

# **TECHNISCHE UNIVERSITÄT MÜNCHEN**

Wissenschaftszentrum Weihenstephan für Ernährung, Landnutzung und Umwelt

Department für Tierwissenschaften

Lehrstuhl für Tierhygiene

## **EINFLUSS VON ROQUEFORTIN C AUF TIERGESUNDHEIT UND LEBENSMITTELQUALITÄT BEI WIEDERKÄUERN**

**Georg Tüller**

Vollständiger Abdruck der von der Fakultät Wissenschaftszentrum Weihenstephan für Ernährung, Landnutzung und Umwelt der Technischen Universität München zur Erlangung des akademischen Grades eines

**Doktors der Agrarwissenschaften**

**(Dr. agr.)**

genehmigten Dissertation.

Vorsitzender: Univ.-Prof. Dr. H.-R. Fries

Prüfer der Dissertation: 1. Univ.-Prof. Dr. J. Bauer  
2. apl. Prof. Dr. D. Schams (i. R.)

Die Dissertation wurde am 09.08.2005 bei der Technischen Universität München eingereicht und durch die Fakultät Wissenschaftszentrum Weihenstephan für Ernährung, Landnutzung und Umwelt am 30.11.2005 angenommen.

# INHALTSVERZEICHNIS

<b>1</b>	<b>EINLEITUNG .....</b>	<b>7</b>
<b>2</b>	<b>LITERATUR .....</b>	<b>8</b>
2.1	CHEMISCH-PHYSIKALISCHE EIGENSCHAFTEN VON ROQUEFORTIN.....	8
2.2	ROQUEFORTINBILDENDE PILZE .....	10
2.3	ROQUEFORTINBIOSYNTHESE .....	14
2.4	VORKOMMEN VON ROQUEFORTIN IN FUTTERMITTELN.....	15
2.5	BIOLOGISCHE WIRKUNG .....	15
2.5.1	Wirkung gegenüber Prokaryonten .....	15
2.5.2	Wirkung in Zellkultursystemen.....	16
2.5.3	Wirkung gegenüber Makroorganismen.....	17
2.6	METABOLISMUS VON ROQUEFORTIN.....	19
<b>3</b>	<b>MATERIAL UND METHODEN .....</b>	<b>21</b>
3.1	MATERIAL UND GERÄTSCHAFTEN.....	21
3.1.1	Chemikalien .....	21
3.1.2	Referenzsubstanz.....	21
3.1.3	Gerätschaften.....	22
3.1.4	Gefäße für die Blutuntersuchung .....	22
3.1.5	Nährmedien.....	23
3.2	METHODEN .....	24
3.2.1	Herstellung von Roquefortin.....	24
3.2.2	Vorversuche .....	24
3.2.2.1	Selektion eines potenten roquefortinbildenden P. roqueforti-Stammes.....	24
3.2.2.2	Nährmedienoptimierung hinsichtlich Roquefortinproduktion.....	25
3.2.3	Herstellung und Reinigung von Roquefortin für das Versuchsvorhaben.....	26
3.2.3.1	Herstellung von Roquefortinkapseln .....	29
3.2.4	Durchführung des Tierversuches .....	30
3.2.4.1	Tiermaterial .....	30
3.2.4.2	Haltung und Fütterung der Tiere .....	31
3.2.4.3	Implantation der Venenverweilkatheter.....	32
3.2.4.4	Versuchsdesign und Probennahmen .....	33
3.2.4.5	Probenaufbereitung und -lagerung .....	36
3.2.4.6	Euthanasie und Sektion der Tiere.....	36
3.2.5	Nachweis von LH, FSH und Progesteron .....	37
3.2.6	Mikrobiologische Pansensaftuntersuchung .....	37
3.2.7	Chemisch-physikalischer Roquefortinnachweis.....	38
3.2.8	Herstellung und Eichung des Roquefortinstandards.....	40
3.2.9	HPLC-Verfahren zum Nachweis von Roquefortin .....	41
3.2.10	Methodenvalidierung .....	42
3.2.11	Statistische Auswertungen.....	43
<b>4</b>	<b>ERGEBNISSE .....</b>	<b>44</b>
4.1	HERSTELLUNG VON ROQUEFORTIN .....	44

4.1.1	<i>Vorversuche</i> .....	44
4.1.1.1	Selektion eines geeigneten <i>P. roqueforti</i> Stammes .....	44
4.1.1.2	Nährmedienoptimierung .....	46
4.1.2	<i>Herstellung und Reinigung von Roquefortin für das Versuchsvorhaben</i> .....	48
4.2	ERGEBNISSE DER METHODENVALIDIERUNG .....	52
4.3	RESULTATE DES FÜTTERUNGSVERSUCHES .....	53
4.3.1	<i>Klinische, hämatologische und Klinisch-chemische Resultate</i> .....	53
4.3.2	<i>Ergebnisse der hämatologischen Untersuchungen</i> .....	54
4.3.3	<i>Ergebnisse der klinisch-chem. Untersuchungen</i> .....	57
4.3.4	<i>Pansensaft: pH-Werte</i> .....	59
4.3.5	<i>Resultate der endokrinologischen Untersuchungen</i> .....	60
4.3.6	<i>Patholog. Anatomische Untersuchungen</i> .....	65
4.3.6.1	Kontrollgruppe ( 0 mg Roquefortin pro Tag) .....	65
4.3.6.2	Behandlungsgruppe M (10 mg Roquefortin pro Tag) .....	66
4.3.6.3	Behandlungsgruppe H (50 mg Roquefortin pro Tag) .....	66
4.3.7	<i>Resultate der Rückstandsuntersuchungen</i> .....	66
4.3.7.1	Roquefortinausscheidung in Harn und Faeces .....	66
4.3.7.2	Roquefortingehalte in Geweben und Körperflüssigkeiten .....	67
<b>5</b>	<b>DISKUSSION .....</b>	<b>72</b>
5.1	HERSTELLUNG VON ROQUEFORTIN .....	72
5.1.1	<i>Vorversuche</i> .....	72
5.1.2	<i>Produktion von Roquefortin für den Fütterungsversuch</i> .....	73
5.2	FÜTTERUNGSVERSUCH .....	75
5.2.1	<i>Allgemeinbefinden, klinisch-chemische und hämatologische Daten</i> .....	75
5.2.1.1	Pansensaft .....	78
5.2.2	<i>Endokrinologische Daten</i> .....	79
5.2.3	<i>Pathologisch-anatomische und histologische Befunde</i> .....	80
5.2.4	<i>Roquefortinnachweis</i> .....	81
5.2.4.1	Methodik .....	81
5.2.4.2	Gehalte in Geweben, Körperflüssigkeiten und Exkreten .....	81
5.2.5	<i>Antibiotische Aktivität</i> .....	84
<b>6</b>	<b>ZUSAMMENFASSUNG .....</b>	<b>85</b>
<b>7</b>	<b>SUMMARY .....</b>	<b>87</b>
<b>8</b>	<b>LITERATUR .....</b>	<b>89</b>
<b>9</b>	<b>ANHANG .....</b>	<b>99</b>
9.1	..PATHOLOGISCH-ANATOMISCHE BEFUNDE .....	100
9.2	ERGEBNISSE DER GROBSINNLICHEN PANSENSAFTUNTERSUCHUNG .....	118
9.3	ROQUEFORTINRÜCKSTÄNDE IN FAECES .....	119
9.4	ERGEBNISSE DER ENDOKRINOLOGISCHEN UNTERSUCHUNGEN .....	121

# TABELLENVERZEICHNIS

TABELLE 1: POLARIMETRIEDATEN VON ROQUEFORTIN - NAD-LINIE, $\lambda=589$ NM.....	9
TABELLE 2: ROQUEFORTINBILDENDE PENICILLIUM-ARTEN .....	11
TABELLE 3. VORKOMMEN VON PILZARTEN DER GATTUNGEN PENICILLIUM UND ASPERGILLUS IN GÄRFUTTERMITTELN (ARMBRUSTER, 1994) .....	13
TABELLE 4. NATÜRLICHES VORKOMMEN VON ROQUEFORTIN IN FUTTERMITTELN .....	15
TABELLE 5. TOXIZITÄTSDATEN VON ROQUEFORTIN .....	18
TABELLE 6. VERZEICHNIS DER AUF DAS ROQUEFORTINBILDUNGSVERMÖGEN UNTERSUCHTEN P. ROQUEFORTI- ISOLATE .....	25
TABELLE 7. EINTEILUNG DER TIERE IN DIE EINZELNEN BEHANDLUNGSGRUPPEN UND DURCHGÄNGE.....	30
TABELLE 8. ZUSAMMENSETZUNG DER FUTTERRATION. - TABELLENWERTE AUS: KIRCHGESSNER, 1987 .....	31
TABELLE 9: SCHEMA DER PROBENNAHMEN WÄHREND KONTROLL- UND BELASTUNGSPERIODE.....	34
TABELLE 10: PROBENAUFBEREITUNG DER EINZELNEN MATERIALIEN.....	39
TABELLE 11. METHODENVALIDIERUNG: ROQUEFORTINKONZENTRATIONEN, ANZAHL DER WIEDERHOLUNGEN UND HERKUNFT DES PROBENMATERIALS .....	42
TABELLE 12. ROQUEFORTINBILDUNGSVERMÖGEN VERSCHIEDENER P. ROQUEFORTI STÄMME.....	45
TABELLE 13: BILDUNG VON ROQUEFORTIN (STAMM-NR. 13) BEI UNTERSCHIEDLICHEN TRYPTOPHAN- UND HISTIDINSUPPLEMENTIERUNGEN .....	46
TABELLE 14: EINFLUSS UNTERSCHIEDLICHER ESSIGSÄUREZUSÄTZE AUF DIE ROQUEFORTINSYNTHESE VON STAMM-NR. 13 .....	47
TABELLE 15. ERGEBNISSE DER METHODENVALIDIERUNG.....	52
TABELLE 16. GEWICHTSENTWICKLUNG DER SCHAFE WÄHREND DES VERSUCHSZEITRAUMS .....	53
TABELLE 17. MITTLERE pH-WERTE DER PANSENSAFTPROBEN. ....	59
TABELLE 18. ZYKLUSLÄNGEN DER SCHAFE WÄHREND VOR (KONTROLL) UND BEHANDLUNGSPERIODE: K: 0,0 MG ROQUEFORTIN / TIER U. TAG; M: 10,0 MG ROQUEFORTIN / TIER U. TAG; H: 50,0 MG ROQUEFORTIN / TIER U. TAG.....	64
TABELLE 19. ROQUEFORTINRÜCKSTÄNDE IN NIEREN: K: 0,0 MG ROQUEFORTIN / TIER U. TAG; M:10,0 MG ROQUEFORTIN / TIER UND TAG; H: 50 MG ROQUEFORTIN /TIER U. TAG. ....	67
TABELLE 20. ROQUEFORTINRÜCKSTÄNDE IN DER SKELETTMUSKULATUR: K: 0,0 MG ROQUEFORTIN / TIER U. TAG; M:10,0 MG ROQUEFORTIN / TIER UND TAG; H: 50 MG ROQUEFORTIN /TIER U. TAG.....	68
TABELLE 21. ROQUEFORTINRÜCKSTÄNDE IN DER HERZMUSKULATUR: K: 0,0 MG ROQUEFORTIN / TIER U. TAG; M:10,0 MG ROQUEFORTIN / TIER UND TAG; H: 50 MG ROQUEFORTIN /TIER U. TAG.....	69
TABELLE 22. ROQUEFORTINRÜCKSTÄNDE IN FETTGeweBE: K: 0,0 MG ROQUEFORTIN / TIER U. TAG; M:10,0 MG ROQUEFORTIN / TIER UND TAG; H: 50 MG ROQUEFORTIN /TIER U. TAG. ....	69

TABELLE 23. ROQUEFORTINRÜCKSTÄNDE IN LEBERGEWEBE: K: 0,0 MG ROQUEFORTIN / TIER U. TAG; M:10,0 MG ROQUEFORTIN / TIER UND TAG; H: 50 MG ROQUEFORTIN /TIER U. TAG. ....	70
TABELLE 24. ROQUEFORTINGEHALTE IM GALLENSAFT DER TIERE: K: 0,0 MG ROQUEFORTIN / TIER U. TAG; M:10,0 MG ROQUEFORTIN / TIER UND TAG; H: 50 MG ROQUEFORTIN /TIER U. TAG.....	70
TABELLE 25. ROQUEFORTINGEHALTE IM PANSENSAFT: K: 0,0 MG ROQUEFORTIN / TIER U. TAG; M:10,0 MG ROQUEFORTIN / TIER UND TAG; H: 50 MG ROQUEFORTIN /TIER U. TAG. ....	71
TABELLE 26. BEREICH DER GEMESSENEN KLIN.-CHEM. UND HÄMATOLOGISCHEN PARAMETER IM VERGLEICH ZU NORMEBEREICHSANGABEN (KRAFT U. DÜRR,1985).- <i>MITTELWERTE DER DURCHGÄNGE I UND II</i> .....	77
TABELLE 27. ROQUEFORTINGEHALTE IM KOT DER MIT 50 MG ROQUEFORTIN PRO TAG BEHANDELTEN TIERE. ....	119
TABELLE 28. ROQUEFORTINGEHALTE IM KOT DER MIT 10 MG ROQUEFORTIN PRO TAG BEHANDELTEN TIERE ....	120

# ABBILDUNGSVERZEICHNIS

ABBILDUNG 1. STRUKTURFORMEL VON ROQUEFORTIN .....	8
ABBILDUNG 2. BIOSYNTHESEWEG VON ROQUEFORTIN .....	14
ABBILDUNG 3. REINIGUNG VON ROQUEFORTINHALTIGEN KULTURROHEXTRAKTEN.....	27
ABBILDUNG 4: SKIZZE DES SCHAFSTALLS (NICHT MAßSTABGETREU).....	31
ABBILDUNG 5. SCHEMATISCHE DARSTELLUNG EINES VERSUCHSDURCHGANGS.....	33
ABBILDUNG 6. HPLC-CHROMATOGRAMM VON ROQUEFORTINSTANDARD.....	49
ABBILDUNG 7. HPLC-CHROMATOGRAMM DER ROQUEFORTINPRÄPARATION.....	49
ABBILDUNG 8. HPLC-SPEKTREN VON ROQUEFORTIN-STANDARD UND GEREINGTEM ROQUEFORTIN. ....	50
ABBILDUNG 9. DC-CHROMATOGRAMM DER ROQUEFORTIN-PRÄPARATION. ....	50
ABBILDUNG 10. MASSENSPEKTRUM VON ROQUEFORTIN-ROHTOXIN (LINKS) UND ROQUEFORTIN- REFRENZSUBSTANZ (RECHTS) (JEWEILS DIREKTEINSPRITZUNG).....	51
ABBILDUNG 11. EINFLUSS VON ROQUEFORTIN AUF DIE ERYTHROZYTENZAHLE BEIM SCHAF (N=6/GRUPPE). .	54
ABBILDUNG 12. EINFLUSS VON ROQUEFORTIN AUF DIE LEUKOZYTENZAHLE IM BLUT BEIM SCHAF (N=6/GRUPPE) .....	55
ABBILDUNG 13. EINFLUSS VON ROQUEFORTIN AUF DIE THROMBOZYTENZAHLEN BEIM SCHAF (N=6/GRUPPE). .....	55
ABBILDUNG 14. EINFLUSS VON ROQUEFORTIN AUF DEN HÄMATOKRIT BEIM SCHAF (N=6/GRUPPE).....	56
ABBILDUNG 15. EINFLUSS VON ROQUEFORTIN AUF DEN HÄMOGLOBINGEHALT DES BLUTES BEIM SCHAF (N=6/GRUPPE).....	56
ABBILDUNG 16. EINFLUSS VON ROQUEFORTIN AUF DIE BLUTGLUKOSEKONZENTRATION BEIM SCHAF (N=6/GRUPPE).....	57
ABBILDUNG 17. EINFLUSS VON ROQUEFORTIN AUF DEN GESAMTBILIRUBINGEHALT IM BLUT BEIM SCHAF (N=6/GRUPPE).....	58
ABBILDUNG 18. EINFLUSS VON ROQUEFORTIN AUF DIE ALANINAMINOTRANSFERASE BEIM SCHAF (N=6/GRUPPE).....	58
ABBILDUNG 19. EINFLUSS VON ROQUEFORTIN AUF DIE ASPARTATAMINOTRANSFERASE BEIM SCHAF (N=6/GRUPPE).....	58
ABBILDUNG 20. EINFLUSS VON ROQUEFORTIN AUF DIE GLUTAMAT-DEHYDROGENASE BEIM SCHAF (N=6/GRUPPE).....	59
ABBILDUNG 21. HORMONPROFILE TIER K471 (ROQUEFORTIN C- DOSIERUNG 0,0 MG/TAG; A: FSH, B: LH, C: PROGESTERON). ....	61
ABBILDUNG 22. HORMONPROFILE TIER M007 (ROQUEFORTIN C-DOSIERUNG 10,0 MG/TAG; A: FSH, B: LH, C: PROGESTERON).....	62

ABBILDUNG 23. HORMONPROFILE TIER H472 (ROQUEFORTIN C-DOSIERUNG 50 MG /TAG; A: FSH, B :LH, C: PROGESTERON). .....	63
ABBILDUNG 24. AUSSCHIEDUNG VON ROQUEFORTIN IN DEN FAECES VON SCHAFEN (N=6/GRUPPE).....	83

# 1 EINLEITUNG

Silagen sind häufig mit der Pilzspezies *Penicillium roqueforti* kontaminiert. Seit den 70er Jahren ist bekannt, dass *P. roqueforti* verschiedene Mykotoxine bildet. Zu den bekanntesten *P. roqueforti*-Toxinen zählen u.a. PR-Toxin, Patulin und Roquefortin.

Von besonderem Interesse ist dabei Roquefortin C, da es häufig und in relativ hohen Konzentrationen in der Silage anzutreffen ist (ARMBRUSTER, 1994). Allerdings liegen zur Toxizität dieser Verbindung sehr widersprüchliche Angaben vor: So variieren die LD<sub>50</sub>-Werte bei der Maus (i.p. Injektion) zwischen 15 und 184 mg/kg (SCOTT et al., 1976; ARNOLD et al., 1978). Während bei den Versuchen von SCHOCH et al. (1984) keinerlei klinische Symptome feststellbar waren, wurden neurotoxische Eigenschaften von WAGNER et al. (1980) beschrieben. Das Auftreten von Inappetenz, Ketose, Mastitis, Paralysen und Aborten in einer Milchviehherde glaubt HÄGGBLOM (1990) auf die Verfütterung Roquefortin-haltiger Silage zurückführen zu können.

Da also die toxikologische Bewertung von Roquefortin unklar ist und Roquefortin häufig und in nicht unerheblichen Mengen in Gärfuttermitteln anzutreffen ist, war das Ziel der vorliegenden Arbeit, zu überprüfen, welche Folgen praxisrelevante Roquefortindosen auf Wiederkäuer haben, und in welcher Größenordnung ein 'carry over' in die Nahrungskette zu erwarten ist. Neben rückstandsanalytischen Untersuchungen, allgemein-klinischen, klinisch-chemischen, histologisch-pathologischen und hämatologischen Untersuchungen, wurden auch noch Progesteron-, LH- und FSH-Profile aufgezeichnet, um zu überprüfen, ob Roquefortin fruchtbarkeitstörende Eigenschaften besitzt.

## 2 LITERATUR

### 2.1 Chemisch-physikalische Eigenschaften von Roquefortin

Roquefortin [10 $\beta$ -(1,1-Dimethyl-2-propenyl)-3-(imidazol-4-ylmethyl)-5 $\alpha$ ,10 $\beta$ ,11,11 $\alpha$ -tetrahydro-2H-pyrazino[1',2':1,5]pyrrolo[2,2b]indol-1,4-(3H,6H)-dion] wurde von OHMOMO et al. (1975) und SCOTT et al. (1976) unabhängig von einander aus Kulturen von *P. roqueforti* isoliert. Die Identität der beiden zunächst als Roquefortin C bzw. Roquefortin bezeichneten Verbindungen wiesen OHMOMO et al. (1977) nach.

Roquefortin ist ein Indol-Alkaloid vom 2,5-Diketopiperazin-Typ mit der Summenformel C<sub>22</sub>H<sub>23</sub>N<sub>5</sub>O<sub>2</sub> und einem Molekulargewicht von 389,1851 g / mol.

Es kristallisiert aus Methanol in Form von farblosen Nadeln (OHMOMO et al., 1977). Der Schmelzpunkt dieser Kristalle wurde von OHMOMO et al. (1975,1977) mit 225 - 228°C (decomp.) angegeben. SCOTT et al. (1977) ermittelten einen etwas niedrigeren Schmelzpunkt von 192 - 202°C, der durch den von SCHOCH et al. (1984b) bestimmten Wert von 194°C und den von WAGENER et al. (1980) ermittelten Schmelzpunkt von 202 - 205°C bestätigt wurde.

