesunden, nicht mit pathogenen Clostridien bzw. *C. botulinum* belasteten Kuh zugesetzt wurden. Als Testsubstrate zur Prüfung der Möglichkeit einer Reduzierung der Toxinlast wurden Fruktose, enthalten als Polymer in Topinambur und als Komponente im Disaccharid Lactulose sowie Cellulose und Ammoniumchlorid gewählt. Die Wirkung im Testsystem wurde sowohl in Abhängigkeit von der Konzentration des jeweiligen Substrates als auch von der Zeit geprüft. Die Ergebnisse belegen

deutlich, dass in Kotkulturüberständen unter Zusatz von Topinambur bei allen Ansätzen mit Sporenzusatz im Vergleich zur positiven Kontrolle ohne Substrat eine deutliche Unterdrückung der BotNT B-Expression zu verzeichnen war (Abb. 1.). Interessant ist jedoch, dass sowohl bei hoher Topinamburkonzentration (0,5 Prozent) als auch bei höherer Sporenzahl (ca.  $10^4$  *C. botulinum* im Ausgangsansatz) eine längere Inkubation des Ansatzes (10 d) wieder zu vergleichbar hohen BotNT-Werten wie im Kontrollansatz führte. Offenbar besteht in einer statischen Kultur bei hoher Sporenlast und relativ großer Topinamburkonzentration ein verändertes Expressionssystem. Inwieweit Topinambur per se bereits das Auskeimen von *C. botulinum*-Sporen unterdrückt, ist ungeklärt. Möglicherweise spielt hier der Aufschluss der Polyfruktane durch die Begleitflora eine Rolle. Auch die im Topinambur in relativ großer Konzentration enthaltenen kurzkettigen Fruktane könnten hierbei von Bedeutung sein.

Ähnlich wie bei Topinambur führte auch der Einfluss von Lactulose in Konzentrationen von 0,05 und 0,5 Prozent im Testsystem nach 7 d Inkubation zu keinen messbaren Signalen von BotNT-B im Vergleich zur Kontrolle. Dieses Resultat konnte sowohl bei Sporenausgangskonzentrationen von  $10^3$  als auch  $10^4$  gezeigt werden (Abb. 3). Der positive Effekt von Lactulose auf die Mikrobiota des MDT von Schweinen wurde bereits von KRÜGER et al. (2002) beschrieben. Untersuchungen von BÖHNEL et al. (2001) zeigen, dass es nach Applikation von Lactulose zu einer Florabeeinflussung und Reduktion der Toxinlast im MDT kommt. Unabhängig von der möglichen direkten Wirkung von Prebiotika wie Lactulose oder auch Fructooligosacchariden auf Clostridien und deren Toxine muss die generelle Wirkung dieser Substrate aber vor allem die einer wiederkäuergerechten Ration im Hinblick auf eine Stabilisierung der mikrobiellen Homöostase der MDF hervorgehoben werden. Der Einfluss der Pansenflora auf präformiertes Botulinum-Toxin wurde schon von ALLISON et al. (1976) hervorgehoben. Die Autoren konnten für *C. botulinum* Typ C nachweisen, dass Pansenbakterien unter physiologischen pH-Bedingungen in der Lage sind, das Toxin zu degradieren. Insbesondere stabilisierende Effekte auf die Pansenprotozoen sind denkbar. Auf deren Bedeutung für die Degradierung von Clostridien im Pansen haben OZUTSUMI et al. (2005) hingewiesen.

Der Pansen-pH besitzt für die Stabilität des *C. botulinum*-Toxin-Komplexes große Bedeutung. PH-Werte um den Neutralpunkt verstärken die Dissoziation des Toxin-Komplexes. Bei Homöostase der Pansenflora sind proteolytische Bakterien in der Lage, den Botulinum-Toxin-Komplex und die BotNT zu degradieren. Pansenazidosen reduzieren die Pansensperre (OZUTSUMI et al. 2005) und gestatten den Übertritt von Clostridien sporen in den Darmkanal. Hier können die Sporen unter günstigen Bedingungen auskeimen und besonders im Dickdarm Toxine bilden.

Die Möglichkeit, durch verschiedene Einflussfaktoren auf die Toxinexpression von *C. botulinum*-Toxovaren Einfluss nehmen zu können, ist in der Literatur dokumentiert. So konnten PATTERSON-CURTIS & JOHNSON (1989) bei je einem Stamm von *C. botulinum* A und B zeigen, dass die Expression von Protease und Neurotoxin von der Kohlenstoff- und Stickstoffversorgung ab-

hängt. Basierend auf den Ergebnissen dieser Autoren, dass Produkte des Argininstoffwechsels bis hin zum Ammoniumchlorid die Proteasebildung und folglich auch die Toxinproduktion zu hemmen scheinen, wurde in dem von uns verwendeten *in vitro*-Testsystem die Wirkung von 3,5 und 7 Prozent Ammoniumchlorid im Anreicherungsmedium auf die Bildung von BotNT geprüft. Bemerkenswert ist, dass bei Verwendung von Sporen von *C. botulinum* B bei der Ausgangskonzentration von  $10^3$  Sporen in der Kotkultur erst die höhere Konzentration an Ammoniumchlorid (7 Prozent) zu einer Unterdrückung der BotNT B-Bildung im System führte. Demgegenüber war bei der höheren Sporenausgangskonzentration ( $10^4$ /ml) bereits 3,5 Prozent Ammoniumchlorid im Medium für einen Hemmeffekt ausreichend.

Interessant ist auch, dass offenbar Unterschiede in der Wirkung von Ammoniumchlorid auf die BotNT-Bildung in Abhängigkeit von der verwendeten *C. botulinum*-Toxovar zu verzeichnen waren. So konnten im Gegensatz zu dem proteolytischen *C. botulinum* B-Stamm in den Kulturanreicherungen mit dem saccharolytischen *C. botulinum* C-Stamm gegensätzliche Ergebnisse erzielt werden. Der in dem *in vitro*-System im Toxinbildungsvermögen sehr eingeschränkte Stamm konnte bei einer Ausgangskonzentration von  $10^4$  Sporen/ml bereits nach drei Tagen Inkubation mit 3,5 und 7,0 Prozent Ammoniumchlorid im Vergleich zur Kontrolle (geringgradige Toxinbildung) zu einer hochgradigen BotNT C-Bildung stimuliert werden (Abb.6). Bei den Ansätzen mit 7 Prozent Ammoniumchlorid in der Anreicherungskultur wurden auch nach 7 und 10 Tagen Inkubation noch hochgradige BotNT-C Werte gemessen.

Die erarbeiteten Ergebnisse sprechen dafür, dass mittels der Prebiotica Lactulose und Topinambur in die Toxinexpression eingegriffen werden kann. Die Ergebnisse mit Ammoniumchlorid müssen demgegenüber im Zusammenhang mit dem Toxintyp betrachtet werden.

### Literatur

- BARKER, H. A., 1981: Amino acid degradation by anaerobic bacteria. *Annu. Rev. Biochem.* 50, 23-40.
- BOEHNEL, H., SCHWAGERICK, B. und GESSLER, F., 2001: Visceral botulism - a new form of bovine *Clostridium botulinum* toxication. *J. Vet. Med. A. Physiol. Pathol. Clin. Med.* 48, 373-383.
- FUJINAGA, Y., INOUE, K., WATARAI, S., SAKAGUCHI, Y., ARIMITSU, H., LEE, J. C., JIN, Y., MATSUMURA, T., KABUMOTO, Y., WATANABE, T., OHYAMA, T., NISHIKAWA, A. und OGUMA, K., 2004: Molecular characterization of binding subcomponents of *Clostridium botulinum* type C progenitor toxin for intestinal epithelial cells and erythrocytes. *Microbiol.* 150, 1529-1538.
- SHARKEY, F.-H., DOOLEY, J. S. und HAYLOCK, R. W. 2005: Quantitative effects of carbohydrates and aromatic amino acids on *Clostridium botulinum* toxin gene expression using a rapid competitive RT/PCR assay. *J. Mol. Microbiol. Biotechnol.* 9, 35-43.
- PATTERSON-CURTIS, S. I. und JOHNSON, E. A. (1989): Regulation of Neurotoxin and Protease Formation in *Clostridium botulinum* Okra B and Hall A by Arginine. *Appl Environ Microbiol* 55, 1544-1548.

- MAAS, M. R, GLASS, K. A. und DOYLE, M. P. (1989): Sodium lactate delays toxin production by *Clostridium botulinum* in cook-in-bag turkey products. *Appl Environ Microbiol* **55**, 2226-2229.
- OZUTSUMI, Y. K., TAJIMA, K., TAKENAKA, A. and ITABSHI, A. (2005): The effect of protozoa on the composition of rumen bacteria in cattle using 16S r RNA gene clone libraries. *Biosci Biotechnol Biochem* **69**, 499 – 506.
- KRUEGER, M., SCHROEDL, W., ISIK, K., LANGE, W. und HAGEMANN, L. (2003): Effects of lactulose on intestinal microflora of periparturient sows and their piglets. *Eur J Nutr.* **41**(Suppl. 1), 26 - 32.
- SCHRÖDL, W., KLEESSEN, B., GROßE-HERRENTHEY, A., KRÜGER, M. 2007: Untersuchungen zu Vorkommen und Verbreitung von *Clostridium botulinum* in Rinderbeständen des Freistaates Sachsen. ebenda

## **Untersuchungen zu Vorkommen und Verbreitung von *Clostridium botulinum* in Rinderbeständen des Freistaates Sachsen**

### **Zusammenfassung**

Es wurden neue Testverfahren zur Untersuchung von Kot, Futter, Gülle/Mist und Bodenproben auf *Clostridium botulinum* entwickelt. In insgesamt fünf sächsischen Milchviehbeständen erfolgten damit Untersuchungen hinsichtlich des Vorkommens und der Verbreitung von *Clostridium botulinum*. Mittels ELISA und typspezifischer Antigene konnten in einigen Blutproben Antikörper gegen *Clostridium botulinum* nachgewiesen werden, was die Aussage der Präsenz von *Clostridium botulinum* in sächsischen Milchkuhbeständen bestätigt. Die Untersuchungen zeigten, dass der Anteil positiver Reagenten in den Rinderbeständen sehr unterschiedlich ist und offenbar durch den Eintrag in den Tierbestand (Futter, Fütterungsregime, andere Ursachen) bestimmt wird.

Unter wiederkäuergerechten Fütterungsregimes mit Orientierung der Fütterung auf ausreichend und qualitativ hochwertiges Grundfutter sowie auf Langlebigkeit der Kühe dürften die Tiere in der Lage sein, *C. botulinum* und seine Toxine über die unspezifische und spezifische Abwehr zu kompensieren. Die Ergebnisse zur Verbreitung von *C. botulinum* in den untersuchten Tierbeständen belegen eindeutig, dass diese *Clostridium sp.* in unseren Rinderbeständen vorkommt. Die gaschromatographisch und per MALDI-TOF als *C. botulinum* charakterisierten Isolate wurden am häufigsten im Kot und im Boden gefunden. Mit den Untersuchungen können die Ergebnisse anderer Autoren bestätigt werden, dass Fäkalien für den Eintrag von Clostridien in den Boden die größte Bedeutung besitzen.

### **Einleitung und Zielstellung**

Anliegen der Untersuchungen war es, in sächsischen Milchkuhbeständen Anhaltspunkte zur Verbreitung von *Clostridium (C.) botulinum* im Magen-Darm-Trakt der Tiere und in ihrer Umgebung zu erhalten. Besteht für *C. botulinum* und dessen Toxovare ein möglicher Kreislauf im Sinne Tier – Gülle/Mist - Boden – Pflanze - Futtermittel/Silage - Tier und kann er nachgewiesen werden? Führt das permanente Eintragen von *C. botulinum* in die Tierbestände zu einer potenziellen Gefahr für die Tiergesundheit?

Aus fünf Tierbeständen in Sachsen sollten Proben hinsichtlich *C. botulinum* untersucht werden. In einem Betrieb davon waren die Untersuchungen auf das Umfeld (Futter, Boden usw.) zur Darstellung des o. g. Kreislaufes auszuweiten.

Zunächst waren Untersuchungsmethoden zum Nachweis von *C. botulinum* zu entwickeln. Dies gewann auch dahingehend an Bedeutung, weil der alleinige Nachweis Botulinumneurotoxin (BotNT)-positiver Isolate per kulturelle Anzuchtung aus Probenmaterial äußerst schwierig ist und vielfältige Störfaktoren vorkommen. Als günstiger Ansatzpunkt wurde die Kultivierung des

Probenmaterials und die daran anschließende spezifische Detektion von *C. botulinum*-Kulturüberstandsantigenen (KÜAg), insbesondere der typspezifischen BotNT mittels ELISA angesehen. Diese Methodik ist unabhängig vom Maus-Bioassay, ergänzt die klassische Methodik der Bakteriologie und gestattet die Untersuchung größerer Probenumfänge.

Ausgehend von Befunden aus der Humanmedizin, wonach es infolge therapeutischer Anwendungen von BotNT (BOTOX) zur Induktion neutralisierender Antikörper und sogar Therapieversagen gekommen ist, sollte der indirekte Erregernachweis in die Untersuchungen einbezogen werden. Dem geht voraus, dass die Auseinandersetzung mit *C. botulinum* im Tier in einem Umfang stattfindet, d. h. ausreichend Antigen mit entsprechend immunogenen Eigenschaften vorhanden ist, dass eine messbare Antikörperinduktion erfolgt. Auf diese Weise kann eine Wechselwirkung zwischen *C. botulinum* und dem Tier, bei gleichzeitig (momentan) negativem bakteriologischem Befund dokumentiert werden.

Unter vergleichender Bewertung der Untersuchungsergebnisse lassen sich erste tendenzielle Schlussfolgerungen zur Problematik von „*C. botulinum* in der Landwirtschaft“ und dem Vorkommen in sächsischen Milchkuhbeständen ziehen.

## **Untersuchungsmaterial und Methoden**

### Probenmaterial - Herkunft

Bei dem Untersuchungsmaterial (Darminhalts- bzw. Kot-, Futtermittel-, Boden- und Gülle- und Mistproben sowie Blutplasmen bzw. -seren) handelte es sich um direkt in den Betrieben der Rinderproduktion gewonnene bzw. an das Institut für Bakteriologie und Mykologie der Universität Leipzig eingesandte Proben aus fünf Betrieben der Rinderproduktion des Freistaates Sachsen (SA/SE). Für die Untersuchungen des Kreislaufes Tier – Mist/Gülle - Boden – Pflanze - Futtermittel/Silage – Tier wurde der sächsische Betrieb SA ausgewählt. Für die Auswahl des Betriebes war sowohl der Belastungsgrad der Tiere, der stetige Zugang zum Probenmaterial als auch die kooperative Zusammenarbeit mit den Verantwortlichen des Betriebes entscheidend. Die Probenmaterialien wurden als Aliquots bei mindestens -20°C bis zur Analyse gelagert.

### Methodik zum Nachweis von *C. botulinum*

Der Nachweis von *C. botulinum* erfolgte über das Toxinbildungsvermögen bzw. den Nachweis der beim Wachstum von *C. botulinum* gebildeten typspezifischen Kulturüberstandsantigene (KÜAg), insbesondere von BotNT. Dazu wurden je Probe zwei Röhrchen im Verhältnis 1 : 10 mit Reinforced Clostridium Medium (RCM, SIFIN) vermischt und jeweils ein Röhrchen bei 80 °C über 10 min erhitzt, während das andere Röhrchen unerhitzt gelassen wurde. Beide Röhrchen wurden dann unter anaeroben Bedingungen 5 bis 7 d bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurden die Proben bei -20 °C bis zur Untersuchung im ELISA eingefroren. Zur Bearbeitung im ELISA wurden die Proben nach dem Auftauen geschüttelt, abzentrifugiert (9 000 rpm, 15 min) und zur weiteren Bearbeitung abpipettiert. Die Anreicherungskultur wurde anschließend wieder bei



-20 °C gelagert und bei einer positiven ELISA-Reaktion weiter bearbeitet (Isolation). Als positiv wurde eine Probe gewertet, die entweder in der erhitzten und/oder in der unerhitzten Anreicherung im ELISA ein Signal über 10 relative ELISA-Einheiten (REE, Extinktion der untersuchten Probe abzüglich dem doppelten Kontrollwert bei RCM und multipliziert mit dem Verdünnungsfaktor) zeigte.

#### Isolation von *Clostridium* spp.

Die Isolation von *Clostridium* spp. mit besonderem Augenmerk auf *C. botulinum* erfolgte aus der 7 d-Anreicherungskultur. Dazu wurden die im ELISA positiv auf *C. botulinum* getesteten Proben auf verschiedene in der Literatur beschriebene Festmedien zur Isolierung von *C. botulinum* beimpft und 2 d unter anaeroben Bedingungen bei 37 °C bebrütet. Alle makromorphologisch typischen Kolonien wurden zur Überprüfung weiterer Parameter isoliert und als Reinkultur bei -20 °C gelagert. Als weitere Parameter wurden überprüft: Sporenbildung, anaerobe Wachstumsweise, Bildung von Lipase, keine Verstoffwechslung von Laktose. Die als *C. botulinum* verdächtig eingruppierten Isolate wurden dann mithilfe biochemischer, gaschromatographischer und massenspektrometrischer Methoden näher untersucht.

#### *C. botulinum*-Kulturüberstandsantigen (KÜAg)

BotNT-positiver Kulturüberstand von Referenzstämmen wurde bei 37 °C mittels Formalin (0,2 Prozent) detoxifiziert. Nach 30 min Zentrifugation bei 1 800 g erfolgte die Trennung nach der Molekulargröße (Ausschlussgrenze bei 12 bzw. 50 kDa) mittels Membranfilter-Zentrifugation. Die Proteinbestimmung erfolgte spektralphotometrisch unter Anwendung der Methodik nach Warburg-Christian (Spektralphotometer MB2000 und integrierte Software für die Proteinbestimmung, Perkin Elmer, USA).

#### Bestimmung Anti-*Clostridium botulinum*-Antikörper in Blutproben

Das IgG- und IgM-anti-KÜAg-*C.bot.* wurde mittels Enzymimmunoassay (EIA) bestimmt. An die Festphase (Mikrotiterplatte, 96 Kavitäten, F-Form, Corning, USA) wurde das entsprechende KÜAg-*C. bot.* adsorptiv (1 µg Protein je ml 0,1M NaHCO<sub>3</sub>) über 2 h bei Raumtemperatur (RT) auf einem Mikrotiterplattenschüttler (MTPS, bei 500 rpm) gebunden. Zwecks Erfassung der jeweiligen Backgroundwerte wurde in parallelen Kontrollkavitäten RCM-Ag (Herstellung s. oben) adsorptiv gebunden (Kontrollwert).

