

Zuwendungsempfänger bzw. Ausführende Stelle

Institut für Tierernährung
Friedrich-Loeffler-Institut (FLI)
Bundesforschungsinstitut für Tiergesundheit
Bundesallee 50
38116 Braunschweig

Forschungsprojekt Nr. EH 07HS011

Thema: Vorversuch zur Ermittlung des Einflusses des Konzentratanteils in der Ration von Milchkühen bei An- bzw. Abwesenheit von *Fusarium*-Toxin kontaminierter Triticale auf den carry-over von Deoxynivalenol (DON) und De-epoxy-DON (DOM-1)

Laufzeit

01.7.2007-30.06.2008

Berichtszeitraum

01.09.2007 – 31.08.2008

1. Ziele und Aufgabenstellung des Projekts

1.1 Planung und Ablauf des Projektes

Ziel dieses Projektes war die Analyse von physiologischen Proben, die aus einem Milchkuhversuch stammten, in dem bei Kühen durch einen hohen Konzentratanteil in der Ration niedrige pH-Werte im Pansen erzeugt werden sollten und untersucht werden sollte, ob es im Vergleich zu einer Ration mit geringem Kraffutteranteil zu einem Übertritt von Deoxynivalenol (DON) und/oder seinen Metaboliten in Blut und Milch kommen kann. Die detaillierte Versuchsbeschreibung ist zu finden bei Keese et al. (2008a). Dem eigentlichen Hauptversuch ging ein Vorversuch an den gleichen Tieren voraus, bei dem die Akzeptanz der Mykotoxin-kontaminierten Ration mit 50% Konzentratanteil getestet wurde.

Das Projekt begann, durch einen personellen Engpass, mit 2 Monaten Verzögerung zum 01.09.2007. Geplante Arbeitsschritte im Rahmen dieses Projektes waren die Analyse von 192 Milchproben und 192 Serumproben auf Deoxynivalenol (DON) und seinem Metaboliten De-Epoxy-Deoxynivalenol (DOM-1), die Bestätigungsanalytik von 32 Milchproben zu einem Zeitpunkt im Versuch mittels LC-MS/MS sowie die Analyse von 30 Futterproben auf DON.

Diese Analysen konnten planmäßig durchgeführt werden. Zusätzlich wurden aus Eigenmitteln 55 weitere Milchproben mittels HPLC-UV-Methode auf DON und DOM-1 analysiert und die Analyseergebnisse in 125 weiteren Milchproben zusätzlich mit der LC-MS/MS-Methode bestätigt. Außerdem konnten mit der Finanzierung aus Eigenmitteln zusätzlich 47 weitere Serumproben sowie 132 Galleproben analysiert werden.

1.2 Wissenschaftlicher und technischer Stand, an den angeknüpft wurde

Unter den Schimmelpilzgiften (Mykotoxine) kommt den durch verschiedene Arten der Gattung *Fusarium* gebildeten Toxinen Deoxynivalenol (DON) und Zearalenon (ZON) die größte praktische Bedeutung zu, da sie in der Fütterungspraxis in Konzentrationen vorkommen können, die für landwirtschaftliche Nutztiere toxikologisch bedeutsam sind. Der Wiederkäuer wird im Allgemeinen als weniger empfindlich gegenüber diesen Toxinen angesehen als beispielsweise das Schwein. Dies kommt auch in den gegenwärtig gültigen Orientierungswerten für kritische Konzentrationen von DON und ZON in der Tagesration zum Ausdruck. So soll die DON und ZON-Konzentration in der Tagesration von Sauen 0,9 mg bzw. 0,25 mg/kg nicht übersteigen, wohingegen die korrespondierenden Werte für die Milchkuh bei 5 mg bzw. 0,5 mg betragen (EC 2006). Damit wird verständlich, dass höher kontaminierte Futtermittel eher im Wiederkäuer- als im Schweinebereich eingesetzt werden.

Dies wiederum birgt die Gefahr, dass in so genannten *Fusarium*-Jahren, die durch flächenhaft erhöhte *Fusarium*-Toxinkonzentrationen gekennzeichnet sein können, auch Probleme im Wiederkäuerbereich auftreten können. Diese Situation wird noch dadurch verschärft, dass in solchen Jahren nicht nur die "traditionell" kontaminierten Weizen- und Maiskörner erhöhte Konzentrationen aufweisen, sondern auch insbesondere die Maissilage. Unter diesen Bedingungen kann eine chronisch subakute Belastungssituation für Milchkühe, die über längere Perioden mit kontaminiertem Grund- und Konzentratfutter gefüttert werden, entstehen, deren Konsequenzen aufgrund der unzureichenden Datenlage bisher nicht abschließend bewertet werden können. Beschränkt man die weiteren Betrachtungen zunächst auf DON, dann ist festzustellen, dass die bisherigen wenigen Untersuchungen an Milchkühen mit einer geringen Tierzahl und nur über kurze Zeiträume durchgeführt wurden und inkonsistente Ergebnisse zeigten (Seeling & Dänicke 2005). Die Ursachen dieser Variabilität sind weitestgehend unbekannt. Es kann aber davon ausgegangen werden, dass der mikrobiellen Aktivität des Pansens eine bedeutende Funktion als präsystemischer Detoxifikationsmechanismus zukommt und dass jeglicher Veränderung des ruminalen mikrobiellen Musters und/oder einer Modifikation der mikrobiellen Aktivität eine potenzielle Bedeutung bei der Effektivität der ruminalen Detoxifikation zukommt. Die grundlegende biochemische Reaktion, die zu einer Detoxifikation von DON führt, besteht in einer Reduktion der C12, 13-Epoxidgruppe, wobei der entstehende, weitestgehend ungiftige Metabolit als DOM-1 bezeichnet wird. Das Auftreten dieses Metaboliten wurde sowohl *in vitro* unter Verwendung von Pansensaft (King et al. 1984; Seeling et al. 2006a) als auch in verschiedenen physiologischen Matrices, wie Dünndarmchymus, Harn, Kot, Blut und Milch, nachgewiesen (z.B. Prelusky et al. 1984; Cote et al. 1986; Dänicke et al. 2005b; Seeling et al. 2006b). In der Mehrzahl der Fälle überwiegt dabei die Konzentration von DOM-1 die des Muttertoxins DON, wobei die Variationen im Metabolitenprofil wahrscheinlich auf die Variation in den ruminalen Umsetzungen zurückzuführen sein dürften. In einem extremen Fall wurde über massives Auftreten von nicht-metabolisiertem DON im Serum von Kühen berichtet (Sabater Vilar 2003). Abgesehen davon, dass die Analysen mittels ELISA durchgeführt wurden und De-epoxy DON nicht bestimmt wurde, so ergibt sich doch die Frage nach den Ursachen solcher Beobachtungen. Neuere (nicht veröffentlichte), mittels HPLC ermittelte Befunde über das Auftreten hoher DON-Konzentrationen im Serum klinisch auffälliger Kühe rückt die Problematik der Ursachen in der Variation des ruminalen Entgiftungspotenzials zunehmend auch in das Interesse des Verbraucherschutzes. Die bisher wenigen publizierten Daten zum Vorkommen von DON und DOM-1 in der Milch lassen zwar

erkennen, dass hauptsächlich der entgiftete Metabolit auftritt; aber in Anbetracht der oben aufgeführten positiven DON-Befunde im Blut ergibt sich natürlich die Frage, ob es bei krankheitsbedingten Veränderungen im Pansenmilieu und/oder veränderten Absorptionsbedingungen der Pansenschleimhaut nicht zu einem Übergang des nicht-metabolisierten Toxins DON in die Milch kommen kann. Dass offensichtlich veränderte Absorptionsbedingungen der Pansenschleimhaut involviert sind, geht indirekt auch aus einem Ussing-Kammer-Versuch hervor, nach dem die Nettoabsorption von DON durch die intakte Pansenschleimhaut vom Schaf nur zwischen 0 und 0,35 % betrug (Dänicke et al. 2005a). Es kann daher zunächst als Hypothese formuliert werden, dass für das Auftreten von nicht-metabolisiertem DON im Blut von Kühen eine verringerte ruminale mikrobielle Metabolisierungskapazität und/oder veränderte Absorptionsverhältnisse im Pansen bzw. im Dünndarm verantwortlich sind. Die These einer pathologisch gesteigerten Absorption von nicht-metabolisiertem DON aus dem Pansen wird durch Untersuchungen zur akuten und chronischen Pansenazidose gestützt. Diese ist durch einen ruminalen pH-Wert $< 5,5$ bis $5,6$ charakterisiert (Owens et al. 1998, Kleen et al. 2003) und wird durch exzessive Aufnahme leicht fermentierbarer Kohlenhydrate verursacht. Damit sind insbesondere Hochleistungskühe und intensiv gemästete Fleischerinder ("feedlot cattles"), deren Ration mehr als 50% Konzentrate enthält, besonders exponiert, eine chronische Pansenazidose zu entwickeln. Die im Zusammenhang mit einer Pansenazidose beobachtete Schädigung der Pansenschleimhaut geht primär auf einen Anstieg in der ruminalen Osmolalität, die unter azidotischen Pansenverhältnissen hauptsächlich auf einen Anstieg der Konzentrationen von Glukose, flüchtigen Fettsäuren (VFA) und Laktat verursacht wird, zurück. Bei Überschreiten der Osmolalität des Blutes tritt Wasser aus dem Blut in den Pansen über, um den osmotischen Druckunterschied auszugleichen. Der rasche Flüssigkeitseinstrom in den Pansen kann zu einer Schwellung der Pansenschleimhautpapillen und zu einer Ablösung der Mucosa von der Unterlage führen (Owens et al. 1998). Diese Veränderungen können lokale Entzündungen und Abszesse nach sich ziehen, die mit einer erhöhten Durchlässigkeit der Pansenschleimhaut einhergehen. Durch Pansenazidose verursachte Rumenitis ermöglicht und erleichtert bestimmten Mikroorganismen das Überwinden der mucosalen Barriere, den Übertritt in das Pfortaderblut und den nachfolgenden Transport in die Leber, wo es zur Ausbildung von Abszessen kommen kann (Nagaraja & Chengappa 1998; Kleen et al. 2003). Bei der Entstehung solcher Abszesse kommt *Fusobacterium necrophorum* (*Sphaerophorus necrophorus*) eine entscheidende Bedeutung zu (Nagaraja & Chengappa 1998; Kleen et al. 2003). Unter azidotischen Pansenverhältnissen kommt es zu einer exzessiven Proliferation