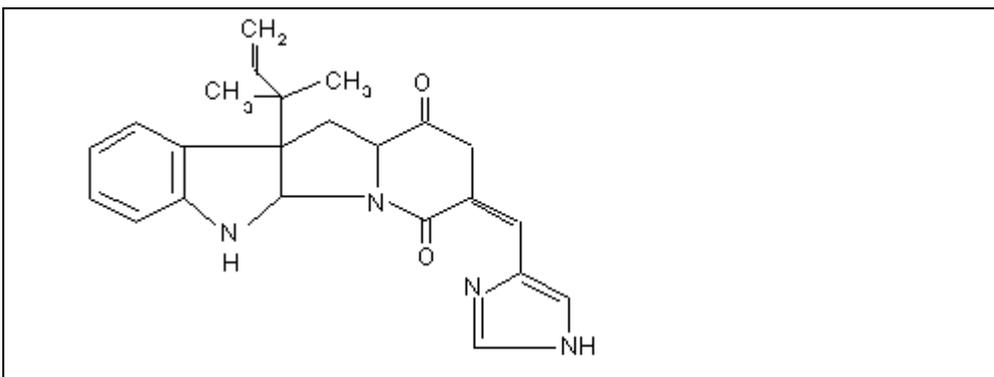


Abbildung 1. Strukturformel von Roquefortin

Roquefortin ist gut löslich in organischen Lösungsmitteln wie Chloroform, Ethylacetat oder Alkohole, schlecht löslich ist es dagegen in Wasser oder Hexan (SCOTT, 1984). Als optisch aktive Substanz besitzt Roquefortin die Eigenschaft die Schwingungsebene polarisierten Lichtes zu drehen, was als weiteres Identifizierungskriterium angewendet werden kann.

**Tabelle 1: Polarimetriedaten von Roquefortin - NaD-Linie,  $\lambda=589$  nm**

Drehungswinkel	Konzentration und Lösungsmittel	Literatur
$[\alpha]_D^{25}-764^\circ$	0,5 g in 100 ml Pyridin	OHMOMO et al., 1975
$[\alpha]_D^{25}-703^\circ$	1,0 g in 100 ml Chloroform	SCOTT et al., 1976
$[\alpha]_D^{25}-733^\circ$	0,1 g in 100 ml Chloroform	SCOTT et al., 1977

Das Infrarotspektrum von in Chloroform gelöstem Roquefortin zeigt Banden bei  $\nu_{\max}=3430\text{ cm}^{-1}$ ,  $3380\text{ cm}^{-1}$ ,  $3190\text{ cm}^{-1}$ ,  $1665\text{ cm}^{-1}$  und  $1608\text{ cm}^{-1}$  (SCOTT et al., 1976). Im UV-Licht fluoresziert Roquefortin nicht, weist aber drei Absorptionsmaxima bei 210 nm, 242 nm und 326 nm auf (SCOTT et al., 1976).

SCOTT und KENNEDY (1976) beobachteten nach Exposition von in Ethanol gelöstem Roquefortin gegenüber Tageslicht eine Verschiebung des Maximums bei 326 nm um bis zu 25 nm in den kurzwelligeren Bereich. Ähnlich verhielt sich auch chloroformgelöstes Roquefortin; allerdings war hier die Bildung eines Doppelmaximums festzustellen. Massenspektrometrische Untersuchungen des Photoprodukts zeigten, dass es sich um ein Roquefortin-Isomer handelte, für das der Trivialname "Isoroquefortin" vorgeschlagen wurde (SCOTT et al., 1979; VLEGGAR und WESSELS, 1980). Dieses Isomer konnte weder in kunstlichtbestrahlten Proben noch in Roquefortkäse nachgewiesen werden (SCOTT et al., 1976).

Im alkalischen Milieu ( $\text{pH} > 12$ ) ist Roquefortin nicht stabil (ARMBRUSTER, 1994) und wird zu einem chemisch nicht näher charakterisierten Produkt mit polarerer Eigenschaften transformiert.

Weitere Reaktionsprodukte von Roquefortin sind das 19,20-Dihydroroquefortin (katalytische Reduktion in Essigsäure mit Wasserstoff in Anwesenheit von Platin) sowie zwei Stereoisomere von 3,12-Dihydroroquefortin, die nach Reduktion mit Zink in Essigsäure bei  $70^\circ\text{C}$  auftreten. Eines dieser Isomere entspricht dem von OHMOMO et al. (1978) beschriebenen Roquefortin D.

## 2.2 Roquefortinbildende Pilze

Alle bislang bekannten Roquefortin-bildenden Pilze sind der Gattung *Penicillium* zugehörig. Insgesamt sind bislang 14 *Penicillium*-Arten bekannt, die zur Bildung von Roquefortin in der Lage sind (s. Tabelle 2).

Die Unterteilung der *Penicillien* in die diversen Spezies erfolgt in der klassischen Weise nach RAPER und THOM (1949) anhand kultureller und morphologischer Merkmale. Eine eindeutige Identifizierung der verschiedenen *Penicillien*-Spezies nach dieser Methode ist schwierig und führte in der Vergangenheit mehrfach zu widersprüchlichen Berichten hinsichtlich des Toxinbildungsvermögens verschiedener Pilzarten (EL-BANNA et al., 1987). Neben gewissen Unsicherheiten bei der Bestimmung der *Penicillium*-Isolate, ist ein weiteres Problem in der Verwendung verschiedener taxonomischer Systeme zu sehen (EL-BANNA et al., 1987). So wird, laut SAMSON und REENEN-HOEKSTRA (1988), *P. griseofulvum* Dierckx oft inkorrektweise als *P. patulum* oder *P. urticae* bezeichnet. Ähnlich unübersichtlich stellt sich der *P. verrucosum* Komplex dar. Nachfolgend aufgeführt sind mögliche Alternativbezeichnungen für die in Tabelle 2 genannten Pilzspezies:

---

<i>P. aurantiogriseum</i> Dierckx	<i>P. verrucosum</i> var. <i>cyclopium</i> (Westling) SAMSON et al.
<i>P. hirsutum</i> Dierckx	<i>P. verrucosum</i> Dierckx var. <i>corymbiferum</i> (Westling) SAMSON et al.
<i>P. commune</i> Thom	a) <i>P. melanochlorum</i> (Samson et al.) FRISVAD
	b) <i>P. verrucosum</i> Dierckx var. <i>melanochlorum</i> SAMSON et al.

---

Um eine genauere Differenzierung vornehmen zu können, wurde die Berücksichtigung zusätzlicher Bestimmungskriterien, wie z.B. die Produktion von sekundären Stoffwechselprodukten, gefordert (FRISVAD und FILTENBORG, 1983). Nach dem von FRISVAD (1988) vorgeschlagen System lassen sich zwei Chemotypen von *P. roqueforti* anhand der Mykotoxinsynthese identifizieren. Chemotyp I bildet Roquefortin, PR-Toxin und Mycophenolsäure, während Chemotyp II durch die Synthese von Roquefortin, Mycophenolsäure, Patulin, Penicillinsäure und Botryodiploidin charakterisiert wird.

**Tabelle 2: Roquefortinbildende *Penicillium*-Arten**

Spezies	zusätzlich nachgewiesene Toxine	Literatur
<i>P. chrysogenum</i>	Cyclopiazonsäure	EL-BANNA et al., 1987
	PR-Toxin	FRISVAD und FILTENBORG, 1983
<i>P. claviforme</i>	Patulin	FRISVAD und FILTENBORG, 1983
<i>P. commune</i>	Penitrem A	WAGENER et al., 1980
<i>P. concentricum</i>	Griseofulvin	FRISVAD und FILTENBORG, 1983
	Patulin	
<i>P. coprophilum</i>	Griseofulvin	FRISVAD, 1988
<i>P. corymbiferum</i>	Cyclophenin	OHMOMO et al., 1980
	Cyclophenol	
	Roquefortin D	
<i>P. crustosum</i>	Festuclavin	COLE et al., 1983
	Roquefortin A	
	Roquefortin B	
	Penitrem A	
<i>P. cyclopium</i>	Penitrem A-E	KYRIAKIDIS et al., 1981
	Penitrem A-F	MANTLE et al., 1983
	Penitreme	VESONDER et al., 1980
<i>P. expansum</i>	Citrinin	FRISVAD und FILTENBORG, 1983
	Patulin	
<i>P. expansum</i>	Roquefortin D	OHMOMO et al., 1980
<i>P. farinosum</i>	3,12-Dihydro-Roquefortin	KOZLOVSKY et al., 1981
<i>P. granulatum</i>	Patulin	FRISVAD und FILTENBORG, 1983
	Penitrem A	
<i>P. griseofulvum</i>	Cyclopiazonsäure	FRISVAD und FILTENBORG, 1983
	Griseofulvin	
	Patulin	
<i>P. hirsutum</i>	Citrinin	FRISVAD und FILTENBORG, 1983
	Penicillinsäure	
	Penitrem A	
<i>P. oxalicum</i>	Oxalin	FRISVAD, 1988
	Secalonsäure D	
	16-Hydroxy-Roquefortin	
<i>P. roqueforti</i>	Oxalin	STEYN und VLEGAAR, 1983
	Patulin	
	PR-Toxin	
	Isfumigaclavin A	
<i>P. roqueforti</i>	Isfumigaclavin B	EL-BANNA et al., 1987
	Isfumigaclavin B	ENGEL und KINDER, 1976

## (Fortsetzung Tabelle 2)

Spezies	zusätzlich nachgewiesene Toxine	Literatur
<i>P. roqueforti</i>	Mycophenolsäure Patulin Penicillinsäure PR-Toxin	FRISVAD und FILTENBORG, 1983
	Botryodiplodin Mycophenolsäure Patulin Penicillinsäure PR-Toxin	FRISVAD, 1988
	Isofumigaclavin Mycophenolsäure PR-Toxin	FRISVAD et al., 1989
	Isofumigaclavin	HONG und ROBBERS, 1985
	PR-Toxin	MEDINA et al., 1985
	Festuclavin Roquefortin A Roquefortin B	OHMOMO et al., 1975
	Marcfortin A, B, C	POLONSKY et al., 1980
	Isofumigaclavin PR-Toxin	SCOTT et al., 1976
<i>P. urticae</i>	Roquefortin D	OHMOMO et al., 1980

Roquefortinbildende Pilze sind vor allem auf Nahrungsmitteln zu finden. Einerseits werden sie bewusst als Starterkulturen bei Wurstwaren (z.B. *P. chrysogenum*) oder in der Käsebereitung (z.B. *P. roqueforti*) eingesetzt (SIEBER, 1978; FRANK, 1986), andererseits spielen sie eine nicht unerhebliche Rolle beim Verderb von Lebensmitteln wie Brot, Getreide, Nüsse, Obst, Gemüse, Fruchtsaft, Milchprodukte und Fleischwaren (REISS, 1986; FRISVAD, 1988; ŠKRINJAR et al., 1992).

Diese Pilzarten besitzen ebenfalls eine große Bedeutung bei dem Verderb von Futtermitteln. Es fällt auf, dass insbesondere *P. roqueforti* häufig in Silagen angetroffen wird, wobei selbst einwandfrei erscheinende Gärfuttermittel, z.B. Grassilage, stark mit *P. roqueforti* kontaminiert sein können (ESCOULA, 1977; PELHATE, 1977; GEDEK et al., 1981; GEDEK, 1985; AUERBACH und OLDENBURG, 1993). Untersuchungen von Armbruster

(1994) zufolge war diese Pilzart in ca. 30% vorselektierter Gärfuttermittelproben nachweisbar (vergl. Tabelle 3).

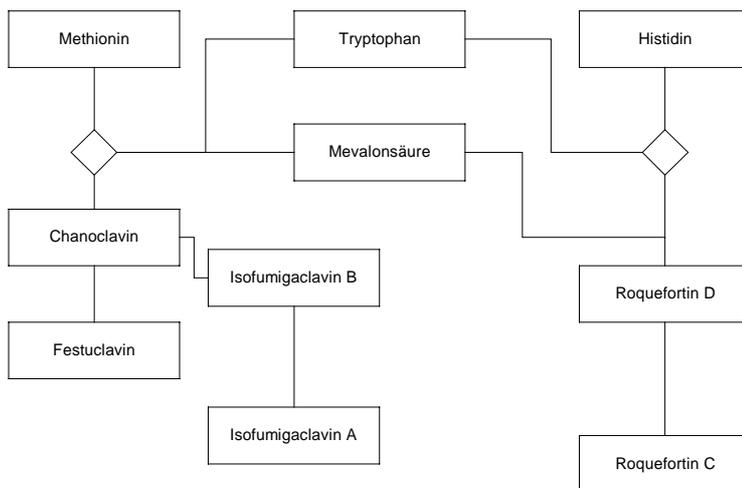
Die Dominanz von *P. roqueforti* in Gärfuttermitteln ist darauf zurückzuführen, dass diese Schimmelart eine hohe Toleranz gegenüber kurzkettigen Fettsäuren besitzt (AUERBACH und GEISSLER, 1992) und auch noch im sauren Milieu (bis zu pH 3) ein Wachstum aufweisen kann (PELHATE, 1977; MOREAU, 1980; OLDENBURG, 1991). Darüber hinaus besitzt *P. roqueforti* die Eigenschaft, noch bei extrem hohen CO<sub>2</sub>-Gehalten (bis zu 80 %) zu wachsen, solange noch 4 -5 % O<sub>2</sub> zur Verfügung stehen (LACEY, 1975). Zudem können die Pilzsporen von *P. roqueforti* lange anaerobe Phasen überdauern, um dann bei späterem Luftzutritt (z.B. bei der Öffnung des Silos) auszukeimen (AUERBACH und OLDENBURG, 1993).

**Tabelle 3. Vorkommen von Pilzarten der Gattungen Penicillium und Aspergillus in Gärfuttermitteln (ARMBRUSTER, 1994)**

Pilzfamilie/ Gattung/-Art	Mais- silage (n = 60)	Gras- silage (n = 20)	Corn-Corb- Mix (n = 27)	Ballen- silage (n = 4)	insgesamt (n = 111)
<i>Aspergillus</i>	28 %	40 %	19 %		27 %
<i>A. clavatus</i>			4 %		1 %
<i>A. flavus</i>	2 %		7 %		3 %
<i>A. fumigatus</i>	17 %	25 %	7 %		15 %
<i>A. sp.</i>	10 %	15 %			8 %
<i>Penicillium</i>	38 %	20 %	30 %	25 %	36 %
<i>P. roqueforti</i>	33 %	20 %	22 %		30 %
<i>P. sp.</i>	5 %		8 %	25 %	6 %

## 2.3 Roquefortinbiosynthese

Mit Hilfe radioaktiv markierter Substanzen untersuchten OHMOMO et al. (1979) die Biosynthesewege von Indol-Alkaloiden am Beispiel von *P. roqueforti*. Wie in Abbildung 2 dargestellt, sind Mevalonsäure, Tryptophan und Histidin die für die Roquefortinsynthese essentiellen Grundbausteine.



**Abbildung 2. Biosyntheseweg von Roquefortin.**

Aus Tryptophan und Histidin wird zunächst ein Intermediärstoffwechselprodukt gebildet (Tryptophanyl-Histidinyl-Laktam), das anschließend mit Mevalonsäure (synthetisiert aus 3 Acetyl-CoA) zu 3,12-Dihydro-Roquefortin (Roquefortin D) reagiert. Durch sigmatrope Umlagerung des Isopentenylrestes nach C-3 und Zyklisierung des 3H-Indols zur Aminoaldehydgruppe entsteht schließlich Roquefortin C (FRANCK, 1984). Neben Roquefortin können aus Tryptophan und Mevalonsäure, unter Verbrauch von Methionin, auch Festuclavin und die Isofumigaclavine A und B (Synonym Roquefortin A und B) über den Chanoclavin-Weg gebildet werden. Bemerkenswert ist, dass das Ausmaß der Bildung dieser Stoffe von der Temperatur abhängig ist. Bis ca. 20°C dominiert der Stoffwechselweg zu Festuclavin und den Isofumigaclavinen, oberhalb dieser Temperatur wird vorwiegend Roquefortin synthetisiert (OHMOMO et al., 1979).

## 2.4 Vorkommen von Roquefortin in Futtermitteln

Über das Vorkommen von Roquefortin in Futtermitteln, speziell Silagen, liegen bisher nur Berichte von HÄGGBLOM (1990) ARMBRUSTER (1994) und AUERBACH et al. (1998) vor. HÄGGBLOM (1990) wies Roquefortin im Rahmen eines Mykotoxikoseverdacht bei einer Milchviehherde in einem einsilierten Gerste-Melasse-Gemisch nach. Den Untersuchungen von ARMBRUSTER (1994) zufolge dürfte Roquefortin häufig in verpilzten Silagen vorkommen, denn in 22 % der Proben war diese Verbindung zu finden (s. Tabelle 4). Aus diesen Daten geht hervor, dass Roquefortin C im Vergleich zu anderen Mykotoxinen relativ häufig und vor allem in vergleichsweise hohen Konzentrationen vorkommt.

**Tabelle 4. Natürliches Vorkommen von Roquefortin in Futtermitteln**

Matrix	Probenzahl		Roquefortin (mg/kg)		Literatur
	n	n positiv	$\bar{x}$	Bereich	
Gerste	3	3	25,30	n. a.	HÄGGBLOM, 1990
Maissilage	60	18	5,47	0,05...28,15	ARMBRUSTER, 1994
Grassilage	20	3	0,28	0,10...0,58	ARMBRUSTER, 1994
Ballenwickelsilage (Gras)	4	1	0,48	-/-	ARMBRUSTER, 1994
Corn Corb Mix	27	2	1,107	0,09...2,13	ARMBRUSTER, 1994
Maissilage	24	13	15,80	0,20...36,00	AUERBACH et al., 1998
Grassilage	24	14	3,70	0,10...15,00	AUERBACH et al., 1998

n.a. nicht angegeben

## 2.5 Biologische Wirkung

### 2.5.1 Wirkung gegenüber Prokaryonten

1979 untersuchten KOPP und REHM die Wirkung von Roquefortin auf ausgewählte Bakterienstämme, die häufig als Begleitflora in Blauschimmelkäse anzutreffen sind. Eine Wachstumshemmung grampositiver Bakterien gegenüber Roquefortin konnte in diesen Untersuchungen ab einer Konzentration von 0,1 mg Roquefortin pro ml Medium

festgestellt werden. Gramnegative Keimarten erwiesen sich dagegen als unempfindlich gegenüber Roquefortin.

Eine Zwischenstellung nahmen Clostridien und Laktobazillen ein: In Anwesenheit von Roquefortin trat zwar noch ein Wachstum dieser Keime auf, dieses war jedoch im Vergleich zu unbehandelten Kontrollansätzen deutlich vermindert. Aus diesen Beobachtungen folgerten die Autoren, dass antimikrobielle Wirkungen von Roquefortin nur bei Bakterien zu beobachten sind, die über Atmungskettencytochrome und Katalase verfügen (grampositive Keime). Bakterien der Gattungen *Lactobacillus* und *Clostridium*, die über kein Häm verfügen, zeigen eine etwas größere Unempfindlichkeit gegenüber Roquefortin als andere grampositive Keime. Aus diesem Grund werden häminhibitorische Eigenschaften von Roquefortin vermutet.

In weiterführenden Untersuchungen von KOPP-HOLTWIESCHE und REHM (1990) wurde am Testkeim *Corynebacterium flaccumfaciens* festgestellt, dass in Anwesenheit von 100 µg Roquefortin pro ml Medium eine 50%ige Reduktion des O<sub>2</sub>-Verbrauchs zu beobachten war. Die antimikrobielle Wirkung von Roquefortin beruht daher mit großer Wahrscheinlichkeit auf einer Hemmung der bakteriellen Zellatmung.

Neben der Hemmung der bakteriellen Zellatmung wurden von KOPP und REHM (1981) auch eine roquefortininduzierte Hemmung der RNA-Synthese bei *C. flaccumfaciens* beschrieben.

Im Ames-Test wurden keine mutagenen Wirkungen von *P. roqueforti* Rohextrakten (BJELDANES et al. 1978) beobachtet. Diese Ergebnisse wurden durch SCHOCH et al. (1983, 1984b) bestätigt, der Roquefortin ebenfalls in diesem Testsystem untersuchte.

### **2.5.2 Wirkung in Zellkultursystemen**

KRUSCH et al. (1977) prüften die Wirkung von Kulturrohextrakten verschiedener *P. roqueforti* Stämme im Zellkulturtest an Flow 4000 C2- und Girardi Heart Zellen. Bis auf einen vermutlich PR-Toxin haltigen Extrakt waren keine cytotoxischen Effekte zu beobachten. Dabei gelten Girardi Heart- und Detroit 98 Zellen als relativ empfindlich gegenüber Roquefortin (LOMPE und v. MILCZEWSKI, 1979): Eine Wachstumshemmung

dieser Zelllinien kann ab einer Konzentration von 22 µg pro ml Zellmedium beobachtet werden.

Im MTT-Zytotoxizitätstest nach MOSMANN (1983) wiesen MDBK-Zellen im Vergleich zu HepG2- und Vero-Zell-Linien die höchste Empfindlichkeit gegenüber Roquefortin auf (ARMBRUSTER, 1994). Zytotoxische Wirkungen konnten mit MDBK-Zellen ab einer Konzentration von 50 µg pro ml Medium beobachtet werden.