Die Blutplasmaproben wurden in Testpuffer verdünnt und mindestens eine Stunde bei RT vorinkubiert. Nach zweimaligem Waschen der MTP mit PBS nach Dulbecco (pH 7,35) mit 0,05 Prozent Tween 20 (PBST) wurden 90 µl je Kavität Testpuffer vorgelegt und danach 10 µl je Kavität vorinkubierte Probe zugegeben. Nach einstündiger Inkubation (s. oben) wurde viermal mit PBST gewaschen. Die Detektion des festphasengebundenen IgG bzw. IgM erfolgte mittels spezies-spezifischer und mit Peroxidase (POD)-markierter polyklonaler Antikörper (100 µl je Kavität, Kaninchen-anti-bovine IgG mit POD, 1/20 000 in Testpuffer verdünnt bzw. Schaf-anti-

bovine IgM mit POD, 1/10 000 in Testpuffer verdünnt). Nach einstündiger Inkubation (s. oben) wurde die MTP viermal mit PBST gewaschen und der festphasen-gebundene Komplex über die Peroxidase unter Verwendung von TMB und Wasserstoffperoxid als Substrat messbar. Die Enzym-Substrat-Reaktion wurde nach 10 Minuten Inkubation bei RT (50 µl je Kavität 1 M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) gestoppt. Die Extinktion bzw. optische Dichte (OD) wurde mittels ELISA-Reader bei 450 nm gemessen.

#### Nachweis von *C. botulinum*-KÜAg (insbesondere von BotNT und assoziierte Proteine) in den Probenkulturüberständen (PKÜ)

Der Nachweis von toxovarspezifischen *C. botulinum* KÜAg in den PKÜ (aus Toxinanreicherung) erfolgte mittels ELISA unter Verwendung typspezifischer, biochemisch gereinigter, polyklonaler Antikörper. Folgendes Testverfahren kam zur Anwendung:

An die Festphase (Mikrotiterplatte/ MTP, 96 Kavitäten, F-Form, Corning, USA) wurde adsorptiv gebunden: Schaf-anti-BotNT-A, Pferd-anti-BotNT-B, Pferd-anti-BotNT-C und Ziege-anti-BotNT-D zu jeweils 2 µg/ml in 0,1 M NaHCO<sub>3</sub> und mit 100 µl/Kavität.

Die MTP wurde 2 h bei RT auf dem MTPS (500 rpm) inkubiert. Die eingefrorenen Proben wurden aufgetaut, geschüttelt und zentrifugiert. Der klare Überstand und Kontrollproben (RCM für die Backgroundkontrolle und eine Mischung von positiven BotNT-Kulturüberständen als Positivkontrolle) wurden zehnfach in Testpuffer verdünnt und 100 µl davon in die Kavitäten der zweimal mit PBST gewaschenen MTP zugegeben. Nach einstündiger Inkubation (s. oben) erfolgte die Entfernung und Detoxifizierung des Kavitäteninhalts sowie dreimalige Waschung der MTP mit PBST.

Die Detektion auf BotNT A bis D erfolgte durch Zugabe von 100 µl je Kavität Anti-*C. botulinum*-toxovarspezifischer und mit Peroxidase markierter polyklonaler Antikörper (<sup>POD</sup>Schaf-anti-BotNT-A, <sup>POD</sup>Pferd-anti-BotNT-B, <sup>POD</sup>Pferd-anti-BotNT-C und <sup>POD</sup>Ziege-anti-BotNT-D). Das Markerenzym wurde mittels TMB und Wasserstoffperoxid als Substrat erfasst. Die Enzym-Substrat-Reaktion wurde nach 10 Minuten Inkubation bei RT durch Zugabe von 50 µl je Kavität 1 M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> gestoppt und die Extinktion bzw. optische Dichte (O.D.) mittels ELISA-Reader bei 450 nm gemessen.

## Datenauswertung

Die erhaltenen REE-Differenzwerte wurden nach folgendem Schema (Score) gewertet:

REE	Symbol	Wertung
0	-	negativ
1,0 – 10,0	+/-	fraglich
10,1 – 25,0	+	geringgradig
25,1 – 50,0	++	mittelgradig
> 50,0	+++	hochgradig

Für die grafische Darstellung der Ergebnisse wurde die Software SigmaPlot und für die statistische Auswertung die Software SigmaStat (SPSS Science Software GmbH, Erkrath, Germany) verwendet.

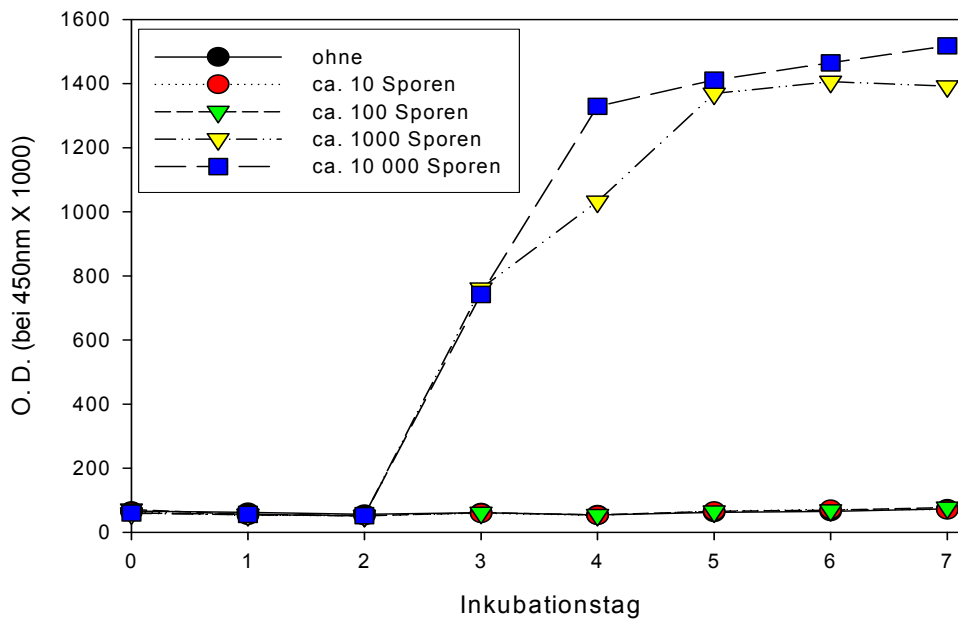
## Ergebnisse

Zur Abschätzung der Relevanz der verwendeten Untersuchungsmethodik wurden von zufällig ausgewählten Kotproben definierte Mengen an Sporen von *C. botulinum* verschiedener Toxovaren zugesetzt. Gleichzeitig wurde geprüft, ob für den Nachweis eines BotNT-positiven Signals in Kulturüberständen (KÜ) eine zeitabhängige Beziehung zwischen Inkubationsdauer der Anreicherung und Sporenmenge besteht.

In Abbildung 1 (10 Prozent Kotsuspension mit *C. botulinum* B-Sporen) ist die Induktion und Freisetzung von BotNT-B in den KÜ über die gesamte Inkubationszeit von sieben Tagen dargestellt.

Bei der 10-Prozent-Kotsuspension war ab ca. 1 000 Sporen pro Gramm Kot ab dem dritten Inkubationstag ein deutlicher Anstieg der BotNT-B-Konzentration vorhanden, der bis zum untersuchten siebenten Inkubationstag eindeutig nachweisbar war.

Die Ergebnisse wurden auch mit den Toxovaren A, C und D erzielt und lassen den Schluss zu, dass ab dem 3. Inkubationstag mit einer BotNT-Freisetzung und Messbarkeit mittels ELISA bei Vorhandensein eines BotNT-positiven Bakterienstammes in ausreichender Sporenzahl zu rechnen ist.



**Abbildung 1: Nachweis von BotNT-B in KÜ während der siebentägigen, anaeroben Inkubation einer 10-Prozent-Kotprobe in RCM unter einmaligem Zusatz unterschiedlicher *C. botulinum*-B-Sporenzahlen zu Versuchsbeginn**

#### **Nachweis von Anti-*C. botulinum*-Antikörper**

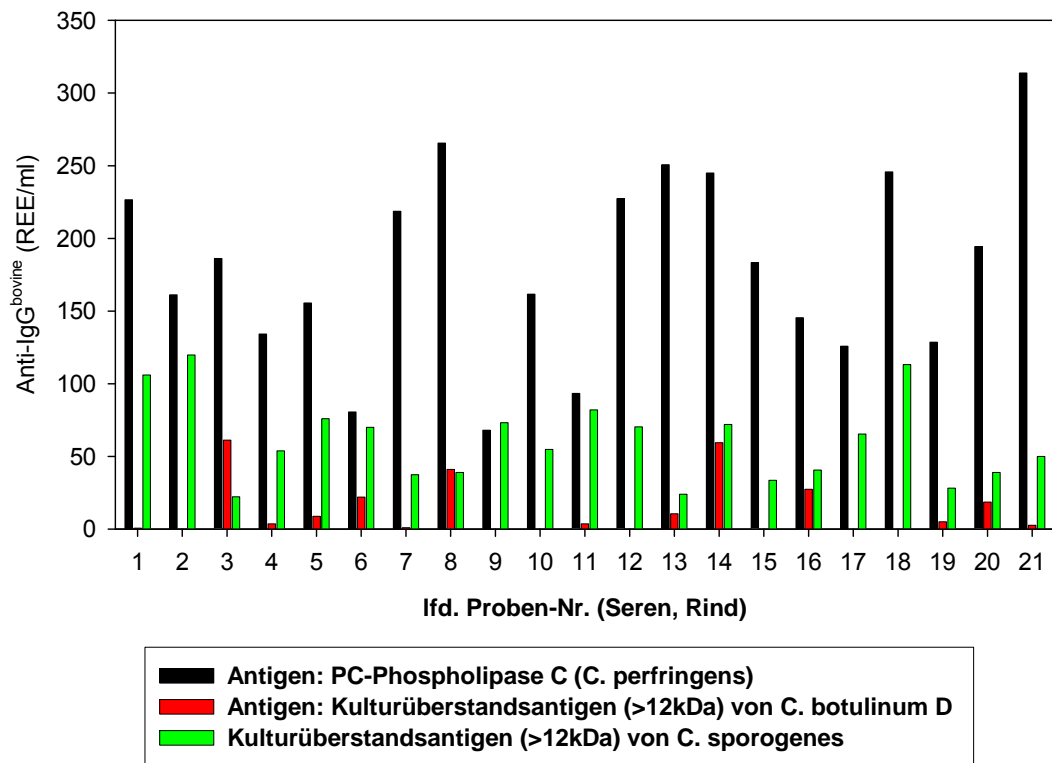
Um einen Hinweis auf die Detektierbarkeit von Antikörpern (Ak) im Blut von Kühen mit dem entwickelten Testverfahren zu erhalten, wurden Seren von Kühen vor und nach Vakzinierung mit einer *C. botulinum* C- und D-Vakzine untersucht.

Diese Seren standen aus anderen Untersuchungen (GROßE-HERRENTHEY, 2004) zur Verfügung. Aus den Ergebnissen in Tab. 1 ist erkennbar, dass die Vakzine-induzierte Ak-Bildung mit dem verwendeten Testsystem eindeutig nachweisbar war. Auch mit monoklonalen Antikörpern gegen *C. botulinum* D konnte in Randversuchen die Präsenz und Detektierbarkeit von festphasenadsorbierten, detoxifizierten BotNT-D unter Verwendung des o. g. KÜAg bestimmt werden.

Die relevantere Frage war, ob natürlich (Vakzine-unabhängig) induzierte Ak-Spiegel gegen *C. botulinum* im Blut von Kühen unter Praxisbedingungen nachweisbar sind.

**Tabelle 1: Prüfung des im ELISA verwendeten KÜAg von *C. botulinum* C und D mit Blutproben immunisierter Rinder**

EIA-KÜAg	vor Vakzinierung	60 Tage nach Vakzierung	vor Vakzinierung	60 Tage nach Vakzierung
	Messwert der optischen Dichte (O. D.) bei 450nm			
	Probenverdünnung: 1/200		Probenverdünnung: 1/400	
von <i>C. bot. C</i>	0,341	<b>2,589</b>	0,184	<b>1,802</b>
von <i>C. bot. D</i>	0,362	<b>2,644</b>	0,183	<b>1,900</b>



**Abbildung 2: Relative IgG-Konzentrationen in 21 bovinen Seren gegen drei verschiedene Clostridienantigene im Vergleich.**

In Abb. 2 sind Voruntersuchungsergebnisse dargestellt und sprechen für das Vorhandensein natürlicher Ak-Spiegel gegen Clostridien-Antigene (PC-Phospholipase C von *C. perfringens*, KÜAg von *C. sporogenes* und KÜAg von *C. botulinum* D) im Blut der untersuchten Kühe. Aus den Ergebnissen wird auch ersichtlich, dass bei den Proben 3, 6, 8, 14, 16 und 20 IgG gegen KÜAg von *C. botulinum* D nachweisbar war und nicht zwangsläufig den hohen relativen Konzentrationen von IgG-anti-*C. sporogenes* oder anti-*C. perfringens*-Phospholipase C entsprach.

#### **Untersuchung von Kot und Blutproben auf *C. botulinum* im Betrieb SA**

Die Untersuchung von Kot- und Blutproben von 60 laktierenden Kühen aus dem Betrieb SA ergab folgendes Ergebnis:

Bei den Milchkühen konnte bei 3 von 60 Blutproben IgG-anti-*C. botulinum*-KÜAg und bei 6 von 60 Kotanreicherungen (BotNT-Anreicherung) ein positiver Nachweis geführt werden. Bei zusätzlich untersuchten Jungrindern (n = 8) waren drei positive Nachweise im Serum (IgG-anti-KÜAg-*C. bot.* A bis D), aber kein positiver Nachweis bei den untersuchten Kotproben (Toxinanreicherung) vorhanden.

#### **Untersuchung von Gülle und Mist (Betrieb SA)**

In Tab. 2 sind die Ergebnisse der Untersuchung der Gülle und Mistproben unterschiedlicher Herkunft aus dem Betrieb SA dargestellt. Die Gesamtkeimzahlen von Clostridien pro g Probe liegen zwischen  $<10^0$  im Kälber und Krankenstall und  $10^4$  in der Schweinegülle bzw. auf einem Feld gelagertem Mist. Der Nachweis von BotNT-bildenden Stämmen (B und D) gelang nur in einem Fall (gelagerter Mist).

**Tabelle 2: Untersuchung von Gülle und Mistproben aus dem Betrieb SA auf Clostridien spp. (Toxinbildungsvermögen und DRCM)**

Probe	Clostr./g Boden	Anreicherung: <i>C. botulinum</i>			
		A	B	C	D
Gülle Rind	10 <sup>3</sup>	-	-	-	-
Gülle Schwein	10 <sup>4</sup>	-	-	-	-
Mist Krankenstall	10 <sup>0</sup>	-	-	-	-
Mist Trockensteher	10 <sup>3</sup>	-	-	-	-
Mist Frischabkalber	10 <sup>3</sup>	-	-	-	-
Mist Jungrinder	10 <sup>3</sup>	-	-	-	-
Mist Kälberstall	10 <sup>0</sup>	-	-	-	-
Mistlager Feld (1)	10 <sup>4</sup>	-	+	-	+
Mistlager Feld (2)	10 <sup>4</sup>	-	-	-	-
Mistlager Feld (3)	10 <sup>4</sup>	-	-	-	-

**Tabelle 3: Untersuchung von Bodenproben nach Düngung mit Schweinegülle auf *Clostridium* spp. (Keimzahlen in KbE/g) und *C. botulinum* Toxinbildungsvermögen, Betrieb SA**

Probe	Düngung Gülle- menge/ha	Clostridien/g Bo- den	Anreicherung: <i>C. botulinum</i>			
			A	B	C	D
Eingesetzte Gülle (Schwein)	-	10 <sup>6</sup> /ml	-	-	-	-
Mai (unbehandelter Boden)	-	10 <sup>5</sup>	-	-	-	-
Mai (7d nach Dün- gung)	50 m <sup>3</sup>	10 <sup>5</sup>	-	-	-	-
	100 m <sup>3</sup>	10 <sup>4</sup>	-	-	+	-
Juni	50 m <sup>3</sup>	10 <sup>6</sup>	-	-	-	-
	100 m <sup>3</sup>	10 <sup>5</sup>	+	-	-	-
Juli	50 m <sup>3</sup>	10 <sup>5</sup>	+	+	-	-
	100 m <sup>3</sup>	10 <sup>5</sup>	-	-	-	-
Oktober (nach Mais- ernte)	50 m <sup>3</sup>	10 <sup>6</sup>	-	-	-	-
	100 m <sup>3</sup>	10 <sup>6</sup>	-	-	-	-

### Untersuchung von Bodenproben (Betrieb SA)

Im Betrieb SA wurden Bodenproben entnommen, um einen Einfluss der im Boden vorhandenen Clostridien auf die in Futter, Rinderkot und Gülle nachzuweisenden Clostridien aufzuzeigen. In Tab. 3 ist die Untersuchung von Bodenproben vor und nach Düngung mit einer definierten Menge Schweinegülle dargestellt. In der eingesetzten Schweinegülle konnte kein Hinweis auf das Vorhandensein von BotNT bildenden Stämmen gefunden werden. Nur in drei Bodenproben war BotNT nachweisbar. Es kann dabei kein Zusammenhang zur eingesetzten Güllemenge pro ha landwirtschaftliche Nutzfläche hergestellt werden.

Wie aus den in Tabelle 4 und 5 dargestellten Ergebnissen deutlich wird, schwankt die Gesamtkeimzahl der gefundenen Clostridien zwischen  $10^3$  und  $10^6$  Sporen/g Boden im Untersuchungszeitraum.

Aus der Tab. 5 lässt sich die Nachweishäufigkeit eines BotNT-Bildungsvermögens (Präsenz BotNT-bildender Clostridien in ausreichender Zell- bzw. Sporenzahl) zu unterschiedlichen Entnahmezeiten ablesen. Insgesamt gesehen war dabei Ende April die Häufigkeit eines positiven Nachweises am größten. Sie lag bei 80 Prozent der insgesamt untersuchten Proben. Über das Jahr verteilt, ließ sich bei den Proben 3, 1 und 4 ein vermehrter Nachweis führen, wobei die Toxovar auch wechseln kann (Probe 3).