dieses anaeroben Darmbakteriums. Bei der Penetration spielen verschiedene Virulenzfaktoren eine Rolle, von denen Leukotoxin und endotoxische Lipopolysaccharide die wichtigsten sind. Neben *F. necrophorum* proliferieren eine Reihe weiterer Bakterienarten, von denen *Streptococcus bovis* und *Lactobacillus spp.* durch Bildung von Laktat zur weiteren Senkung des pH-Wertes beitragen (Glock & DeGroot 1998) und die Kaskade der Rumenitis weiter forcieren.

Im Zusammenhang mit dem durch Azidose beobachteten plötzlichen Tod wurde die Vermutung geäußert, dass dieser möglicherweise auf eine endotoxämische anaphylaktische Hypersensitivität zurückzuführen sein könnte (Glock & DeGroot 1998). Von Bedeutung ist nun der (bisher nicht publizierte) Nachweis des nicht-metabolisierten Muttertoxins DON im Blut von klinisch auffälligen Kühen. Trifft dies zu, dann erscheint ein Übergang in die Milch möglich.

2 Material und Methoden

Dem eigentlichen Hauptversuch ging ein Vorversuch (im Folgenden als Periode 1 bezeichnet) an den gleichen Tieren voraus, bei dem die Akzeptanz der Mykotoxin-kontaminierten Ration mit 50% Konzentratanteil und einer DON-Konzentration von 5.3 mg/kg T (n=13) im Vergleich zu einer Kontrollration, die gleichfalls 50% Konzentrate, aber nur Spuren von DON aufwies (n=14), über 11 Wochen getestet wurde. Für den eigentlichen Hauptversuch (im Folgenden als Periode 2 bezeichnet) wurde eine vollständige 2-faktorielle Versuchsanlage gewählt (Tabelle 1), woraus sich 4 Versuchsgruppen ergaben. Die DON-Konzentration der Gesamtration wurde in beiden Perioden so gewählt, dass der Orientierungswert für die kritische DON-Konzentration von 5 mg/kg Gesamtration (88 % T) knapp unterschritten wird. Damit wird einerseits praktischen Belangen Rechnung getragen und andererseits vermieden, dass durch eine zu hohe DON-Konzentration eine Übertragbarkeit der Ergebnisse auf praktische Fütterungsbedingungen (< 5 mg DON/kg) nicht möglich wäre. Die Rationen wurden als totale Mischration (TMR) verfüttert.

Tiere (Periode 2): 8 Tiere je Gruppe (Rasse „Deutsche Holstein“) im zweiten Laktationsdrittel bei möglichst gleichmäßiger Verteilung von Färsen auf die Gruppen.

Tabelle 1. Versuchsdesign in Periode 2 (n=8)

Gruppe	Konzentratfutter-Gabe	DON-Konzentration in der Gesamtration (mg/kg bei 88% Trockensubstanz)
Control-30	Niedrig	-
Control-60	Hoch	-
Myco-30	Niedrig	4,8
Myco-60	Hoch	4,8

Versuchsbeginn: Periode 1: Dezember 2005

Periode 2: 06.03.2006

Versuchsdauer: Periode 1: 11 Wochen

Periode 2: 18 Wochen

- Die TMR wurde einmal täglich gemischt und den Kühen zur freien Aufnahme angeboten.
- tägliche tierindividuelle Erfassung der Futteraufnahme

Haltung: - Versuchstation Braunschweig, Stall 3

- Boxenlaufstall mit Betonspaltenboden
- Tiere der Versuchs- und Kontrollgruppen wurden räumlich getrennt gehalten
- zweimal täglich Erfassung der Lebendmasse (jeweils nach dem Melken)

Melkungen: Zweimal täglich (6.00 Uhr und 16.00 Uhr) im Melkstand

tägliche Erfassung der Milchmenge

Proben (siehe auch Tabelle 2):

Futterproben für Analysen:

- **TMR und Silagen: viermal je Woche (Montag bis Donnerstag)** Entnahme einer Probe von jeder TMR aus den Futtertrögen und Bestimmung der Trockensubstanz; aus diesen Futterproben Herstellung von Sammelproben im vierwöchigen Abstand zur Bestimmung der Weender Roh Nährstoffe, ADF, NDF sowie der Mykotoxine.
- **Krafftfutter: einmal wöchentlich** Entnahme von Kraftfutterproben aller vier Sorten, aus diesen Futterproben Herstellung von Sammelproben im ca. vierwöchigen Abstand zur Bestimmung der Weender Roh Nährstoffe, ADF, NDF sowie der Mykotoxine.

Milchprobennahme: zweimal wöchentlich (Montag und Donnerstag) morgens und abends

- Untersuchung der Milchproben auf Milchinhaltsstoffe (Fett, Protein, Laktose, Harnstoff, somatische Zellen), Hemmstoffaktivität, Progesteron sowie zu bestimmten Zeitpunkten während des Versuches auf den Mykotoxin- und Metabolitengehalt (siehe Probenplan)
- Untersuchung von Milch-, Serum-, und Galleproben auf Mykotoxin- und Metabolitengehalt
- Untersuchung des Harns auf pH-Wert und die Netto-Säure-Basen-Ausscheidung
- Untersuchung von Blutserum auf Leberenzyme, Haptoglobin und Fibrinogen sowie Differentialblutbild
- Untersuchung von Pansensaft auf pH-Wert und Bestimmung der kurzkettigen Fettsäuren
- Leber- und Muskelbiopsien sowie Gallepunktate (durch die Klinik für Rinder der TiHo Hannover) zur biochemischen Untersuchung auf den Energieumsatz sowie den Mykotoxin- und Metabolitengehalt (nur Galle, s.o.)
- Zum letzten Beprobungszeitpunkt (Versuchsabschluss) werden von allen Kühen zusätzliche Leberbiopsieproben für histopathologische Untersuchungen bereitgestellt. Die Aufarbeitung der Proben ist am Institut für Pathologie der TiHo vorgesehen.

Tabelle 2. Probenahmeschema

Versuchswoche	Datum	Blut	Pansensaft	Harn	Milch	Galle	Leber	Muskel
<i>Periode 1</i>								
0	13.12.+19.-21.12.05	X	X	X	X	X	X	X
2	04.01.2006	X	X		X			
4	15.01.-17.01.06	X	X	X	X	X	X	X
6	01.02.2006	X	X					
8	10.02.-15.02.06	X	X	X	X	X	X	X
<i>Periode 2</i>								
12*	06.03.-10.03.06	X	X	X	X	X	X	X
16	04.04.-6.04.06	X	X	X	X	X	X	X
18	19.-21.04.06	X	X	X	X			
20	02.-04.05.06	X	X	X	X	X	X	X
22	15.-19.05.06	X	X	X	X			
28	26.-30.06.06	X	X	X	X	X	X	X
<i>Abfütterung</i>								
Abfütterung	ab 01.07.06	X			X			

*Woche 12: Proben nicht auswertbar durch technischen Defekt

Toxinanalytik

Die DON-Konzentrationen in Futtermitteln wurden mittels HPLC mit UV-Detektion nach Reinigung der Extrakte mit Immunoaffinitätssäulen (DONprep[®], r-biopharm AG, Darmstadt, Germany) nach der Methode von Oldenburg et al. (2007) bestimmt. Die Nachweisgrenze lag bei 0.03 mg/kg. Die durchschnittliche Wiederfindungsrate lag bei 92%.

DON and DOM-1 in Serum und gefriergetrockneten Milchproben wurden mittels HPLC mit UV-Detektion nach Reinigung der Extrakte mit Immunoaffinitätssäulen bestimmt (Valenta et al. 2003). Die Nachweisgrenze lag bei 2 ng/ml in Serum und bei 4 µg/kg in gefriergetrockneten Milchproben (entspricht 0.5 µg/kg Frischmilch mit 12.5% Trockensubstanz). Die durchschnittliche Wiederfindungsrate lag bei 90% and 91% für DON and DOM-1 in Serum und bei 87% für jeweils DON and DOM-1 in Milchproben.