### **2.5.3 Wirkung gegenüber Makroorganismen**

Die in Studien zur Bestimmung der akuten Toxizität (LD<sub>50</sub>-Dosis) von Roquefortin gewonnenen Ergebnisse sind insgesamt sehr widersprüchlich und differieren teilweise um den zehnfachen Wert (s. Tabelle 5).

Scott et al. (1976) erwähnten in einer Fußnote die Arbeiten von FRAYSSINET und LAFARGE-FRAYSSINET, die eine LD<sub>50</sub>-Dosis bei Mäusen von 15-20 mg pro kg KGW (i.p.) ermittelten, während ARNOLD et al. (1978), mit 169 bis 189 mg pro kg KGW (i.p.), etwa die 10-fache Dosis angaben und im Gegensatz zu FRAYSSINET und LAFARGE-FRAYSSINET keine neurologischen Symptome beobachten konnten.

Demgegenüber steht ein Bericht, in dem neurologische Symptome nach Verabreichung von Roquefortin mittels Kropfintubation bei Eintagsküken beschrieben wurden (WAGENER et al., 1980). Etwa zwei Stunden nach der Roquefortinapplikation (Dosis nicht angegeben) kam es bei den Küken zu einem "Auf die Seite neigen" des Kopfes, Niedersetzen und zu einem Verlust des Gleichgewichtssinnes. Nach fünf Stunden starben die Küken mit ausgestreckten Beinen und Füßen und nach hinten gestrecktem Kopf.

Die Verfütterung von roquefortinhaltigem Käse über einen Zeitraum von 28 Tagen an Mäusen (tägliche Roquefortindosis 238 µg pro kg KGW) verlief dagegen unauffällig: Hämatologische und klinisch- chemische Parameter sowie Organ- und Körpergewichte der Roquefortin-behandelten Tiere zeigten keine Abweichungen gegenüber den Kontrolltieren auf (SCHOCH et al., 1984c).

**Tabelle 5. Toxizitätsdaten von Roquefortin**

Dosis	Applikation	Spezies	Symptome	Literatur
15...20 mg/kg KM	i.p.	Maus ♂	nicht beschrieben	FRAYSSINET und LAFARGE-FRAYSSINET, 1975
50...100 mg/kg KM	i.p.	Maus ♂	Entkräftung, Atonie, kurze provozierbare Krampfanfälle, Opisthotonus, Tod nach einigen Stunden	FRAYSSINET und LAFARGE-FRAYSSINET, 1975
Nicht angegeben	Kropfintubation	Eintagsküken	Neurologische Symptome	WAGENER et al., 1980
169 mg/kg KM	i.p.	C57-Maus ♂	keine neurologischen Veränderungen	ARNOLD et al., 1978
184 mg/kg KM	i.p.	C57-Maus ♀	keine neurologischen Veränderungen	ARNOLD et al., 1978
189 mg/kg KM	i.p.	Swiss-Webster-Maus ♂	keine neurologischen Veränderungen	ARNOLD et al., 1978
184 mg/kg KM	i.p.	Swiss-Webster-Maus ♀	keine neurologischen Veränderungen	ARNOLD et al., 1978

Neben den Ergebnissen der Toxizitätsstudien liegen auch einige Fallbeschreibungen aus der Praxis vor, in denen Roquefortinhaltige Futtermittel für das Auftreten klinischer Symptome verantwortlich gemacht werden. Besonders sensibel scheinen demnach Hunde auf eine Roquefortinverabreichung zu reagieren. SMITH (1987) fand im Mageninhalt eines verstorbenen Hundes "reines, kristallines" Roquefortin. PULS und LADYMAN (1988) beschrieben den Fall eines Hundes, der die Symptome Konvulsionen, tetanische Spasmen und leichten Opisthotonus zeigte. Es wurde die Verdachtsdiagnose einer Strychninvergiftung gestellt. Im Mageninhalt des verstorbenen Hundes fand man Roquefortin und ein Stück Blauschimmelkäse jedoch kein Strychnin. Basierend auf diesen Berichten untersuchten LOWES et al. (1992) die Mageninhalte von 57 Hunden, bei denen

der Verdacht einer Strychninintoxikation bestand. In sechs von 26 strychninnegativen Proben wurde Roquefortin nachgewiesen.

Beim Rind wird die Aufnahme roquefortinhaltiger Futtermittel (bestimmter Roquefortingehalt: 25,3 mg/kg) in Zusammenhang mit Inappetenz, Ketose, Mastitis, Aborte und nicht mit Calcium therapierbaren Paralysen gebracht (HÄGGBLUM, 1990).

## 2.6 Metabolismus von Roquefortin

Über den Metabolismus von Roquefortin ist zur Zeit nur wenig bekannt. Es liegt jedoch eine Arbeit von LAWS und MANTLE (1987) vor, in der die Ausscheidung von <sup>14</sup>C-markiertem Roquefortin an Sprague Dawley Ratten (♂, 180-200 g KGW; Roquefortin-Dosis: 0.90-1,77 mg) nach intraperitonealer und oraler Applikation untersucht wurde.

In Faeces und Urin wurden innerhalb von drei Tagen p.a. ca. 60% des verabreichten radiomarkierten Toxins wiedergefunden. Unabhängig von der Applikationsform wurde Roquefortin fast ausschließlich über den Kot innerhalb von 24 h ausgeschieden; lediglich 5% waren im Urin der Versuchstiere nachweisbar. Auch drei Tage p.a. wurden noch geringe Mengen von radiomarkiertem Roquefortin ausgeschieden, woraus die Autoren folgerten, dass Roquefortin zeitweilig in Fettdepots oder anderen Geweben eingelagert wird.

HPLC-Untersuchungen der Faeces zeigten, dass etwa 1/3 der bestimmten Radioaktivität auf unverändertes Roquefortin zurückzuführen war, die restlichen 2/3 beruhten auf polarerer Roquefortinmetaboliten. In vitro Versuche ergaben, dass ein Abbau von Roquefortin durch Rattenleberhomogenisate nicht stattfand, so dass dieser Abbau vermutlich auf die im Intestinaltrakt vorhandene Mikroflora zurückzuführen war.

Mit Hilfe des RUSITEC-Systems wurden die Wirkungen von *P. roqueforti*-verschimmelter Maissilage und roquefortinhaltigen Rohextrakten auf die Pansenfermentation überprüft (HÖLTERSHINKEN et al., 1995). Nach Beladung der Fermenter mit *P. roqueforti* verschimmelter Silage wurde ein Rückgang der Gasproduktion (bis zu 61%), insbesondere der Methan-Fraktion (bis zu 93%), festgestellt. Auch war eine Abnahme der Konzentration flüchtiger Fettsäuren um bis zu 77% bei leicht erhöhten pH-Werten feststellbar.

---

Versuche mit roquefortinhaltigen Rohextrakten (78 bis 180 µg je Inkubator) führten zu anderen Ergebnissen. So wurde nach 5-stündiger Inkubation eine leichte Erhöhung der Gasproduktion, Methan- und Ammoniakkonzentration sowie eine leichte Abnahme des Protozoengehalts beobachtet, während andere Parameter keine Änderung aufwiesen (HÖLTERSHINKEN et al., 1995).

## 3 MATERIAL UND METHODEN

### 3.1 Material und Gerätschaften

#### 3.1.1 Chemikalien

- Hefeextrakt ..... Difco #0127-07-1
- L-Histidin ..... Sigma H-8000
- Methanol..... Merck 1.06009
- Ethylacetat ..... Merck 1.09623
- Acetonitril..... Merck 1.00003
- Chloroform ..... Merck 1.02445
- Natriumsulfat..... Merck 1.06649
- Hexan ..... Merck 1.04368
- Natriumhydrogencarbonat..... Merck 1.06329
- Ammoniumhydrogencarbonat.. Merck 1126
- Salzsäure..... Merck 1.09057
- Essigsäure..... Merck 1.00063
- L-Tryptophan..... Sigma T-0254
- Saccharose..... Merck 1.07687
- Natriumhydroxid ..... Merck 1.06498
- Ammoniumhydroxid ..... Merck 5426

#### 3.1.2 Referenzsubstanz

- Roquefortin C ..... Foodtek, CSIR, Pretoria - South Africa

### 3.1.3 Gerätschaften

- Laborschüttler..... Jahnke & Kunkel KS 250
- HPLC-Anlage .....Beckmann System Gold
  - .....Steuereinheit IBM PS/2
  - .....Solvent Module 126
  - .....Diode Array Detector 168
  - .....Rheodyne Injector 7725i
- pH-Meter .....WTW pH 535
- Densitometer .....Desaga CD-60
- Gelatinekapseln .....WEPA Nr. 35758
- Rotationsverdampfer ..... Büchi Rotavapor RE 111
- Filtrationsmodul ..... Millipore
  - ..... Millidisk 10/40 Filter Housing
  - ..... Millidisk Cartridge Filter MCGL 10S03
  - ..... Millipore Bowl 51
- Ultraschallbad..... Bandelin Sonorex RK 255
- LC-MS-Anlage ..... Fisons

### 3.1.4 Gefäße für die Blutuntersuchung

- Plasma ..... Sarstedt 26.369  
(Li-Heparin Beschichtung)
- Vollblut ..... Sarstedt 38.346  
(Kalium-EDTA Beschichtung)
- Aufbewahrungsröhrchen ..... Sarstedt 55.486
- Serum ..... Sarstedt 26.323
- Blutglucose-Bestimmung ..... Sarstedt 34.344  
(Fluoridbeschichtung)

### 3.1.5 Nährmedien

#### Sabouraud-Agar (Merck)

#### YES-Medium I

Hefeextrakt (Difco)	20 g
Saccharose (Merck)	40 g
Aqua dest. ad	1000 ml
Steril filtrieren	

#### YES-Medium II

Hefeextrakt (Difco)	20 g
Saccharose (Merck)	40 g
L-Histidin (Merck)	1 g
L-Tryptophan (Merck)	1 g
Aqua dest. ad	1000 ml
pH-Korrektur mit 100%iger Essigsäure auf pH =4,0	
Steril filtrieren	

#### Frank Medium

Pepton aus Fleisch (Merck)	10 g
Glucose (Merck 8342 E)	5 g
Bromkresolpurpur (Oxoid CM 731)	40 mg
Brilliant schwarz (Merck 1921)	1 mg
Aqua dest. ad	1000 ml
15 min autoklavieren	

## 3.2 Methoden

### 3.2.1 Herstellung von Roquefortin

Die Produktion von Roquefortin erfolgte in Anlehnung an Arbeiten von OHMOMO (1975, 1977, 1978, 1979) und SCOTT et al. (1977) durch Extraktion von *P. roqueforti*-Kulturen. Ziel der nachfolgend aufgeführten Vorversuche war es, die Roquefortinproduktion zu optimieren, um möglichst schnell ca. 10 g Roquefortin herzustellen.

### 3.2.2 Vorversuche

#### 3.2.2.1 Selektion eines potenten roquefortinbildenden *P. roqueforti*-Stammes

Zur Selektion eines geeigneten Roquefortinbildners wurden 18 *P. roqueforti*-Stämme aus der lehrstuhleigenen Stammsammlung auf ihr Roquefortinbildungsvermögen untersucht (s. Tabelle 6). Die Anzucht der Pilze erfolgte mit jeweils 5 ml sterilfiltriertem YES-Medium (2% Hefeextrakt, 4% Saccharose). Nach 14 Tagen Inkubation bei 25°C wurden die Kulturen (Mycel und Medium) mit 5 ml Chloroform überschichtet und 2h auf einem Laborschüttler ausgeschüttelt. 1 ml des Lösungsmittelüberstandes wurden eingeeengt, in Methanol resolviert und der Roquefortingehalt mittels HPLC bestimmt (HPLC-Methode s. Seite 38). Die durchschnittlichen Toxinmengen eines *Penicillium roqueforti* Isolates, ermittelt aus 3 Ansätzen, wurden mit Hilfe eines multiplen Mittelwertsvergleiches ausgewertet, um Unterschiede zwischen den *P. roqueforti* Stämmen statistisch zu sichern.

**Tabelle 6. Verzeichnis der auf das Roquefortinbildungsvermögen untersuchten *P. roqueforti* -Isolate**

Lfd. Nummer	Spezies	Isolat-Nummer	Herkunft
1	<i>P. roqueforti</i>	113/92 SK1	Corn-Corb-Mix (CCM)
2	<i>P. roqueforti</i>	114/92	Corn-Corb-Mix (CCM)
3	<i>P. roqueforti</i>	33/92	Verdorbenener Joghurt
4	<i>P. roqueforti</i>	32/92	Maissilage
5	<i>P. roqueforti</i>	112/92 SK1	Corn-Corb-Mix (CCM)
6	<i>P. roqueforti</i>	112/92 SK2	Corn-Corb-Mix (CCM)
7	<i>P. roqueforti</i>	103/92	Corn-Corb-Mix (CCM)
8	<i>P. roqueforti</i>	100/92	Corn-Corb-Mix (CCM)
9	<i>P. roqueforti</i>	113/92 SK2	Corn-Corb-Mix (CCM)
10	<i>P. roqueforti</i>	278/93	Maissilage
11	<i>P. roqueforti</i>	277/93	Maissilage
12	<i>P. roqueforti</i>	32/92 fl.	Maissilage
13	<i>P. roqueforti</i>	117/92	Corn-Corb-Mix (CCM)
14	<i>P. roqueforti</i>	150/92 a	Grassilage
15	<i>P. roqueforti</i>	150/92 b	Grassilage
16	<i>P. roqueforti</i>	149/92	Grassilage
17	<i>P. roqueforti</i>	9/92	Grassilage
18	<i>P. roqueforti</i>	Stamm	DSM

### 3.2.2.2 Nährmedienoptimierung hinsichtlich Roquefortinproduktion

Die Nährmedienoptimierung wurde analog zu den Selektionsversuchen im Dreifachansatz durchgeführt. Im Einzelnen wurden folgende Versuche angestellt:

- Wirkung einer Tryptophan - Histidin Zugabe

Neben einem Kontrollansatz mit nicht supplementiertem Medium, wurden jeweils 0,10%; 0,25%; 0,50%; 0,75% und 1,00% L-Tryptophan und L-Histidin zu gleichen Teilen dem Medium zugesetzt.

- Einfluss des pH-Wertes bzw. eines Essigsäurezusatzes

Durch Zugabe von 100%-iger Essigsäure zu 0,1% Tryptophan und 0,1% Histidin supplementiertem Nährmedium wurde der pH auf folgende Werte eingestellt: 3,5; 4,0; 4,5 und 5,0.

Als Basisnährmedium wurde YES-Medium I (2% Hefeextrakt, 4% Saccharose) verwendet, das nach Zugabe der zu untersuchenden Substanzen abermals sterilfiltriert wurde.

Jeweils 5 ml des zu untersuchenden Mediums wurden in ein steriles Reagenzglas eingefüllt, mit 10 µl Sporensuspension (Stamm 150/92 a) inokuliert und 14 Tage bei 25°C im Brutschrank inkubiert. Medium und Mycel eines jeden Ansatzes wurden in diesen Versuchen mit Hilfe einer Pipette getrennt und mit 2 ml Ethylacetat (Medium) bzw. 2 ml Chloroform (Mycel) versetzt und über einen Zeitraum von 1h auf einem Laborschüttler extrahiert. 1 ml eines jeden Rohextraktes wurde im Rotationsverdampfer bis zur Trockene eingengt, die Rückstände in 0,5 ml Methanol aufgenommen und der Roquefortingehalt mittels HPLC (Methodik auf S. 38) bestimmt.

Die statistische Auswertung der Resultate erfolgte durch einen multiplen Mittelwertsvergleich in Form eines LSD-Tests nach vorangegangener Varianzanalyse.

### **3.2.3 Herstellung und Reinigung von Roquefortin für das Versuchsvorhaben**

Aufgrund der Ergebnisse der Vorversuche wurde die Produktion von Roquefortin mit dem *P. roqueforti*-Stamm 150/92 a und dem Nährmedium durchgeführt YES-II:

Die benötigten Mengen von Saccharose, Hefeextrakt, Tryptophan und Histidin wurden abgewogen und in 5 l Erlenmeyerkolben überführt. Nach Zugabe der entsprechenden Menge Aqua dest. wurde der pH-Wert mit Essigsäure auf pH 4 abgesenkt und das Medium sterilfiltriert (Millipore-Sterilfiltrationsanlage). Die Lagerung der Medien erfolgt in 1 l Schott-Flaschen bei 5°C.

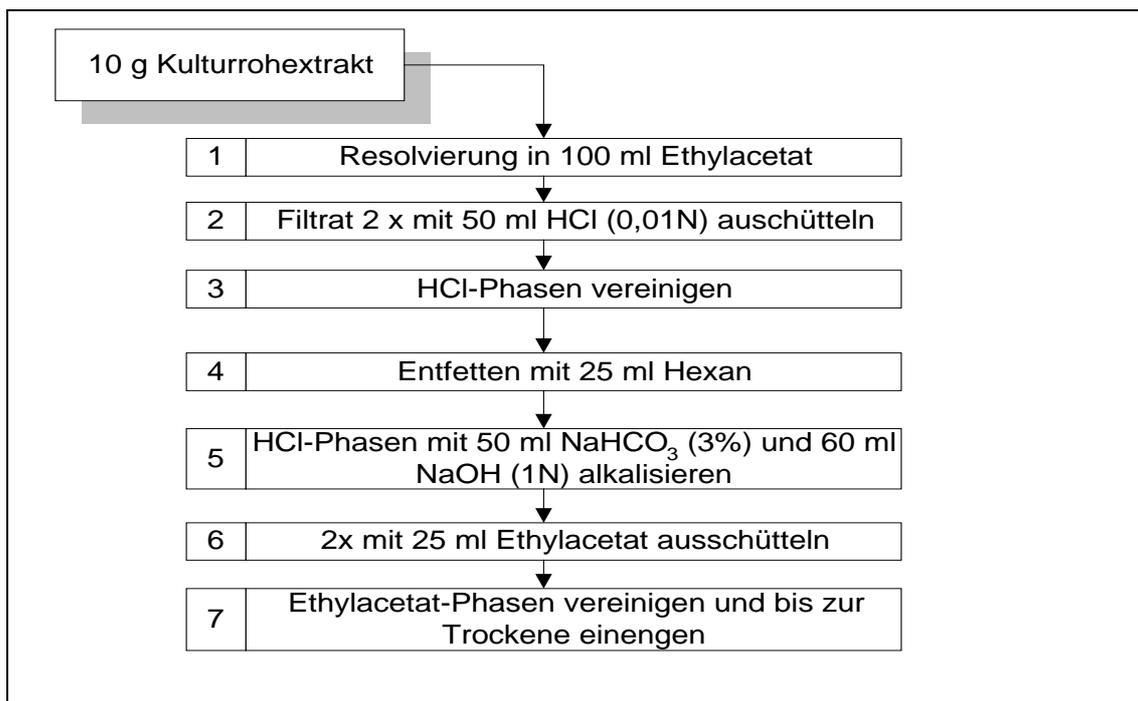
200 ml dieses Mediums wurden unter einem Laminar-Flow in eine trockensterilisierte Penicillinflasche eingefüllt und mit 100 µl Sporensuspension beimpft. Die Kulturen wurden mit einem Zellstoffstopfen verschlossen und 14 Tage bei 25°C inkubiert.

Zur Extraktion wurden Pilzmycel und Nährmedium mit einem Filter getrennt. Das toxinhaltige Nährmedium einer Penicillinflasche wurde zweimal mit jeweils 300 ml Ethylacetat über 60 min ausgeschüttelt. Analog dazu wurde das Pilzmycel behandelt, als Extraktionsmittel wurde jedoch Chloroform (jeweils 150 ml) verwendet. Durch dieses

Vorgehen, Trennung von Mycel und Medium sowie materialspezifischer Lösungsmiteleinsetz, gelang es, störende Emulsionsbildungen bei der Extraktion zu vermeiden.

Die Ethylacetat- und Chloroformphasen wurden unter Vakuum eingengt, anschließend vereinigt und bis zur weiteren Verarbeitung bei  $-21^{\circ}\text{C}$  asserviert.

Die Reinigung der gewonnenen Rohextrakte erfolgte mittels Säure-Base-Schritt und Entfettung mit Hexan nach dem in Abbildung 3 dargestellten Verfahren.



**Abbildung 3. Reinigung von roquefortinhaltigen Kulturrohextrakten.**

Zur Absicherung der Identität des hergestellten Rohtoxins wurden HPLC-Chromatogramme des gereinigten Toxins mit Chromatogrammen der Referenzsubstanz verglichen. Weiterhin wurden HPLC-UV-Absorptionsspektren von Referenzsubstanz und der hergestellten Verbindung aufgezeichnet und mittels der HPLC-Steuersoftware ausgewertet.

Zusätzlich wurden massenspektrometische Untersuchungen (Direkteinspritzung) durchgeführt, in denen die Massenspektren der Referenzsubstanz und der hergestellten Verbindung verglichen wurden.