**Tabelle 4: Bestimmung der Gesamt-Clostridienanzahl je g Boden ausgewählter Felder über ein Jahr verteilt (DRCM), Betrieb SA**

	26.04.2005	31.05.2005	11.07.2005	16.08.2005	27.10.2005
1	$10^5$	$10^6$	$10^4$	$10^4$	$10^4$
2	$10^4$	$10^4$	$10^4$	$10^5$	$10^5$
3	$10^4$	$10^4$	$10^3$	$10^5$	$10^5$
4	$10^4$	$10^5$	$10^5$	$10^4$	$10^4$
5	$10^3$	$10^5$	$10^4$	$10^4$	$10^4$



**Tabelle 5: Untersuchung von Bodenproben auf *C. botulinum* Toxinbildungsvermögen ausgewählter Felder über ein halbes Jahr verteilt, Betrieb SA**

	26.04.2005				31.05.2005				11.07.2005				16.08.2005				27.10.2005				Pos. Nachweis
	A	B	C	D	A	B	C	D	A	B	C	D	A	B	C	D	A	B	C	D	in %
1	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	+	-	-	-	+	-	-	+	60
2	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	20
3	-	-	-	+	-	-	-	-	+	-	-	-	+	-	+	-	+	-	-	-	80
4	-	-	-	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	40
5	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	20
%	80				20				40				40				40				

**Untersuchung von Futterproben (Betrieb SA)**

In Tabelle 6 sind die Gesamtclostridiengehalte pro g Futtermittel, aus denen die verfütterte TMR hergestellt wurde und das Ergebnis der Untersuchung auf das Toxinbildungsvermögen dargestellt. Die Untersuchung auf BotNT verlief dabei ohne positives Ergebnis. Insgesamt sind in den Futtermitteln relativ geringe Gehalte an Clostridien zu finden. Die besonders betroffenen Futtermittel sind dabei die Silagen, silierte Biertreber und Rübenpressschnitzel.

In frischem Biertreber, Sojaschrot, Rapsschrot und Silage aus gehäckseltem Mais konnten keine Clostridien mittels DRCM gefunden werden.

Stichproben von TMR wurden über 16 Stunden verteilt genommen und untersucht. Der Betrieb mischte einmal täglich die gesamte Ration für alle Rinder an und verteilte diese auf dem Futtertisch. Mehrmals täglich wurde der Futterhaufen dann den Kühen wieder vorgeschoben. Untersucht wurde sowohl die TMR für die laktierenden Tiere als auch die TMR für die Trockensteher. Dazu wurden über den Tag verteilt Proben direkt vom Futtertisch gezogen. Zusätzlich wurde aus der frisch gemischten TMR jeweils auf dem Futtertisch für die Kühe unzugänglich ein Haufen gebildet, der auf die gleiche Weise beprobt wurde wie der für die Kühe zugängliche Teil. Die Gesamtclostridienzahl ist bei den TMR etwa gleich und schwankt um  $10^5$  Clostridien pro g TMR.

**Tabelle 6: Untersuchung der zur TMR-Herstellung verwendeten Futtermittel auf Clostridien spp. (Toxinbildungsvermögen und DRCM), Betrieb SA**

Futtermittel	Anreicherung: <i>C. botulinum</i>				DRCM: Clostridien/g
	A	B	C	D	
GPS Gras	-	-	-	-	10 <sup>2</sup>
Maissilage, Frisch	-	-	-	-	10 <sup>2</sup>
Luzernesilage, Frisch	-	-	-	-	10 <sup>2</sup>
Silage aus gehäckseltem Mais	-	-	-	-	<10 <sup>0</sup>
Sojaschrot	-	-	-	-	<10 <sup>0</sup>
Rapsschrot	-	-	-	-	10 <sup>0</sup>
Biertreber siliert	-	-	-	-	10 <sup>2</sup>
Biertreber frisch	-	-	-	-	<10 <sup>0</sup>
Rübenpressschnitzel	-	-	-	-	10 <sup>2</sup>

Bei der TMR für Trockensteher steigt die Gesamtmenge zum Ende der Untersuchung bis 10<sup>6</sup> Clostridien pro g an. In einem Probenfall (TMR laktierende Tiere, Haufen gegen 11 Uhr) konnte ein geringgradig positiver Nachweis auf BotNT geführt werden.

**Zweituntersuchung von Blut und Kot zu *C. botulinum* im Bestand SA**

Bei einer zweiten Untersuchung im Bestand SA (ca. fünf Monate später) ergab die Blutprobenanalyse, dass im Mittel erhöhte Ak-Spiegel (IgG und IgM) gegen *C. botulinum* C/D-Antigen vorlagen. In der Toxinanreicherung war folgendes Ergebnis mit der Beurteilung auf *C. botulinum* - Nachweis positiv (>10 REE) vorhanden:

**Tabelle 7: Untersuchung von Kot und Blutproben auf *C. botulinum* im Betrieb SA**

BotNT-A im KÜ	BotNT-B im KÜ	BotNT-C im KÜ	BotNT-D im KÜ
0/60 (0%)	1/60 (1,7%)	3/60 (5%)	2/60 (3,35%)
IgG-anti-KÜAg von <i>C. botulinum</i> A/B		IgG-anti-KÜAg von <i>C. botulinum</i> C/D	
7/70 (10%)		11/70 (16%)	

Es wurde häufiger die Toxovar C und D als A bzw. B im Kulturüberstand (Toxinbildungsvermögen) nachgewiesen. Auch Antikörper gegen diese Toxovar waren vergleichend häufiger detektierbar.

## **Charakterisierung von Isolaten aus BotNT-positiven Originalanreicherungen: Vorkommen von *C. botulinum* im Boden, Futtermittel, Tier (Kot), Gülle/Mist (sächsischer Betrieb SA)**

### Übersicht zu *C. botulinum*-verdächtigen Isolaten

Zur Charakterisierung des Kreislaufes Boden-Pflanze/Futtermittel-Tier (Kot)-Gülle-Boden (Futterflächen) wurden epidemiologische Untersuchungen an Clostridium-Isolaten im Zeitraum von zwei Jahren durchgeführt. Die Charakterisierung von *C. botulinum*-verdächtigen Isolaten stand hierbei im Vordergrund. Zu diesem Zweck wurden die aus den BotNT-positiven Anreicherungen isolierten Stämme, die sich biochemisch als *C. botulinum*- bzw. *C. sporogenes*-verdächtige Isolate erwiesen, mittels Gaschromatographie und MALDI-TOF Massenspektrometrie weiter charakterisiert.

Die epidemiologischen Untersuchungen wurden im Betrieb SA durchgeführt. Aus den verschiedenen BotNT-positiven Anreicherungen wurden insgesamt 108 *C. botulinum*- bzw. *C. sporogenes*-verdächtige Isolate untersucht. Davon wurden 28 Isolate aus Kotanreicherungen (Milchkühe) gewonnen. Weitere 18 Stämme wurden aus Anreicherungen von gepacktem Mist isoliert. Fünf verschiedene Böden (Ackerflächen, Boden 1 - 5) des Betriebes SA wurden zu unterschiedlichen Jahreszeiten in Abhängigkeit von der Bearbeitung der Bodenflächen beprobt (April, Mai, Juli, August, Oktober). Zusätzlich standen Proben von Ackerflächen zur Verfügung, die mit Schweinegülle gedüngt wurden. Gülle wurde auf diesen Böden in Mengen von 50 m<sup>3</sup>/ha bzw. 100 m<sup>3</sup>/ha ausgebracht. Bodenproben wurden vor der Düngung bzw. eine Woche nach Düngung (Mai) sowie in den Monaten Juni, Juli und Oktober (nach der Maisernte) untersucht.

Von den Bodenflächen 1 - 5 standen im Beobachtungszeitraum insgesamt 40 *C. botulinum*-verdächtige Isolate zur Verfügung. Von den mit Schweinegülle gedüngten Böden wurden aus BotNT-positiven Anreicherungen sieben *C. botulinum*-verdächtige Isolate gewonnen. Von den im Betrieb SA verwendeten Futtermitteln konnten von folgenden Anreicherungen *C. botulinum*-verdächtige Isolate gewonnen werden: GPS Gras 1 Isolat, Maissilage frisch 2 Isolate, Luzerne-silage frisch 1 Isolat, Biertreber siliert 1 Isolat, Rüben-Press-Schnitzel 1 Isolat.

Bei den Untersuchungen zur TMR (Haufen/ Futtertisch) bei laktierenden Tieren bzw. Trockenstehern (Tagesverlauf) standen 9 *C. botulinum*-verdächtige Isolate zur Verfügung.

### **Charakterisierung *C. botulinum* verdächtiger Isolate mittels Gaschromatographie**

Werden die Metabolitmuster der niedermolekularen Fettsäuren mit in die Auswertung einbezogen, lassen sich die *C. botulinum*-verdächtigen Isolate teilweise verschiedenen Spezies zuordnen. Es wird deutlich, dass *C. botulinum* A bzw. B in allen untersuchten Habitaten gefunden wurde, jedoch dominierend im Boden und Kot der Tiere. *C. sporogenes* wurde hauptsächlich aus Bodenproben isoliert. Bei keiner der gedüngten Ackerflächen konnten diese Spezies kontinuierlich zu allen Probeentnahme-Zeiten festgestellt werden. Interessant ist, dass bei Boden 1,

der nach Ernte des Winterroggens (Ende April) mit Mist gedüngt wurde, in den Monaten Juli, August und Oktober gefundene Isolate auf das Vorkommen von *C. botulinum* A, B bzw. *C. sporogenes* hinweisen. Bei dem Boden 4, der im April mit 80 m<sup>3</sup>/ha Schweinegülle bzw. bei dem Boden 5 der mit 100 m<sup>3</sup>/ha Rindergülle gedüngt wurde, waren *C. sporogenes* bzw. *C. botulinum* im Zeitraum April und Mai nachweisbar.

### **Charakterisierung *C. botulinum* verdächtiger Isolate mittels MALDI-TOF Massenspektrometrie**

Im Vergleich zur gaschromatographischen Charakterisierung der Isolate konnte auf der Basis einer sehr umfangreich erstellten MALDI-TOF-Clostridien-Datenbank neben *C. botulinum* A und B auch *C. botulinum* C festgestellt werden. Außerdem konnten Isolate aus Kot- und Bodenanreicherungen *C. cadaveris* zugeordnet werden.

### **Untersuchungen in weiteren sächsischen Betrieben**

#### Betrieb SB

Bei dem Betrieb SB handelt es sich um einen Gemischtbetrieb mit Tier- und Pflanzenproduktion. Für epidemiologische Untersuchungen zum Vorkommen *C. botulinum* bzw. zum Nachweis von BotNT im Kulturüberstand von Anreicherungen und zur Prävalenz von Anti-*C. botulinum*-Antikörperspiegeln standen Kot, Blutserum als auch Futtermittel zur Verfügung.

Es wurden bei einem Tier (n = 10) IgG-Ak gegen *C. botulinum* KÜAg sowie einmal *C. botulinum* Typ B und C über ihr Toxinbildungsvermögen (n = 10 Kotproben) nachgewiesen. Die untersuchten Futtermittel wiesen Gesamtkeimzahlen an Clostridien von 10<sup>5</sup> bis 10<sup>6</sup>/g Feucht-masse auf. In der Probe TMR-Reste war ein geringgradiges Toxinbildungsvermögen (Typ D) messbar.

#### Betrieb SC

In dem Betrieb SC wurden ebenfalls Kot-, Serum- sowie Futterproben untersucht. Dabei waren zwei Tiere (n = 11) im Antikörpernachweis bzgl. Typ D und nach Toxinanreicherung der 11 Kotproben einmal *C. botulinum* Typ B positiv.

Die Gesamtbelastung der Futtermittel mit Clostridien lag bei weniger als 10 bis 10<sup>5</sup> Keime je Gramm. In Gerste, Rapsschrot, Mais und Melasse wurden keine Clostridien nachgewiesen. Höhere Keimzahlen von 10<sup>5</sup>/g wurden vor allem in den TMR-Mischungen festgestellt.

#### Betrieb SD

Vom Milchkuhbestand SD wurden 10 Kot- und Blutproben von Frischabkalbern zur Untersuchung eingesandt. Ein BotNT-Bildungsvermögen war dabei in drei Kotproben für die Toxovar A festzustellen. Für das Vorhandensein von *C. botulinum* im MDT sprachen auch die relativ häufi-

gen positiven Ak-Befunde zu 40 bis 60 Prozent bei IgG- und IgM-anti-KÜAg von *C. botulinum* C und D.

#### Betrieb SE

Bei diesem Betrieb handelte es sich um eine Milchviehanlage mit ca. 1 200 Milchkühen, ca. 200 Färsen und Frischabkalber. Im Bestand traten Fruchtbarkeitsprobleme auf und es wurden Salmonellen nachgewiesen (*Salmonella* Cerro).

Bei der letzten zusammenhängenden Probenuntersuchung (n = 38) lag zusammengefasst folgendes Ergebnis vor: In 12 Blutproben wurden IgG-AK gegen *C. botulinum*-KÜAg und in einer angereicherten Kotprobe einmal *C. bot.* Typ D nachgewiesen. Bei diesen Tieren lag somit ein ausgeprägter positiver indirekter Erregernachweis bzgl. *C. botulinum* vor.

#### **Diskussion**

*C. botulinum* ist weit verbreitet und auch gelegentlich im Magen-Darmtrakt (MDT) völlig gesunder Rinder nachzuweisen. Erkrankungen durch *C. botulinum* haben in den letzten Jahren in Deutschland scheinbar zugenommen.

DAHLENBORG et al. (2003) konnten demgegenüber in ihren Untersuchungen an Schlachtrindern unterschiedlicher Regionen Schwedens mit molekularbiologischen Methoden im MDT zwar eine sehr große Verbreitung (63 bis 82 Prozent positive Proben mit Häufung auf 90 Prozent im Winter) von *C. botulinum* Typ B feststellen, doch handelte es sich bei 2/3 der Proben um weniger als 10 Sporen pro Gramm Kot. Umfangreiche Untersuchungen zur Epidemiologie des Erregers, die diese Aussagen bei Rindern und ihrer Umwelt bestätigen, gibt es in Deutschland bislang nicht.

Der Schwerpunkt unserer Untersuchungen musste sich daher auf Methoden konzentrieren, die geeignet sind, mit vertretbarem Aufwand und ausreichender Sicherheit eine Vielzahl von Proben unterschiedlicher Herkunft auf *C. botulinum* zu untersuchen.

Nach umfangreichen Voruntersuchungen wurde die kulturelle Anreicherungsmethodik gewählt, weil auch über den Nachweis *C. botulinum*-spezifischer Kulturüberstandsantigene (KÜAg), insbesondere BotNT eine Charakterisierung der Probe bzgl. Präsenz von *C. botulinum* möglich ist. Der Grundgedanke war dabei, dass nur unter bestimmten Bedingungen (ausreichende Anzahl von *C. botulinum*-Keimen bzw. -Sporen, vorhandenes Potenzial zur Neurotoxinbildung, geringgradige Präsenz von Hemmfaktoren usw.) mittels in vitro-Kultivierung des Probenmaterials über ELISA messbare BotNT-Konzentrationen erreicht werden.

Erst ab ca. 1 000 Sporen/ml bzw. g war ein mittels ELISA-Test deutlich wertbares Messergebnis vorhanden. Die Spezifität und Sensitivität der Methode wurde mit ausgewählten Toxinanrei-

cherungen (Referenzstämme), auch vergleichend mit dem Maus-Bioassay, validiert. Danach liegt die untere Sensitivitätsgrenze unseres Testverfahrens ca. bei 10 MLD.

Nach MOELLER et al. (2003) liegt die LD<sub>50</sub> für Rinder nach i. v. Applikation bei 388 pg/kg Körpermasse. Bei oraler Applikation liegt sie nach den gleichen Autoren um den Faktor 10 - 100 darüber. Bezieht man die relevanten Toxinmengen auf toxinbildende Erregerkonzentrationen, müssen weit über 1 000 Erreger in der Kotprobe enthalten sein, um eine solche Toxinmenge zu bilden. Die Bedeutung der Sporenzahl in der Probe für das positive Kulturergebnis konnten ZHAO et al. (2002) in ihren Untersuchungen bereits feststellen. Der kritische Umschlagpunkt liegt zwischen 100 und 1 000 Sporen. Erst Sporenzahlen in dieser Größenordnung haben auch in den eigenen Untersuchungen zu einem nachweisbaren Toxinsignal geführt.

Ob eine natürliche Interaktion im MDT zwischen *C.botulinum*-Keimen und Makroorganismus besteht, kann auf Basis der immunologisch-adaptiven Reaktion auf diese Toxine entschieden werden. Dafür wurde ein ELISA-Test entwickelt, der mit typspezifischem Erregerantigen die Antikörperspiegel erfasst. Erste Hinweise für das Vorkommen natürlicher Anti-Botulinum-Antikörper wurden von OHISHI et al. (1975) nach Untersuchungen verschiedener Wildtiere publiziert. GREGORY et al. (1996) untersuchten in Australien mittels ELISA gezielt Rinderbestände auf Antikörper gegen BotNT C und D. Dabei waren in mit BotNT-vakzinierten Beständen eindeutig hohe Antikörperspiegel messbar. In Regionen mit einzelnen Botulismusfällen bzw. erhöhter Gefährdung konnten im Blut ebenfalls deutlich höhere Anti-BotNT-C und -D-Antikörperspiegel ermittelt werden. Aber auch bei der Untersuchung nicht vakzinierter und hinsichtlich Botulismus unauffälliger Bestände konnten in wenigen Proben positive Messergebnisse erhalten werden.

Aus den wenigen bekannten Untersuchungsergebnissen lässt sich ableiten, dass natürliche Antikörper gegen BotNT induzierbar und mittels ELISA messbar sind. Offenbar bestehen zwischen dem Vorkommen von *C. botulinum* sowie dessen Neurotoxin/Neurotoxinkomplexen und der Quantität natürlicher Antikörperspiegel gegen diese Antigene direkte Beziehungen, die mit einem geeigneten Testantigen und Testverfahren gemessen, diagnostische Bedeutung für die Praxis oder epidemiologische Untersuchungen haben könnten. Ein weiterer Hinweis für die Induzierbarkeit von Anti-BotNT-Antikörpern ergibt sich aus der Humanmedizin nach therapeutischer Anwendung von BotNT in niedriger Dosierung. Nach BotNT-Injektion wurden bei einem Teil der Patienten Anti-BotNT-Antikörperspiegel induziert, die neutralisierend im Tierversuch waren und bei den Patienten selber zum sog. Therapieversagen geführt haben (HANNA et al., 1999, DRESSLER, 2003, SESARDIC et al., 2004). Das sind deutliche Hinweise dafür, dass gegen sehr niedrige (subtoxische) BotNT-Konzentrationen Antikörper *in vivo* induziert werden können, sofern eine entsprechende Toxinexposition und die immunologischen Voraussetzungen gegeben sind.

### **Epidemiologische Untersuchungen zur Prävalenz von *C. botulinum* in Rinderbeständen**

Die serologischen Untersuchungsergebnisse von Kühen aus fünf Beständen des Freistaates Sachsen auf *C. botulinum*-KÜAg-IgG-Antikörper ergaben zusammenfassend eine positive Nachweisrate von 12,5 Prozent bei den Typen A/B und von 24,36 Prozent bei den Typen CD.