Die Bestätigung der Analysenergebnisse für die Milch erfolgte in Woche 28 mittels LC-MS-MS nach einer Methode von Valenta et al. (2008). Über die beantragte Probenmenge hinaus wurden 125 weitere Milchproben aus diesem Versuch mit der LC-MS/MS zur Bestätigung der HPLC-UV-Methode gemessen.

3. Ergebnisse

3.1 Ausführliche Darstellung der wichtigsten Ergebnisse

DON-Konzentrationen im Futter

Die Analyse der Futterproben ergab eine mittlere DON-Konzentration in den TMRs von 0.6 mg/kg T in Gruppe Control-30, 0.4 mg/kg T in Gruppe Control-60, 4.4 mg/kg T in Gruppe Myco-30 und 4.6 mg/kg T in Gruppe Myco-60. Die DON-Aufnahme der verschiedenen Gruppen (bezogen auf µg/kg Körpergewicht (BW)/Tag (d) über den gesamten Versuchszeitraum wird in Abbildung 1 gezeigt.

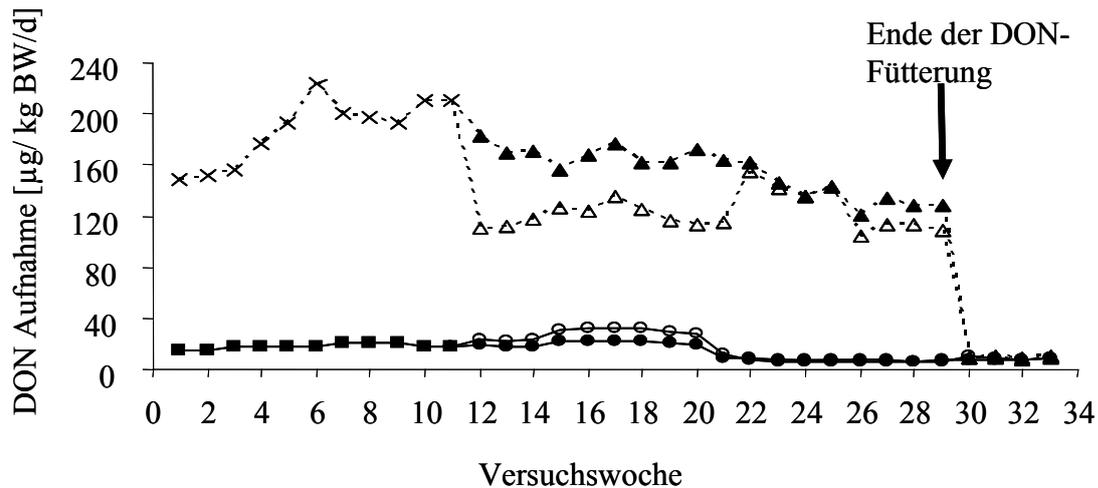


Abbildung 1: Entwicklung der DON-Aufnahme für die Fütterungsgruppen über den Versuchszeitraum (Periode 1: Woche 1-11, n=14/13; Periode 2: Woche 12-29, n=8).

Period 1: ■ Control Group -×- Myco Group

Period 2: ○ Control-30 -△- Myco-30 -●- Control-60 -▲- Myco-60

Mykotoxin-Rückstände in der Milch

Im Zwischenbericht wurde über 6 Milchproben berichtet, in denen DON in Konzentrationen um die Nachweisgrenze auftrat. Diese 6 Proben wurden nachanalysiert und die DON-Konzentrationen lagen diesmal unterhalb der Nachweisgrenze der HPLC-UV-Methode, so dass die vorherigen Ergebnisse nicht bestätigt wurden. Damit wurde weder in Periode 1 noch in Periode 2 mit der HPLC-UV-Methode nach Inkubation mit β -Glucuronidase nicht-metabolisiertes DON in den Milchproben nachgewiesen. In Periode 1 lagen bei Kühen, die die *Fusarium* toxin-kontaminierte Ration fraßen, die DOM-1 Konzentrationen in der Milch zwischen 0.6 and 2.2 $\mu\text{g}/\text{kg}$ Frischmilch. In Milchproben von den Kontrollkühen konnten weder DON- noch DOM-1 in Konzentrationen oberhalb der Nachweisgrenze gemessen werden. In Abbildung 2 wird der zeitliche Verlauf der DOM-1 Konzentration in der Milch gezeigt. Die tägliche DOM-1 Exkretion in die Milch lag zwischen 13.3 and 67.6 μg . Die totale Carry over Rate von aufgenommenen DON als DOM-1 in die Milch lag zwischen 0.0002 and 0.0006.

In Periode 2 lag die DOM-1-Konzentrationen in der Milch von Kühen, die die Mykotoxin-kontaminierte Ration bekamen, zwischen unterhalb der Nachweisgrenze und 3.2 $\mu\text{g}/\text{kg}$ Frischmilch. Bei den Kontrollkühen waren keine DOM-1-Rückstände nachweisbar. Der Abfall der Milch-DOM-1-Konzentrationen in Woche 20 ließ sich zurückführen auf eine

reduzierte Futter- und damit verbundene DON-Aufnahme am Tag vor und während der Milchprobennahme.

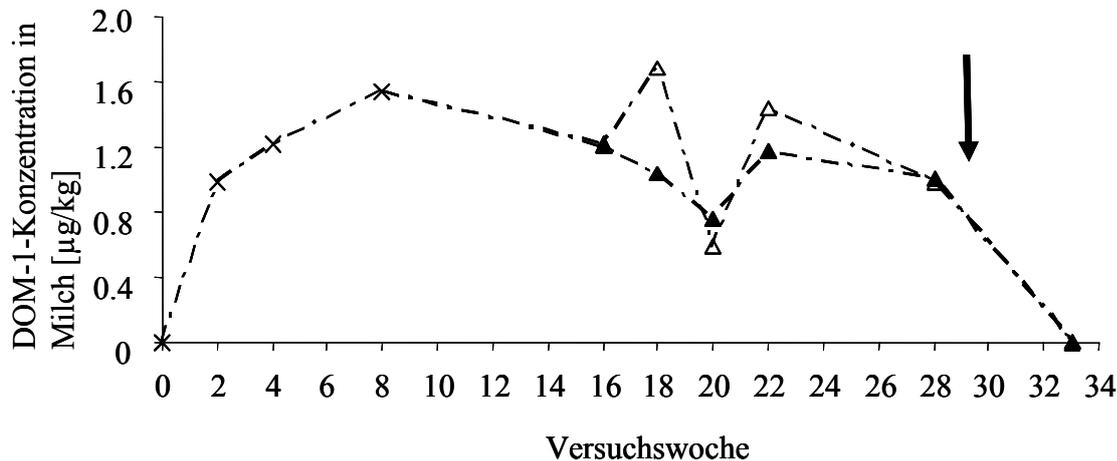


Abbildung 2: Entwicklung der DOM-1-Konzentration in der Milch für die Fütterungsgruppen über den Versuchszeitraum (Periode 1: Woche 1 bis 11, n=14/13; Periode 2: Woche 12 bis 29, n=8).

Period 1: ■ Control Group - × - Myco Group
 Period 2: ○ Control-30 △ Myco-30 ● Control-60 ▲ Myco-60

Der Konzentratanteil in der Ration beeinflusste weder die DOM-1 Konzentration in der Milch noch die DOM-1 Exkretion in die Milch, aber die totale Carry over Rate war signifikant höher in Gruppe Myco-30 (Tabelle 3).

Die totale Carry over Rate von aufgenommenem DON als DOM-1 in der Milch lag zwischen 0.0002 and 0.001 in Gruppe Myco-30 und zwischen 0.0001 and 0.001 in Gruppe Myco-60. Mit zunehmender Milchleistung nahm die Carry over Rate tendenziell zu, allerdings weniger deutlich als bei Seeling et al. (2006b) berichtet.

In Woche 28 wurden die Milchproben zusätzlich mit der sensitiveren LC-MS/MS-Methode analysiert. Zu diesem Entnahmezeitpunkt wurde DON nur in 2 Proben und in sehr niedrigen Konzentrationen nachgewiesen (0.1 µg DON/kg and 0.2 µg DON/kg Frischmilch). Die Ergebnisse der HPLC-UV-Methode waren hochsignifikant mit den Ergebnissen der LC-MS/MS-Methode korreliert und bestätigten die HPLC-Ergebnisse (für DOM-1: $y_{(LC-ESI-MS/MS)} = 0.01 + 0.889 \cdot x_{(HPLC-UV)}$; $***p < 0.001$, $r^2 = 0.99$). Die DOM-1-Konzentrationen, die mit der LC-MS/MS-Methode gemessen wurden, waren um ca. 11% niedriger als die mit der HPLC-

Methode bestimmten Konzentrationen. Die Analyse von weiteren 125 Milchproben aus diesem Versuch mit der LC-MS/MS-Methode bestätigte die gute Korrelation ($r^2=0.91$)

Die DOM-1-Konzentration in der Milch war signifikant linear korreliert mit der DOM-1-Konzentration im Serum ($y=0.702 + 0.891^{***} \cdot x$, $r^2=0.37$, $p<0.001$).

Milchproben, die nach einer Abfütterungsperiode von einer Woche (alle Kühe erhielten die Kontrolle-30-Ration) untersucht wurden, enthielten keine mit der HPLC-Methode messbaren Gehalte an DON oder DOM-1.