Zur weiteren Reinheitskontrolle wurde das produzierte Roquefortin dünnenschichtchromatographisch untersucht. Mit diesem Verfahren können im Vergleich zur HPLC-Methode auch Begleitsubstanzen erfaßt werden, die kein UV-Absorptionsmaximum im Bereich von  $\lambda = 328$  nm besitzen. Für diese Untersuchung wurden HPTLC-Kieselgelplatten mit Fluoreszenz-Verstärker (Merck 1.05629) eindimensional in dem Fließmittel Chloroform/Methanol/Ammoniumhydroxid (90:10:1) entwickelt. Die Auswertung der Platten erfolgte visuell unter UV-Licht bei  $\lambda = 254$  nm und  $\lambda = 366$  nm sowie mit Hilfe eines DC-Scanners (Desaga).

Weiterhin wurde die antimikrobielle Aktivität des hergestellten Roquefortins bestimmt und mit Roquefortin-Referenzsubstanz verglichen. Diese Untersuchung wurde in Form eines Reihenverdünnungstest unter den nachfolgend aufgeführten Bedingungen im Doppelansatz durchgeführt:

Testkeim: *Bacillus stearothermophilus*

Bebrütungstemperatur: 60°C

Medium: Frank-Medium mit 5% Methanol als Lösungsvermittler

Roquefortin-Konzentrationen:

200,0	µg pro ml Medium
100,0	µg pro ml Medium
50,0	µg pro ml Medium
25,0	µg pro ml Medium
12,5	µg pro ml Medium
0,0	µg pro ml Medium.

### 3.2.3.1 Herstellung von Roquefortinkapseln

Das gereinigte Roh toxin wurde den Tieren mittels wasserlöslicher Gelatine kapseln (WEPA, Gr."1") verabreicht. Dazu wurden Kapseln mit folgenden Roquefortingehalten hergestellt:

- Kapseln mit 0 mg Roquefortin (Placebo)
- Kapseln mit 5 mg Roquefortin
- Kapseln mit 25 mg Roquefortin

Als Träger- bzw. Füllmaterial der Kapseln diente ein für diese Zwecke übliches Gemisch aus Mannitol (99,5%) und hochdisperssem Siliziumdioxid (0,5% Aerosil®). Für die Befüllung der Kapseln wurde ein Gerät der Firma WEPA eingesetzt, das nach dem Prinzip der Volumendosierung arbeitet und die gleichzeitige Herstellung von 60 Kapseln nach dem folgenden Verfahren ermöglicht: Die 60 Bohrungen der Trägerplatten wurden mit leeren Kapseln besetzt und die Kapselverschlüsse mit Hilfe des Füllgerätes entfernt. Zur Volumeneichung wurden die Kapseln vollständig mit dem Trägermaterial befüllt. Nach Entleeren der Kapseln erfolgte die Volumenbestimmung des eingefüllten Materials mit einem Standzylinder. Die für 60 Kapseln notwendige Menge Roquefortin wurde auf einer Analysenwaage abgewogen und zunächst mit einer kleineren Menge des Füllmaterials vermischt (Prämix-Prinzip). Die Vormischung wurde nun auf das zuvor bestimmte 60 Kapselvolumen aufgefüllt und anschließend in eine Rührschale überführt. Nach sorgfältigem Durchmischen der Komponenten wurden die Kapseln damit befüllt und verschlossen.

### 3.2.4 Durchführung des Tierversuches

#### 3.2.4.1 Tiermaterial

Für das Versuchsvorhaben wurden 18 weibliche Schafe der Rasse Merinolandschaf vom Gut Hochmutting, Oberschleißheim erworben. Die adulten Tiere waren zyklisch, nicht trächtig und hatten bereits mindestens einmal abgelammt. Die Tiere wurden, nach Behandlung mit 1 ml Ivomec<sup>®</sup> (s.c.) und Vaccinierung mit 2 ml FootVax<sup>®</sup> (s.c.) gegen Moderhinke, bis zum Versuchsbeginn auf dem staatl. Versuchsgut Grünschwaige gehalten. Während dieser Wartezeit wurde der Gesundheitsstatus der Tiere klinisch und serologisch überprüft. Nach Abschluß dieser Untersuchungen wurden je sechs Schafe zufällig der Kontrollgruppe **K** (Placebokapseln) und den Behandlungsgruppen **H** (50 mg Roquefortin pro Tag) und **M** (10 mg Roquefortin pro Tag) zugeteilt. In der folgenden Tabelle 7 sind die Zuordnungen der Tiere in die einzelnen Gruppen und Durchgänge dargestellt.

Tabelle 7. Einteilung der Tiere in die einzelnen Behandlungsgruppen und Durchgänge

Durchgang	Behandlungsgruppe K (Kontrollgruppe)			Behandlungsgruppe M (10 mg Roquefortin / Tag)			Behandlungsgruppe H (50 mg Roquefortin / Tag)		
	Tier-Nr	KGW* (kg)	Dosis** (mg/kg)	Tier-Nr	KGW* (kg)	Dosis** (mg/kg)	Tier-Nr	KGW* (kg)	Dosis** (mg/kg)
I	471	74,0	0	489	83,3	0,12	472	71,4	0,70
	474	73,5	0	490	71,4	0,14	476	89,3	0,56
							479	73,5	0,68
II	473	93,5	0	007	76,9	0,13			
	481	87,0	0	475	90,9	0,11	480	96,2	0,52
	482	61,5	0	477	71,4	0,14	486	74,6	0,67
	488	79,0	0	485	83,3	0,12	487	89,3	0,56

\* durchschnittliches Körpergewicht während der Behandlungsperiode

\*\* tägliche Roquefortinaufnahme pro kg Körpergewicht

### 3.2.4.2 Haltung und Fütterung der Tiere

Die Haltung der Schafe erfolgte im lehrstuhleigenen Tierstall in Dürnast, der, nach Umbau zu einem Tiefraumlaufstall mit Stroheinstreu, eine Liegefläche von 21,3 m<sup>2</sup>, bei einem Tier-Freßplatzverhältnis von 1:1, zur Verfügung stellte (s. Abbildung 4).

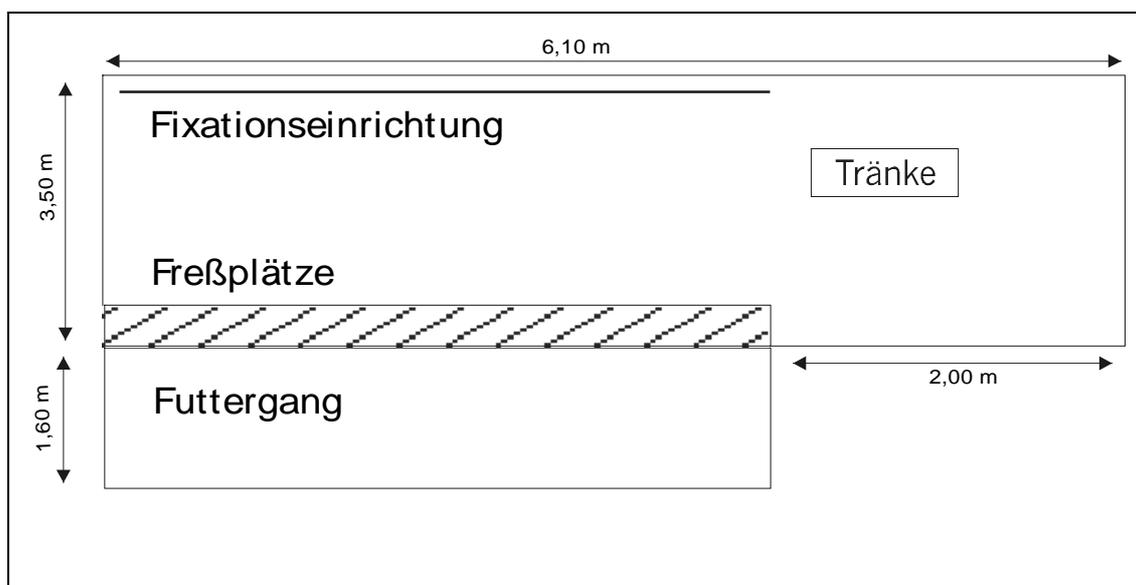


Abbildung 4: Skizze des Schafstalls (nicht maßstabsgetreu).

Die Futtermittelration, bestehend aus Maissilage und Heu, wurde zweimal täglich vorgelegt; zur Nährstoffergänzung wurde ein vitaminisiertes Mineralfuttermittel für Schafe eingesetzt. Die Fütterung erfolgte semi ad libitum, d.h. je Tier und Tag wurden 2 kg Maissilage zugeteilt, während Heu und Wasser zur freien Verfügung standen. Die verwendete Ration (s. Tabelle 8) deckte den Erhaltungsbedarf von nicht tragenden Schafen mit einem Lebendgewicht zwischen 60 und 80 kg. Über diesen Bedarf hinausgehende Futteransprüche konnten die Tiere durch den unlimitierten Verzehr von Heu decken.

Tabelle 8. Zusammensetzung der Futtermittelration. - Tabellenwerte aus: KIRCHGESSNER, 1987

Futtermittel	Frischsubstanz je Tier und Tag (kg)	Rohprotein Je Tier u. Tag (g)	Energiegehalt je Tier und Tag (StE)
Maissilage (32% TS)	2,00	52,00	408,00
Wiesenheu (86% TS)	0,50	69,00	177,50
Mineralfutter	0,01	--,-	--,-
<b>Gesamt</b>	<b>2,51</b>	<b>121,00</b>	<b>585,50</b>

### 3.2.4.3 Implantation der Venenverweilkatheter

Die geplanten endokrinologischen Untersuchungen erforderten frequente Blutentnahmen. Da Einzelpunktionen in diesem Ausmaß zu erheblichen Beeinträchtigungen der Versuchstiere geführt hätten, wurden den Tieren Venenverweilkatheter implantiert. Die Ausführung des operativen Eingriffes erfolgte durch Herrn Dr. W. Kraetzl, Versuchsstation Veitshof.

Nach 16-stündiger Nüchterung wurden die Tiere mit Xylazin und Ketamin sediert, das Operationsfeld großflächig ausgeschoren und desinfiziert. Im Bereich der Regio axillaris wurde die Haut eingeschnitten und die V. cephalica freipräpariert. Mit einer Irisschere wurde ein Zugang zum Lumen der Vene geschaffen und der Katheter herzwärts bis zur V. jugularis geschoben. Anschließend wurde der Katheter in der Nähe des Gefäßaustritts fixiert und subcutan in die Regio infraspinata verlegt. Um ein rasches Einwachsen des Katheters zu ermöglichen, wurde ein Stück Dacrongewebe am Katheter fixiert und am Hautdurchtritt eingelegt. Das freie Katheterende wurde mit einem LUER-Ansatzkonus versehen und in einem Ledertäschchen aufbewahrt, das direkt über dem Katheteraustritt fixiert wurde.

Nach Ende des Eingriffes wurde das Tier in ein eigens dafür eingerichtetes "Aufwach-Abteil" verlegt. Erst nach dem Abklingen der sedierungsbedingten Koordinationsschwierigkeiten, wurden die Tiere wieder in die Herde eingegliedert.

### 3.2.4.4 Versuchsdesign und Probennahmen

Da die zur Verfügung stehende Stallfläche und -einrichtung die gleichzeitige Haltung von 18 Tieren in artgerechter Weise nicht ermöglichte, wurde eine Unterteilung des Versuches in zwei direkt aufeinanderfolgende Durchgänge vorgenommen. Die folgende Abbildung 5 gibt schematisch den Ablauf eines Versuchsdurchgangs wieder.

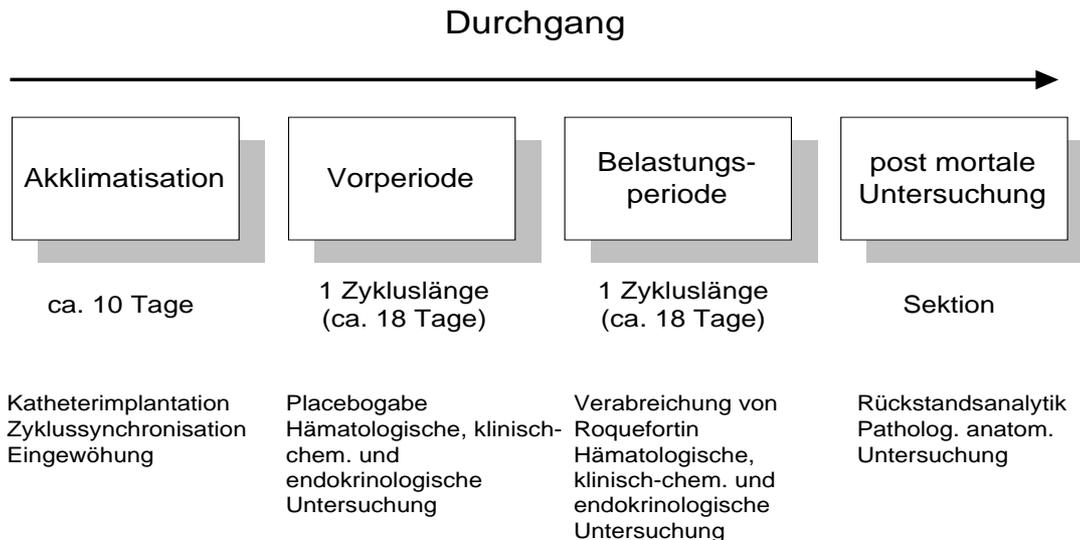


Abbildung 5. Schematische Darstellung eines Versuchsdurchgangs.

Zu Beginn der Akklimatisationsphase erfolgte die Implantation der Venenverweilkatheter und die post operative Behandlung, in der besonderes Augenmerk auf den Wundverschluss gelegt wurde. Zwei Tage nach dem operativen Eingriff wurde die Zyklussynchronisation mit einem  $\text{PGF}_{2\alpha}$ -Analogon durchgeführt. Im Abstand von 12 h wurde dazu den Tieren 2 x 1,5 ml Estrumate<sup>®</sup> (Cloprestenol) i.m. injiziert. Nach Ablauf von 9 Tagen wurde diese Behandlung wiederholt.

Mit Einsetzen der Brunst, ca. 2 Tage nach der letzten Cloprestenol-Injektion, begann die Vorperiode, die als tierindividueller Kontrollzeitraum diente. Mit der darauffolgenden Brunst begann die Belastungsperiode. In dieser Zeit wurde den Tieren der Versuchsgruppe **H** zu den Fütterungszeiten eine wasserlösliche Gelatine kapsel mit 25 mg Roquefortin über einen Pillengeber (Hauptner) verabreicht, so dass eine tägliche Roquefortinaufnahme von 50 mg erfolgte. Diese Dosierung entspricht einer Konzentration in Silage von 25 mg/kg und korrespondiert mit beobachteten Höchstgehalten von Roquefortin in natürlich kontaminierten Silagen. Den Schafen der Versuchsgruppe **M** wurde zu den

Fütterungszeiten eine Kapsel mit 5 mg Roquefortin verabreicht. Die tägliche Roquefortinaufnahme innerhalb dieser Gruppe betrug somit 10 mg Roquefortin pro Tier und Tag und entspricht einer Dosierung von 5 mg/kg Maissilage. Diese Roquefortinkonzentration entspricht den Durchschnittsgehalten natürlich kontaminierter Maissilagen.

Auf die jeweilige Versuchsgruppe bezogen kam es daher zu folgenden mittleren Roquefortinaufnahmen pro Tag:

**H:** 0,62 mg ( $\pm$  0,08) Roquefortin pro kg KGW

**M:** 0,13 mg ( $\pm$  0,012) Roquefortin pro kg KGW

**K:** 0,00 mg Roquefortin pro kg KGW

Während der Kontrollperiode wurden den Tieren roquefortinfreie Placebos appliziert, um einen Einfluss der Kapseleingabe berücksichtigen zu können. Diese Placebokapseln wurden den Kontrolltieren (Gruppe **K**) auch während des Belastungszeitraumes weiter eingegeben.

Während des gesamten Versuchzeitraums wurden die Katheter der Tiere nach jeder Blutentnahme, jedoch mindestens zweimal täglich, mit 10 ml einer Spüllösung, bestehend aus physiologischer Kochsalzlösung und Heparin (500 I.E./ml), gereinigt.

Abhängig von der Versuchsphase wurden Proben nach dem in Tabelle 9 dargestellten Schema entnommen.

**Tabelle 9: Schema der Probennahmen während Kontroll- und Belastungsperiode**

Art der Untersuchung	Art der Probe	Frequenz	
		Vorperiode	Belastungsperiode
Toxikologische Untersuchung	Plasma	2 / Woche	1 / Tag
	Harn	2 / Woche	1 / Tag
	Kot	2 / Woche	1 / Tag
	Gewebe	Post mortal	
Endokrinologische Untersuchung	Plasma	1 / Tag	2 / Tag
		Während Brunst alle 6 h	
Hämatologische Untersuchung	Vollblut	2 / Woche	2 / Woche
Klinisch-chemische Untersuchung	Serum	2 / Woche	2 / Woche

Kotproben wurden direkt aus dem Enddarm entnommen, Spontanurin wurde vorwiegend mit Hilfe von Harnbeuteln für Kinder gewonnen. Dazu wurde die Schamregion der fixierten Schafe vorsichtig gereinigt und ein selbstklebender Harnbeutel aufgebracht. Alternativ wurden die Tiere mit einem Harnkatheter für Hündinnen katheterisiert. Aufgrund der erhöhten Infektionsgefahr wurde von dieser Möglichkeit nur Gebrauch gemacht, wenn mit der Harnbeutelmethode mehrere Tage lang kein Urin von einem Tier aufgefangen werden konnte. Nach Ende der Belastungsperiode wurden die Tiere euthanasiert und der pathologisch-anatomischen Untersuchung zugeführt.

Während des gesamten Versuchszeitraums wurden nachfolgend aufgeführten Parameter erfaßt:

• **Klinische Untersuchung**

- Allgemeinbefinden
- sichtbare Schleimhäute
- Futterverzehr
- Rektaltemperatur

• **Lebendmasseentwicklung**

• **Klinisch-chemische und hämatologische Untersuchungen**

- ALT (Alaninaminotransferase)
- Erythrozytenzahl
- Gesamt-Bilirubin
- Leukozytenzahl
- AST (Aspartataminotransferase)
- Hämoglobin
- GLDH (Glutamat-Dehydrogenase)
- Thrombozytenzahl
- Blutglucose
- Hämatokrit

• **Roquefortingehalt**

- Galle
- Herz
- Pansensaft
- Milz
- Niere
- Plasma
- Lunge
- Kot
- Leber
- Harn
- Skelettmuskel

• **Hemmstofftest**

- Niere
- Skelettmuskel

• **Endokrinologische Untersuchungen**

- Progesteron
- LH (Luteotropes Hormon)
- FSH (Follikel stimulierendes Hormon)

### **3.2.4.5 Probenaufbereitung und -lagerung**

Kot- und Harnproben wurden ohne weitere Behandlung bei  $-21^{\circ}\text{C}$  in verschließbaren Kunststoffgefäßen asserviert.

Zur Gewinnung von Blutplasma wurden  $200\ \mu\text{l}$  einer Stabilisatorlösung (Acetylsalicylsäure) in Serumgewinnungsröhrchen einpipettiert und vorsichtig mit dem frisch entnommenen Blut vermischt. Danach wurde das Probenmaterial bei  $4.500\ \text{U}/\text{min}$  ( $4^{\circ}\text{C}$ , 20 min) zentrifugiert. Das Plasma wurde mittels Pasteurpipetten abgehebert, auf zwei Probenröhrchen verteilt und anschließend bei  $-21^{\circ}\text{C}$  gelagert.

Die Herstellung von Blutserum erfolgte mit Serumgewinnungsröhrchen (Sarstedt) und Zentrifugation unter den bereits genannten Bedingungen. Vollblutproben für die hämatologische und klin.-chem. Untersuchung wurden mit Hilfe von Fluorid- und Lithium-Heparin beschichteten Probenröhrchen (Sarstedt) gewonnen. Das für diese Untersuchungen aufbereitete Material wurde bei etwa  $5^{\circ}\text{C}$  in einer Kühltasche unmittelbar nach Gewinnung zum analysierenden Labor überführt.

### **3.2.4.6 Euthanasie und Sektion der Tiere**

Die Versuchstiere wurden am Institut für Tierpathologie der Ludwig-Maximilians-Universität euthanasiert. Dazu wurden den Tieren  $20\ \text{ml}$  Narcoren<sup>®</sup> über den Venenkatheter verabreicht. Unmittelbar nach Eintritt der Bewusstlosigkeit wurden die Tiere entblutet. Mit dieser Methodik wurde versucht, den herkömmlichen Schlachtprozess zu simulieren.