### **Prävalenz von *C. botulinum* und BotNT in Kotkulturüberständen (KKÜ)**

Der Anteil BotNT-positiver KKÜ der untersuchten Tiere war mit 1,9 Prozent BotNT A, 3,2 Prozent BotNT B, 3,2 Prozent BotNT C und 1,9 Prozent BotNT D verhältnismäßig niedrig. Aufgrund der ausgeprägten Antikörperbildung besonders gegen KÜAg von *C. bot. C/D* sind hierbei protektive Antikörperwirkungen zu vermuten. Weil in den untersuchten Beständen keinerlei Hinweise auf ein Erkrankungsgeschehen durch *C. botulinum* vorlagen, dürfte es sich hierbei um Nachweise bei diesbezüglich klinisch gesunden Tieren handeln.

### **Prävalenz von BotNT in Kulturüberständen von Futtermitteln**

Von 49 untersuchten Futtermittelproben verschiedener Betriebe waren nur zwei Proben *C. botulinum* NT Typ A (2,1 Prozent)- positiv. In einem Fall (TMR) konnte BotNT Typ D nachgewiesen werden. Es handelte sich aber um einen TMR-Rest, der aus der Umwelt möglicherweise (Katzenkot, verschleppter Boden) kontaminiert wurde. In der Mehrzahl der Fälle wurde Maissilage (im Betrieb SA) verfüttert. Die Wahrscheinlichkeit, dass Feldfutter bei entsprechender Schnitthöhe kontaminiert wird, ist relativ gering.

### **Prävalenz von BotNT in Kulturüberständen von Bodenproben**

In den 35 untersuchten Bodenproben wurde in 25,7 Prozent der BotNT Typ A, in 5,7 Prozent Typ B, in 5,7 Prozent Typ C und in 14,3 Prozent Typ D nachgewiesen. Das spricht für eine Verbreitung, wie sie auch in der internationalen Literatur beschrieben ist. Insbesondere dort, wo Fäkalien zur Düngung verwendet werden, ist der Eintrag in den Boden gegeben. Sofern nicht Grünland mit Gülle, Gärresten, Mist oder ähnlichem Material gedüngt wird, spielen die im Boden enthaltenen *C. botulinum*-Erreger bzw. Sporen für den Eintrag in die Futtermittel und somit in den Tierkörper eine untergeordnete Rolle. In weiterführenden Untersuchungen sollten Futterflächen (Grünland) hinsichtlich der Konzentration von toxischen *C. botulinum* untersucht werden.

### **Darstellung der Kreisläufe toxischer *C. botulinum*-Isolate an einem ausgewählten sächsischen Betrieb der Rinderproduktion**

Für die Untersuchungen des Kreislaufes Tier – Mist/Gülle - Boden – Pflanze - Futtermittel/Silage – Tier wurde der sächsische Betrieb SA ausgewählt, bei dem es sich um einen Gemischtbetrieb mit Tier- und Pflanzenproduktion handelte. MCGARVEY et al. (2004) geben pro Tier und Tag eine anfallende Dungmenge von 35 kg an, die bei 1 000 Kühen pro Jahr eine Menge von ca. 12 000 t ausmachen. Im Prinzip werden die meisten Dungentsorgungssysteme in Tierproduktionsanlagen im Kreislauf gefahren. Dadurch kann es zu einer Konzentrierung von Pa-

thogenen kommen, die sowohl die Tiergesundheit als auch die menschliche Gesundheit über das Erntegut von behandelten Feldern beeinflussen können.

Nur wenige Informationen liegen über die Zusammensetzung der Bakterienpopulationen im Ökosystem Kot und über Strukturveränderungen während des Transits im Abwassersystem vor. Über die Sequenzierung von 1 500 Clonen aus Kot, Gülle und Güllelager konnten MCGARVEY et al. (2004) die Dominanz (70 – 80 Prozent) von grampositiven Bakterien (Clostridien, Bazillen, Ruminokokken) feststellen. Interessanterweise weist die Zusammensetzung der bakteriellen Gemeinschaften in den Abwasserlagunen von Rindern, Broilern und Schweinen große Ähnlichkeiten auf. Mehr als 2/3 der Bakterienpopulationen bestehen aus *Firmicutes* (grampositive Bakterien), ca. 1/4 *Actinobacteria* und ca. 1/10 *Proteobacteria*. (LEUNG, 2001). Die erarbeiteten Ergebnisse können in gewissem Sinne als exemplarisch für den Kreislauf von Abprodukten aus Tierproduktionsanlagen betrachtet werden.

Im Beobachtungszeitraum von zwei Jahren gelang es, aus den verschiedensten Habitaten Kot von Milchkühen und Jungrindern, Gülle und Mist unterschiedlicher Herkunft, verschiedenen Böden/Ackerflächen - vor und nach Düngung sowie sieben verschiedenen im Betrieb eingesetzten Futtermitteln als auch TMR auf der Basis biochemischer Kriterien insgesamt 108 *C. botulinum*- bzw. *C. sporogenes*-verdächtige Isolate aus BotNT-positiven Probenanreicherungen zu isolieren. Die weitere Charakterisierung der Isolate auf der Grundlage von Stoffwechselprodukten (Gaschromatographie) als auch von stammspezifischen Massenspektren (MALDI-TOF-Massenspektrometrie) ermöglichte eine genauere Zuordnung von Isolaten zu *C. botulinum* verschiedener Toxovare, zu *C. sporogenes* und zu anderen *Clostridium* spp.. Im Vergleich zur Gaschromatographie war mittels MALDI-TOF eine bessere Trennung der *C. botulinum* - Toxovare möglich. So konnte *C. botulinum* Typ A sicher von *C. botulinum* Typ B getrennt werden. Nur mit der letzteren Methodik gelang es auch *C. botulinum* C alpha zu identifizieren.

Auffällig ist auch, dass auf der Basis der Gaschromatographie mehr Isolate *C. botulinum* zugeordnet werden konnten als mittels MALDI-TOF. Demgegenüber war der Anteil der als *C. sporogenes* identifizierten Isolate, insbesondere aus Boden- und Kotproben, deutlich höher nach MALDI-TOF-Charakterisierung im Vergleich zur Gaschromatographie. Diese Befunde bestätigen die bekannte Tatsache der Schwierigkeit, Stämme sicher *C. botulinum* zuzuordnen zu können und erst der Nachweis des Toxinbildungsvermögens bzw. der Nachweis von BotNT in Kulturanreicherungen bestätigt die exakte Identifizierung.

Unabhängig von der Methode konnte *C. botulinum* der Typen A und/oder B und nach MALDI-TOF auch *C. botulinum* C allen Habitaten zugeordnet werden, was insgesamt gesehen für eine Belastung im Sinne des Kreislaufes spricht. Ebenso konnte auch nach MALDI-TOF die Verbreitung der atoxischen Spezies *C. sporogenes* gezeigt werden. Im Speziellen muss jedoch darauf hingewiesen werden, dass insbesondere bei den verschiedenen gedüngten Ackerflächen, kein



kontinuierlicher Nachweis von *C. botulinum* im Beobachtungszeitraum vorlag. Eine mögliche Degradierung von Clostridien und/oder deren Sporen durch im Boden befindlichen Antagonisten wie Streptomyceten (BACCELLA et al. 2002), Bodenprotozoen (KREUZER, 2004), Bacteriophagen und Bacteriocine (ELLISON et al., 1970) ist in diesem Zusammenhang nicht auszuschließen.

Die Wahrscheinlichkeit einer Degradierung von potenziell pathogenen Bakterien durch Bodenmikroorganismen ist in ungestörten Ökosystemen groß. Anders sieht es auf Grünfütterflächen aus, an deren Grasaufwuchs Mikroorganismen aus Gülle oder Mist adhären können. Auffällig war in dem Betrieb SA auch die starke Belastung von gepacktem Mist mit *C. botulinum*, insbesondere vom Typ C, was sich dann auch wieder bei den Bodenisolaten zeigte. *C. botulinum* kann aber auch durch Kot von Wildtieren, z. B. Wildschweinen und anderen auf Futterflächen und Ackerflächen verbracht werden. Bei den Futtermitteln wurde *C. botulinum* aus GPS Gras und frischer Maissilage isoliert, andere Futtermittel enthielten *C. sporogenes*.

Die eindeutige Zuordnung eines Isolates zu *C. botulinum* verlangt den Nachweis des Toxinbildungsvermögens des Erregers. Die Ergebnisse einer Re-Toxinprüfung aller nach MALDI-TOF als *C. botulinum* charakterisierten Isolate zeigte jedoch keine bzw. geringgradige BotNT Signale. Ob dieses Ergebnis Folge der Isolierung (mehrmalige Passage bei der Reinzüchtung) oder auf ungeeignete Kultivierungsbedingungen zurückzuführen ist, bleibt offen. Demgegenüber ist es beim direkten Ausstrich von hochgradig BotNT-positiven Anreicherungen auf Blutagar im Rahmen der Anreicherungsversuche mit *C. botulinum* B Sporen als auch aus Anreicherungen von Gärrestmischungen gelungen, toxische Feldisolate bzw. Mischungen von toxinbildenden Bakterien zu gewinnen, die folglich bei der Re-Toxinprüfung deutlich positive BotNT Signale zeigten.

### **Zusammenfassung und Schlussfolgerungen**

Mit den beschriebenen Testverfahren ist es möglich, *C. botulinum* und dessen BotNT in unterschiedlichsten Untersuchungsmaterialien nachzuweisen. Das Nachweisverfahren ist unter Beachtung der praktischen Relevanz ausreichend sensitiv und spezifisch. Es erfasst Toxinsignale in einer Probe ( $\geq 1\ 000$  Sporen/Keime), die auch für ein Erkrankungsgeschehen relevant sein dürften.

Mit den beschriebenen Nachweisverfahren wurde außerdem ein tierschutzgerechtes und ökonomisch vertretbares Analytiksystem etabliert. Mittels ELISA und unter Anwendung typspezifischen Antigens können Hinweise zur stattgefundenen Auseinandersetzung der Tiere mit *C. botulinum* ausreichend spezifisch und sensitiv nachgewiesen werden.

Die immunologischen Untersuchungsergebnisse belegen eindeutig, dass *C. botulinum* mit seinen Toxinen in der Umwelt von Rindern vorkommen und in den Tieren auch eine Antikörperantwort induzieren kann. Nach den eigenen Untersuchungen ist der Anteil von Reagenten in

den Milchviehbeständen Sachsens sehr unterschiedlich und wird durch den Eintrag in den Tierbestand (Futter, Fütterungsregime, andere Ursachen) bestimmt.

Die erarbeiteten Ergebnisse zur Verbreitung von *C. botulinum* in sächsischen Tierbeständen belegen eindeutig, dass diese *Clostridium sp.* in unseren Rinderbeständen vorkommt.

Die Charakterisierung von verdächtigen Isolaten ist schwierig, war aber unter Einbeziehung gaschromatographischer Methoden und insbesondere per MALDI-TOF möglich. Als *C. botulinum* charakterisierte Isolate wurden am häufigsten im Kot und im Boden gefunden.

## Literatur

- BACCELLA, S., BOTTA, A. L., MANFRONI, S., et al., 2002: Use of Actinobacteria in Composting of sheep bitter. - In: Microbiology of composting. Springer-Verlag Berlin Heidelberg, S. 505-516.
- DAHLENBORG, M., BORCH, E., RADSTROM, P., 2003: Prevalence of Clostridium botulinum types B, E and F in faecal samples from Swedish cattle. Int. J. Food Microbiol. 82, 105-110.
- DRESSLER, P., 2003: Antibody-induced failure of botulinum toxin therapy. Nervenarzt 74, 1098-1104.
- ELLISON, J. S. und KAUTTER, J.A., 1970: Purification and some properties of two botocins. J. Bacteriol. 104, 19-26.
- GREGORY, A. R., ELLIS, T. M., JUBB, T. F., et al. 1996: Use of enzyme-linked immunoassays for antibody to types C and D botulinum toxins for investigations of botulism in cattle. Aust. Vet. J. 73: 55-61.
- GROßE-HERRENTHEY, A., 2004: Untersuchungen zu den Einflussfaktoren einer effizienten Bekämpfungsstrategie für Rinderbotulismus in Brasilien. Leipzig, Univ., Diss.
- HANNA, P. A., JANKOVIC, J., VINCENT, A., 1999: Comparison of mouse bioassay and immunoprecipitation assay for botulinum toxin antibodies. J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry 66: 612-616.
- KREUZER, K. 2004: Einfluss von Bodenamöben (*Acanthamoeba castellanii* Neff) auf das Wachstum von Pflanzen und die bakterielle Rhizosphärengemeinschaft. Darmstadt, Univ., . Diss.
- LEUNG, K. E. und TOPP, E., 2001: Bacterial community dynamics in liquid swine manure during storage: molecular analysis using DGGE/PCR of 16S rDNA. FEMS Microbiol. Ecol. 38,169–177
- MCGARVEY, E. A., WILLIAM, G. M., SANCHEZ, S. und STANKER, L., 2004: Identification of bacterial populations in dairy wastewaters by use of 16S rRNA gene sequences and other genetic markers. Appl. Environment Microbiol. 70, 4267–4275
- MOELLER, R. B., PUSCHNER, B., WALKER, R. L., et al. 2003: Determination of the median toxic dose of type C botulinum toxin in lactating dairy cows. J Vet. Diagn. Invest. 15, 523-526
- OHISHI, I., SAKAGUCHI, G., RIEMANN, H., BEHYMER, D. und HURVELL, B., 1975: Antibodies to Clostridium botulinum toxins in free-living birds and mammals. J. Wildl. Dis. 15, 3-9

- SESARDIC, D., JONES, R. G., LEUNG, T., ALSOP, T. und TIERNEY, R., 2004: Detection of antibodies against botulinum toxins. *Mov. Disord.* 19: 85-91
- ZHAO, L., MONTVILLE, T. J. und SCHAFFNER, T. W., 2002: Time-to-detection, percent-growth-positive and maximum growth rate models for *Clostridium botulinum* 56A at multiple temperatures. *Internat. J. Food Microbiol.* 77, 187– 197

## Mykotoxinscreening in Blut, Galle und Milch bei gesunden und kranken Kühen

### 1 Literatur

Obwohl Wiederkäuer prinzipiell in der Lage sind, eine Reihe von Mykotoxinen im Pansen soweit zu metabolisieren bzw. zu detoxifizieren, dass von ihnen keine oder nur geringe toxische Effekte ausgehen, so können von ihnen dennoch Gesundheitsprobleme verursacht werden, wenn beispielsweise ein gestörtes Pansenmilieu oder andere gesundheitlich relevante Probleme gleichzeitig auftreten. Insofern sind die von der EU empfohlenen Richtwerte für kritische Konzentrationen von Deoxynivalenol (DON) und Zearalenon (ZON) in der Gesamtration von Wiederkäuern nur bei ansonsten optimalen Haltungs- und Fütterungsbedingungen zutreffend. Es wird empfohlen, bei Rindern (außer Kälbern) 5 mg DON und 0,5 mg ZON je kg der täglichen Ration bei einem Referenz-trockensubstanzgehalt von 88 Prozent nicht zu überschreiten (EU, 2006).

Mykotoxine sind toxische Sekundärstoffwechselprodukte von Schimmelpilzen, deren chemische Strukturen sehr unterschiedlich sind (SCHUH 1989, BISCHOFF 1998). Die bekanntesten Mykotoxine wurden nach den Schimmelpilzen benannt. Bisher wurden ca. 400 Mykotoxine nachgewiesen, die bei Säugetieren und Vögeln dosisabhängig zu Vergiftungssymptomen führen können (BAUER und GAREIS 1987; FINK-GREMMEIS 1999; GAREIS und WOLFF 2000; HOCHSTEINER et al. 2000; ATROSHI et al. 2002; VÖLKL et al. 2004). Hinsichtlich der Prävention der Mykotoxinbildung ist zu berücksichtigen, dass die *Fusarium*-Spezies Pflanzen in der Phase des Wachstums befallen und so genannte „Feldmykotoxine“, d.h. vor der Ernte, bilden. Demgegenüber entwickeln sich die Arten von *Aspergillus* und *Penicillium* im Allgemeinen erst nach der Ernte und werden als „Lagermykotoxine“ bezeichnet (D’MELLO et al. 1999).

**Tabelle 1: DON- und ZON-Gehalte in Futtermittelproben (mg/kg; n. OLDENBURG et al. 2000)**

	Jahr	ZON	DON	Autor(en)
Silo-Mais	1995	0,005-2,97	0,12 - 3,51	OLDENBURG et al. 1996
Silo-Mais	1996	0,006-0,82	0,73-12,93	OLDENBURG 1997
Silo-Mais			0,26 - 2,55	LEW et al. 1997
Silo-Mais	2000	5,91-12,00	1,10-1,44	OLDENBURG U. HÖPPNER 2003
Silo-Mais	1998-01	- 3,44	- 4,64	STEINHÖFEL 2002
Getreide-Mais	1996/97	-0,09	- 0,91	USLEBER et al. 1998
Silo-Mais		0,10-4,00	-	DROCHNER et al. 1984

**Zearalenon (ZON)** ist eines der wichtigsten Mykotoxine in Europa. Es gehört zu den am weitesten verbreiteten Fusarientoxinen und kann auf jeder Getreideart in Europa, Afrika, Asien und Nordamerika nachgewiesen werden. Es tritt jedoch insbesondere in kühl-gemäßigten Regionen auf. Seinen Namen erhielt das Toxin von der lateinischen Bezeichnung des Mais (*Zea mays*), weil es weltweit hauptsächlich auf diesem gebildet wird (URRY et al. 1966; REIß 1998).

In Futtermittelproben bewegen sich laut Literaturangaben die ZON-Gehalte im Bereich von 0,005 bis 12 mg/kg und die DON-Gehalte zwischen 0,12 bis 12,9 mg/kg (Tab. 1). Zearalenon und seine Derivate haben eine Östrogenwirkung durch die Bindungsfähigkeit an Östrogenrezeptoren. ZON und seine Metabolite ( $\alpha$ -Zearalenol [ZOL] und  $\beta$ -ZOL) binden an zytoplasmatische Östrogenrezeptoren des Uterus und des Ovidukts. Der ZON-Rezeptor-Komplex gelangt anschließend in den Zellkern und setzt dort die entsprechende Proteinbiosynthese in Gang, wodurch das sexualzyklische Geschehen der Tiere beeinflusst werden kann (KIANG et al. 1978; KATZENELLENBOGEN et al. 1979; ROGER und COULOMBE 1993; OETTEL 1996; OLDENBURG et al. 2000; BENNET und KLICH 2003; MITTERBAUER et al. 2005). ZON- und ZOL-Konzentrationen in verschiedenen Körperflüssigkeiten bei Rindern sind in Tab. 2 zusammengestellt.