Mykotoxin-Rückstände im Serum

Kühe, die die kontaminierten Rationen erhielten, hatten signifikant höhere DON und DOM-1 Konzentrationen im Serum als Kontrollkühe. Während beider Perioden -und unabhängig vom Konzentratanteil- war nicht-metabolisiertes DON nur in sehr niedrigen Konzentrationen und nur in Einzeltieren meist nahe der Nachweisgrenze nachweisbar (in Periode 2 in Konzentrationen zwischen unterhalb der Nachweisgrenze und maximal 14 ng/ml). Der Metabolit DOM-1 hingegen war regelmäßig bei Mykotoxin-gefütterten Kühen nachweisbar und lag zwischen unterhalb der Nachweisgrenze und 69 ng/ml in Gruppe Myco-30 und zwischen 4 ng/ml und 52 ng/ml in Gruppe Myco-60. Kühe, die die Niedrigkonzentrationen erhielten, zeigten signifikant höhere DOM-1 Konzentrationen im Serum als Kühe, die die Hochkonzentrat-Rationen erhielten (Tabelle 4). In Serumproben von Kontrollkühen lagen die DOM-1-Konzentrationen zwischen unterhalb der Nachweisgrenze und maximal 36 ng/ml, resultierend aus der Hintergrund-Kontamination der eingesetzten Maissilage.

Weder die Anwesenheit von *Fusarium* Toxin-kontaminierter Triticale noch der Konzentratanteil beeinflussten das Metabolitenprofil von DON und DOM-1. Die zeitabhängige Entwicklung der DON und DOM-1 Konzentration wird in der Abbildung 3 gezeigt.

Die DOM-1-Konzentration im Serum war signifikant linear korreliert mit der täglichen DON-Aufnahme pro kg Körpergewicht.

Nach 3 Wochen Abfütterung waren die DOM-1 Rückstände im Serum bei allen Tieren auf einem niedrigen Kontrollniveau (siehe Abbildung 3).

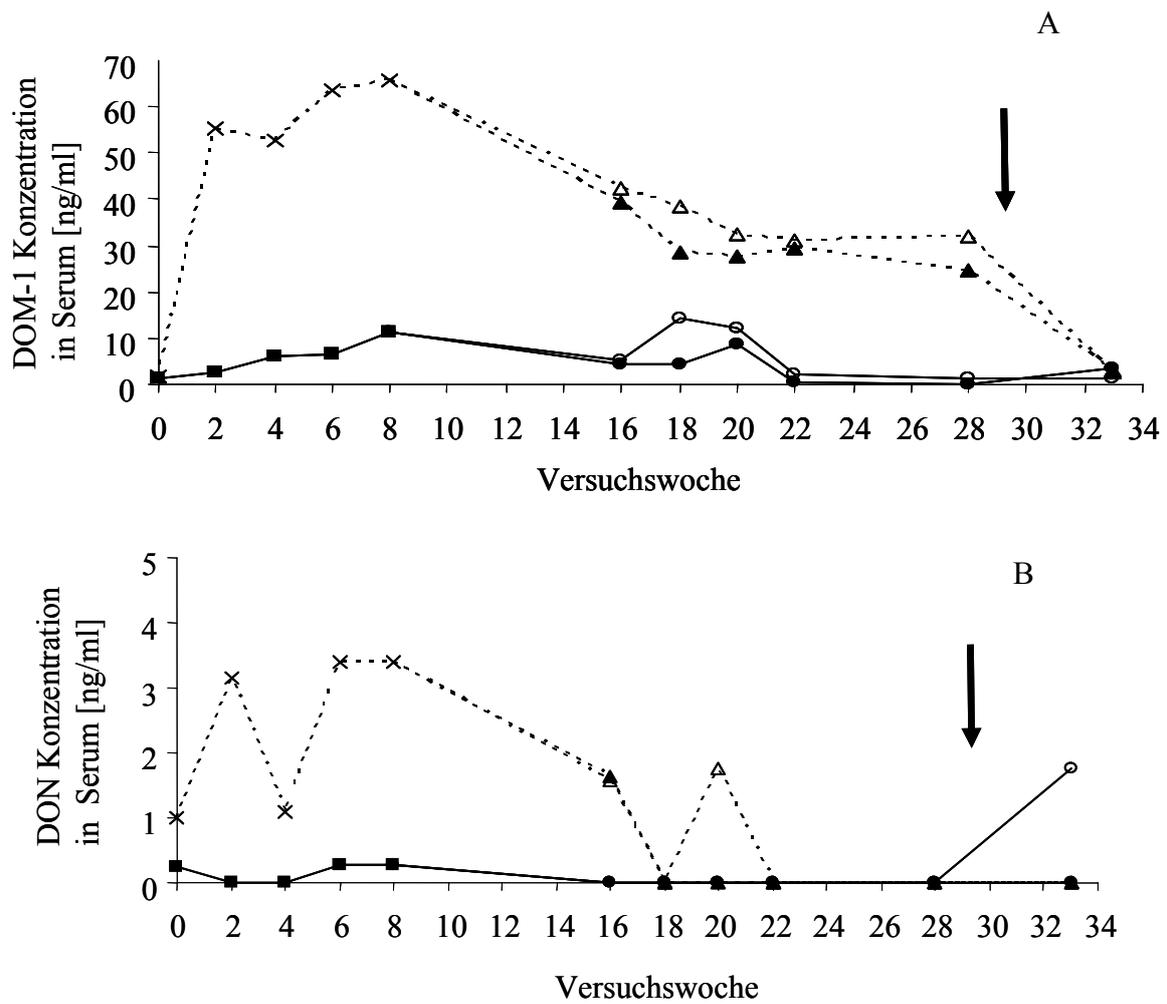


Abbildung 3: Entwicklung der DOM-1- (A) bzw. der DON -Konzentration (B) im Serum für die Fütterungsgruppen über den Versuchszeitraum (Periode 1: Woche 1-11, n=14/13; Periode 2: Woche 12-29, n=8). Der Pfeil kennzeichnet das Ende der DON-Fütterung und den Beginn der Abfütterung (alle Kühe auf Ration Control-30).

Period 1: ■ Control Group -×- Myco Group

Period 2: ○ Control-30 -△- Myco-30 -●- Control-60 -▲- Myco-60

Tabelle 3. DOM-1-Konzentration in der Milch von *Fusarium* Toxin-gefütterten Tieren in Periode 2 (LS means \pm Standardfehler, n=8)

	Gruppe	
	Myco-30	Myco-60
DOM-1 Konzentration in Milch [$\mu\text{g}/\text{kg}$ Frischmilch]	1.3 \pm 0.2	1.0 \pm 0.2
β (DON-Aufnahme ¹ * DOM-1 Konzentration in Milch)	0.010	0.005
DOM-1 Ausscheidung in Milch [$\mu\text{g}/\text{d}$]	34.9 \pm 3.2	29.1 \pm 3.1
β (DON-Aufnahme ² * DOM-1 Ausscheidung in Milch)	0.615	0.146
Carry over-Rate*	0.0004 ^a \pm 0.0	0.0003 ^b \pm 0.0
β (Milkmenge * Carry over-Rate)	0.00001	0.00003

¹ Aufnahme in μg pro kg Lebendmasse pro Tag

² Aufnahme in μg pro Tag

* definiert als DOM-1 Ausscheidung in die Milch in $\mu\text{g}/\text{d}$ im Verhältnis zur täglichen DON-Aufnahme in $\mu\text{g}/\text{d}$

Abkürzungen: β = Regressionskoeffizient, Periode 2= Woche 12-29, Myco-30= Kühe erhalten 30% Konzentrat und durchschnittlich 4.4 mg DON/kg T, Myco-60: Kühe erhalten 60% Konzentrat und durchschnittlich 4.6 mg DON/kg T

Tabelle 4. DOM-1-Konzentration in Serum und Galle aller Kühe in Periode 2 (LS means \pm Standardfehler, n=16)

	Konzentratanteil	
	Concentrate-30	Concentrate-60
DOM-1 in Serum [ng/ml]	27.7 ^a \pm 1.5	19.3 ^b \pm 1.4
β (DON Aufnahme ¹ * DOM-1 in Serum)	0.24	0.19
DOM-1 in Galle [ng/ml]	35.2 ^a \pm 3.4	22.4 ^b \pm 3.4
β (DON intake ¹ * DOM-1 in Galle)	0.33	0.28

¹ Aufnahme in μg pro kg Lebendmasse pro Tag

Abkürzungen: β = Regressionskoeffizient, Periode 2= Woche 12-29, Concentrate-30= Kontroll- und Myco-Kühe, die 30% Konzentrat erhalten, Concentrate-60= Kontroll- und Myco-Kühe, die 30% Konzentrat erhalten

Charakterisierung der Pansen pH-Werte im Hinblick auf den Konzentratanteil in der täglichen Ration

Pansen-pH-Werte, die als kritisch für die Entwicklung einer subakuten Pansenazidose (SARA) angesehen werden können (Werte unter 5.5), wurden bei Einzeltieren in Periode 1, jedoch nicht in Periode 2 gemessen (Abb. 4). Hierbei ist jedoch zu berücksichtigen, dass der pH zu den entsprechenden Probenahmezeitpunkten lediglich einmal innerhalb von 24 h gemessen wurde und die Tiere unter *ad libitum* Fütterungsbedingungen gehalten wurden, so dass Mahlzeiten-assoziierte Schwankungen im Pansen-pH versuchstechnisch bedingt nicht erfasst wurden. Zudem erfolgte die Gewinnung des Pansensaftes über eine Schlundsonde; bei

diesem Verfahren ist durch eine vermehrte Speichelsekretion mit geringfügig höheren pH-Werten zu rechnen, die Fütterungseffekte im Übergangsbereich zu einer SARA maskieren können.