Die Sektion wurde ebenfalls am Institut für Tierpathologie der Ludwig-Maximilians-Universität durchgeführt. Nach Euthanasie und Blutentzug wurden die Tierkörper geöffnet und zunächst einer makroskopischen Beurteilung unterzogen. Präparate für die histologische Untersuchung wurden aus Gehirn, Herz, Hypophyse, Leber, Lunge, Milz, Nebenniere, Niere, Ovar, Pankreas, Schilddrüse, Skelettmuskel, Sternalmark und Uterus angefertigt; darüber hinaus wurden für die rückstandsanalytischen und mikrobiologischen Untersuchungen benötigten Proben entnommen.

### **3.2.5 Nachweis von LH, FSH und Progesteron**

Der Nachweis der einzelnen Hormone wurde am Institut für Physiologie der Technischen Universität München - Weihenstephan durchgeführt.

Die gonadotropen Hormone LH und FSH wurden mittels Radioimmuntest (RIA) in Doppelantikörpertechnik direkt aus dem Schafplasma bestimmt, wobei als Tracer ein Jodisotop verwendet wurde (WALTERS et al., 1984)..

Das Steroidhormon Progesteron (P-4) wurde ebenfalls direkt aus dem Schafplasma bestimmt. Zum Einsatz kam ein Enzymimmuntest (EIA) mit einem Meerrettich-Peroxidase-markiertem Antikörper (WALTERS et al., 1984).

Alle Hormonbestimmungen wurden im Doppelansatz durchgeführt, wobei definierte Kontrollproben mit sehr niedrigem bis sehr hohem Hormongehalt (Bestimmung der plattenspezifischen Eichkurve) bei jedem Ansatz mitgeführt wurden.

Diese Verfahren werden im Institut für Physiologie routinemäßig eingesetzt. Intra-Assay wird ein Fehler < 8 % angegeben, der Inter-Assay-Fehler beträgt 6 -12 %.

### **3.2.6 Mikrobiologische Pansensaftuntersuchung**

Nach Euthanasie der Tiere wurden etwa 200 ml frischer Pansensaft entnommen und in sterile Glasgefäße überführt. Diese Gefäße wurden luftdicht verschlossen und unmittelbar nach der Probennahme in das Labor gebracht, wo die nachfolgend aufgeführten Parameter umgehend bestimmt wurden.

- pH-Wert.
- Protozoengehalt
- Sedimentation
- Grobsinnliche Parameter (Geruch, Farbe, Konsistenz)

### 3.2.7 Chemisch-physikalischer Roquefortinnachweis

Die Extraktion der Proben erfolgte, abhängig vom Material (s. Tabelle 10), mit Ethylacetat, Chloroform, Acetonitril, Chloroform/Methanol ( $\Delta_{\text{MeOH}}=0,25$ ) oder einem Festphasen-Extraktionsverfahren.

Vor Herstellung der Rohextrakte wurden feste Probenmaterialien, wie Gewebe oder Kot, homogenisiert und durch Zusatz von wasserfreiem Natriumsulfat zum Extraktionsmittel mazeriert. Mit Ausnahme von Urin, erfolgte die Extraktion auf einem Laborschüttler bei Raumtemperatur über einen Zeitraum von 30 Minuten.

Im Urin vorhandenes Roquefortin wurde nach dem in Tabelle 10 beschriebenen Verfahren mit Hilfe eines Vakuumblocks in einer SPE-Säule angereichert und anschließend eluiert.

Die Rohextrakte bzw. die gereinigten Rohextrakte wurden im Rotationsverdampfer unter Vakuum bis zur Trockene eingengt und mit Methanol (Volumina s. Tabelle 10) im Ultraschallwasserbad resolviert und der HPLC-Untersuchung zugeführt.

**Tabelle 10: Probenaufbereitung der einzelnen Materialien**

Probenmaterial	Extraktion	Reinigungsschritt
<b>Galle</b> 5,0 ml	25,00 ml Chloroform + 0,25 ml NaOH (1N) 20 ml Filtrat => Einengen	Nicht erforderlich Resolvierung in 1,0 ml Methanol
<b>Herz, Milz, Lunge</b> 25,0 g	125,00 ml CHCl <sub>3</sub> /MeOH ( $\Delta_{\text{MeOH}}=0,25$ ) + 20,00 g Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> 50 ml Filtrat => Einengen	Nicht erforderlich Resolvierung in 1,0 ml Methanol
<b>Kot</b> 10,0 g	125,00 ml Chloroform + 10,00 g Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> 50 ml Filtrat => Einengen	Nicht erforderlich Resolvierung in 1,0 ml Methanol
<b>Leber, Niere</b> 25,0 g	125,00 ml Chloroform + 10,00 g Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> 100 ml Filtrat => Einengen	Nicht erforderlich Resolvierung in 1,0 ml Methanol
<b>Pansensaft</b> 12,5 ml	125,00 ml Ethylacetat + 25,00 ml NaHCO <sub>3</sub> (3%) + 10,00 ml NaOH (1N) 100 ml Ethylacetatphase => Einengen	<u>Säure-Base-Schritt</u> 100 ml Ethylacetat-Rohextrakt 2 x Ausschütteln mit 25 ml 0,01 N HCl HCl-Phasen vereinigen und mit 25 ml NaHCO <sub>3</sub> (3%) und 30 ml NaOH (1N) alkalisieren 2 x mit 25 ml Ethylacetat ausschütteln Ethylacetatphasen vereinigen, einengen und in 1,0 ml Methanol resolvieren
<b>Plasma</b> 2,5 ml	25,00 ml Acetonitril 20 ml Filtrat => Einengen	Nicht erforderlich Resolvierung in 0,5 ml Methanol
<b>Skelettmuskel</b> 25,0 g	125,00 ml CHCl <sub>3</sub> /MeOH ( $\Delta_{\text{MeOH}}=0,25$ ) + 10,00 g Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> 50 ml Filtrat => Einengen	Nicht erforderlich Resolvierung in 1,0 ml Methanol
<b>Urin</b> 10, ml	<u>Festphasenextraktion (SPE)</u> Säule: 0,5 g LiChrolut® RP-18 endcapped Konditionierung: 1 x 5 ml Methanol 2 x 5 ml Methanol/NaHCO <sub>3</sub> (3%) $\Delta_{\text{MeOH}}=0,5$ 4 x 5 ml Methanol( $\Delta_{\text{MeOH}}=0,7$ )-Wasser - (NH <sub>4</sub> )H <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> (5,75g ad 300 ml A.reinst))	Nicht erforderlich Resolvierung in 1,0 ml Methanol

### 3.2.8 Herstellung und Eichung des Roquefortinstandards

Zur Herstellung der Roquefortinstandardlösung wurde auf einer Analysenwaage 1 mg kristallines Roquefortin abgewogen und mit 10 ml Methanol gelöst. Anschließend erfolgte eine exaktere Konzentrationsbestimmung mit Hilfe eines Spektralphotometers (Perkin-Elmer) und Extinktionsmessung bei  $\lambda=328$  nm. Die Berechnung der Roquefortinkonzentration auf der Basis des Extinktionswertes wurde mit folgender Formel durchgeführt:

$$C = \frac{\Delta E \times MG \times 1000}{e \times d} \times F$$

C = Roquefortinkonzentration [:g/ml]

E = Extinktionswert

MG = Molekulargewicht (389,1851 Dalton)

e = Molarer Extinktionskoeffizient (27000 l/mol\*cm)

D = Schichtdicke (1,00 cm)

F = Verdünnungsfaktor

Von dieser geeichten Stammlösung wurden Verdünnungen angefertigt, die einer Konzentration von 10  $\mu\text{g}$  pro ml Methanol entsprachen und bei den HPLC-Untersuchungen als Vergleichsubstanz eingesetzt wurden.

### 3.2.9 HPLC-Verfahren zum Nachweis von Roquefortin

Der chemisch-physikalische Nachweis von Roquefortin erfolgte mittels HPLC und UV-Absorptionsmessung bei  $\lambda=328$  nm. Als stationäre Phase wurde eine RP-18 Säule (LiChro-CART<sup>®</sup>250-4) und als mobile Phase ein entgastes Gemisch aus Methanol ( $\Delta=0,7$ ) und  $(\text{NH}_4)\text{H}_2\text{PO}_4$ -Lösung (5,75g ad 300 ml Aqua reinst) eingesetzt. Die Probenaufgabe erfolgte mit einer 50  $\mu\text{l}$  Hamilton<sup>®</sup>-Spritze und einem Rheodyne<sup>®</sup>-Ventil, an das eine 20  $\mu\text{l}$  Probenschleife angeschlossen war. Bei der gewählten Flussrate von 1,2 ml pro Minute (isokratisch), ist bei diesem System eine Retentionszeit für Roquefortin von etwa 5 - 6 Minuten zu erwarten; in diesem Zeitfenster wurde parallel zur Absorptionsmessung ein Diodenarray-Spektrum aufgezeichnet, was als zusätzliches Identifikationskriterium verwendet wurde. Die quantitative Auswertung der Chromatogramme erfolgte durch Vergleich der Peakflächen von Probe und Roquefortinstandard bekannter Konzentration nach folgender Formel:

$$\text{ROF} = \frac{\mathbf{S} \times \mathbf{A}_p \times \mathbf{V}}{\mathbf{A}_s \times \mathbf{I}} \times \mathbf{F}$$

ROF = Roquefortingehalt der Probe [g/kg bzw. G/l]

S = Menge des Toxinstandards [:g]

A<sub>p</sub> = Peakfläche der Probe [counts]

A<sub>s</sub> = Peakfläche des Standards [counts]

V = Volumen des gelösten Probenextraktes [:l]

I = Injektionsvolumen [:l]

F = Verdünnungsfaktor: Quotient aus Gesamtprobenmenge [g] und Probenmenge [g] gelöst in V

### 3.2.10 Methodenvalidierung

Zur Validierung der eingesetzten Nachweismethoden wurden entsprechende Probenmaterialien artifiziell mit Roquefortin in verschiedenen Konzentrationen kontaminiert (s. Tabelle 11) und nach den entsprechenden Analysenvorschriften untersucht.

**Tabelle 11. Methodenvalidierung: Roquefortinkonzentrationen, Anzahl der Wiederholungen und Herkunft des Probenmaterials**

Material (Herkunft)	Roquefortinzugabe ( $\mu\text{g/g}$ bzw. $\mu\text{g/ml}$ )					Wiederholungen (n)	Anzahl Analysen (n)
Herz (Rind)	0,00	0,10	0,25	0,50	1,00	3	15
Muskel (Rind)	0,00	0,10	0,25	0,50	1,00	3	15
Milz (Rind)	0,00	0,10	0,25	0,50	1,00	3	15
Galle (Rind)	0,00	0,10	0,25	0,50	1,00	3	15
Leber (Rind)	0,00	0,10	0,25	0,50	1,00	3	15
Harn (Rind, Schaf)	0,00	0,10	0,25	0,50	1,00	3	15
Kot (Rind, Schaf)	0,00	0,10	0,25	0,50	1,00	3	15
Niere (Rind)	0,00	0,10	0,25	0,50	1,00	3	15
Plasma (Rind, Schaf)	0,00	0,10	0,25	0,50	1,00	3	15
Pansensaft (Rind)	0,00	0,10	0,25	0,50	1,00	3	15

Anhand der Analyseergebnisse wurden die mittlere Wiederfindungsrate, Standardabweichung und das 95%-Konfidenzintervall jeder Methode bestimmt.

### **3.2.11 Statistische Auswertungen**

Für die statistische Auswertung der Daten wurde das zweistufige LSD-Testverfahren verwendet. In der ersten Stufe wurde mit Hilfe einer Varianzanalyse ein F-Test auf die Gleichheit der Mittelwerte durchgeführt. Im Ablehnungsfall (die Mittelwerte sind unterschiedlich) wurde in einer zweiten Stufe ein multipler t-Test verwendet, um die Mittelwerte zu ermitteln, die signifikante Unterschiede aufwiesen.

## 4 ERGEBNISSE

### 4.1 Herstellung von Roquefortin

#### 4.1.1 Vorversuche

##### 4.1.1.1 Selektion eines geeigneten *P. roqueforti* Stammes

In der Tabelle 12 sind die Einzelergebnisse, Mittelwerte und Standardabweichungen der Selektionsversuche dargestellt. Die varianzanalytische Auswertung des Datenmaterials ergab, dass hochsignifikante Unterschiede ( $p \leq 0,05$ ) zwischen einzelnen *P. roqueforti* Stämmen vorlagen. Als Grenzdifferenz ( $\alpha = 5\%$ ) wurde ein Wert von  $0,269 \mu\text{g}$  Roquefortin bestimmt, d.h. Unterschiede zwischen Mittelwerten, die größer als die Grenzdifferenz sind, unterscheiden sich signifikant voneinander. Mit dieser Methodik wurde festgestellt, dass die Roquefortinsynthese des *P. roqueforti* Stammes 150/92 a (Ifd. Nr. 13) signifikant höher war als die der anderen getesteten Stämme. Daher wurde in den weiteren Versuchen und zur Roquefortinproduktion der Stamm 150/92 a eingesetzt.

**Tabelle 12. Roquefortinbildungsvermögen verschiedener *P. roqueforti* Stämme.**

Lfd. Nr.	Roquefortin ( $\mu\text{g}/\text{Ansatz}$ )				
	Ansatz 1	Ansatz 2	Ansatz 3	$\bar{x}$	s
1	0,600	0,540	0,560	0,567	0,031
2	0,016	0,016	0,020	0,017	0,002
3	0,460	0,640	0,520	0,540	0,092
4	0,920	0,820	0,580	0,773	0,175
5	0,460	0,420	0,380	0,420	0,040
6	1,380	1,240	0,780	1,133	0,314
7	0,400	0,480	0,340	0,407	0,070
8	0,500	0,660	0,820	0,660	0,160
9	0,460	0,540	0,400	0,467	0,070
10	0,500	0,540	0,620	0,553	0,061
11	0,440	0,580	0,540	0,520	0,072
12	0,140	0,008	0,160	0,103	0,083
13	2,360	1,700	2,420	2,160	0,399
14	1,000	0,820	0,901	0,927	0,095
15	1,240	1,160	0,680	1,027	0,303
16	1,700	1,840	1,700	1,747	0,081
17	1,660	1,520	1,420	1,533	0,121

#### 4.1.1.2 Nährmedienoptimierung

##### Einfluss von L-Tryptophan und L-Histidin auf die Roquefortinbildung

Der Zusatz von L-Tryptophan und L-Histidin führte nicht zu der erwarteten deutlichen Steigerung der Roquefortinbildung (Tabelle 13). Allein bei einer 0,1 %igen Supplementierung waren bei 2 von 3 Versuchsansätzen geringgradig höhere Roquefortingehalte feststellbar als bei den entsprechenden Kontrollen. Eine weitere Erhöhung der Tryptophan- und Histidiningehalte hatte eher negative Auswirkungen auf die Roquefortinbildung.

**Tabelle 13: Bildung von Roquefortin (Stamm-Nr. 13) bei unterschiedlichen Tryptophan- und Histidinsupplementierungen**

Ansatz	Roquefortin ( $\mu\text{g}/\text{Ansatz}$ )					
	0,00 %	0,10 %	0,25 %	0,50 %	0,75 %	1,00 %
I	76,08	29,64	97,70	107,30	96,78	82,90
II	116,20	128,02	93,22	105,88	89,80	87,72
III	91,24	110,72	96,24	101,42	86,30	88,60
$\bar{x}$	94,51	89,46	95,72	104,80	90,96	86,41
S	20,26	52,52	2,28	3,07	5,34	3,07

Vergleicht man die Resultate mit dem in Tabelle 12 dargestellten Ergebnissen, so fällt auf, dass bei diesem Versuch prinzipiell mehr Roquefortin nachgewiesen wurde als dies bei der Selektion der Stämme der Fall war. Dies dürfte in erster Linie auf das unterschiedliche Extraktionsverfahren zurückzuführen sein. Während bei dem Selektionsversuch Mycel und Medium gemeinsam extrahiert wurden, wurde bei den Versuchen zur Nährmedienoptimierung Mycel und Medium getrennt und mit unterschiedlichen Lösungsmitteln extrahiert.

### Einfluss von Essigsäure auf die Roquefortinbildung

In Tabelle 14 sind die Einzelergebnisse, Mittelwerte und Standardabweichungen dieser Versuche dargestellt. Die varianzanalytische Auswertung der Daten ergab, dass zwischen den Mittelwerten der verschiedenen pH-Gruppen hochsignifikante Abweichungen vorlagen ( $p \leq 0,05$ ).

Die statistische Auswertung der Resultate mit Hilfe des multiplen t-Tests zeigte, dass eine Korrektur des pH-Wertes mit Hilfe von Essigsäure auf 4,0 zu einer signifikant höheren Roquefortin-Synthese führt als dies bei pH 4,5 oder 5,0 der Fall ist. Dabei bleibt jedoch unklar, ob es sich hier um Effekt der  $H_3O^+$ -Ionenkonzentration oder um eine Precursor-Wirkung des höheren Essigsäure-Angebots handelt, die zu einer verbesserten Acetyl-CoA-Bereitstellung führt (vergl. Kapitel 2.3 Roquefortinbiosynthese). Darüber hinaus hat sich gezeigt, dass durch den Zusatz von Essigsäure das Risiko bakterieller oder mycetischer Sekundärinfektionen deutlich reduziert wurde.

**Tabelle 14: Einfluss unterschiedlicher Essigsäurezusätze auf die Roquefortinsynthese von Stamm-Nr. 13**

Wiederholung	Roquefortin ( $\mu\text{g}/\text{Ansatz}$ )			
	pH 3,5	pH 4,0	pH 4,5	pH 5,0
I	0,00	129,26	79,56	69,20
II	0,00	125,70	79,06	83,52
III	0,00	132,54	72,64	73,00
$\bar{x}$	0,00	129,17	77,09	75,24
s	0,00	3,42	3,86	7,42

#### 4.1.2 Herstellung und Reinigung von Roquefortin für das Versuchsvorhaben

Während eines Zeitraums von 14 Monaten wurden mit den beschriebenen Methoden ca. 10 g hoch angereichertes Rohtoxin hergestellt, das für die klinische Studie und zu analytischen Zwecken verwendet wurde. Zu Beginn der Produktionsperiode betrug die Roquefortinausbeute nur ca. 5 mg Roquefortin pro Liter Nährmedium. Durch die kontinuierliche Optimierung des Produktionsverfahrens konnte die Ausbeute auf bis zu 120 mg Roquefortin pro Liter Medium gesteigert werden, so dass im Durchschnitt ca. 43 mg gereinigtes Roquefortin pro Liter Nährmedium gewonnen wurden. Speziell der Zusatz von Essigsäure führte zu stabilen Produktionsbedingungen, da Sekundärkontaminationen, die zuvor häufiger auftraten, erheblich reduziert wurden.

Die dünnschichtchromatographischen und hochleistungsflüssigchromatographischen Untersuchungen ergaben, dass die gewonnene Roquefortinpräparation weitgehend frei von unerwünschten Begleitsubstanzen war (vergl. Abbildung 6 und Abbildung 7 sowie Abbildung 9).

Die Identität von Roquefortin wurde anhand der Retentionszeit (6,00 min) und des UVSpektrums bestimmt. Dabei wiesen die Spektren von Roquefortinreferenzsubstanz und hergestelltem Roquefortin eine sehr hohe Übereinstimmung auf (s. Abbildung 8); der von der HPLC-Software berechnete Korrelationskoeffizient zwischen den Spektren betrug 0,99. Diese Ergebnisse wurden auch durch die massenspektrometrischen Untersuchungen bestätigt. Nach Direktinjektion konnten die für Roquefortin typischen Massen  $m/z$  390,2; 322,2 und 193,0 eindeutig im Spektrum des hergestellten Materials erkannt werden (s. Abbildung 10). Auf Verunreinigungen weisen die Massen  $m/z$  367,2 und 299,09 hin.

Auch im Vergleich der antimikrobiellen Wirkung von Roquefortinreferenzsubstanz und produziertem Roquefortin waren keine Unterschiede zu beobachten. Im Reihenverdünnungstest wurden bei beiden Substanzen antimikrobielle Wirkungen gegenüber *B. stearothermophilus* ab einer Konzentration von 50 µg pro ml festgestellt.