**Tabelle 2: ZON- und ZOL-Gehalte in Galle, Serum und Milch bei Rindern (n. SEELING 2005)**

Dosis		Konzentration	Autor(en)
10 mg ZON einmalig	G a l l e	t-max.nach 96 h: ZAL 3 $\mu$ g/l	KENNEDY et al. 1998
10 mg $\alpha$ -ZOL einmalig		t-max. 24 h: $\alpha$ -ZOL 150 $\mu$ g/l	
10 mg $\beta$ -ZOL einmalig		nach 240 h: ZAL 20 $\mu$ g/l	
0,1 mg ZON/kg bei Bullen		t-max. 12-24 h: $\alpha$ -ZOL 200 $\mu$ g/l	
		nach 24 h: $\alpha$ -ZOL 60 $\mu$ g/l	
545 mg ZON/21 d	S e r u m	ZON:7-24-; $\alpha$ -ZOL:2-11-, $\beta$ -ZOL: 23-53 $\mu$ g/kg	DÄNICKE et al. 2002
1,8 g ZON einmalig		ZAL <100, $\alpha$ ZAL < 50, $\beta$ -ZAL <200 $\mu$ g/kg	
6,0 g ZON einmalig			
0,39 -1,93 mg/kg Diät über 49 d	M	t-max 62 h post appl. : 3 $\mu$ g/l	PRELUSKY et al. 1990
1,8 g/Kuh einmalig	i	t-max 12 h post appl.: 9 $\mu$ g/l	
0,02 - 0,05 mg/kg Diät über 63 d	l	t-max 12 h post appl.: 13 $\mu$ g/l	
	c		
	h	ZON < 4 $\mu$ g/l	SHREEVE et al. 1978
		ZON und $\beta$ -ZOL < 1 $\mu$ g/l	HAGLER et al. 1980
		ZON und $\beta$ -ZOL < 0,5 $\mu$ g/l	GOLL et al. 1995

ZON wurde je nach Belastung und Zeit nach der Kontrolle in Mengen bis maximal 200  $\mu$ g/l in Galle (überwiegend 0-20), bis 13  $\mu$ g/l Blutserum sowie bis 4  $\mu$ g/l Milch nachgewiesen (Tab. 2).

**Deoxynivalenol (DON)**, auch Vomitoxin genannt, ist ein Fusarientoxin und wurde erstmals von MOROOKA et al. (1972) in Japan isoliert. Es wird als sekundärer Stoffwechselmetabolit vorwiegend von *Fusarium graminearum* und *Fusarium culmorm* gebildet und kann die Proteinsynthese im Or-

ganismus hemmen. Als Vertreter der Trichothecene ist DON durch seine allgemeine Zytotoxizität und Immunsuppression gekennzeichnet (ROTTER et al. 1996).

DON ist nahezu weltweit in Getreide nachweisbar (ROTTER et al. 1996; scf 1999; FUCHS et al. 2002; BENNET und KLICH 2003; VÖLKL et al. 2004). Es ist häufig Ursache von Mykotoxikosen bei landwirtschaftlichen Nutztieren, hauptsächlich bei Monogastriern (Schwein). Die Aufnahme von DON ab 0,05 - 2 mg/kg Futter führt bei Schweinen zu Abmagerung, Erbrechen und Anorexie.

Die Wirkungen beim Wiederkäuer auf die Leistung sind relativ gering (Abb. 1a + 1b). Ein Großteil des DON wird bereits im Pansen zu de-epoxy-DON, auch DOM-1 genannt, umgewandelt. DON ist in Serum und Milch in Spuren nachweisbar, wobei der als weitgehend ungiftig anzusehende Metabolit de-epoxy-DON deutlich überwiegt (Tab. 3, Abb. 2).

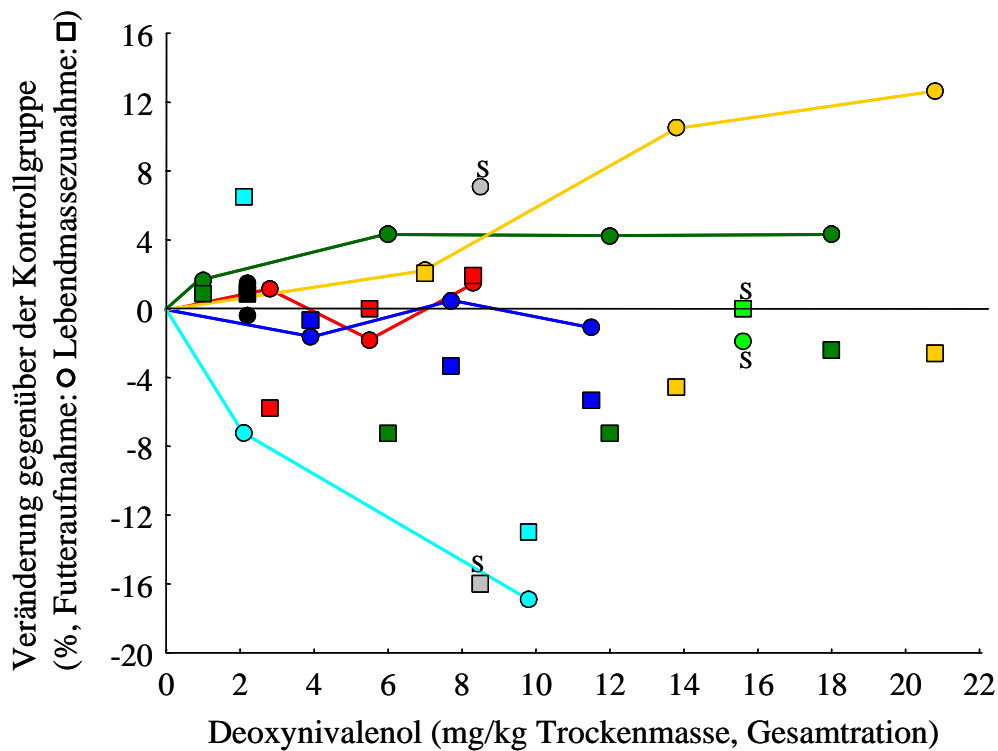


Abbildung 1a: Einfluss von Deoxynivalenol auf die Leistung von Mastrindern und Schafen (S) (Literaturlauswertung)

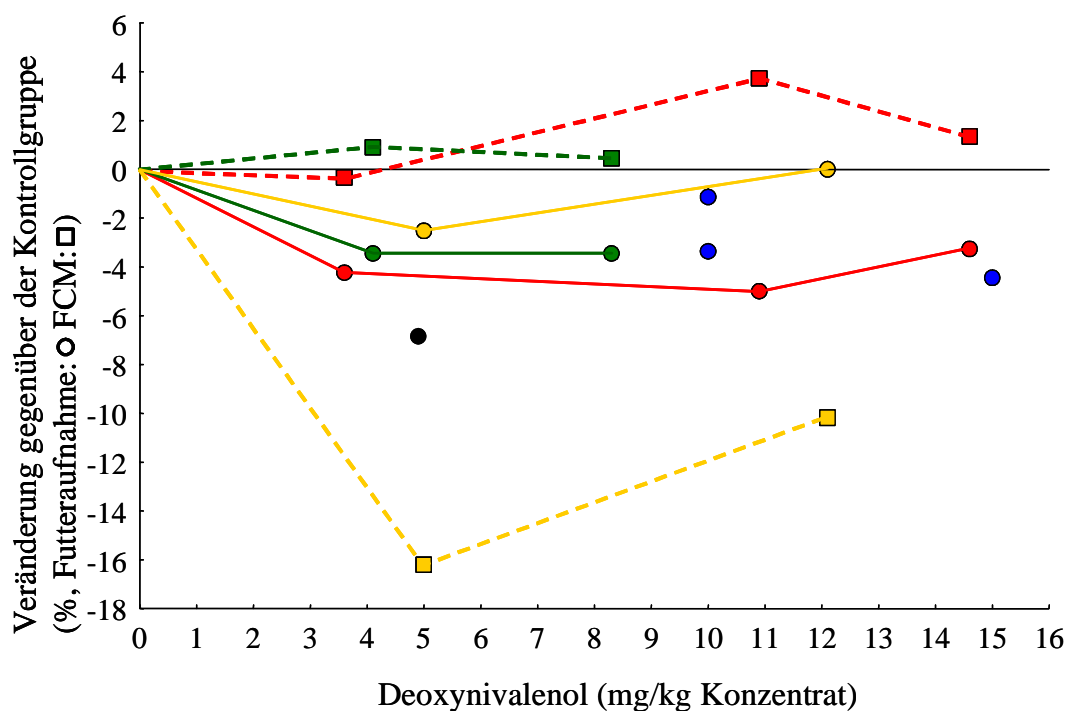


Abbildung 1b: Einfluss von Deoxynivalenol auf die Leistung von Milchkühen (Literaturauswertung)

Tabelle 3: DON- und de-epoxy-DON-Gehalte in Serum und Milch bei Milchrindern (nach SEELING 2005)

Dosis	Serum	Milch	Autor(en)
4 mg/kg KM: 24 h post appl.	<2 ng/ml		PRELUSKY et al. 1984
50 mg per os		< 10 µg/l	PRELUSKY et al. 1984
66 mg/kg Diet		2 - 26 µg de-epoxy-DON/l	COTE et al. 1986
4,5 mg/d	35 µg/l (8,1-58,4 µg/l)*		SABATER-VILAR 2003
0, 6, 12 mg/ kg Konzentrat		< 1 DON und de-epoxy-DON	CHARMLEY et al. 1993

\*Werte wurden mittels ELISA bestimmt

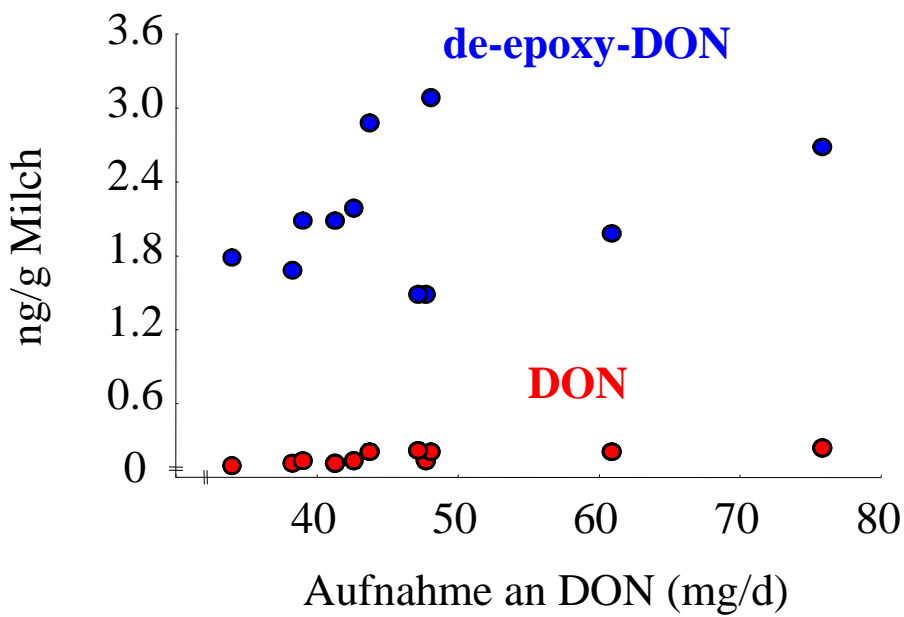
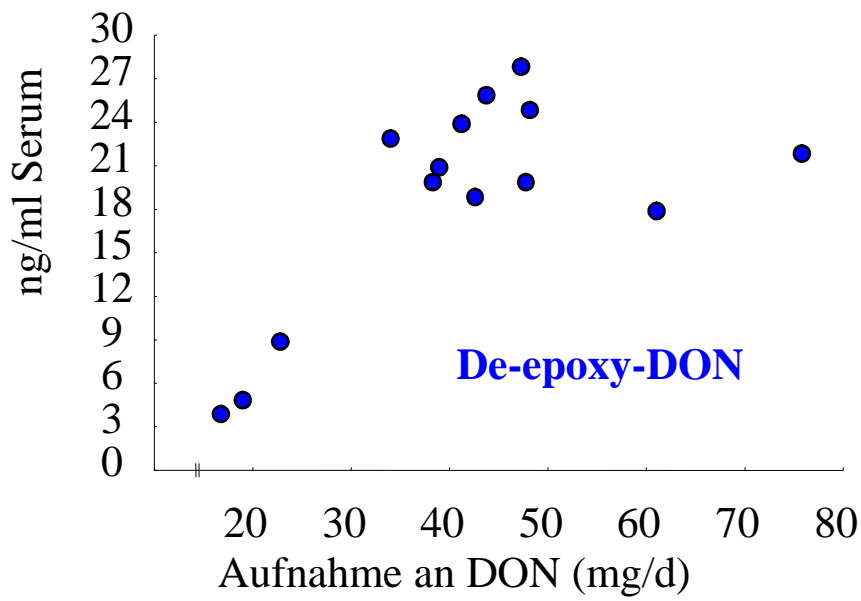


Abbildung 2: Einfluss steigender DON-Aufnahmen durch Milchkühe auf die DON und de-epoxy-DON-Konzentrationen im Serum und in der Milch (SEELING et al. 2006)



**Tabelle 4: Klinische Mykotoxineffekte bei Milchkühen**

Autor(en)	MK	Dosis	FA	ML	weitere Befunde
MIROCHA et al. 1968, 1974	ZON	4,5 mg/ kg Heu 1 mg/kg	↓		Anämie, Lethargie, ↓ BI
VANYI und SZAILER 1974		5 bis 75 mg/kg	↓	↓	Vulvaschwellung
SCHUH 1981, 1989		1,25 mg/kg			Ovarzysten, ↑Uterus- konsistenz
WEAVER et al. 1986a		500 mg/d 2 Ovarzyklen			Ø Progesteron Ø Genitalalteration
DROCHNER 1990		0,1 mg/kg Futter			Verhaltensänderung
DÄNICKE et al. 2002	DON ZON	8,05 mg/ kg 0,26 mg/ kg Wei- zen 35 d			↑ NH <sub>3</sub> im PS, ↓ Proteinfluss
SEELING et al. 2005	DON ZON	5,2 mg/kg 60 µg g/kg Konzentrat			Ø VFA, ↑ Proteinabbau im Duode- num

MK = Mykotoxin; FA = Futteraufnahme; ML = Milchleistung; ↑ = vergrößert, - erhöht; ↓ = verkleinert, - reduziert; Ø = unverändert

Literaturangaben über ZON- sowie DON-Schadwirkungen bei Rindern sind relativ gering und z. T. wenig konkret. COTE et al. 1986 (66 mg/kg), CHARMLEY et al. 1993 (6 und 12 mg/kg 70 d), INGALLS 1996 (14,6 mg/kg 21 d) sowie SABATER-VILAR 2003 (4,5 mg/kg tgl.) beschrieben keine klinischen ZON-Effekte. Weitere klinische Befunde nach ZON- und DON-Belastungen zeigt Tab. 4.

Aus der Literatur wird deutlich, dass relativ wenig systematische Daten über eine gesicherte Schadwirkung von ZON sowie DON bei Rindern existieren. Weitgehend offen ist, ob diese Mykotoxine an der Entstehung der häufigsten nichtinfektiösen Rinderkrankheiten beteiligt sind. Deshalb wurden folgende Fragestellungen verfolgt:

- Kommen Mykotoxine bei Kühen mit Labmagenverlagerung u. a. Erkrankungen vor?
- Spielen Mykotoxine eine Rolle bei der Entstehung der Labmagenverlagerung?
- Bestehen Beziehungen zwischen dem Vorkommen von Mykotoxinen und klinischen Störungen?
- Eignet sich Gallensaft zum ZON/ZOL-Nachweis?
- Gibt es sinnvolle Korrelationen zwischen Blutinhaltsstoffen und Mykotoxinbelastungen?

## 2 Tiere, Material und Methoden

### 2.1 Tiere

Für die Untersuchungen wurden 61 Kühe aus dem Patientengut der Medizinischen Tierklinik der Universität Leipzig genutzt. Die Tiere gehörten der Rasse Schwarzbuntes Milchrind (SB) an. Das Alter der Tiere lag zwischen zwei und acht Jahren. Die Patientenkühe stammten von 39 Milchviehbetrieben aus dem Einzugsgebiet der Klinik und wurden ausschließlich wegen einer Labmagenverlagerung (*Dislocatio abomasi*) mit unterschiedlichen Begleiterkrankungen (Endometritis, Mastitis, Enteritis, Peritonitis, Laminitis u. a.) eingewiesen. Die gesunden Kontrollkühe (n = 13) stammten aus zwei Betrieben im Leipziger Umland. Die Tiere hatten einen BCS (body condition score (EDMONSON et al. 1989) von 1,5 bis 4,0. Für die Mykotoxinbestimmungen wurden von 20 Patienten- bzw. 13 Kontrollkühen Serum, Galle, Milch und Futter sowie von 41 Patientenkühen Serum und Galle entnommen (Tab. 5).

**Tabelle 5: Verteilung der Patienten- und Kontrollkühe auf die einzelnen untersuchten Substrate**

Tiere	Serum	Galle	Milch	Futter
n Patienten	61 (41+20)	61 (41+20)	20	20
Kontrolle	13	13	13	2

### 2.2 Methoden

#### 2.2.1 Klinische Untersuchung und Diagnosestellung

Die klinische Untersuchung der Kühe erfolgte nach dem in der Medizinischen Tierklinik der Universität Leipzig etablierten Untersuchungsgang (BAUMGARTNER 2002).

#### 2.2.2 Entnahme von Blut, Milch, Futter und Gallensaft

Zur Blutentnahme wurde die *Vena jugularis externa* genutzt. Die Blutzentrifugation erfolgte bei 3 800 g 10 min. Für die Milchproben wurden die Kühe ausgemolken und 1/2 l Milch je Kuh eingefroren. Das Futter aus den Herkunftsbetrieben (2 kg Maissilage) wurde tiefgefroren.

Die Entnahme von Gallensaft erfolgte bei den Patienten durch Punktion der Gallenblase während der „Labmagenoperation“. Bei den gesunden Kühen erfolgte die Entnahme durch transkutane Punktion der Gallenblasen unter sonografischer Kontrolle 5 cm dorsal oder ventral der Buggelenkslinie im 9. bis 11. Interkostalraum. Der gewonnene Gallensaft wurde bis zur Analyse ebenfalls tiefgefroren. Die transabdominale Gewinnung von Gallenflüssigkeit durch Punktion war bei kranken Kühen mit Gallenstau problemlos möglich, bei gesunden Kühen hingegen nur schwer realisierbar.

#### 2.2.3 Klinisch-chemische Analysen

Die klinisch-chemischen Analysen wurden mittels Hitachi 912 Automatic Analyser, Boehringer, Mannheim, durchgeführt. Das Blutbild wurde mit dem Hämatologieautomat Technicon H1, Bayer, Leverkusen, analysiert. Der Säure-Basen-Haushalt wurde mittels Analysenautomaten ABL 555 Radiometer, Copenhagen, ermittelt.