Deshalb wurden weitere Indikatoren für SARA in die Untersuchung miteinbezogen (erniedrigte Milchfettkonzentration, erniedrigtes Milchfett:Protein-Verhältnis sowie erniedrigte Netto Säuren-Basen-Ausscheidung im Harn). Diese Parameter zeigten eine azidotische Belastung bei einigen Kühen in der Myco-Gruppe in Periode 1 an sowie bei einigen Kühen in beiden Hochkonzentratgruppen (Control- und Myco) in Periode 2, die auf SARA schließen lassen. Der Metabolismus und die Absorption von DON waren allerdings auch in betroffenen Kühen nicht beeinflusst (siehe oben).

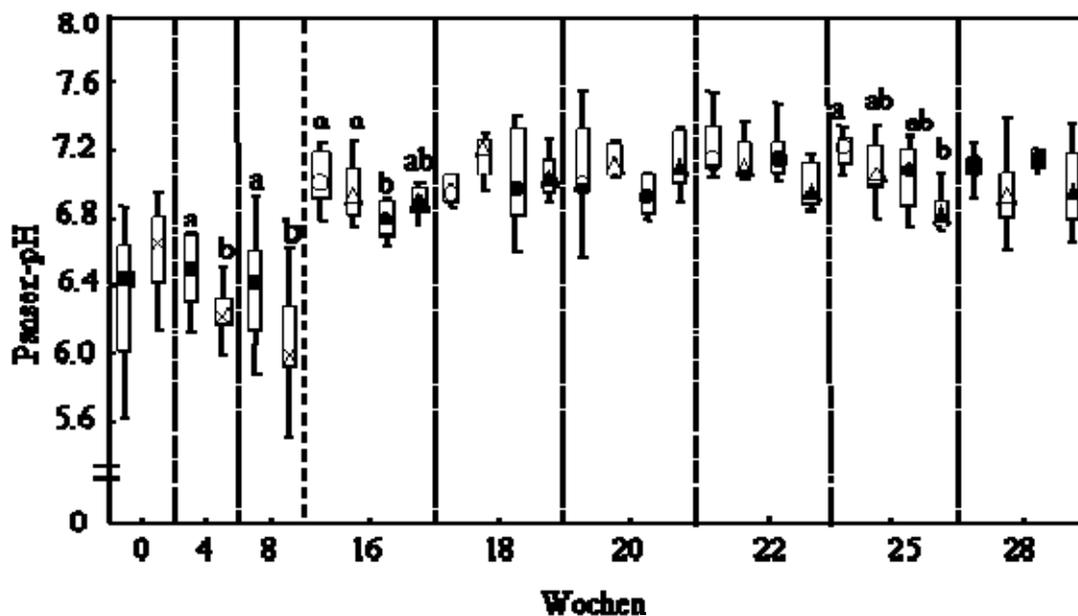


Abbildung 4: Entwicklung des Pansen-pH in Periode 1 (Woche 1-11, n=14/13) und Periode 2 (Woche 12-29, n=8) in den Fütterungsgruppen.

Unterschiedliche Buchstaben kennzeichnen signifikante Unterschiede zwischen den Versuchsgruppen innerhalb der Messpunkte ($p < 0.05$)

Median, Box: 25%, 75%, Whisker: Min, Max ohne Ausreißer

Period 1: ■ Control Group, × Myco Group

Period 2: ○ Control-30, △ Myco-30, ● Control-60, ▲ Myco-60

3.2 Voraussichtlicher Nutzen und Verwertbarkeit der Ergebnisse

Aus dem durchgeführten Versuch lässt sich ableiten, dass bei gesunden Kühen, die Rationen mit 30 bis 60% Konzentratanteil und DON-Konzentrationen zwischen 4.4 mg/kg T und 5.3 mg/kg T erhalten, nicht mit dem Auftreten von relevanten Konzentrationen von nicht metabolisierten DON in Serum und Milch zu rechnen ist.

Die höheren DOM-1-Rückstände bei Kühen, die 30% Konzentrat erhielten, sind vermutlich auf eine höhere Bioverfügbarkeit von DON aus der Maissilage und/oder auf die Präsenz von maskierten Mykotoxinen zurückzuführen. Daher sollte das Auftreten von maskierten Mykotoxinen und die Bioverfügbarkeit von DON in Abhängigkeit von der pflanzlichen Matrix in zukünftigen Studien untersucht werden. Außerdem sind weitere Studien nötig, die die Effekte praktisch relevanter DON-Konzentrationen bei klinisch gestörten Milchkühen und Mastbullen untersuchen.

4. Zusammenfassung

Ziel dieses Projektes war die Analyse von physiologischen Proben, die aus einem Milchkuhversuch stammten, in dem bei Kühen durch einen hohen Konzentratanteil in der Ration niedrige pH-Werte im Pansen erzeugt werden sollten und untersucht werden sollte, ob es im Vergleich zu einer Ration mit geringem Kraftfutteranteil zu einem Übertritt von Deoxynivalenol (DON) und/oder seinen Metaboliten in Blut und Milch kommen kann.

Im Rahmen dieses Projektes konnten die geplante Analysen von 192 Milchproben und 192 Serumproben auf Deoxynivalenol (DON) De-Epoxy-Deoxynivalenol (DOM-1), die Bestätigungsanalytik von 32 Milchproben zu einem Zeitpunkt im Versuch mittels LC-MS/MS sowie die Analyse von 30 Futterproben auf DON planmäßig durchgeführt werden. Zusätzlich wurden aus Eigenmitteln 55 weitere Milchproben mittels HPLC-UV-Methode auf DON und DOM-1 analysiert und die Analysenergebnisse in 125 weiteren Milchproben aus diesem Versuch zusätzlich mit der LC-MS/MS-Methode bestätigt. Außerdem konnten mit der Finanzierung aus Eigenmitteln zusätzlich 47 weitere Serumproben sowie 132 Galleproben analysiert werden.

In einer Vorperiode (Periode 1) wurden die Akzeptanz und die Effekte einer *Fusarium*-Toxin kontaminierten Triticale mit DON als hauptsächlichen Kontaminanten auf DON-Rückstände in Serum, Galle und Milch getestet. Dazu erhielten laktierende Deutsche Holstein-Kühe entweder eine *Fusarium*-Toxin kontaminierte TMR mit durchschnittlich 5.3 mg DON/ kg

Trockensubstanz (T) und einem Konzentratanteil von 50% und jeweils 25% Gras- und Maissilage (auf T-basis; Myco Group, n= 13) oder eine Kontrollration mit 50% Konzentrat; Control Group, n=14).

In der Hauptperiode (Periode 2), die direkt an Periode 1 anschloss und die über 18 Wochen durchgeführt wurde, wurden die gleichen 27 Kühe und 5 weitere Kühe (letztere nach entsprechender Anfütterung) in 4 Fütterungsgruppen unterteilt. In zwei Gruppen wurde der Konzentratanteil in der Ration auf 60% angehoben und die Effekte mit einem niedrigen Konzentratniveau von 30% verglichen. Es ergaben sich folgende Gruppen: Control-30 (30% Konzentrat), Myco-30 (30% Konzentrat, 4.4 mg DON und 0.07 mg ZON/kg T in der Ration), Control-60 (60% Konzentrat) und Myco-60 (60% Konzentrat, 4.6 mg DON und 0.07 mg ZON/kg T in der Ration). Anschließend folgte eine Abfütterungsphase, in der alle Kühe die Kontrollration mit 30% Konzentrat über vier Wochen erhielten und in der weitere Milch- (wöchentlich) und Serumproben (nach Abfütterungswoche 3) genommen wurden. Die Bestimmung von DON und DOM-1-Rückständen in Serum, Galle und Milch erfolgte nach einer Inkubation mit β -Glucuronidase mit einer HPLC-UV-Methode.

In Serum, Galle und Milch wurde während beider Perioden hauptsächlich DOM-1 nachgewiesen. Nicht-metabolisiertes DON trat im Serum nur in sehr niedrigen Konzentrationen (maximal 4 ng/ml) in Periode 1 und nur sporadisch in Periode 2 in Mykotoxin-gefütterten Kühen auf. In Periode 1 lagen die DOM-1 Konzentration in der Myko-Gruppe zwischen 22 und 123 ng/ml im Serum, bei unterhalb der Nachweisgrenze bis hin zu 391 ng/ml in der Galle und zwischen 0.6 und 2.2 μ g/kg Frischmilch. In Periode 2 zeigte sich, dass Kühe in den Niedrigkonzentratgruppen signifikant höhere DOM-1 Gehalte in Serum und Galle hatten, sowie bei Gruppe Myko-30 eine höhere Carry-over Rate verglichen mit Gruppe Myko-60. Die Carry-over Raten (als Verhältnis zwischen der täglichen Ausscheidung von DOM-1 in die Milch und der DON-Aufnahme) lagen zwischen 0.0002 und 0.0006 in der Myko-Gruppe in Periode 1, zwischen 0.0002 und 0.001 in Gruppe Myko-30 und zwischen 0.0001-0.001 in Gruppe Myko-60 in Periode 2. In der Milch von Kontrollkühen konnten weder in Periode 1 noch in Periode 2 DON/DOM-1-Rückstände nachgewiesen werden. Unabhängig vom Konzentratanteil konnte mit der HPLC-UV-Methode kein nicht-metabolisiertes DON in den Milchproben nachgewiesen werden. Mit der sensitiveren LC-MS/MS-Methode konnte von zusätzlich untersuchten Milchproben in Woche 28 nur in 2 Proben Spuren (≤ 0.2 μ g/kg Frischmilch) von nicht-metabolisiertem DON nachgewiesen werden. Weitere 125 der mit der LC-MS/MS-Methode analysierten Milchproben aus diesem Versuch bestätigten die gute Übereinstimmung der HPLC-Methode mit der LC-MS/MS-

Methode. Weiterhin zeigte sich ein Trend zu einer höheren Carry-over Rate (gezeigt für DOM-1) bei höherer Milchleistung.