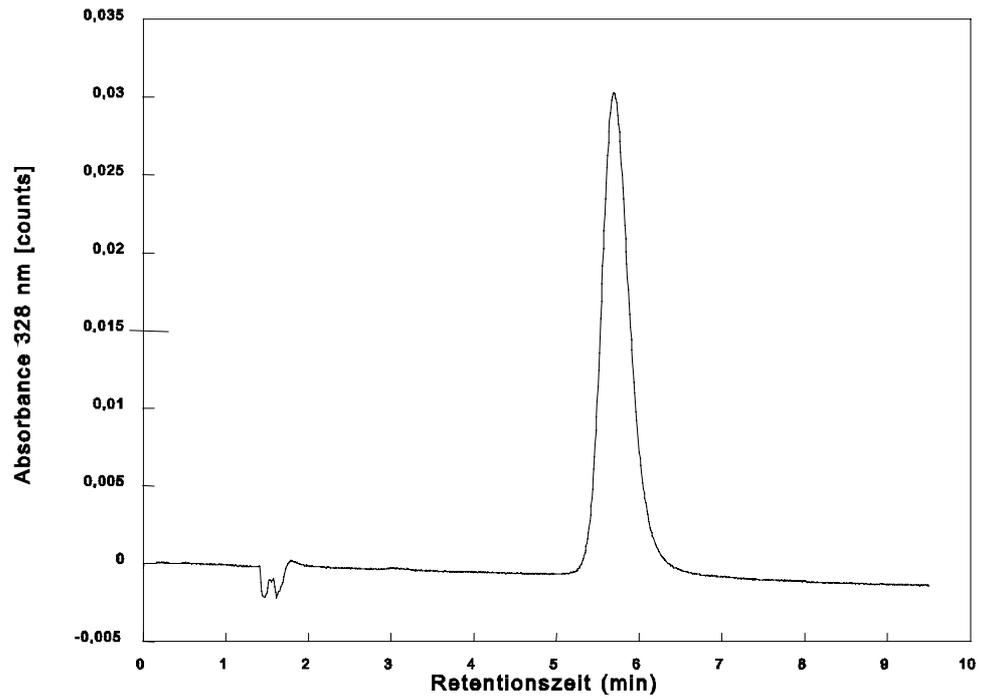


Abbildung 6. HPLC-Chromatogramm von Roquefortinstandard.

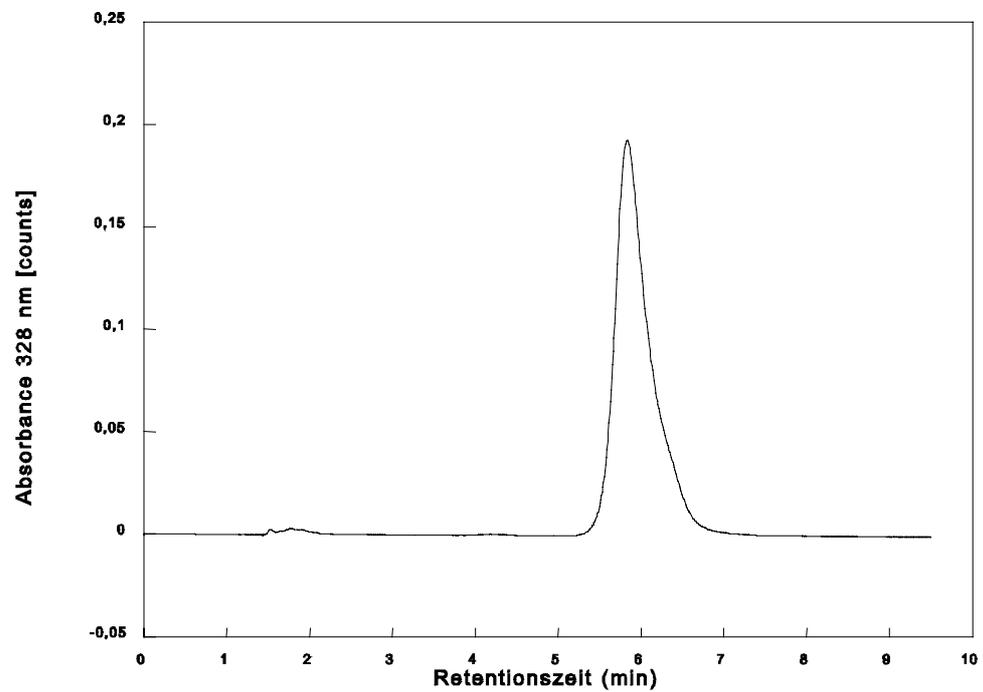


Abbildung 7. HPLC-Chromatogramm der Roquefortinpräparation.

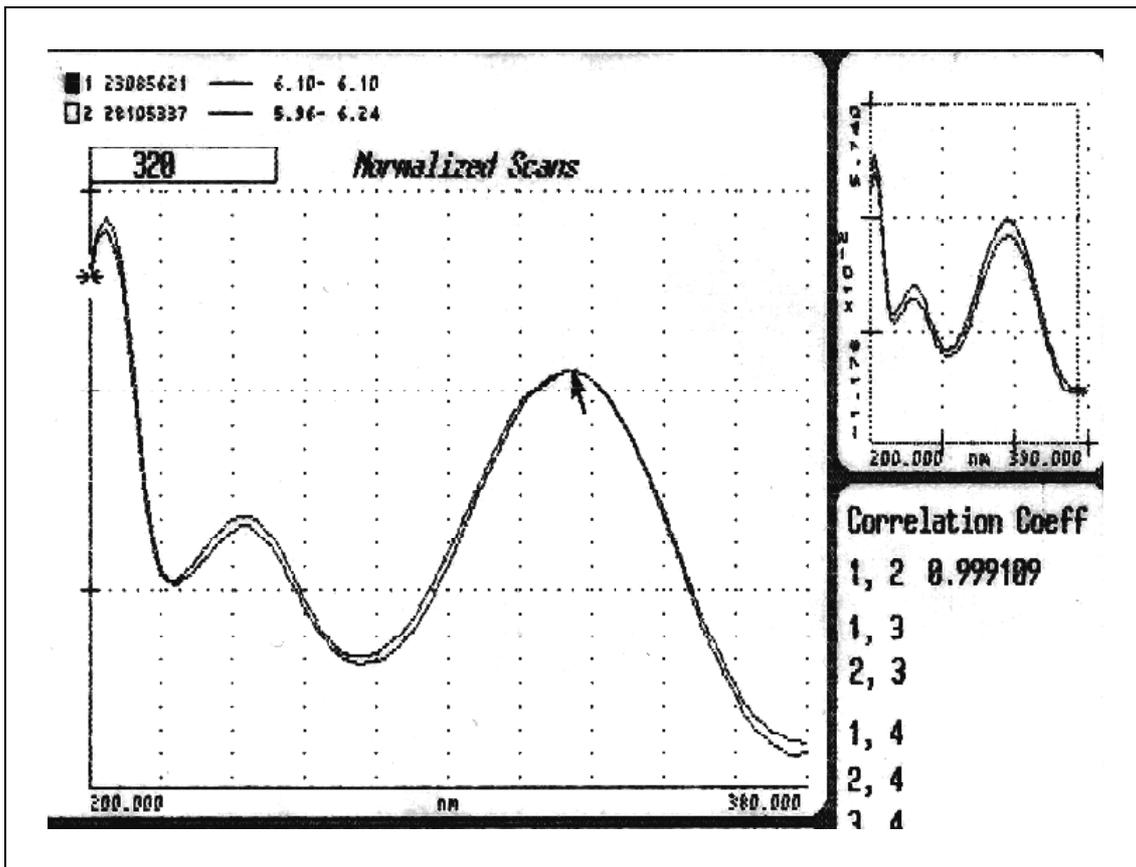


Abbildung 8. HPLC-Spektren von Roquefortin-Standard und gereinigtem Roquefortin.

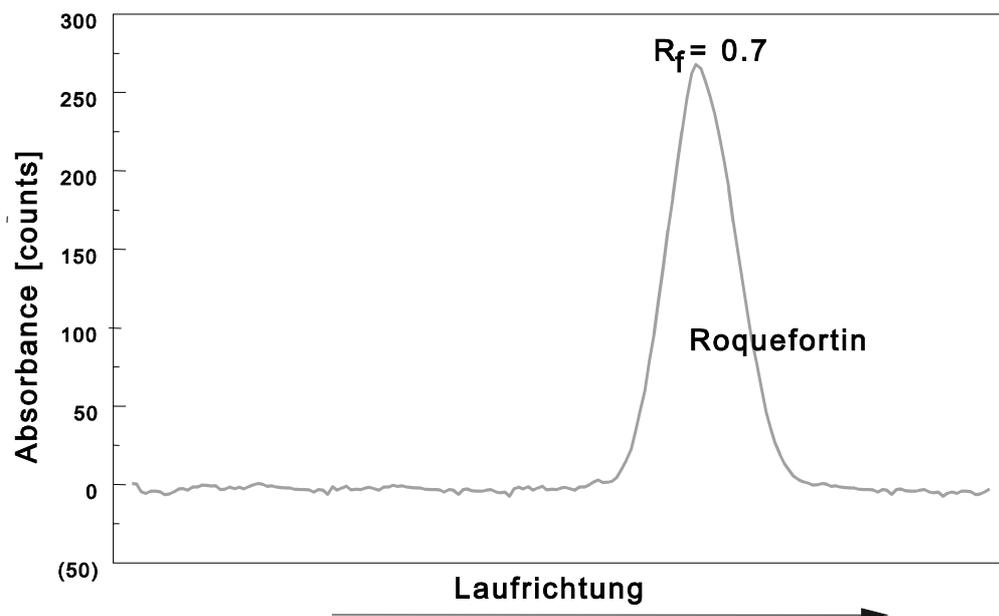


Abbildung 9. DC-Chromatogramm der Roquefortin-Präparation.

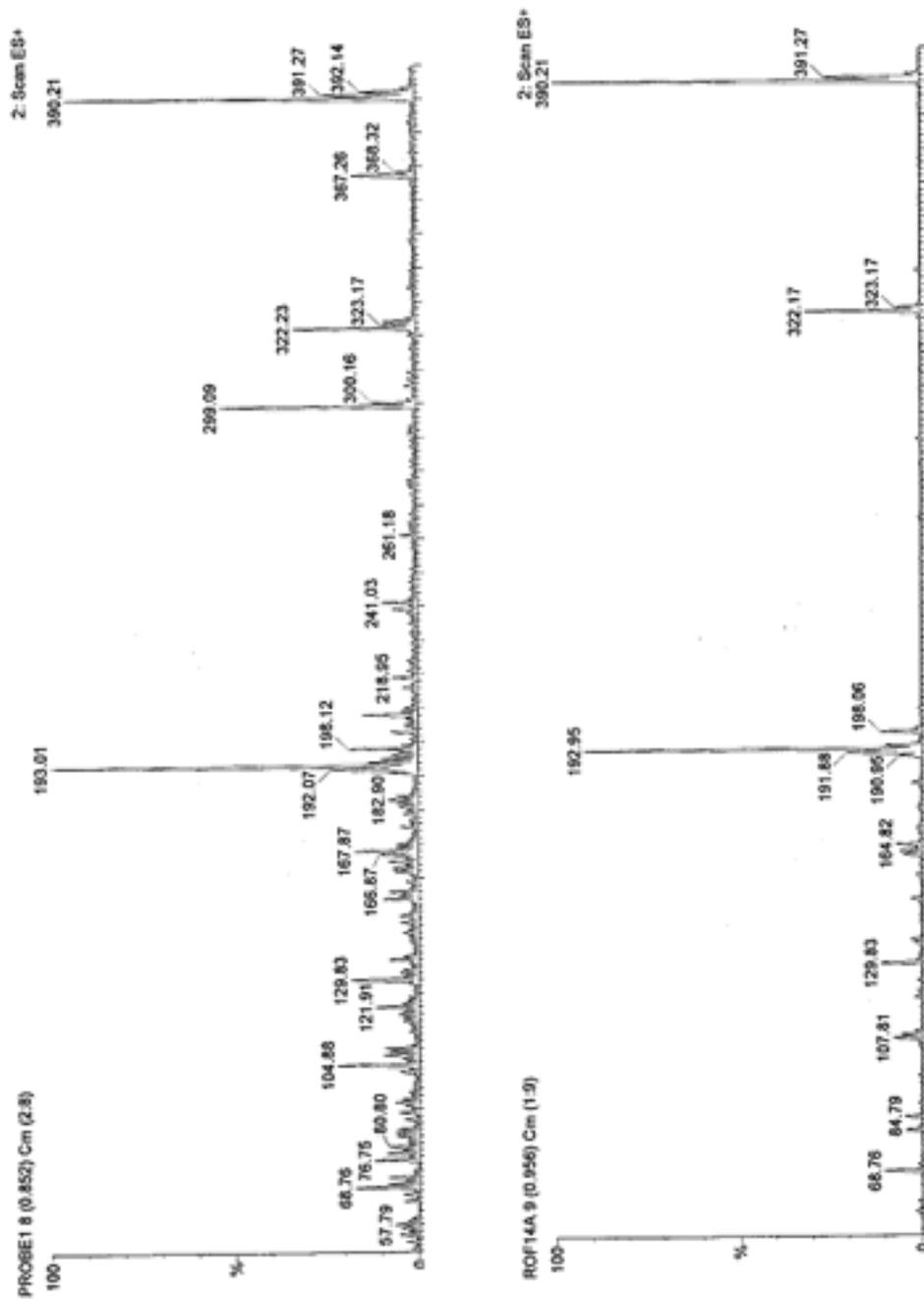


Abbildung 10. Massenspektrum von Roquefortin-Rohtoxin (links) und Roquefortin-Referenzsubstanz (rechts) (jeweils Direkteinspritzung).

## 4.2 Ergebnisse der Methodvalidierung

Mit den entwickelten Methoden war durchwegs ein Nachweis von 0,10 µg/ml bzw. g möglich. Die durchschnittlichen Wiederfindungsraten variierten zwischen 88,9 % (Skelettmuskulatur) und 59,6 % (Niere; vergl. Tabelle 15)

**Tabelle 15. Ergebnisse der Methodvalidierung.**

Probenmaterial	Wiederfindung		mittlere Wiederfindung 95%-Konfidenzintervall
	(%)	s <sub>n-1</sub>	
Galle	64,75	5,40	(64,75 ± 2,80) %
Herz	71,25	12,38	(71,25 ± 6,42) %
Kot	72,33	14,11	(72,33 ± 7,32) %
Leber	66,33	8,35	(66,33 ± 4,33) %
Lunge	73,33	5,76	(73,33 ± 2,99) %
Milz	60,50	12,27	(60,50 ± 6,36) %
Niere	59,58	6,39	(59,58 ± 3,31) %
Pansensaft	60,50	8,85	(60,50 ± 4,59) %
Plasma	70,67	16,81	(70,67 ± 8,72) %
Skelettmuskel	80,75	7,43	(80,75 ± 3,85) %
Urin	88,92	10,09	(88,92 ± 5,23) %

## 4.3 Resultate des Fütterungsversuches

### 4.3.1 Klinische, hämatologische und Klinisch-chemische Resultate

Über den gesamten Versuchszeitraum wurden mit einer Ausnahme keine Beeinträchtigungen des Allgemeinbefindens festgestellt. Futter- und Wasseraufnahme sowie Harn- und Kotabsatz waren normal. Die gemessenen Rektaltemperaturen (s. Anhang) waren im physiologischen Bereich.

**Tabelle 16. Gewichtsentwicklung der Schafe während des Versuchszeitraums**

Tier	Beginn Vorperiode [kg]	Beginn Belastungsperiode [kg]	Ende Belastungsperiode [kg]
H-472	73,0	72,0	71,5
H-476	88,0	88,0	91,0
H-479	72,0	72,0	74,0
H-486	72,0	74,0	75,0
H-487	83,0	88,0	92,0
K-471	72,0	73,00	75,00
K-473	89,0	94,0	93,0
K-474	79,0	73,0	74,5
K-481	82,0	87,0	87,0
K-482	61,0	61,0	62,0
K-488	76,0	78,0	80,0
M-007	70,0	73,0	77,0
M-475	83,0	86,0	90,0
M-477	71,0	71,0	73,0
M-480	92,0	94,0	97,0
M-485	77,0	81,0	88,0
M-489	81,0	83,0	86,0
M-490	70,0	71,0	75,0

Wie der Tabelle 16 entnommen werden kann, änderte sich das Körpergewicht der Schafe während des Versuchszeitraums nur geringfügig. Während der Behandlungsperiode waren bei keinem Tier deutliche Gewichtsverluste zu beobachten. Mit Ausnahme der Tiere H472, K473 und K481 waren in diesem Versuchsabschnitt sogar Zunahmen bis zu 7,0 kg zu verzeichnen. Größere Gewichtsreduktionen traten nur während der Vorperiode bei dem Kontrolltier K474 auf.

#### 4.3.2 Ergebnisse der hämatologischen Untersuchungen

Die Resultate der hämatologischen Untersuchungen sind der Übersicht wegen in den folgenden Abbildungen dargestellt. Generell ist festzustellen, dass die Verabreichung von Roquefortin zu keinen auffälligen Abweichungen von den als physiologisch anerkannten Werten führte.

Die durchschnittliche Erythrozytenzahl der Tiere lagen in einem Bereich von  $6,36 \times 10^{12} / l$  bis  $7,47 \times 10^{12} / l$ . Eine dosisabhängige Veränderung der Werte konnte nicht beobachtet werden.

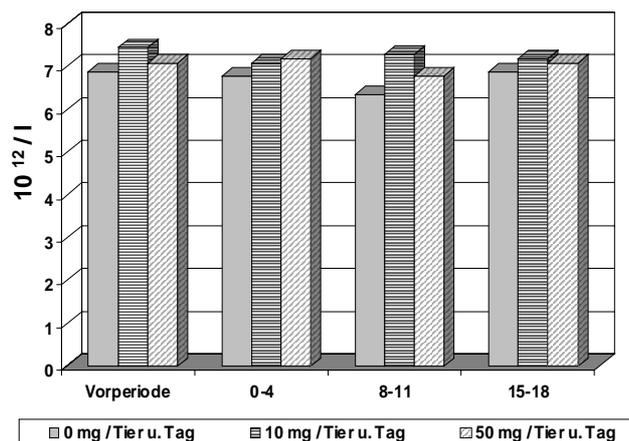


Abbildung 11. Einfluss von Roquefortin auf die Erythrozytenzahl beim Schaf (n=6/Gruppe).

Vergleichbares gilt auch für die Zahl der Leukozyten. Die Proben der mit 50 mg Roquefortin pro Tag behandelten Tiere wiesen zwar durchwegs höhere Werte als die Kontrolltiere auf, allerdings konnte dieser Sachverhalt bereits während der Vorperiode beobachtet werden.

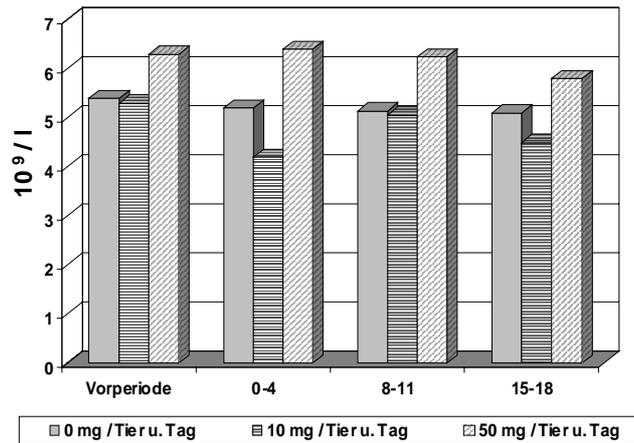


Abbildung 12. Einfluss von Roquefortin auf die Leukozytenzahl im Blut beim Schaf (n=6/Gruppe)

Die Werte der Thrombozytenzahlen wiesen während des gesamten Versuches die stärksten Schwankungen auf und lagen meist im unteren Bereich der physiologischen Normwerte. Ein Zusammenhang zwischen der Applikationsdauer und/oder der Roquefortindosierung kann jedoch nicht abgeleitet werden.

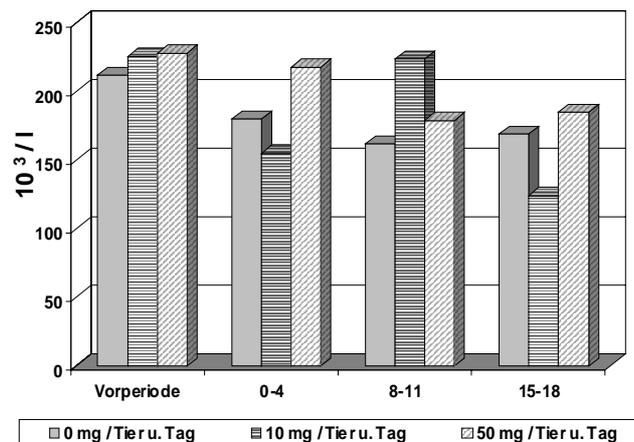


Abbildung 13. Einfluss von Roquefortin auf die Thrombozytenzahlen beim Schaf (n=6/Gruppe).

Die Hämatokritwerte lassen ebenfalls keinen Einfluss der Roquefortinverabreichung erkennen. Die ermittelten Durchschnittswerte liegen allerdings deutlich unterhalb des physiologischen Bereiches von 30 - 36%. Dies ist in erster Linie auf die frequenten Blutentnahmen zurückzuführen.

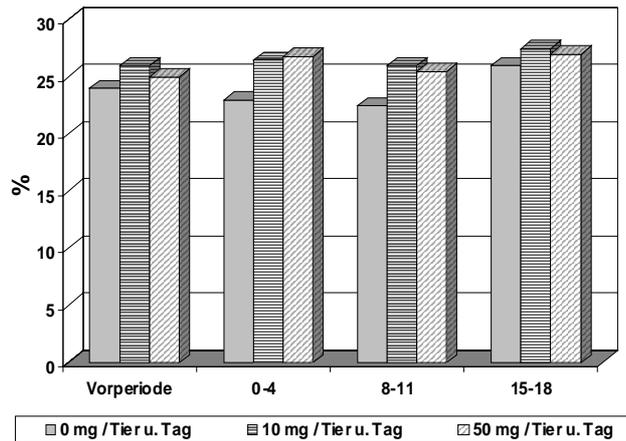


Abbildung 14. Einfluss von Roquefortin auf den Hämatokrit beim Schaf (n=6/Gruppe).