Die Mykotoxine Deoxynivalenol (VALENTA und GOLL 1995), Zearalenon sowie deren Derivate (ÜBERSCHÄR 1999, DÄNICKE et al. 2001) wurden mittels HPLC in der Bundesforschungsanstalt für Landwirtschaft, Braunschweig (FAL) analysiert.

### 3 Ergebnisse

Mykotoxine konnten regelmäßig in den Futterproben aus den Herkunftsbetrieben der Patienten (Tab. 6), im Serum selten und in der Galle mehrheitlich um die Nachweisgrenze nachgewiesen werden (Tab. 7, 8). Die Mykotoxinkonzentrationen in den Milchproben waren generell niedriger als die jeweiligen Nachweisgrenzen (Tab. 7).

**Tabelle 6: Mykotoxinkonzentrationen in den Futterproben**

	DON (mg/kg)	ZON (mg/kg)
obB	<1,000	<0,050
Median	0,161	0,00635
1. Quartil	0,086	0,00488
2.Quartil	0,191	0,00785

**Tabelle 7: Mykotoxinnachweise in Galle, Serum und Milch**

Matrix	Patienten aus 39 Betrieben: n = 61	Kontrollen aus 2 Betrieben: n=13
Galle	20 x positiv um die Nachweisgrenze	0
Serum	5 x positiv um die Nachweisgrenze	0
Milch	0	0

Den zwei aus 39 Serumproben ermittelten DON-Nachweisen kommt praktisch keine Bedeutung zu (Tab. 8). Ähnliches trifft für die 16 von 41 positiven ZON-Nachweise in der Galle mit 9,9 ng/g zu (Tab. 8).

**Tabelle 8: Mykotoxinnachweis in Serum- und Gallenproben von 42 Kühen mit LMV**

Serum		Galle		
DON (µg/ml)	de-epoxy-DON (µg/mL)	de-epoxy-DON (µg/mL)	β-Zearalenol (ng/g)	Zearalenon (ng/g)
alle negativ	39 negativ	alle negativ	alle negativ	25 x negativ
	2 x positiv: (0,003-0,004)			16 x positiv: Median 9,85 1. Q 8,10 3. Q 16,33

Die differenzierte Untersuchung der Mykotoxine bei weiteren 20 Kühen mit Labmagenverlagerung ergab im Serum 1 x DON (1,6 Prozent) und 4 x de-epoxy-DON (6,6 Prozent), in der Galle 23 x ZON

(37,7 Prozent) und 4 x  $\alpha$ - sowie  $\beta$ -ZOL (6,6 Prozent) und schließlich in der Milch 1 x de-epoxy-DON (1,6 Prozent) (Tab. 9).

**Tabelle 9: Mykotoxinnachweise in Serum, Galle und Milch bei 20 Kühen mit Labmagenverlagerung aus 20 Betrieben Mitteldeutschlands**

Serum		Galle					Milch				
DON mg/l	de-epoxy-DON mg/l	$\beta$ -Zol $\mu$ g/kg	$\alpha$ -Zol $\mu$ g/kg	ZON $\mu$ g/kg	DON mg/l	de-epoxy-DON mg/l	$\beta$ -Zol $\mu$ g/kg	$\alpha$ -Zol $\mu$ g/kg	ZON $\mu$ g/kg	DON mg/l	de-epoxy-DON mg/l
19 x neg	18 x neg	19 x neg	17 x neg	13 x neg	20 x neg	19 x neg	20 x neg	20 x neg	20 x neg	20 x neg	19 x neg
<b>1 x positiv</b> (0,002)	2 x positiv (0,002 0,009)	1 x positiv (37,6)	3 x positiv 59,9 5,0 7,8	<b>7 x positiv</b> <b>M:20,9</b> <b>1Q :13,6</b> <b>3Q:39,7</b>		1 x positiv: 0,009					1 x positiv: 0,005

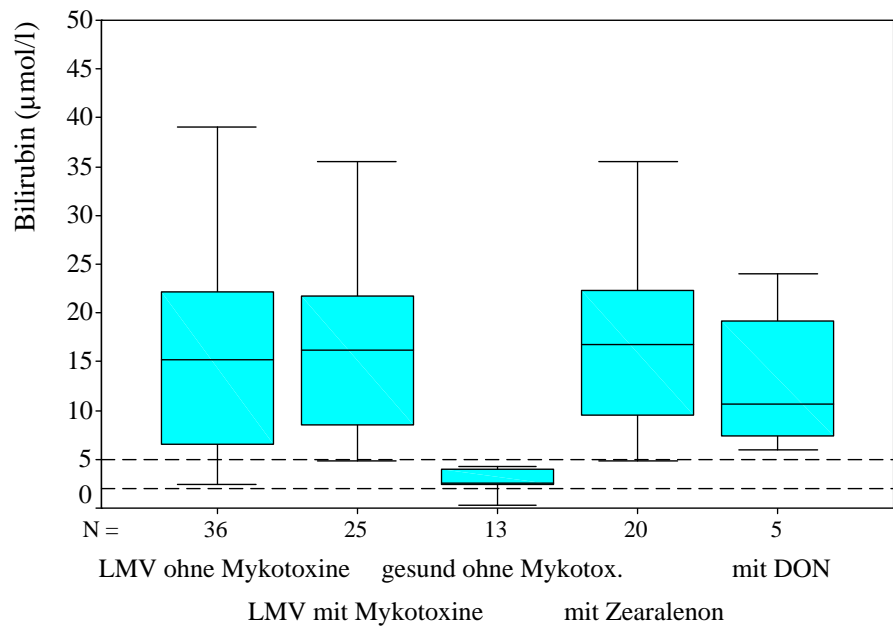
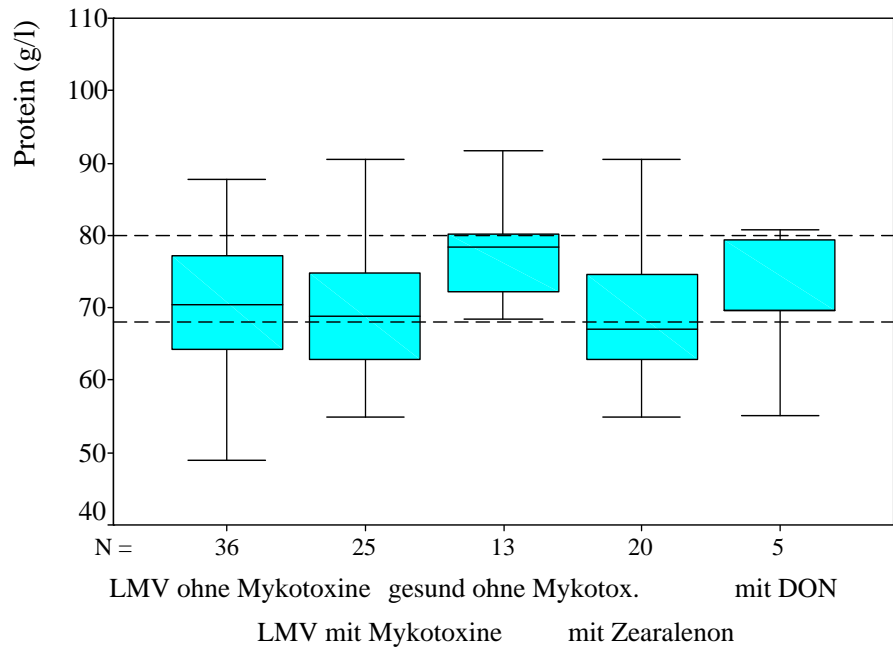
Im Blut wurde ein breites Untersuchungsspektrum analysiert (Tab. 10), von denen die meisten Parameter keine oder gleichartige Veränderungen zwischen Mykotoxin-positiven und -negativen Proben ergaben. Die bei positiven DON- sowie ZON-Nachweisen ermittelten AST- sowie GLDH-Reaktionen sind geringfügig bzw. haben mit rechtsseitigen Labmagenverlagerungen schwere Krankheitszustände als Hintergrund.

Die in Abb. 3a + 3b dargestellten Proteinkonzentrationen bewegen sich im Referenzbereich. Die Bilirubin-Veränderungen entsprechen denen bei Kühen mit Labmagenverlagerung. Letzteres trifft auch für die AST- und GLDH-Aktivitäten zu.

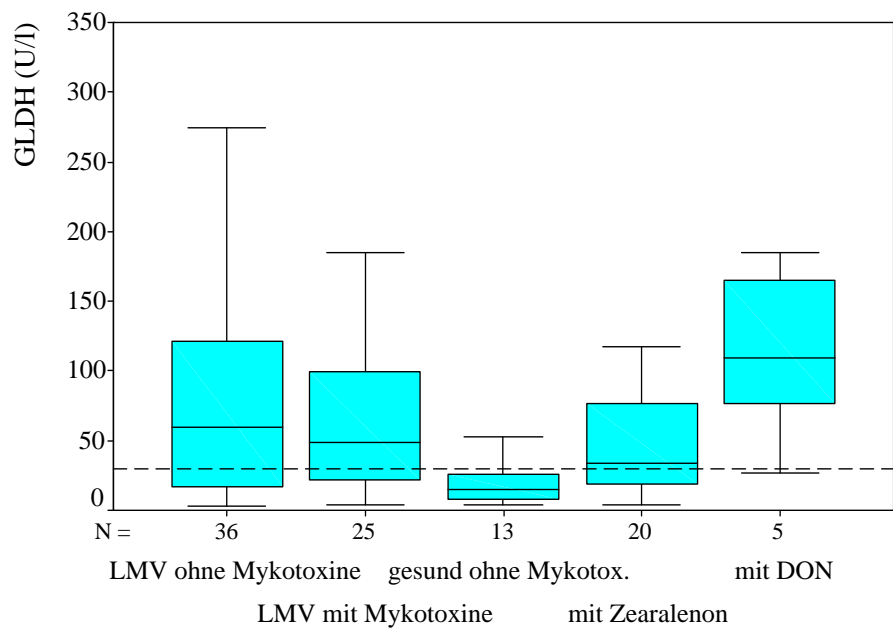
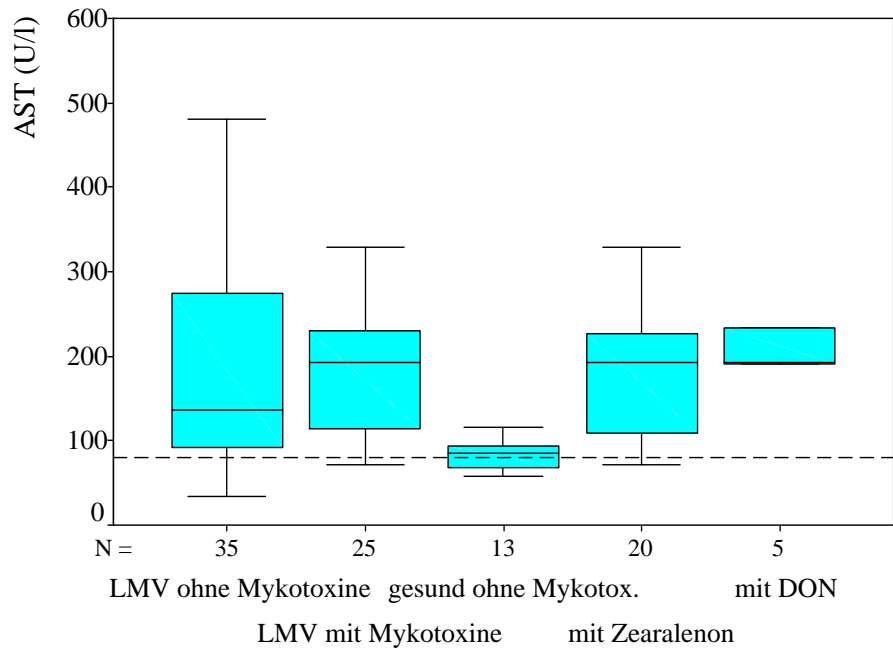
**Tabelle 10: Zusammenhänge zwischen Mykotoxinnachweis und Ergebnissen der klinisch-chemischen und hämatologischen Untersuchungen**

keine Veränderungen bei Patienten ohne und mit Mykotoxinen	gleiche Veränderungen bei Patienten ohne und mit Mykotoxinen	nur bei positivem DON und ZON verändert	nur bei positivem DON verändert	nur bei positivem ZON verändert
Protein, Albumin Harnstoff, Kreatinin, TEAC, Leukozyten Erythrozyten, Hämoglobin, Hämatokrit, MCH, MCV, MCHC, Thrombozyten, Basophile, Jugendliche	Bilirubin, Glucose, FFS, Cholesterol, BHB, AST, CK, GLDH GGT, Mg, Ca, Na, K, Cl, FFS, pH-Wert, BE, , pCO <sub>2</sub> , SBC, Eosinophile, Stabkernige, Segmentkernig, Lymphozyten, Monozyten	AST GLDH	GLDH	AST

Aus den hämatologischen sowie klinisch-chemischen Befunden lassen sich keine spezifischen Hinweise auf Mykotoxineinflüsse ableiten.



**Abbildung 3a: Protein- und Bilirubin-Konzentrationen bei gesunden Kühen, Kühen mit und ohne Labmagenverlagerung sowie mit positivem ZON- und DON-Nachweis**



**Abbildung 3b: AST- und GLDH-Aktivitäten bei gesunden Kühen, Kühen mit und ohne Labmagenverlagerung sowie mit positivem ZON- und DON-Nachweis**

### Klinische Untersuchungsergebnisse

Die häufigsten bei den untersuchten Kühen festgestellten Symptome in Abhängigkeit vom Mykotoxinbefund zeigt Abb. 4a. Demnach sind zwischen Kühen mit positivem und negativem Mykotoxin nachweis keine Unterschiede feststellbar. Allein die Zahl der Pansenbewegungen differiert. Beim Krankheitsausgang ließen sich ebenfalls keine Unterschiede in Abhängigkeit vom Mykotoxinbefund ermitteln.

## Symptome (%) bei Kühen mit positivem und negativem Mykotoxinnachweis

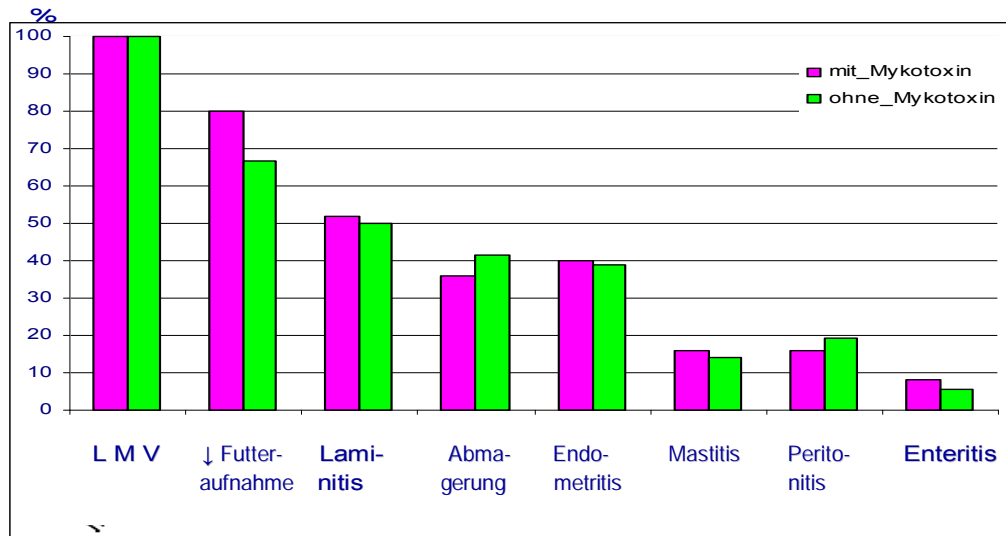


Abbildung 4a: Am häufigsten bei untersuchten Kühen festgestellte Symptome in Abhängigkeit vom Mykotoxinbefund



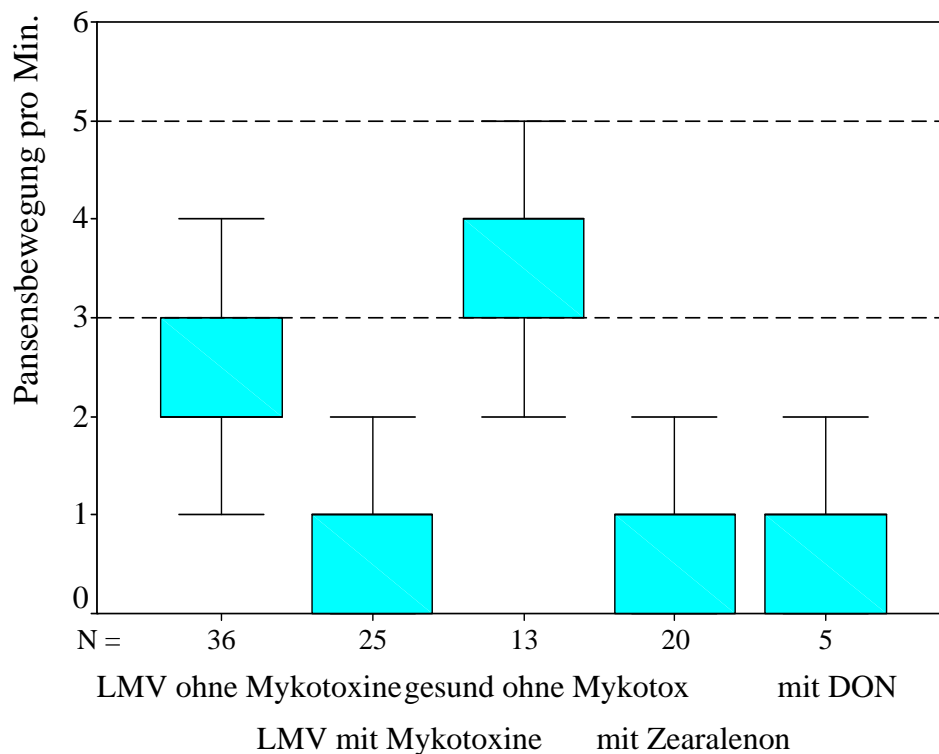


Abbildung 4b: Klinische Ergebnisse bei gesunden Kühen, Kühen mit und ohne Labmagenerverlagerung und positivem ZON- bzw. DON-Nachweisen