Nach einwöchiger Fütterung der Kontroll-30-Ration an alle Kühe waren in den Milchproben keine DON-Rückstände mehr nachweisbar, und die DOM-1 Gehalte im Serum (untersucht nach 3 Wochen Abfütterung) waren auf ähnlich niedrigem Level wie in den Kontrolltieren. Dies lässt die Vermutung zu, dass DON-Rückstände nach der Exposition schnell ausgeschieden werden und sich vermutlich nicht im Tier ablagern.

Die höheren DOM-1-Rückstände bei Kühen, die 30% Konzentrat erhielten, sind vermutlich auf eine höhere Bioverfügbarkeit von DON aus der Maissilage und/oder auf die Präsenz von maskierten Mykotoxinen zurückzuführen. Daher sollte das Auftreten von maskierten Mykotoxinen und die Bioverfügbarkeit von DON in Abhängigkeit von der pflanzlichen Matrix in zukünftigen Studien untersucht werden.

Aus dem durchgeführten Versuch lässt sich ableiten, dass bei gesunden Kühen, die Rationen mit 30 bis 60% Konzentratanteil und DON-Konzentrationen zwischen 4.4 mg/kg T und 5.3 mg/kg T erhalten, nicht mit dem Auftreten von relevanten Konzentrationen von nicht metabolisierten DON in Serum und Milch zu rechnen ist.

5. Gegenüberstellung der ursprünglich geplanten zu den tatsächlich erreichten Ziele

Der Analysenplan wurde voll und ganz erfüllt. Zusätzlich konnten durch die Finanzierung aus Eigenmitteln noch die unter Punkt 1.1 bereits genannten weiteren Proben, u.a. Galleproben, auf DON und DOM-1 analysiert werden. Weiterhin wurden auch der Gesundheitsstatus und Leistungsparameter der Milchkühe, von den die analysierten Proben stammten, erfasst, um eine Aussage über Tiergesundheit und Leistung treffen zu können. Diese Ergebnisse sind bei Keese et al. (2008a, b) dargestellt.

6. Literaturverzeichnis

- Cote L-M, Dahlem AM, Yoshizawa T, Swanson SP, Buck WB. 1986. Excretion of deoxynivalenol and its metabolite in milk, urine, and feces of lactating cows. *J Dairy Sci.* 69:2416-2423.
- Dänicke S, Breves G, Überschär K-H, Valenta H. 2005a. *In vitro* study on the transfer of the *Fusarium* toxins deoxynivalenol (DON), zearalenone (ZON), alpha-zearalenol (α -ZOL) and beta-zearalenol (β -ZOL) across ruminal epithelium of sheep. *Proc Soc Nutr Physiol.* 14:97.
- Dänicke S, Matthäus K, Lebzien P, Stemme K, Überschär K-H, Fazeli-Razzazi E, Böhm J, Flachowsky G. 2005b. 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 AN Nutr.* 89:303-315.
- EC. 2006. Empfehlung der Kommission vom 17.08.06 betreffend das Vorhandensein von Deoxynivalenol, Zearalenon, Ochratoxin A, T-2- und HT-2-Toxin sowie von Fumonisin in zur Verfütterung an Tieren bestimmten Erzeugnissen (2006/576/EG). *Official Journal of the European Union.* 229:7-9.
- Glock RD, DeGroot BD. 1998. Sudden death of feedlot cattle. *J Anim Sci.* 76:315-319.
- Keese Ch, Meyer U, Rehage J, Spilke J, Boguhn J, Breves G, Dänicke S. 2008a. On the effects of the concentrate proportion of dairy cow rations in the presence and absence of a *Fusarium* toxin-contaminated triticale on cow performance. In press.
- Keese Ch, Meyer U, Rehage J, Spilke J, Boguhn J, Breves G, Dänicke S. 2008b. Ruminal fermentation patterns and parameters of the acid base metabolism in the urine as influenced by the proportion of concentrate in the ration of dairy cows with and without *Fusarium* toxin-contaminated triticale. In press.
- King RR, McQueen RE, Levesque D, Greenhalgh R. 1984. Transformation of deoxynivalenol (vomitoxin) by rumen microorganisms. *J Agric Food Chem.* 32:1181-1183.
- Kleen JL, Hooijer GA, Rehage J, Noordhuizen JPTM. 2003. Subacute Ruminal Acidosis (SARA): A review. *J Vet Med A.* 50:406-414.
- Nagaraja TG, Chengappa MM. 1998. Liver abscesses in feedlot cattle: a review. *J Anim Sci* 1998. 76:287-298.
- Oldenburg E, Bramm A, Valenta H. 2007. Influence of nitrogen fertilization on deoxynivalenol contamination of winter wheat - experimental field trials and evaluation of analytical methods. *Mycotoxin Res.* 23(1):7-12.
- Owens FN, Secrist DS, Hill WJ, Gill DR. 1998. Acidosis in cattle: A review. *J Anim Sci.* 76:275-286.
- Prelusky DB, Trenholm HL, Lawrence GA, Scott PM. 1984. Nontransmission of deoxynivalenol (vomitoxin) to milk following oral administration. *J Environ Sci Health.* B19 (7):593-609.

- Sabater Vilar M. 2003. Assessment and intervention of food- und feed-borne mycotoxines. PhD-Thesis.
- Seeling K, Dänicke S. 2005. Relevance of the *Fusarium* toxins deoxynivalenol and zearalenone in ruminant nutrition: A review. J Anim Feed Sci. 14:3-40.
- Seeling K, Dänicke S, Ueberschär K-H, Lebzien P, Flachowsky G. 2006a. On the effects of *Fusarium* toxin-contaminated wheat and wheat chaff on nutrient utilisation and turnover of deoxynivalenol and zearalenone in vitro (Rusitec). Toxicol in vitro. 20(5):703-711.
- Seeling K, Dänicke S, Valenta H, Egmond HP, Schothorst RC, Jekel AA, Lebzien P, Schollenberger M, Razzazi-Fazeli E, Flachowsky G. 2006b. Effects of *Fusarium* toxin-contaminated wheat and feed intake level on the biotransformation and carry over of deoxynivalenol in dairy cows. Food Addit Contam. 23(10):1008-1020.
- Valenta H, Dänicke S, Döll S. 2003. Analysis of deoxynivalenol and de-epoxy-deoxynivalenol in animal tissues by liquid chromatography after clean-up with an immunoaffinity column. Mycotoxin Res. 19:51-55.
- Valenta H, Keese C, Rohweder D, Dänicke S. 2008. Comparison of the determination of deoxynivalenol and de-epoxy-deoxynivalenol in milk and blood plasma by HPLC-MS/MS and HPLC-UV. Proc 30 Mykotoxin Workshop.

Anhang

Tabelle 5: Analysenwerte der Serumproben (HPLC-UV Methode nach Inkubation mit β -Glucuronidase)

Probennummer	Tiernummer	Probenart	Versuchsnummer	Datum	DON ¹ [ng/ml]	DOM-1 ¹ [ng/ml]
3668	Tier 211/DON	Serum/Rind	M 32	13/12/05	0	0
3194	Tier 12/Kontrolle	Serum/Kuh	M32	13/12/05	0	0
3196	Tier 247/Kontrolle	Serum/Kuh	M32	13/12/05	0	0
3197	Tier 256/Kontrolle	Serum/Kuh	M32	13/12/05	2	0
3201	Tier 265/Kontrolle	Serum/Kuh	M32	13/12/05	0	0
3203	Tier 303/Kontrolle	Serum/Kuh	M32	13/12/05	4	2
3204	Tier 306/Kontrolle	Serum/Kuh	M32	13/12/05	4	0
3206	Tier 310/Kontrolle	Serum/Kuh	M32	13/12/05	0	0
3210	Tier 349/Kontrolle	Serum/Kuh	M32	13/12/05	0	7
3211	Tier 356/Kontrolle	Serum/Kuh	M32	13/12/05	0	0
3213	Tier 363/Kontrolle	Serum/Kuh	M32	13/12/05	0	4
3214	Tier 364/Kontrolle	Serum/Kuh	M32	13/12/05	0	0
3216	Tier 924/Kontrolle	Serum/Kuh	M32	13/12/05	0	2
3217	Tier 955/Kontrolle	Serum/Kuh	M32	13/12/05	0	2
3219	Tier 246/Kontrolle	Serum/Kuh	M32	19/12/05	0	3
3671	Tier 211/DON	Serum/Rind	M 32	1/2/06	4	72
3427	Tier 012/Kontrolle	Serum/Rind	M 32	1/2/06	0	10
3428	Tier 256/ Kontrolle	Serum/Rind	M 32	1/2/06	0	7
3429	Tier 265/ Kontrolle	Serum/Rind	M 32	1/2/06	0	6
3430	Tier 310/ Kontrolle	Serum/Rind	M 32	1/2/06	0	11
3431	Tier 364 / Kontrolle	Serum/Rind	M 32	1/2/06	0	4
3432	Tier 924 / Kontrolle	Serum/Rind	M 32	1/2/06	2	0
3433	Tier 955 / Kontrolle	Serum/Rind	M 32	1/2/06	0	7
3434	Tier 246 / DON- Gruppe	Serum/Rind	M 32	1/2/06	3	50
3435	Tier 247 / DON- Gruppe	Serum/Rind	M 32	1/2/06	0	53
3436	Tier 257 / DON- Gruppe	Serum/Rind	M 32	1/2/06	0	77
3437	Tier 274 / DON- Gruppe	Serum/Rind	M 32	1/2/06	18	42