Die mittleren Hämoglobingehalte variierten zwischen den Versuchsgruppen in dem Bereich von 8,32 g/dl bis 9,28 g/dl. Diese Werte liegen geringfügig unterhalb der physiologisch anerkannten Grenze von 10,00 g/dl. Ursache hierfür dürften ebenfalls die frequenten Blutentnahmen sein.

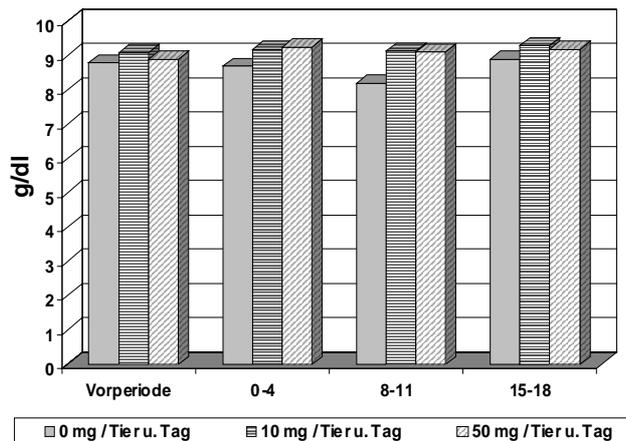


Abbildung 15. Einfluss von Roquefortin auf den Hämoglobingehalt des Blutes beim Schaf (n=6/Gruppe).

### 4.3.3 Ergebnisse der klinisch-chem. Untersuchungen

Auch die Resultate der klinisch-chemischen Untersuchungen geben keinen Hinweis auf eine Beeinträchtigung des Gesundheitszustandes durch die Roquefortinapplikation.

Die Blutglukosekonzentrationen lagen bei allen Tieren geringgradig über dem als physiologische geltenden Bereich. Da diese leicht erhöhten Konzentrationen auch bei den Tieren der Kontrollgruppe beobachtet werden konnten, ist ein Zusammenhang zwischen der Roquefortinverabreichung und den Blutglukosekonzentrationen nicht festzustellen.

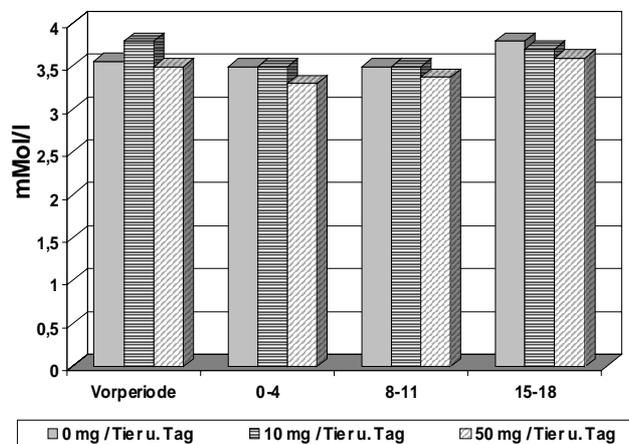


Abbildung 16. Einfluss von Roquefortin auf die Blutglukosekonzentration beim Schaf (n=6/Gruppe).

Des weiteren wurden während Vor- und Belastungsperiode keine Bilirubingehalte gemessen, die den physiologischen Grenzwert überschritten. Dies gilt ebenso für die Werte der Alaninaminotransferase, Aspartataminotransferase und Glutamatdehydrogenase; Veränderungen, die mit der Applikation von Roquefortin in Zusammenhang gebracht werden könnten, wurden nicht beobachtet.

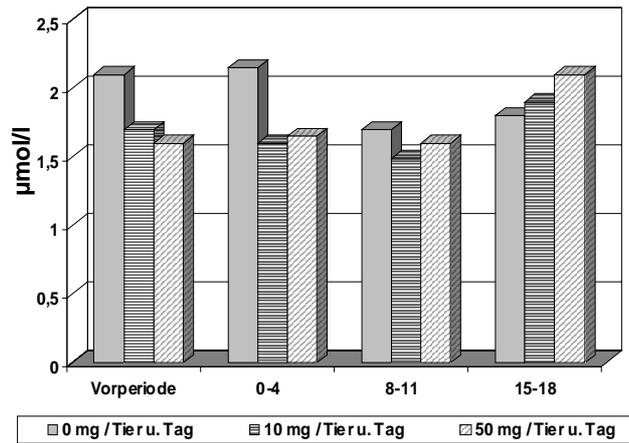


Abbildung 17. Einfluss von Roquefortin auf den Gesamtbilirubingehalt im Blut beim Schaf (n=6/Gruppe).

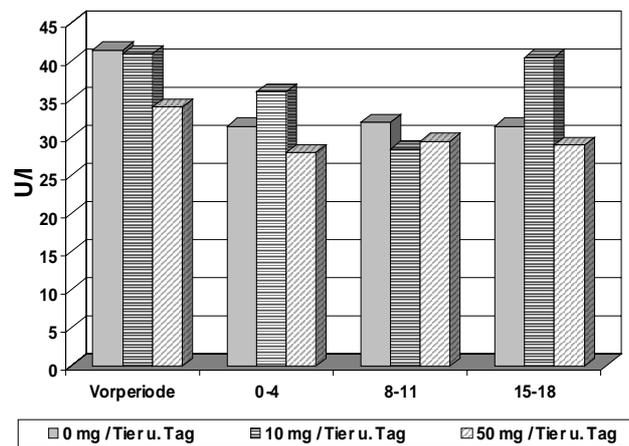


Abbildung 18. Einfluss von Roquefortin auf die Alaninaminotransferase beim Schaf (n=6/Gruppe).

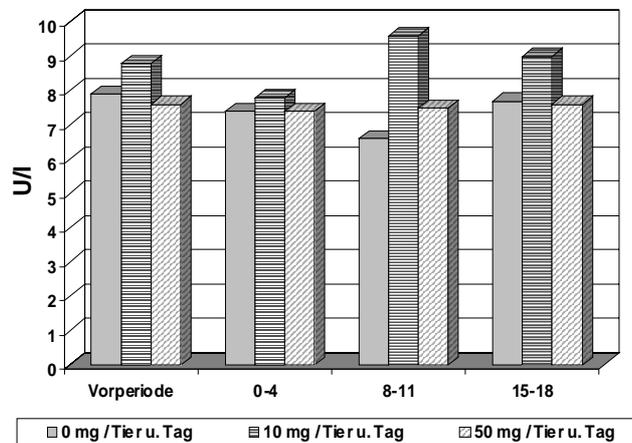


Abbildung 19. Einfluss von Roquefortin auf die Aspartataminotransferase beim Schaf (n=6/Gruppe).

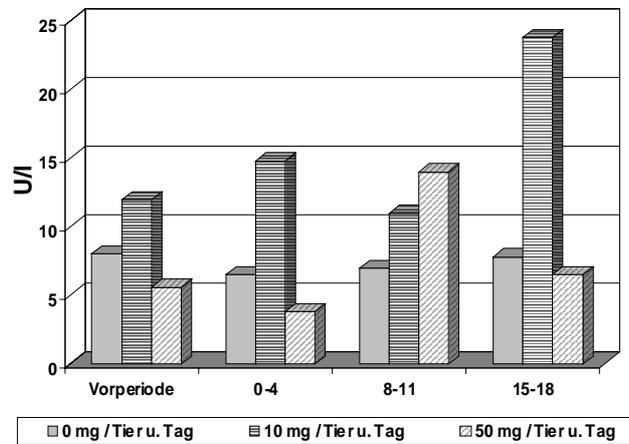


Abbildung 20. Einfluss von Roquefortin auf die Glutamat-Dehydrogenase beim Schaf (n=6/Gruppe).

#### 4.3.4 Pansensaft: pH-Werte

Die bestimmten durchschnittlichen pH-Werte der Versuchsgruppen (Einzelwerte s. Anhang) sind der Tabelle 17 zu entnehmen.

Tabelle 17. Mittlere pH-Werte der Pansensaftproben.

Versuchsgruppe	$\bar{x}$	$\sigma$
K (Kontrolle)	6,01*	5,98
M (10 mg Roquefortin pro Tag)	5,75	5,99
H (50 mg Roquefortin pro Tag)	5,59*	6,03

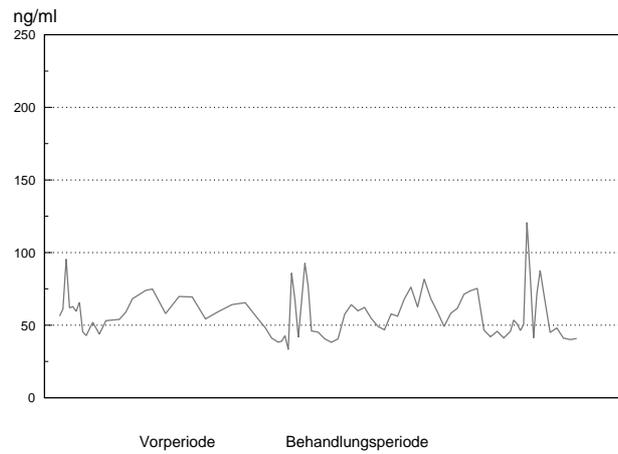
\* statistisch gesicherte Abweichung von 0,42 pH-Einheiten bei Signifikanzniveau = 5%

Die Differenz von 0,42 pH-Einheiten zwischen Kontrollgruppe und Versuchsgruppe **H** konnte varianzanalytisch auf einem Signifikanzniveau von 5% abgesichert werden. Signifikante Unterschiede zwischen Kontrollgruppe- und Versuchsgruppe **M** oder zwischen den beiden Versuchsgruppen waren dagegen nicht festzustellen.

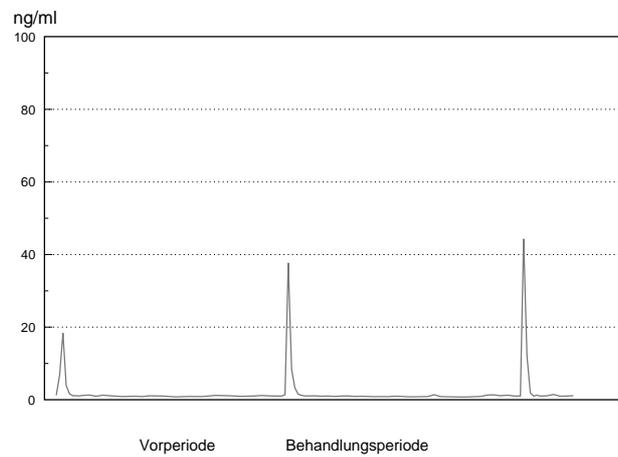
#### **4.3.5 Resultate der endokrinologischen Untersuchungen**

Da Hormonprofile starken individuellen Schwankungen unterliegen, sind die Resultate für jedes Tier im Anhang wiedergegeben. Die Profile der FSH, LH und Progesterongehalte bei unterschiedlichen Roquefortinbelastungen sind exemplarisch an jeweils einem Tier dargestellt. Daraus geht hervor, dass während der Vorperiode sowohl die Tiere der Behandlungsgruppen als auch die Kontrollgruppe ein einwandfreies Zyklusgeschehen aufwiesen, so dass die Schafe für das Versuchsvorhaben geeignet waren. Darüber hinaus wiesen die Kontrolltiere während der Behandlungsperiode ebenfalls einen physiologischen Zyklus auf. Somit kann davon ausgegangen werden, dass in diesem Zeitraum keine Einflüsse vorhanden waren, die die Ergebnisse der Behandlungsgruppe hätten beeinträchtigen können. Weder im tierindividuellen Vergleich von Vor- zu Behandlungsperiode noch im Vergleich der Versuchsgruppen untereinander ist ein Einfluss von Roquefortin auf die Hormonprofile zu erkennen. Der Sachverhalt, dass bei bestimmten Tieren die LH bzw. FSH Peaks unterschiedlich hoch ausfielen, ist weniger das Resultat der Roquefortinverabreichung, sondern hängt vermutlich mit dem Zeitpunkt der Probennahme zusammen.

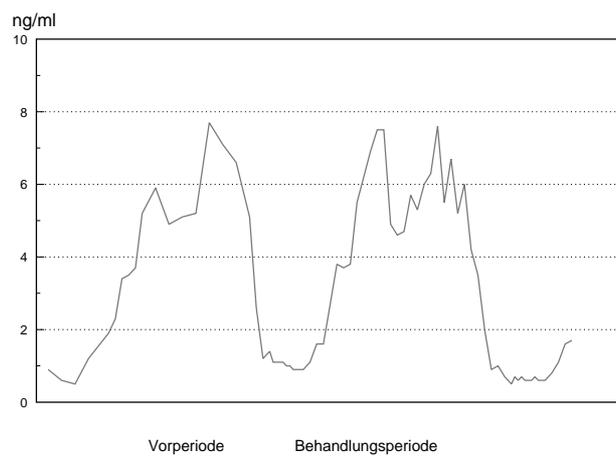
A



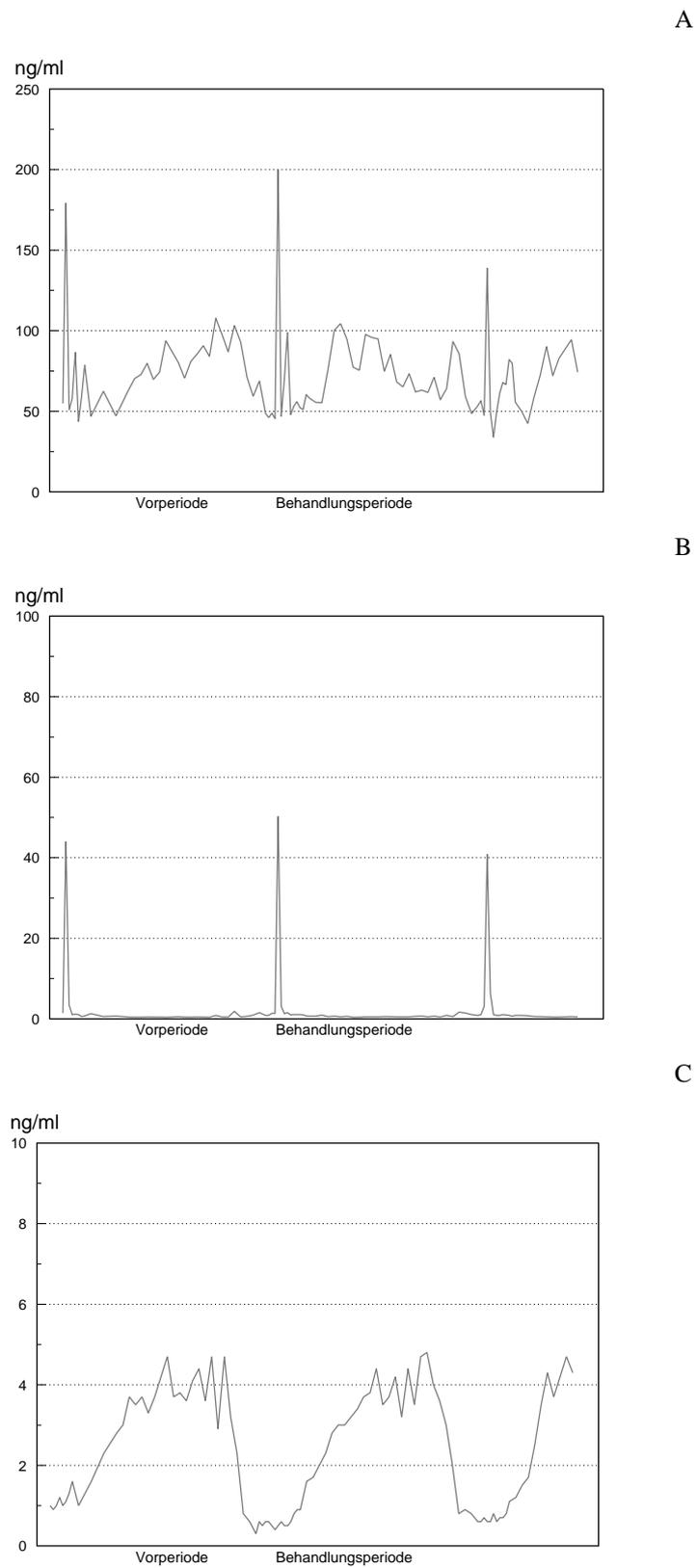
B



C



**Abbildung 21. Hormonprofile Tier K471 (Roquefortin C- Dosierung 0,0 mg/Tag; A: FSH, B: LH, C: Progesteron).**



**Abbildung 22. Hormonprofile Tier M007 (Roquefortin C-Dosierung 10,0 mg/Tag; A: FSH, B: LH, C: Progesteron).**

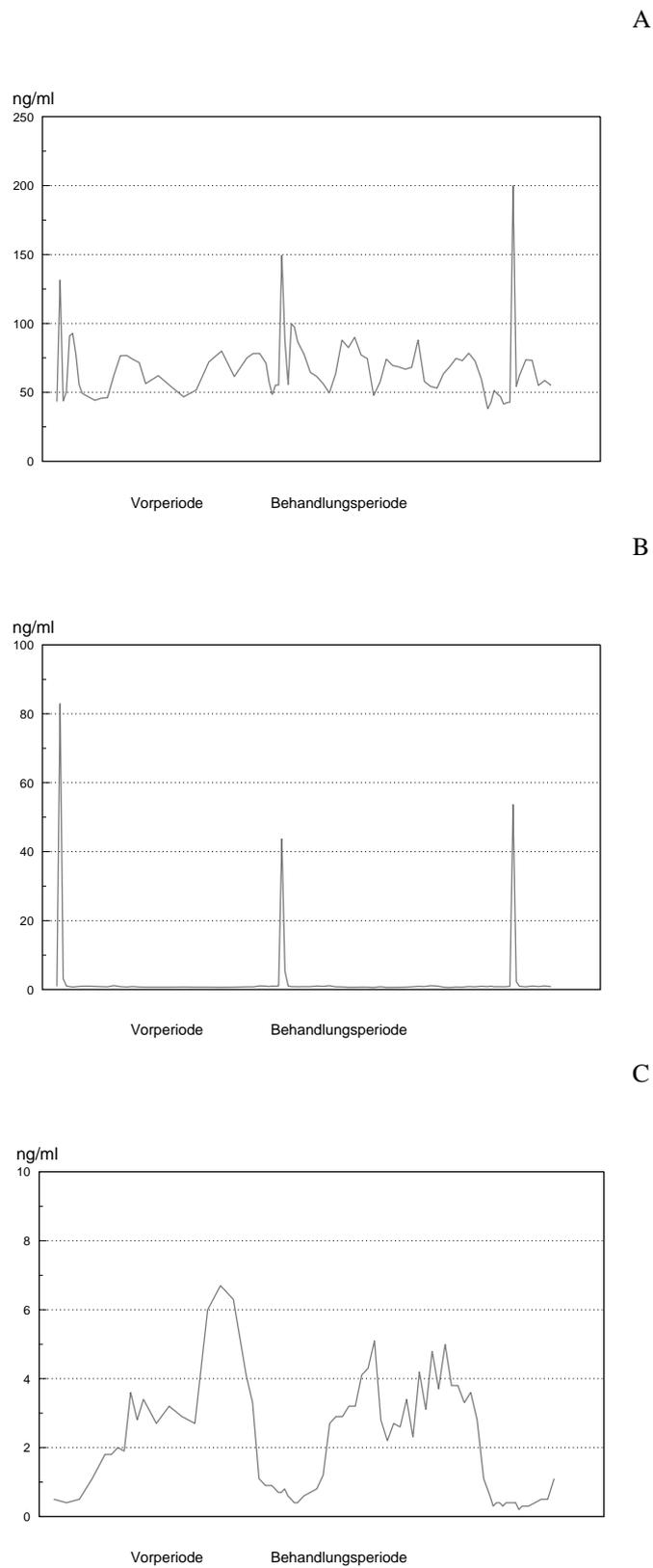


Abbildung 23. Hormonprofile Tier H472 (Roquefortin C-Dosierung 50 mg /Tag; A: FSH, B :LH, C: Progesteron).

Darüber hinaus konnten keine signifikanten Veränderungen bezüglich der Zykluslänge beobachtet werden. So betrug die durchschnittliche Zyklusdauer bei Tieren der Gruppe H während Vor- und Behandlungsperiode 17,17 Tage (Tabelle 18).