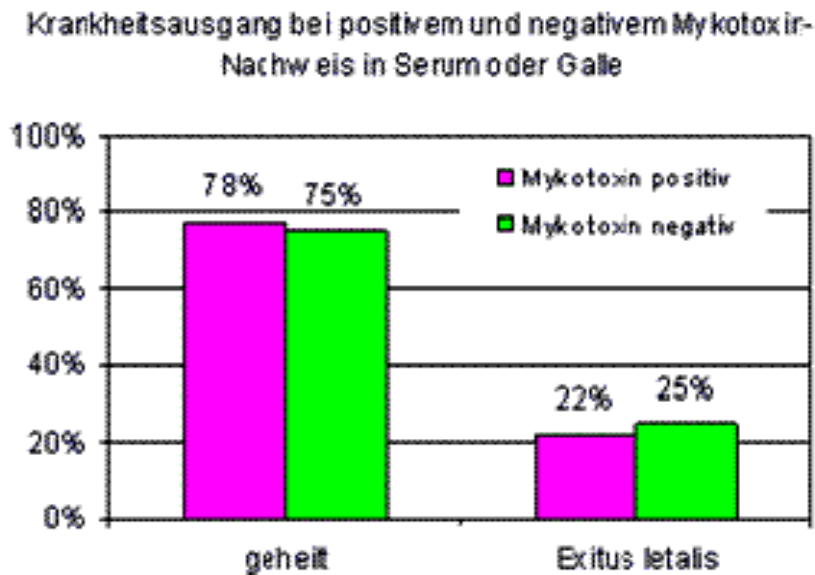


Abbildung 4c: Krankheitsausgang nach Mykotoxinbefund

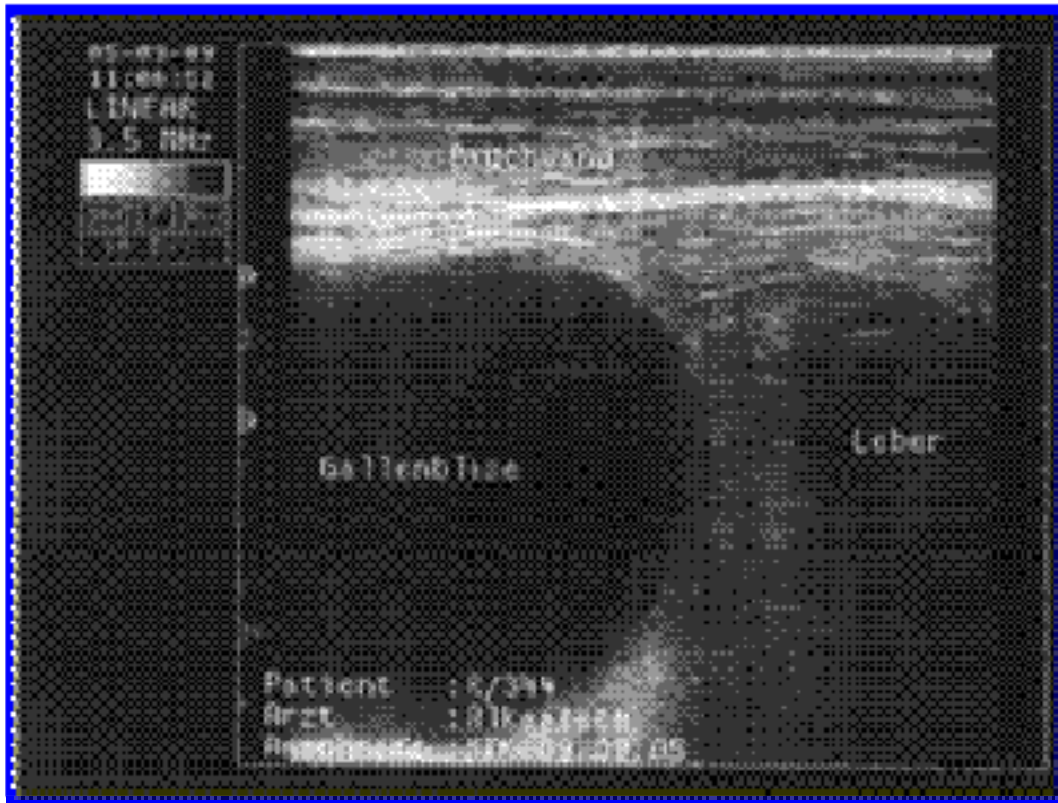
#### 4 Diskussion

Ziel dieser Arbeit war es, an kranken und gesunden Kühen je eine Probe von Futter, Blut, Milch und Gallensaft auf die Rückstände von DON, ZON und deren Metabolite sowie deren Auswirkung auf die Tiergesundheit zu überprüfen.

Die Gewinnung von Gallensaft am lebenden Rind ist intraoperativ kein Problem, z.B. bei Labmagenreposition. Durch Punktion von außen lässt sich ebenfalls Gallensaft gewinnen. Das geht am besten, wenn die Gallenblase gestaut ist. Bei gesunden Kühen ist das selten der Fall und deshalb ist die Punktion der Gallenblase mitunter etwas problematisch, bei kranken Kühen hingegen die Regel und somit auch diagnostisch gut nutzbar (Abb. 5a + 5b).



**Abbildung 5a: Gewinnung von Gallensaft - Ortung mittels Ultraschall, Gallenblase im 10. Interkostalraum in Höhe des Buggelenkes**



**Abbildung 5b: Gewinnung von Gallensaft - Gallenblase im Ultraschallbild**

Von den Patienten mit negativem Mykotoxinnachweis wurden 28 (77,8 Prozent) geheilt. Acht mussten euthanasiert werden. Bei denen mit positivem Mykotoxinnachweis wurden 18 (75,4 Prozent) geheilt ohne klinische Reaktionen, sieben mussten eingeschläfert werden, darunter hauptsächlich Kühe mit schweren Begleiterkrankungen und starken hämatologischen oder klinisch-chemischen Abweichungen im Blut wie sie für Labmagenverlagerungen typisch sind (Abb. 3a + 3b).

**Mykotoxine konnten in dieser Untersuchung weder für spezifische Symptome noch für den Krankheitsausgang, d.h. Heilung oder Exitus letalis verantwortlich gemacht werden.** Sowohl bei den klinischen Symptomen wie auch beim klinischen Ausgang gab es keine Unterschiede zwischen Mykotoxin-belasteten und -unbelasteten Kühen, ausgenommen die Pansenkontraktionen, die bei Patienten mit positivem Mykotoxinnachweis im Futter reduziert waren (Abb. 4a – 4c).

Zum einen lagen die Mykotoxinkonzentrationen der verschiedenen Futterproben ohnehin unter den geltenden Referenzwerten bzw. in den physiologischen Proben an der Nachweisgrenze (Tab. 9) und zum anderen werden auch in der Literatur sehr widersprüchliche Ergebnisse mitgeteilt. Ähnliche Resultate ergaben z. B. die Arbeiten von CHARMLEY et al. (1993) sowie DÄNICKE et al. (2002, 2005). Auch TRENHOLM et al. (1985) stellten mit 66 mg **DON**/kg TS, COTE et al. (1986) mit 6,4 mg

DON/kg TS sowie DÄNICKE et al. (2005) mit 5,2 und 8,1 mg DON/100 kg Körpermasse keinen negativen Einfluss auf den Gesundheitszustand fest.

Auf der anderen Seite sollen höhere Mykotoxinkonzentrationen von mehr als 5 mg DON/kg Futter eine verminderte Futteraufnahme, langes, struppiges Haarkleid und schlechtere Fleischqualität von Masttieren verursachen (SCHUH 1996). ZEPAUER und SCHACHT (1985) beschrieben bei Rindern bei einer Dosis von 0,4 bis 0,6 mg DON/kg Körpermasse Abweichungen in Form eines Rückgangs der Milchleistung, von Aborten und blutiger Diarrhöe.

Bei Patienten mit positivem Nachweis von ZON und seinen Metaboliten  $\alpha$ - und  $\beta$ -ZOL stellten WEAVER et al. (1986a) keine Veränderungen am Genitaltrakt fest. Auch wurde von HOCHSTEINER et al. (1999) sowie DÄNICKE et al. (2002b) kein Einfluss auf Leistungsparameter festgestellt. WEAVER et al. (1986b) beschrieben bei einer ZON-Dosierung von 250 mg pro Tier keine Veränderungen im Blut und am Genitale. Auf der anderen Seite berichteten BLOMQUIST et al. (1982 über eine Eutervergrößerung bei einer Kalbin. Milchkühe, die mit fusarienkontaminiertem Getreide gefüttert wurden, wiesen Vaginitis, verlängerte Brunst, verminderte Futteraufnahme und reduzierte Milchleistung auf (MANSFELD et al. 1989, DROCHNER 1990). SCHUH und BAUMGARTNER (1988) berichteten über Fruchtbarkeitsprobleme in einem Braunviehbestand. Hierbei wurde ein ZON-Gehalt im Futter von 0,5 mg/kg TS festgestellt.

In den eigenen Untersuchungen ließen sich klinisch sowie biochemisch weder DON- noch ZON-spezifische Effekte nachweisen. Entweder waren die geprüften Parameter unverändert wie Protein, Albumin, Harnstoff, Kreatinin, TEAC, Leukozyten, Erythrozyten, Hämoglobin, Hämatokrit, MCH, MCV, MCHC, Thrombozyten, Basophile und Jugendliche oder die Veränderungen waren auch bei den Kühen ohne nachweisbaren Mykotoxinen vorhanden wie bei Bilirubin, Glucose, FFS, Cholesterol, BHB, AST, CK, GLDH, GGT, Mg, Ca, Na, K, Cl, FFS, pH-Wert, BE, , pCO<sub>2</sub>, SBC, Eosinophilen, Stabkernigen, Segmentkernigen, Lymphozyten und Monozyten. Über ähnliche Ergebnisse wurde auch von SCHUH und BAUMGARTNER (1988), HOCHSTEINER et al. (2000b) sowie von DÄNICKE et al. (2002) berichtet.

Die mittleren AST- und GLDH-Aktivitäten aller Patienten mit Mykotoxinnachweis waren geringgradig höher als bei Patienten ohne Mykotoxinnachweis. Dies wurde auch von JAKSCH und GLAWISCHNIG (1990), HOCHSTEINER et al. (2000b) sowie SABATER et al. (2004) berichtet. MATTHÄUS et al. (2004) sowie SEELING et al. (2005b) führten die erhöhte Enzymaktivitäten von AST und GLDH nicht auf die Mykotoxinbelastung des Futters, sondern auf die erhöhte Aufnahme organischer Substanz zurück, weil die Erhöhungen der Enzymaktivitäten sowohl ohne und mit Mykotoxinanwesenheit im Futter auftraten.

In der Milch waren in den vorliegenden Untersuchungen Mykotoxine mit einer Ausnahme nicht nachweisbar. Ähnliche Ergebnisse von SHREEVE et al. (1978), CHARMLEY et al. (1993a) sowie DÄNI-

CKE et al. (2005c) zeigen, dass bei einer Dosierung von 2,5 und 8,1 mg DON/100kg Körpermasse kein Einfluss auf die Milch besteht. COTE et al. (1986) berichteten, dass bei einer Dosis von 66 mg DOM/kg Futter über 5 Tage 26 ng/ml de-epoxy-deoxynivalenol in der Milch nachgewiesen werden konnten. Von PRELUSKY et al. (1990) sowie GAREIS und WOLFF (2000) wurde beschrieben, dass bei einer Dosierung von 50 sowie 165 mg ZON/kg Futter über 21 Tage ZEA und seine Derivate  $\alpha$ - und  $\beta$ -Zearalenol in der Milch auftraten. Bei vielen der zitierten Arbeiten ist zu berücksichtigen, dass die Mykotoxinkonzentrationen im Futter z. T. deutlich über den in der Einleitung zitierten kritischen Richtwerten lagen.

Als Ursachen für die geringen oder nicht nachweisbaren Beziehungen zwischen Mykotoxinrückständen in den Futterproben und den hier erhobenen klinischen Befunden ist einerseits zu berücksichtigen, dass die DON- und ZON-Konzentrationen in den Futterproben gering waren, andererseits die Mykotoxine DON und ZON durch die Pansenmikroorganismen metabolisiert werden. DON wird zum de-epoxy-deoxynivalenol (KING et al. 1984; COTE und BUCK 1984; COTE et al. 1986; SWANSON et al. 1987; ROTTER et al. 1996; FUCHS et al. 2002) und ZON zu  $\alpha$  und  $\beta$  Zearalenol umgebaut (KIESSLING et al. 1984; MILES et al. 1996; VALENTA und VEMMER 1996; KENNEDY et al. 1998; VÖLKL et al. 2004). Dadurch, dass DON sehr schnell als de-epoxy-DON über den Harn ausgeschieden wird und nicht über die Milch, ist davon auszugehen, dass DON fast vollständig durch die Pansenflora umgebaut wird (PING et al. 1992; DÄNICKE et al. 2005a; DÄNICKE et al. 2005). Aufgrund des Abbaus im Pansen können die Stoffwechselmetabolite von DON weder in der Muskulatur noch in der Leber nachgewiesen werden (BÖHN 1992). ZON wird hingegen nicht vollständig im Pansen umgebaut.

Abschließend kann in Übereinstimmung mit BÖHN (1992) sowie SABATER-VILAR et al. (2004) festgestellt werden, dass die DON- und ZON-Kontaminationen in geringen Konzentrationen beim Milchrind keine besondere Gefahrenquelle darstellen, wenn die Haltungs- und Fütterungsbedingungen optimal gestaltet werden.

## **5 Zusammenfassung**

1. Untersuchungen auf die Mykotoxine DON und ZON sowie deren Metabolite erfolgten in Futterproben von 22 verschiedenen Betrieben Mitteldeutschlands, in 74 Blutserum- und Gallensaftproben sowie in 32 Milchproben von SB-Milchkühen in mehr als 30 Betrieben. Davon entfielen 13 gesunde Kontrollkühe auf zwei Betriebe. Die übrigen Kühe waren Patienten der Medizinischen Tierklinik Leipzig.
2. Die kontrollierten 61 Kühe hatten zu 95 Prozent eine Labmagenverlagerung. Eine Häufung von Begleitkrankheiten ( $\downarrow$  Futteraufnahme, Endometritis, Laminitis, Mastitis, Enteritis, Peritonitis, Abmagerung) ließ sich weder bei Mykotoxin-positiven noch -negativen feststellen. ZON- bzw. ZOL-assoziierte Veränderungen an den Ovarien und Uteri wurden makroskopisch in keinem Fall festgestellt.

3. Die transabdominale Gewinnung von Gallenflüssigkeit durch Punktion ist bei kranken Kühen durch Gallenstau problemlos möglich. Bei gesunden Kühen ohne gestaute Gallenblase kann deren Punktion schwieriger sein. Bei Kühen ist ein Gallensaft-Screening in der Praxis möglich.
4. Die untersuchten Futterproben aus den 20 Betrieben wiesen DON-Konzentrationen von 0,161 (1. Quartil: 0,086, 3. Quartil: 0,191) mg/kg und ZON-Konzentrationen von 6,35 (4,88, 7,85) µg/kg auf.
5. Von den 61 Kühen wurden bei negativen Mykotoxinnachweisen 34 (78 Prozent) geheilt und drei nicht. Von den Kühen mit positiven Mykotoxinnachweisen wurden 18 (75 Prozent) geheilt; sechs mussten eingeschläfert werden, darunter hauptsächlich Kühe mit Peritonitis.
6. Bei den 61 kranken Kühen (Patienten der MTK Leipzig) konnten Mykotoxine
  - 1 x als DON (1,6 Prozent) und 4 x als de-epoxy-DON (6,6 Prozent) im Blutserum
  - 23 x als ZON (37,7 Prozent) und 4 x  $\alpha$ - sowie als  $\beta$ -ZOL (6,6 Prozent) in der Galle
  - 1 x de-epoxy-DON (1,6 Prozent) in der Milch
 in sehr niedrigen Konzentrationen im Bereich der Nachweisgrenzen nachgewiesen werden.
7. Hämatologische oder klinisch-chemische Abweichungen im Blut entsprachen den bekannten Veränderungen bei Kühen mit Labmagenverlagerung. Spezifische hämatologische oder klinisch-chemische Veränderungen für Mykotoxineinflüsse (DON, ZON) ließen sich jedoch für keine der Gruppen eruieren.
8. Bei 13 untersuchten gesunden Kontrollkühen aus zwei Betrieben konnten weder in Blutserum, in der Galle noch in der Milch Mykotoxine nachgewiesen werden.

Es ist zu schlussfolgern, dass bei den untersuchten Kühen keine spezifischen klinischen, hämatologischen oder klinisch-chemischen Veränderungen mit Mykotoxinrückständen in Verbindung gebracht werden konnten.

## 6 Literaturverzeichnis

- ATROSHI F, RIZZO A, WESTERMARCK T, ALI-VEHMAS T. Antioxidant nutrients and mycotoxins. *Toxicology* 2002; 15:151-167.
- BAUER J, GAREIS M. Veränderungen am Genitaltrakt des weiblichen Schweines nach Verfütterung praxisrelevanter Zearalenonmengen. *J Vet Med.* 1987;34:613-23.
- BAUMGARTNER W. Klinische Propädeutik der inneren Krankheiten und Hautkrankheiten der Haus- und Heimtiere. 5. Auflage. Berlin, Wien: Blackwell Wissenschafts-Verlag GmbH; 2002.
- BENNET JW, KLICH M. Mycotoxins. *Clinical Microbiology Reviews.* 2003;16(3):497-516.
- BISCHOFF M. Mykotoxine im Getreide unter Berücksichtigung der Ernte 1998. *Lufa der Landwirtschaftskammer Weser-Ems,* 17-37. 1998.
- BLOOMQUIST C, DAVIDSON JN, PEARSON EG. Zearalenone toxicosis in prepubertal dairy heifers. *J Am Vet Med Assoc.* 1982; 180(2):164-5.
- BML (The German federal Ministry of Nutrition AaF). Orientation values for critical concentrations of deoxynivalenol and zearalenone in diets for pigs, ruminants and gallinaceous poultry. *VDM.* 2000;27/00:2-3.