3438	Tier 303 / DON-Gruppe	Serum/Rind	M 32	1/2/06	0	73
3439	Tier 306 / DON-Gruppe	Serum/Rind	M 32	1/2/06	0	70
3440	Tier 341 / DON-Gruppe	Serum/Rind	M 32	1/2/06	3	75
3441	Tier 345 / DON-Gruppe	Serum/Rind	M 32	1/2/06	9	55
3442	Tier 348 / DON-Gruppe	Serum/Rind	M 32	1/2/06	2	62
3443	Tier 356 / DON-Gruppe	Serum/Rind	M 32	1/2/06	0	48
3444	Tier 362 / DON-Gruppe	Serum/Rind	M 32	1/2/06	3	79
3445	Tier 363 / DON-Gruppe	Serum/Rind	M 32	1/2/06	2	71
3672	Tier 211/DON	Serum/Rind	M 32	15/2/06	3	75
3447	Tier 012/Kontrolle	Serum/Rind	M 32	15/2/06	0	12
3448	Tier 256/Kontrolle	Serum/Rind	M 32	15/2/06	2	25
3449	Tier 265/Kontrolle	Serum/Rind	M 32	15/2/06	0	8
3450	Tier 310/Kontrolle	Serum/Rind	M 32	15/2/06	0	11
3451	Tier 364 / Kontrolle	Serum/Rind	M 32	15/2/06	0	9
3452	Tier 924 / Kontrolle	Serum/Rind	M 32	15/2/06	0	7
3453	Tier 955 / Kontrolle	Serum/Rind	M 32	15/2/06	0	6
3454	Tier 246 / DON-Gruppe	Serum/Rind	M 32	15/2/06	0	61
3455	Tier 247 / DON-Gruppe	Serum/Rind	M 32	15/2/06	0	59
3456	Tier 257 / DON-Gruppe	Serum/Rind	M 32	15/2/06	2	57
3457	Tier 274 / DON-Gruppe	Serum/Rind	M 32	15/2/06	7	48
3458	Tier 303 / DON-Gruppe	Serum/Rind	M 32	15/2/06	0	67
3459	Tier 306 / DON-Gruppe	Serum/Rind	M 32	15/2/06	2	79
3460	Tier 341 / DON-Gruppe	Serum/Rind	M 32	15/2/06	4	74
3461	Tier 345 / DON-Gruppe	Serum/Rind	M 32	15/2/06	6	68
3462	Tier 348 / DON-Gruppe	Serum/Rind	M 32	15/2/06	4	67
3463	Tier 356 / DON-Gruppe	Serum/Rind	M 32	15/2/06	2	53
3464	Tier 362 / DON-Gruppe	Serum/Rind	M 32	15/2/06	4	79
3465	Tier 363 / DON-Gruppe	Serum/Rind	M 32	15/2/06	4	68

3674	Tier 012/Kontrolle	Serum/Rind	M 32	4/4/06	0	4
3675	Tier 256/ Kontrolle	Serum/Rind	M 32	4/4/06	0	5
3676	Tier 265/ Kontrolle	Serum/Rind	M 32	4/4/06	0	5
3677	Tier 310/ Kontrolle	Serum/Rind	M 32	4/4/06	0	8
3678	Tier 364 / Kontrolle	Serum/Rind	M 32	4/4/06	0	4
3679	Tier 924 / Kontrolle	Serum/Rind	M 32	4/4/06	0	3
3680	Tier 955 / Kontrolle	Serum/Rind	M 32	4/4/06	0	5
3681	Tier 246 / DON- Gruppe	Serum/Rind	M 32	4/4/06	0	0
3682	Tier 247 / DON- Gruppe	Serum/Rind	M 32	4/4/06	0	42
3683	Tier 257 / DON- Gruppe	Serum/Rind	M 32	4/4/06	0	39
3684	Tier 274 / DON- Gruppe	Serum/Rind	M 32	4/4/06	0	28
3685	Tier 303 / DON- Gruppe	Serum/Rind	M 32	4/4/06	0	48
3686	Tier 306 / DON- Gruppe	Serum/Rind	M 32	4/4/06	0	52
3687	Tier 341 / DON- Gruppe	Serum/Rind	M 32	4/4/06	0	33
3688	Tier 345 / DON- Gruppe	Serum/Rind	M 32	4/4/06	0	34
3689	Tier 348 / DON- Gruppe	Serum/Rind	M 32	4/4/06	4	52
3690	Tier 356 / DON- Gruppe	Serum/Rind	M 32	4/4/06	0	38
3691	Tier 362 / DON- Gruppe	Serum/Rind	M 32	4/4/06	3	69
3692	Tier 363 / DON- Gruppe	Serum/Rind	M 32	4/4/06	0	45
3693	Tier 211/DON- Gruppe	Serum/Rind	M 32	4/4/06	6	51
3694	Tier 315 / Kontrolle	Serum/Rind	M 32	4/4/06	0	5
3695	Tier 038/ DON- Gruppe	Serum/Rind	M 32	4/4/06	2	48
3696	Tier 261 / DON- Gruppe	Serum/Rind	M 32	4/4/06	0	51
3729	Tier 012/Kontrolle	Serum/Rind	M 32	19/4/06	0	6
3730	Tier 256/ Kontrolle	Serum/Rind	M 32	19/4/06	0	36
3731	Tier 265/ Kontrolle	Serum/Rind	M 32	19/4/06	0	0
3732	Tier 310/ Kontrolle	Serum/Rind	M 32	19/4/06	0	8

3733	Tier 315 / Kontrolle	Serum/Rind	M 32	19/4/06	0	6
3734	Tier 364 / Kontrolle	Serum/Rind	M 32	19/4/06	0	7
3735	Tier 924 / Kontrolle	Serum/Rind	M 32	19/4/06	0	7
3736	Tier 955 / Kontrolle	Serum/Rind	M 32	19/4/06	0	5
3737	Tier 038 / DON- Gruppe	Serum/Rind	M 32	19/4/06	0	44
3738	Tier 211 / DON- Gruppe	Serum/Rind	M 32	19/4/06	0	42
3739	Tier 246 / DON- Gruppe	Serum/Rind	M 32	19/4/06	0	36
3740	Tier 247 / DON- Gruppe	Serum/Rind	M 32	19/4/06	0	38
3741	Tier 257 / DON- Gruppe	Serum/Rind	M 32	19/4/06	0	32
3742	Tier 261 / DON- Gruppe	Serum/Rind	M 32	19/4/06	0	15
3743	Tier 274 / DON- Gruppe	Serum/Rind	M 32	19/4/06	0	17
3744	Tier 303 / DON- Gruppe	Serum/Rind	M 32	19/4/06	0	26
3745	Tier 306 / DON- Gruppe	Serum/Rind	M 32	19/4/06	0	37
3746	Tier 341 / DON- Gruppe	Serum/Rind	M 32	19/4/06	0	17
3747	Tier 345 / DON- Gruppe	Serum/Rind	M 32	19/4/06	0	34
3748	Tier 348 / DON- Gruppe	Serum/Rind	M 32	19/4/06	0	37
3749	Tier 356 / DON- Gruppe	Serum/Rind	M 32	19/4/06	0	27
3750	Tier 362 / DON- Gruppe	Serum/Rind	M 32	19/4/06	0	46
3751	Tier 363 / DON- Gruppe	Serum/Rind	M 32	19/4/06	0	38
3752	Tier 977 / DON- Gruppe	Serum/Rind	M 32	19/4/06	0	47
3839	Tier 012/Kontrolle	Serum/Rind	M 32	2/5/06	0	6
3840	Tier 256/ Kontrolle	Serum/Rind	M 32	2/5/06	0	19
3841	Tier 265/ Kontrolle	Serum/Rind	M 32	2/5/06	0	9
3842	Tier 310/ Kontrolle	Serum/Rind	M 32	2/5/06	0	12
3843	Tier 315 / Kontrolle	Serum/Rind	M 32	2/5/06	0	11
3844	Tier 364 / Kontrolle	Serum/Rind	M 32	2/5/06	0	12
3845	Tier 924 / Kontrolle	Serum/Rind	M 32	2/5/06	0	7