- BÖHN J. Über die Bedeutung der Mykotoxine Desoxynivalenol, Zearalenon und Ochratoxin A für landwirtschaftliche Nutztiere. Arch Anim Nutr. 1992; 412(95):111.
- CHARMLEY E, TRENHOLM HL, THOMPSON BK, VUDTHALA D, NICHOLSON JWG, PRELUSKY DB et al. Influence of Level of Deoxynivalenol in the Diet of Dairy Cows on Feed Intake, Milk Production, and Its Composition. J Dairy Sci. 1993; 76:3580-7.
- COTE LM, BUCK B. Implications of mycotoxins in the bovine. World Buiatrics Assoc. Auflage. 1984.
- COTE LM, DAHLEM AM, YOSHIZAWA T, SWANSON SP, BUCK WB. Excretion of deoxynivalenol and its metabolite in milk, urine, and feces of lactating dairy cows. J Dairy Sci. 1986; 69(9):2416-23.
- D'MELLO JPF, PLACINTA CM, MACDONALD AMC. *Fusarium* mycotoxins: a review of global implications for animal health, welfare and productivity. Anim Feed Sci Techn. 1999; 80:183-205.
- DÄNICKE S, ÜBERSCHÄR KH, HALLE I, VALENTA H, FLACHOWSKY G. Excretion kinetics and metabolism of zearalenon in broilers in dependence on a detoxifying agent. Arch Anim Nutr. 2001; 55:299-313.
- DÄNICKE S, GADEKEN D, ÜBERSCHÄR KH, MEYER U, SCHOLZ H. Effects of *Fusarium* toxin contaminated wheat and of a detoxifying agent on performance of growing bulls, on nutrient digestibility in wethers and on the carry over of zearalenone. Arch Tierernähr. 2002; 56(4):245-61.
- DÄNICKE S, MATTHÄUS K, LEBZIER P, VALENTA H, STEMME K, ÜBERSCHÄR KH et al. Effects of *Fusarium* toxin-contaminated wheat grain on nutrient turnover, microbial protein synthesis and metabolism of deoxynivalenol and zearalenone in the rumen of dairy cows. J Anim Physiol Anim Nutr (Berl). 2005; 89(9-10):303-15.
- DROCHNER W. Aktuelle Aspekte zur Wirkung von Phytohormonen, Mykotoxinen und ausgewählten schädlichen Pflanzeninhaltsstoffen auf die Fruchtbarkeit beim weiblichen Rind. Übers Tierernährung. 1990; 18:177-96.
- DROCHNER W, HECKÖTTER E, SCHOLZ H. Aktuelle Ergebnisse aus der tierärztlichen Fütterungsberatung. 4. Mitt: Die Zusammensetzung von Grünfütter und Silagen für Wiederkäuer, Untersuchungen von Einzelfuttermitteln für Wiederkäuer in Problembeständen. Dtsch Tierärztl Wschr. 1984; 91:45-84
- EDMONSON AJ, LENA IJ, WEAVER LD, FARVER T, WEBSTER G. A body condition scoring chart for Holstein dairy-cows. J Dairy Sci. 1989; 72(1):68-78.
- EU (2006): Empfehlung der Kommission vom 17. August 2006 betreffend das Vorhandensein von Deoxynivalenol, Zearalenon, Ochratoxin A, T-2- und HT-2-Toxin sowie von Fumonisin in zur Verfütterung an Tiere bestimmten Erzeugnissen (Text von Bedeutung für den EWR) (2006/576/EG) Amtsblatt der Europäischen Union L 229/7 (23.8.2006)
- FINK-GREMMELS J. Mycotoxins: their implications for human and animal health. The Veterinary Quarterly. 1999; 21((4)):115-20.
- FRANK K. Enzymatische Untersuchungen bei verschiedenen Erkrankungen der Schweine in der tierärztlichen Praxis [Dissertation med. vet.] 1975.
- FUCHS E, BINDER EM, HEIDLER D, KRŠKA R. Structural characterization of metabolites after the microbial degradation of type A trichothecenes by the bacterial strain BBSH 797. Food Addit Contam. 2002; 19(4):379-86.
- FÜRLI M. Vorkommen, Ätiologie, Pathogenese, Diagnostik und medikamentelle Beeinflussung von Leberschäden beim Rind. Habil.-Schrift, Vet. Med. Fak., Uni. Leipzig. Auflage. 1989.

- FÜRL M. Spezielle Untersuchungen beim Wiederkäuer. In: Kraft W, Dürr UM, Hrsg. Klinische Labordiagnostik in der Tiermedizin, 6. Aufl. Stuttgart, New York: Schattauer. 2005: 444-471.
- GAREIS M, WOLFF J. Relevance of mycotoxin contaminated feed for farm animals and carryover of mycotoxins to food of animal origin. *Mycoses*. 2000;43 Suppl 1:79-83.
- GOLL M, VALENTA H, OLDENBURG E. Übergang von Zearalenon in die Milch von Kühen nach Langzeitverfütterung. Braunschweig, 17. Mykotoxin-Workshop
- HAGLER WM, DANKO G, HORVATH L, PALUSIK M, MIROCHNA CJ. Transmission of zearalenone and its metabolite into ruminant milk. *Acta Vet Acad Sci H*. 1980; 28:209-16
- HAGLER WM, MIROCHA CJ, PATHRE SV, BEHRENS JC. Identification of the naturally occurring isomer of zearalenol produced by *Fusarium roseum* 'Gibbosum' in rice culture. *Appl Environ Microbiol*. 1995; 37(5) 849-853.
- HOCHSTEINER W, SCHUH M, LUGER K, BAUMGARTNER W. Einfluss von mykotoxinkontaminiertem Futter auf Leistungsparameter beim Milchrind. *Berl Münch Tierärztl Wschr*. 1999; 12:1-8.
- HOCHSTEINER W, SCHUH M, LUGER K, BAUMGARTNER W. Effects of mycotoxin contaminated feed on production parameters of dairy cows. *Berl Münch Tierärztl Wschr*. 2000; 113(1):14-21.
- INGALLS J R. Influence of deoxynivalenol on feed consumption by dairy cows. *Anim Feed Sci Tech*. 1996; 60:297-300.
- JAKSCH W, GLAWISCHNIG E. Klinische Propädeutik der inneren Krankheiten und Hautkrankheiten der Haus- und Heimtiere. 3. Aufl. 1990.
- KATZENELLENBOGEN BS, KATZENELLENBOGEN JA, MORDECAI D. Zearalenones: Characterisation of the estrogenic potencies and receptor interactions of a series of fungal -resorcylic acid lactones. *Endocrinology*. 1979; 105:33-40.
- KENNEDY DG, HEWITT SA, McEVOY JD, CURRIE JW, CANNAVAN A, BLANCHFLOWER WJ et al. Zearanol is formed from *Fusarium* spp. toxins in cattle in vivo. *Food Additives and Contaminants*. 1998; 15(4):393-400.
- KIANG DT, KENNEDY BJ, PATHRE SV, MIROCHA CJ. Binding characteristics of zearalenone analogs to estrogen receptors. *Cancer Res*. 1978; 38(11 Pt 1):3611-5.
- KIESSLING KH, PETERSON H, SANDHOLM K, OLSEN M. Metabolism of aflatoxin, ochratoxin, zearalenone, and three trichothecenes by intact rumen fluid, rumen protozoa, and rumen bacteria. *Appl Environ Microbiol*. 1984; 47((59):1070-3.
- KING RR, McQUEEN RE, LEVESQUE D, GREENHALGH R. Transformation of deoxynivalenol (vomitoxin) by rumen microorganisms. *J Agric Food Chem*. 1984;32:1181-3.
- LACEY J. Mycotoxins in UK cereals and their control. *Asp Appl Biol* 25, 395-405. 1990.
- LEW H, ADLER A, BRODACZ W, EDINGER W. Zum Vorkommen von Nivalenol in Getreide und Mais. *Mycotoxin Res*. 1997; 19:6-9
- MANSFELD R, GRUNER E, KAUTNI J. Mykotoxine als Bestandproblem bei Milchkühen-ein Fallbericht. *Mh Vet-Med*. 1989; 44:409-12.
- MATTHÄUS K, DÄNICKE S, LEBZIEN P, VALENTA H, ÜBERSCHÄR KH, FLACHOWSKY G. On the effects of a *Fusarium*-contaminated wheat and the feed intake level on ruminal fermentation and toxin-turnover of cows. 26. Mykotoxin-Workshop, (Hrsg.). 38. 2004.



- MILES CO, ERASMUSON AF, WILKINS AL, TOWERS NR, SMITH BL, GARTHWAITE I et al. Ovine Metabolism of Zearalenone to -Zearalenol (Zeranol). *J Agric Food Chem.* 1996;44:3244-50.
- MILLER NJ, SAMPSON J, CANDEISAS, L.P., RICE-EVANS CA. Antioxidant activities of carotenes and xanthophylls. *FEBS Lett.* 1996; 384((3)):240-2.
- MITTERBAUER R, WONDRASCH K, PERUCI M, BERTHILLER F, SCHAUMACHER R, KRASKA R et al. Biosynthese und Metabolismus von Zearalenon. *ALVA-Mitteilungen*, 2, 22-24; ISSN 1811-7317.
- MIROCHA C J, HARRISON J, NICHOLS A, MCCLINTOCK M. Detection of a fungal estrogen (F-2) in hay associated with infertility in dairy cattle. *Appl Microbiol.* 1968; 16(5):797-798.
- MIROCHA C J, CHRISTENSEN CM. Fungus metabolites toxic to animals. *Annu Rev Phytopathol.* 1974; 12:303-330.
- MOROOKA N, URAGUCHI N, YOSHIZAWA T, YAMAMOTO H. Studies on the toxic substances in barley infected with *Fusarium* spp. *Jpn J food Hyg.* 1972; 13:368-75.
- OETTEL M. Endokrinpharmakologie in Lehrbuch der Pharmakologie und Toxikologie für die Veterinärmedizin (Frey, H.-H. u. W. Lösch). 1996:370-423.
- OLDENBURG E, LEPSCHY J, VALENTA H, WEIßBACH F. Fusarientoxine in Silomais - Abhängigkeit von Sorte und Standort. *Mycotoxin Res.* 1996; 12:174-79
- OLDENBURG E. Fusarientoxine in Silomais - Abhängigkeit von Sorte und Standort. Jahresbericht 1997 der Bundesforschungsanstalt für Landwirtschaft Braunschweig-Völkenrode (FAL), 29
- OLDENBURG E, HÖPPNER F. *Fusarium* mycotoxins in silo maize - occurrence, risk assessment, minimization. *Mycotoxin Res.* 2003; 19:43-6
- OLDENBURG E, VALENTA H, SATOR C. Risikoabschätzung und Vermeidungsstrategien bei der Futtermittelherzeugung. *Landbauforschung Völkenrode, Sonderheft.* 2000;(216):5-34.
- PING HE, YOUNG LG, FORSBERG C. Microbial Transformation of Deoxynivalenol (Vomitoxin). *Appl Environ Microbiol.* 1992; 58(12):3857-63.
- PRELUSKY DB, TRENHOLM HL, LAWRENCE GA, SCOTT PM. Nontransmission of deoxynivalenol (vomitoxin) to milk following oral administration to dairy cows. *J Environ Sci Health B.* 1984;19(7):593-609.
- PRELUSKY DB, SCOTT PM, TRENHOLM HL, LAWRENCE GA. Minimal transmission of zearalenone to milk of dairy cows. *J Environ Sci Health B* 25 1990;1, 87-103..
- PRELUSKY DB, WARNER RM, TRENHOLM HL. Sensitive analysis of the mycotoxin zearalenone and its metabolites in biological fluids by high-performance liquid chromatography alpha. *J Chromatogr.* 1989; 29(494):267-77.
- REIß J. Schimmelpilze, Lebensweise, Nutzen, Schaden, Bekämpfung. Springer-Verlag, Berlin. 1998.
- ROGER A, COULOMBE JR. Biological action of mycotoxins. *J Dairy Sci.* 1993;76(3):880-91.
- ROTTER BA, PRELUSKY DB, PESTKA JJ. Toxicology of deoxynivalenol (vomitoxin). *J Toxicol Environ Health.* 1996; 48(1):1-34.((1)):1-34.
- SABATER-VILAR M. Assessment and intervention of food- and feed-borne mycotoxicoses. PHD Thesis, Deptm. of Veterinary Pharmacology, Pharmacy and Toxicology, Utrecht University, The Netherlands

- SCF. SCIENTIFIC COMMITTEE ON FOOD OF THE EUROPEAN COMMISSION (SCF). Opinion on Fusarium toxins. Part 1: Deoxynivalenol (DON), expressed on 2 December 1999. SCIENTIFIC COMMITTEE ON FOOD . 1999.
- SCHUH M. Klinische Auswirkungen der in Österreich vorkommenden Mykotoxine. Wien Tierärztl Mschr. 1981; 68:308-12.
- SCHUH M. The significance of mycotoxin assimilation for the productivity and health of animals. Dtsch Tierärztl Wschr. 1989; 96(7):353-5.
- SCHUH M. Verminderung von Futtermittelverpilzungen. Der fortschrittliche Landwirt. 1996; 21:7-8.
- SCHUH M, BAUMGARTNER W. Microbiological and mycotoxicological feedstuffs as disease causing agents in cattle. Wien Tierärztl Mschr. 1988; 75:329-33.
- SEELING K. Investigations of the interactions between feed intake level (passage rate) and Fusarium contaminated wheat on ruminal nutrient fermentation as well as on metabolism and carry over of deoxynivalenol and zearalenone into milk. Diss. Halle, 2005
- SEELING K, DÄNICKE S, GÄDEKEN D, LEBZIEN P, VALENTA H, ÜBERSCHAR KH et al. On the effects of Fusarium-contaminated wheat and the feed intake level on ruminal fermentation and toxin -turnover of cows. Mycotoxin Res. 2005a; 20(1):1-4.
- SEELING K, LEBZIEN P, DANICKE S, SPILKE J, SUDEKUM KH, FLACHOWSKY G. Effects of level of feed intake and Fusarium toxin-contaminated wheat on rumen fermentation as well as on blood and milk parameters in cows. J Anim Physiol Anim Nutr. 2005b; 90(3-4):103-15.
- SEELING K, DÄNICKE S, VALENTA H, VAN EGMOND HP, SCHOTHORST RC, JEKEL AA, LEMZIEN P, SCHOLLENBERGER M, RAZZAZI-FAZELI E, FLACHOWSKY G. Effects of Fusarium toxin contaminated wheat and feed intake level on the biotransformation and carry-over of deoxynivalenol in dairy cows. Food Addit Contam. 2006; 23:1008-1020.
- SHREEVE BJ, PATTERSON DSP, ROBERTS BA. The `Carry-Over` of aflatoxin, Ochratoxin and Zearalenone from naturally Contaminated Feed to Tissues, Urine and milk of dairy Cows. Fd Cosmet Toxicol. 1978; 17:151-2.
- STEINHÖFEL, O. Futterqualitätsprogramm 1996-2002, Mykotoxikologischer Befund von Silomaisproben im Freistaat Sachsen. zit. n. Seeling 2005
- SWANSON SP, NICOLETTI J, ROOD HD, JR., BUCK WB, COTE LM, YOSHIZAWA T. Metabolism of three trichothecene mycotoxins, T-2 toxin, diacetoxyscirpenol and deoxynivalenol, by bovine rumen microorganisms. J Chromatogr. 1987; 414(2):335-42.
- TRENHOLM HL, THOMPSON BK, HARTIN KE, GREENHALGH R, McALLISTER AJ. Ingestion of vomitoxin (deoxynivalenol)-contaminated wheat by nonlactating dairy cows. J Dairy Sci. 1985; 68(4):1000-5.
- ÜBERSCHÄR K H. Einfluss von Zearalenon auf Wachstum und Rückstände in den Geweben von Mastkaninchen. VDLUFA-Kongreßband 1999, Halle/Saale. VDLUFA-Schriftenreihe 52/1999:425-428.
- USLEBER E, SCHNEIDER E, MÄRTLBAUER E. Untersuchungen zum Vorkommen von Deoxynivalenol, Zearalenon und Fumonisin in Speisegetreide. Mycotoxin Res 1998; 14:131-35
- URRY WH, WEHRMEISTER HL, HODGE EB, HIDDY PH. The structure of zearalenone. Tetrahedron. 1966;27:3109-14.

- VALENTA H, GOLL M. Determination of zearalenon,  $\alpha$ -zearalenol and  $\beta$ -zearalenol in plasma and milk by HPLC and GC/MS. Institut für Tierernährung-Bundesforschungsanstalt für Landwirtschaft (FAL)-Braunschweig, 168-171. 1995.
- VALENTA H, VEMMER H. In vitro-Untersuchungen zum Metabolismus von Zearalenon bei Inkubation mit Pansensaft. Mycotoxin Res. 1996; 12:185-91.
- VANYI A, SZAILER E. Investigation of the cytotoxic effect of F-2 toxin (zearalenone) in various monolayer cell cultures. Acta Vet Acad Sci Hung. 1974; 24(4):407-412.
- VÖLKL A, VOLGER B, SCHOLLENBERGER M, KALROVSKY P. Microbial detoxification of mycotoxin deoxynivalenol. Basic Microbiol. 2004; 44(2):147-56.
- WEAVER GA, KURTZ HJ, BEHRENS JC, ROBISON TS, SEGIUM BE, BATES FY et al. Effect of zearalenone on dairy cows. Am J Vet Res. 1986a; 47(8):1826-8.
- WEAVER GA, KURTZ HJ, BEHRENS JC, ROBISON TS, SEGIUM BE, BATES FY et al. Effect of zearalenone on the fertility of virgin dairy heifers. Am J Vet Res. 1986b; 47(6):1395-7.
- ZEPAUER GV, SCHACHT KH. Beitrag zur Mykotoxikose beim Rind. Mh Vet-Med. 1985; 40:622-4.

## Impressum

- Herausgeber:** Sächsische Landesanstalt für Landwirtschaft  
August-Böckstiegel-Straße 1, 01326 Dresden  
Internet: [www.landwirtschaft.sachsen.de/lfw/publikationen](http://www.landwirtschaft.sachsen.de/lfw/publikationen)
- Autoren:** **Prof. Dr. sc. Monika Krüger, Dr. Brigitta Kleessen,  
Dr. Anke Große-Herrenthey, Dr. Wieland Schrödl**  
Universität Leipzig, Veterinärmedizinische Fakultät,  
Institut für Bakteriologie und Mykologie  
An den Tierkliniken 29, 04103 Leipzig  
**Dr. Ahmad Alkassam, Prof. Dr. habil. Manfred Füll**  
Universität Leipzig, Veterinärmedizinische Fakultät,  
Medizinische Tierklinik  
An den Tierkliniken 11, 04103 Leipzig  
**PD Dr. habil. Sven Dänicke**  
Bundesforschungsanstalt für Landwirtschaft, Institut für Tierernährung  
Bundesallee 50, 38116 Braunschweig
- Redaktion:** Dr. Olaf Steinhöfel  
Fachbereich Tierische Erzeugung  
Telefon: 034222/46-172  
Telefax: 034222/46-229  
E-Mail: [olaf.steinhoefel@smul.sachsen.de](mailto:olaf.steinhoefel@smul.sachsen.de)
- Endredaktion:** Sächsische Landesanstalt für Landwirtschaft  
Anne-Christin Matthies-Umhau, Ramona Scheinert, Matthias Löwig  
Telefon: 0351/2612-345  
Telefax: 0351/2612-151  
E-Mail: [anne-christin.matthies@smul.sachsen.de](mailto:anne-christin.matthies@smul.sachsen.de)
- ISSN:** 1861-5988
- Redaktionsschluss:** November 2007

Für alle angegebenen E-Mail-Adressen gilt:

Kein Zugang für elektronisch signierte sowie für verschlüsselte elektronische Dokumente

### Verteilerhinweis

Diese Informationsschrift wird von der Sächsischen Staatsregierung im Rahmen der Öffentlichkeitsarbeit herausgegeben. Sie darf weder von Parteien noch von Wahlhelfern zum Zwecke der Wahlwerbung verwendet werden. Dies gilt für alle Wahlen.