3846	Tier 955 / Kontrolle	Serum/Rind	M 32	2/5/06	0	8
3847	Tier 038 / DON- Gruppe	Serum/Rind	M 32	2/5/06	0	33
3848	Tier 211 / DON- Gruppe	Serum/Rind	M 32	2/5/06	0	36
3849	Tier 246 / DON- Gruppe	Serum/Rind	M 32	2/5/06	14	30
3850	Tier 247 / DON- Gruppe	Serum/Rind	M 32	2/5/06	0	17
3851	Tier 257 / DON- Gruppe	Serum/Rind	M 32	2/5/06	0	13
3852	Tier 261 / DON- Gruppe	Serum/Rind	M 32	2/5/06	0	33
3853	Tier 274 / DON- Gruppe	Serum/Rind	M 32	2/5/06	0	23
3854	Tier 303 / DON- Gruppe	Serum/Rind	M 32	2/5/06	0	21
3855	Tier 306 / DON- Gruppe	Serum/Rind	M 32	2/5/06	0	39
3856	Tier 341 / DON- Gruppe	Serum/Rind	M 32	2/5/06	0	25
3857	Tier 345 / DON- Gruppe	Serum/Rind	M 32	2/5/06	0	28
3858	Tier 348 / DON- Gruppe	Serum/Rind	M 32	2/5/06	0	43
3859	Tier 356 / DON- Gruppe	Serum/Rind	M 32	2/5/06	0	32
3860	Tier 362 / DON- Gruppe	Serum/Rind	M 32	2/5/06	0	49
3861	Tier 363 / DON- Gruppe	Serum/Rind	M 32	2/5/06	0	28
3862	Tier 977 / DON- Gruppe	Serum/Rind	M 32	2/5/06	0	30
4091	Tier 012/Kontrolle	Serum/Rind	M 32	19/5/06	0	0
4092	Tier 256/ Kontrolle	Serum/Rind	M 32	19/5/06	0	2
4093	Tier 265/ Kontrolle	Serum/Rind	M 32	19/5/06	0	0
4094	Tier 310/ Kontrolle	Serum/Rind	M 32	19/5/06	0	4
4095	Tier 315 / Kontrolle	Serum/Rind	M 32	19/5/06	0	2
4096	Tier 364 / Kontrolle	Serum/Rind	M 32	19/5/06	0	2
4097	Tier 924 / Kontrolle	Serum/Rind	M 32	19/5/06	0	0
4098	Tier 955 / Kontrolle	Serum/Rind	M 32	19/5/06	0	0
4099	Tier 038 / DON- Gruppe	Serum/Rind	M 32	19/5/06	0	29
4100	Tier 211 / DON- Gruppe	Serum/Rind	M 32	19/5/06	0	23

4101	Tier 246 / DON-Gruppe	Serum/Rind	M 32	19/5/06	0	29
4102	Tier 247 / DON-Gruppe	Serum/Rind	M 32	19/5/06	0	23
4103	Tier 257 / DON-Gruppe	Serum/Rind	M 32	19/5/06	0	28
4104	Tier 261 / DON-Gruppe	Serum/Rind	M 32	19/5/06	0	4
4105	Tier 274 / DON-Gruppe	Serum/Rind	M 32	19/5/06	0	33
4106	Tier 303 / DON-Gruppe	Serum/Rind	M 32	19/5/06	0	26
4107	Tier 306 / DON-Gruppe	Serum/Rind	M 32	19/5/06	0	33
4108	Tier 341 / DON-Gruppe	Serum/Rind	M 32	19/5/06	0	34
4109	Tier 345 / DON-Gruppe	Serum/Rind	M 32	19/5/06	0	37
4110	Tier 348 / DON-Gruppe	Serum/Rind	M 32	19/5/06	0	43
4111	Tier 356 / DON-Gruppe	Serum/Rind	M 32	19/5/06	0	19
4112	Tier 362 / DON-Gruppe	Serum/Rind	M 32	19/5/06	0	50
4113	Tier 363 / DON-Gruppe	Serum/Rind	M 32	19/5/06	0	32
4114	Tier 977 / DON-Gruppe	Serum/Rind	M 32	19/5/06	0	42
4195	Tier 012/Kontrolle	Serum/Rind	M 32	26/6/06	0	0
4196	Tier 256/Kontrolle	Serum/Rind	M 32	26/6/06	0	2
4197	Tier 265/Kontrolle	Serum/Rind	M 32	26/6/06	0	0
4198	Tier 310/Kontrolle	Serum/Rind	M 32	26/6/06	0	2
4199	Tier 315 / Kontrolle	Serum/Rind	M 32	26/6/06	0	0
4200	Tier 364 / Kontrolle	Serum/Rind	M 32	26/6/06	0	0
4201	Tier 924 / Kontrolle	Serum/Rind	M 32	26/6/06	0	2
4202	Tier 955 / Kontrolle	Serum/Rind	M 32	26/6/06	0	0
4203	Tier 038 / DON-Gruppe	Serum/Rind	M 32	26/6/06	0	32
4204	Tier 211 / DON-Gruppe	Serum/Rind	M 32	26/6/06	0	45
4205	Tier 246 / DON-Gruppe	Serum/Rind	M 32	26/6/06	0	28
4206	Tier 247 / DON-Gruppe	Serum/Rind	M 32	26/6/06	0	31
4207	Tier 257 / DON-Gruppe	Serum/Rind	M 32	26/6/06	0	4

4208	Tier 261 / DON-Gruppe	Serum/Rind	M 32	26/6/06	0	33
4209	Tier 274 / DON-Gruppe	Serum/Rind	M 32	26/6/06	0	19
4210	Tier 303 / DON-Gruppe	Serum/Rind	M 32	26/6/06	0	36
4211	Tier 306 / DON-Gruppe	Serum/Rind	M 32	26/6/06	0	19
4212	Tier 341 / DON-Gruppe	Serum/Rind	M 32	26/6/06	0	27
4213	Tier 345 / DON-Gruppe	Serum/Rind	M 32	26/6/06	0	31
4214	Tier 348 / DON-Gruppe	Serum/Rind	M 32	26/6/06	0	32
4215	Tier 356 / DON-Gruppe	Serum/Rind	M 32	26/6/06	0	20
4216	Tier 362 / DON-Gruppe	Serum/Rind	M 32	26/6/06	0	28
4217	Tier 363 / DON-Gruppe	Serum/Rind	M 32	26/6/06	0	29
4218	Tier 977 / DON-Gruppe	Serum/Rind	M 32	26/6/06	0	37
4440	Tier 012/Kontrolle	Serum	M 32 / Abfütterung	2/8/06	0	0
4441	Tier 256/ Kontrolle	Serum	M 32 / Abfütterung	2/8/06	0	0
4442	Tier 265/ Kontrolle	Serum	M 32 / Abfütterung	2/8/06	0	0
4443	Tier 310/ Kontrolle	Serum	M 32 / Abfütterung	2/8/06	0	0
4444	Tier 315 / Kontrolle	Serum	M 32 / Abfütterung	2/8/06	0	0
4445	Tier 364 / Kontrolle	Serum	M 32 / Abfütterung	2/8/06	0	6
4446	Tier 924 / Kontrolle	Serum	M 32 / Abfütterung	2/8/06	0	0
4447	Tier 955 / Kontrolle	Serum	M 32 / Abfütterung	2/8/06	0	0
4448	Tier 038 / DON-Gruppe	Serum	M 32 / Abfütterung	2/8/06	0	2
4449	Tier 211 / DON-Gruppe	Serum	M 32 / Abfütterung	2/8/06	0	0
4450	Tier 246 / DON-Gruppe	Serum	M 32 / Abfütterung	2/8/06	0	0
4451	Tier 247 / DON-Gruppe	Serum	M 32 / Abfütterung	2/8/06	0	0
4452	Tier 257 / DON-Gruppe	Serum	M 32 / Abfütterung	2/8/06	0	0
4453	Tier 261 / DON-Gruppe	Serum	M 32 / Abfütterung	2/8/06	0	3
4454	Tier 274 / DON-Gruppe	Serum	M 32 / Abfütterung	2/8/06	0	2
4455	Tier 303 / DON-Gruppe	Serum	M 32 / Abfütterung	2/8/06	0	2

4456	Tier 306 / DON-Gruppe	Serum	M 32 / Abfütterung	2/8/06	0	3
4457	Tier 341 / DON-Gruppe	Serum	M 32 / Abfütterung	2/8/06	0	5
4458	Tier 345 / DON-Gruppe	Serum	M 32 / Abfütterung	2/8/06	0	4
4459	Tier 348 / DON-Gruppe	Serum	M 32 / Abfütterung	2/8/06	0	6
4460	Tier 356 / DON-Gruppe	Serum	M 32 / Abfütterung	2/8/06	0	3
4461	Tier 362 / DON-Gruppe	Serum	M 32 / Abfütterung	2/8/06	0	4
4462	Tier 363 / DON-Gruppe	Serum	M 32 / Abfütterung	2/8/06	0	6
4463	Tier 977 / DON-Gruppe	Serum	M 32 / Abfütterung	2/8/06	0	3

¹ Nachweisgrenze von DON und DOM-1 im Serum (HPLC-UV-Methode): 2 ng/ml