**Tabelle 18. Zykluslängen der Schafe während Vor (Kontroll) und Behandlungsperiode: K: 0,0 mg Roquefortin / Tier u. Tag; M: 10,0 mg Roquefortin / Tier u. Tag; H: 50,0 mg Roquefortin / Tier u. Tag**

Tier-Nr	Vorperiode (Tage)	Behandlungsperiode (Tage)
K-471	18	18
K-473	17	18
K-474	17	17
K-481	17	17
K-482	17	17
K-488	17	18
(s)	17,17 (0,4)	17,5 (0,55)
M-007	17	17
M-475	17	17
M-477	18	19
M-485	19	19
M-489	23	18
M-490	19	18
(s)	18,83 (2,23)	18,00 (0,89)
H-472	18	18
H-476	17	17
H-479	18	18
H-480	17	17
H-486	17	16
H-487	16	17
(s)	17,17 (0,75)	17,17

Insgesamt bleibt festzuhalten, dass die Roquefortingaben weder einen Einfluss auf die Profile von FSH, LH oder Progesteron hatten noch zu einer Veränderung der Zykluslänge führten.

### 4.3.6 Patholog. Anatomische Untersuchungen

Die pathologisch-anatomischen und histologischen Untersuchungen ergaben, dass keine Veränderungen festgestellt werden konnten, die kausal mit der Verabreichung von Roquefortin in Zusammenhang zu bringen waren. Die Befunde waren im Allgemeinen parasitär bedingt oder dem Formenkreis der Spontanpathologie zuzuordnen. Dabei muss auch die Herkunft der Schafe berücksichtigt werden, die aus einer kommerziell genutzten Herde stammten: Sicherlich wurde seitens des Tierhalters eine gewisse „Selektion“ vorgenommen.

Im Nachfolgenden werden kurz die Ergebnisse der einzelnen Versuchsgruppen dargestellt. Die protokollierten Befunde dieser Untersuchungen sind ausführlich im Anhang einzusehen.

#### 4.3.6.1 Kontrollgruppe ( 0 mg Roquefortin pro Tag)

Der Ernährungszustand aller Tiere der Kontrollgruppe wurde als „gut“ eingestuft. Sehr häufig wurde ein Parasitenbefall mit *Sarcocystis tenella* festgestellt. Weniger oft waren *Trichuris sp.* nachzuweisen, in einem Fall auch *Chabertina ovina*.

Die Lungen dieser Tiere wiesen ohne Ausnahme Veränderungen auf, die überwiegend parasitären Ursprungs waren. Dabei handelte es sich um Parasitengranulome bzw. um parasitäre Herdpneumonien, teilweise im fortgeschrittenen Stadium. In einem Falle (Tier K-471) wurde eine interstitielle Pneumonie des Typs Maedi diagnostiziert; bei einem weiteren Tier (K-474) eine beginnende Adenomatose festgestellt. Die Nieren der Tiere K-471 und K-482 wiesen geringgradige, die des Tieres K-488 schwere pathologische Veränderungen auf. Dabei handelte es sich um eine interstitielle Nephritis, die zu einer Schrumpfniere führte. Auffällig oft wiesen die Gehirne der Schafe perivaskuläre Rundzellinfiltrate auf. Bei dem Tier K-474 wurde eine leichte Vakuolisierung innerhalb der weißen Substanz des Kleinhirns festgestellt, die allerdings tötungsbedingt sein dürfte.

#### **4.3.6.2 Behandlungsgruppe M (10 mg Roquefortin pro Tag)**

Der Ernährungszustand dieser Tiere wurde als „gut“ bezeichnet. Wie bei den Tieren der Kontrollgruppe waren auch bei diesen Schafen hauptsächlich parasitäre Veränderungen feststellbar. Die Schafe M-475, M-485 und M-007 wiesen zum Teil hochgradige Veränderungen an den Lungen in Form von Pneumonien, Fibroseherden und vergrößerten Alveolarzellen auf. Bei drei Tieren (M-485, M-477 und M-007) wurden pathologisch veränderte Lebern diagnostiziert. Dabei reichte das Spektrum von einer leichten Verfettung der Itozellen über interstitielle Hepatitis bis hin zu chronischen Leberabszessen. Bei den Schafen M-477 und M-475 wurden pathologische Prozesse am Euter (Mastitis, Abszesse) festgestellt.

#### **4.3.6.3 Behandlungsgruppe H (50 mg Roquefortin pro Tag)**

Der Ernährungszustand dieser Tiere wurde ausnahmslos als „gut“ eingestuft. Auch bei diesen Tieren wurden hauptsächlich parasitäre Veränderungen festgestellt. Besonders auffällig war ein 9 cm großer Leberabszeß des Tieres H-479, in dem die Gallenblase vollständig eingeschmolzen war. Auch an den Lungen wurden zum Teil erhebliche Veränderungen festgestellt. Am stärksten war das Tier H-487 betroffen, das eine hochgradige, chronisch-abszedierende Bronchopneumonie aufwies. Wie bei den anderen Versuchsgruppen wurden bei der histologischen Untersuchung des Gehirns die bereits erwähnten „perivaskulären Rundzellularinfiltrate“ sowie „astrozytäre Ödeme“ festgestellt.

### **4.3.7 Resultate der Rückstandsuntersuchungen**

#### **4.3.7.1 Roquefortinausscheidung in Harn und Faeces**

In relativ hohen Konzentrationen, bis zu 14,5 µg Roquefortin pro g Kot, wurde Roquefortin in Kotproben der Versuchsgruppen **H** (s. Anhang Tabelle 27) und **M** (s. Anhang Tabelle 28) nachgewiesen. Dabei war ein gewisser Zeittrend zu beobachten, denn die Roquefortingehalte stiegen vom Zeitpunkt der initialen Roquefortinverabreichung (relativer Tag 0) zunächst langsam an und erreichten dann etwa zwischen dem 8. und 12.Tag ihr Maximum. Danach waren nahezu konstante Roquefortingehalte bis zum

Versuchsende zu beobachten, die etwas unterhalb der Maximalkonzentration lagen. Während der Behandlungsperiode war in den Proben der Gruppe **M** durchschnittlich 0,73 µg Roquefortin pro Gramm Kot nachweisbar. In den Proben der Versuchsgruppe **H** wurden durchschnittlich 3,56 µg Roquefortin pro Gramm nachgewiesen. Die untersuchten Kotproben der Kontrolltiere wiesen keine Kontamination mit Roquefortin auf, so dass davon ausgegangen werden kann, dass ein zusätzlicher Eintrag von Roquefortin über evtl. kontaminiertes Futter auszuschließen ist. Dies wird auch an den untersuchten Proben der Versuchsgruppen **H** und **M** deutlich, die während der Vorperiode gewonnen wurden. In den untersuchten Harnproben war in keinem Fall Roquefortin nachweisbar.

#### 4.3.7.2 Roquefortingehalte in Geweben und Körperflüssigkeiten

Die Tabelle 19 gibt die Ergebnisse des chemisch-physikalischen Roquefortinnachweises aus den untersuchten Nierenproben der Tiere wieder. Im Probenmaterial der Kontrollgruppe war Roquefortin ohne Ausnahme nicht nachweisbar, in der Gruppe **M** war Roquefortin in der Hälfte der untersuchten Proben anzutreffen, wobei der mittlere Gehalt 0,02 µg/g betrug. Innerhalb der Gruppe **H** konnte Roquefortin in allen untersuchten Nierengeweben nachgewiesen werden, wobei ein Höchstgehalt von 0,46 µg/g bestimmt werden konnte. Im Durchschnitt betrug die nachgewiesene Roquefortinmenge bei der Versuchsgruppe **H** 0,15 µg pro g Nierengewebe.

**Tabelle 19. Roquefortinrückstände in Nieren: K: 0,0 mg Roquefortin / Tier u. Tag; M:10,0 mg Roquefortin / Tier und Tag; H: 50 mg Roquefortin /Tier u. Tag.**

Tier	Roquefortin (µg/g)	Tier	Roquefortin (µg/g)	Tier	Roquefortin (µg/g)
K-471	n.n.	M-007	0,03	H-472	0,11
K-473	n.n.	M-475	n.n.	H-476	0,06
K-474	n.n.	M-477	0,02	H-479	0,46
K-481	n.n.	M-485	n.n.	H-480	0,06
K-482	n.n.	M-489	n.n.	H-486	0,11
K-488	n.n.	M-490	0,01	H-487	0,12
$\bar{x}$	<i>positiver Proben</i>		0,02		0,15
<i>s</i>	<i>positiver Proben</i>		0,01		0,15

n.n.: nicht nachweisbar

In den Fettgewebe- (Tabelle 22), Herz- (Tabelle 21) und Skelettmuskelproben (Tabelle 20) der Kontrolltiere war Roquefortin nicht nachweisbar. Im Fettgewebe und Herzmuskel von Tieren der Gruppe **M** war ebenfalls kein Roquefortin nachweisbar, dagegen waren bei diesen Tieren in den Skelettmuskelproben durchschnittlich 0,02 µg Roquefortin pro g nachzuweisen.

Ähnlich verhielt sich auch das untersuchte Probenmaterial der Tiergruppe **H**. Hier traten jedoch vermehrt positive, nicht quantifizierbare Ergebnisse auf, die in den Tabellen mit „Spuren“ gekennzeichnet wurden.

**Tabelle 20. Roquefortinrückstände in der Skelettmuskulatur: K: 0,0 mg Roquefortin / Tier u. Tag; M:10,0 mg Roquefortin / Tier und Tag; H: 50 mg Roquefortin /Tier u. Tag.**

Tier	Roquefortin (µg/g)	Tier	Roquefortin (µg/g)	Tier	Roquefortin (µg/g)
K-471	n.n.	M-007	0,02	H-472	"Spuren"
k-473	n.n.	M-475	n.n.	H-476	0,01
K-474	n.n.	M-477	0,02	H-479	"Spuren"
K-481	n.n.	M-485	0,03	H-480	"Spuren"
K-482	n.n.	M-489	0,01	H-486	0,01
K-488	n.n.	M-490	n.n.	H-487	"Spuren"
$\bar{x}$	<i>positiver Proben</i>		<i>0,02</i>		<i>0,01</i>
<i>s</i>	<i>positiver Proben</i>		<i>0,01</i>		<i>0,00</i>

n.n.: nicht nachweisbar

**Tabelle 21. Roquefortinrückstände in der Herzmuskulatur: K: 0,0 mg Roquefortin / Tier u. Tag; M:10,0 mg Roquefortin / Tier und Tag; H: 50 mg Roquefortin /Tier u. Tag.**

Tier	Roquefortin (µg/g)	Tier	Roquefortin (µg/g)	Tier	Roquefortin (µg/g)
K-471	n.n.	M-007	n.n.	H-472	0,03
K-473	n.n.	M-475	n.n.	H-476	"Spuren"
K-474	n.n.	M-477	n.n.	H-479	"Spuren"
K-481	n.n.	M-485	n.n.	H-480	n.n.
K-482	n.n.	M-489	n.n.	H-486	n.n.
K-488	n.n.	M-490	n.n.	H-487	n.n.

n.n.: nicht nachweisbar

**Tabelle 22. Roquefortinrückstände in Fettgewebe: K: 0,0 mg Roquefortin / Tier u. Tag; M:10,0 mg Roquefortin / Tier und Tag; H: 50 mg Roquefortin /Tier u. Tag.**

Tier	Roquefortin (µg/g)	Tier	Roquefortin (µg/g)	Tier	Roquefortin (µg/g)
K-471	n.n.	M-007	n.n.	H-472	"Spuren"
K-473	n.n.	M-475	n.n.	H-476	"Spuren"
K-474	n.n.	M-477	n.n.	H-479	"Spuren"
K-481	n.n.	M-485	n.n.	H-480	"Spuren"
K-482	n.n.	M-489	n.n.	H-486	n.n.
K-488	n.n.	M-490	n.n.	H-487	n.n.

n.n.: nicht nachweisbar

Von allen untersuchten Geweben wiesen die Leberproben die höchsten Roquefortingehalte auf (Tabelle 23). Durchschnittlich wurde in dem Probenmaterial der Gruppe **M** 0,36 µg Roquefortin pro g Leber und in dem Material der Gruppe **H** 1,15 µg Roquefortin pro g Leber nachgewiesen; in den Leberproben der Kontrollgruppe war Roquefortin nicht nachweisbar.

**Tabelle 23. Roquefortinrückstände in Lebergewebe: K: 0,0 mg Roquefortin / Tier u. Tag; M:10,0 mg Roquefortin / Tier und Tag; H: 50 mg Roquefortin /Tier u. Tag.**

Tier	Roquefortin (µg /g)	Tier	Roquefortin (µg/g)	Tier	Roquefortin (µg/g)
K-471	n.n.	M-007	0,46	H-472	1,77
K-473	n.n.	M-475	0,30	H-476	1,45
K-474	n.n.	M-477	0,44	H-479	2,22
K-481	n.n.	M-485	0,26	H-480	0,22
K-482	n.n.	M-489	0,41	H-486	0,92
K-488	n.n.	M-490	0,26	H-487	0,33
$\bar{x}$	<i>positiver Proben</i>		0,36		1,15
s	<i>positiver Proben</i>		0,09		0,80

n.n.: nicht nachweisbar

In der Galle war Roquefortin nur bei den Tieren der Versuchsgruppe **H** anzutreffen (Tabelle 24). Das untersuchte Material enthielt im Durchschnitt 0,18µg Roquefortin pro ml, wobei Einzelwerte zwischen 0,12 und 0,23 µg/ml anzutreffen waren.

**Tabelle 24. Roquefortingehalte im Gallensaft der Tiere: K: 0,0 mg Roquefortin / Tier u. Tag; M:10,0 mg Roquefortin / Tier und Tag; H: 50 mg Roquefortin /Tier u. Tag.**

Tier	Roquefortin (µg/ml)	Tier	Roquefortin (µg/ml)	Tier	Roquefortin (µg/ml)
K-471	n.n.	M-007	n.n.	H-472	0,23
K-473	n.n.	M-475	n.n.	H-476	n.n.
K-474	n.n.	M-477	n.n.	H-479	-*
K-481	n.n.	M-485	n.n.	H-480	0,22
K-482	n.n.	M-489	n.n.	H-486	0,14
K-488	n.n.	M-490	n.n.	H-487	0,12
$\bar{x}$	<i>positiver Proben</i>		n.n.		0,18
s	<i>positiver Proben</i>		n.n.		0,056

\*Versuchsansatz konnte nicht durchgeführt werden, da kein Probenmaterial gewonnen werden konnte.

In den Milzproben war bei keinem Tier Roquefortin in nachweisbaren Konzentrationen anzutreffen.

Die Resultate der Pansensaftuntersuchung sind in Tabelle 25 zusammengefasst. Daraus ist ersichtlich, dass bei neun von 13 behandelten Tieren Roquefortin nachweisbar war. Wenn auch die durchschnittlich gefundenen Werte die abgestuften Dosierungen der einzelnen Versuchsgruppen widerspiegeln, so fällt dennoch auf, dass die insbesondere bei den Tieren der Gruppe **H** (50 mg/Tag) gemessenen Werte eine hohe Variationsbreite aufweisen.

**Tabelle 25. Roquefortingehalte im Pansensaft: K: 0,0 mg Roquefortin / Tier u. Tag; M:10,0 mg Roquefortin / Tier und Tag; H: 50 mg Roquefortin /Tier u. Tag.**

Tier	Roquefortin (µg/ml)	Tier	Roquefortin (µg/ml)	Tier	Roquefortin (µg/ml)
K-471	n.n.	M-007	57,7	H-472	366,9
K-473	n.n.	M-475	20,8	H-476	n.n.
K-474	n.n.	M-477	n.n.	H-479	80,0
K-481	n.n.	M-485	19,4	H-480	n.n.
K-482	n.n.	M-489	43,0	H-486	47,0
K-488	n.n.	M-490	31,8	H-487	26,9
$\bar{x}$	<i>positiver Proben</i>		<i>28,80</i>		<i>86,80</i>
s	<i>positiver Proben</i>		<i>20,10</i>		<i>140,50</i>

n.n.: nicht nachweisbar

In den untersuchten Plasmaproben war in keinem Fall Roquefortin eindeutig nachweisbar. Lediglich in einzelnen Plasmaproben der Gruppe **H** war eine Substanz anzutreffen, die ein roquefortinähnliches chromatographisches Verhalten aufwies. Die UV-Absorptionsspektren dieser Substanz zeigten jedoch keine Übereinstimmung mit Spektren, die mit Hilfe von Roquefortin-Referenzsubstanz aufgezeichnet wurden.

## 5 DISKUSSION

### 5.1 Herstellung von Roquefortin

#### 5.1.1 Vorversuche

Bei den Untersuchungen zur Findung des „besten“ Roquefortin-bildenden Stammes stellte sich heraus, dass 17 von 18 geprüften Stämmen dieses Stoffwechselprodukt bilden konnten.

Dieses Resultat stimmt weitgehend mit Ergebnissen von FILTENBORG et al. (1983) überein, die bei 39 untersuchten *P. roqueforti*-Isolaten in allen Fällen Roquefortin nachwiesen. Auch die von SCOTT et al. (1977) untersuchten *P. roqueforti*-Stämme (n=4) waren allesamt zur Roquefortinsynthese befähigt.

In quantitativer Hinsicht scheinen jedoch zwischen den einzelnen Stämmen große Differenzen zu bestehen, so dass Werte zwischen 0,017 und 2,16 µg pro Ansatz gemessen wurden.

Es ist bekannt, dass die Bildung von Sekundärmetaboliten durch Umweltfaktoren wie Substratzusammensetzung, Temperatur, Sekundärkontaminationen, Sauerstoffpartialdruck, pH-Wert beeinflusst wird (KELLER et al., 1997a ,1997b). Die Versuche zur Nährmedienoptimierung zeigen dies teilweise: Während überraschenderweise der Zusatz von Tryptophan und Histidin nur einen geringen Einfluss auf die Roquefortinbildung zu haben scheint, führt der Zusatz von Essigsäure zu einer wesentlichen Erhöhung der Roquefortinsynthese. Die Ursache für die gesteigerte Syntheseleistung ist nicht eindeutig auszumachen. Neben einer direkten Wirkung der  $H_3O^+$ -Ionenkonzentration kann auch ein verändertes Dissoziationsverhalten der einzelnen Nährmedienkomponenten nicht ausgeschlossen werden..

Auch ist zu berücksichtigen, dass die verwendete Essigsäure zu einem im Intermediärstoffwechsel erhöhten Angebot von Acetyl-CoA geführt haben könnte. Dem Acetyl-CoA kommt im Rahmen der Roquefortinbiosynthese neben den Precursoren Tryptophan und Histidin ebenfalls eine zentrale Stellung bei Bereitstellung von Mevalonsäure zu (s. S.14). Ein synergistisch wirkender Effekt der pH-Wert-Senkung ist auf jeden Fall in der Ausschaltung pH-empfindlicher Konkurrenzkeime zu sehen, da die

hohe Toleranz von *P. roqueforti* gegenüber niedrigen pH-Werten ausgenutzt werden kann (PELHATE, 1977; MOREAU, 1980; OLDENBURG, 1991, AUERBACH und GEISLER, 1992).

Eine Stimulierung der Alkaloidsynthese durch einen Zusatz von L-Tryptophan bzw. L-Histidin zu YES-Medium konnte in den hier angestellten Versuchen nicht statistisch abgesichert werden, da die Resultate innerhalb der Versuchsgruppen große Varianzen aufwiesen. Tendenziell führte der Zusatz von jeweils 0,10 % Tryptophan und Histidin jedoch zu etwas höheren Roquefortinausbeuten. Gegensätzlich zu diesen Ergebnissen konnten SCOTT et al. 1977 nach Zusatz von 0,2 g L-Tryptophan pro Liter Nährmedium (0,2%) kein Wachstum von *P. roqueforti* feststellen.

### **5.1.2 Produktion von Roquefortin für den Fütterungsversuch**

Mit den in Abschnitt 3.2.3 aufgeführten Methoden gelang es, Roquefortin in einer ausreichenden Menge für das Versuchsvorhaben herzustellen. Sowohl die mittels Dünnschichtchromatographie und Hochleistungsflüssigchromatographie ermittelten  $R_f$ -Werte bzw. Retentionszeiten als auch das UV-Absorptionsspektrum wiesen völlige Übereinstimmung mit der entsprechenden Referenzsubstanz auf. Die Resultate der massenspektrometrischen Untersuchungen an Roquefortin-Rohtoxin und Roquefortin-Referenzsubstanz bestätigten die Ergebnisse der chromatographischen Untersuchungen zusätzlich, so dass die Identität der hergestellten Verbindung als sicher gelten kann. Im Vergleich der Massenspektren von Rohtoxin und Referenzsubstanz sind leichte Verunreinigungen des Rohtoxins festzustellen; diese führten aber zu keinen Interferenzen bei den chromatographischen Untersuchungen, wie anhand der Abbildung 10 ersichtlich ist.

Auch im Reihenverdünnungstest konnten keine Unterschiede bezüglich der antibiotischen Aktivität zwischen der hergestellten Verbindung und Roquefortin-Referenzsubstanz beobachtet werden. Die in den Versuchen beobachtete minimale Hemmkonzentration von 50 µg Roquefortin pro ml Medium gegenüber *B. stearothersophilus* beträgt etwa das Doppelte der von KOPP und REHM (1979) angegebenen Nachweisgrenze für das von ihnen entwickelte biologische Nachweisverfahren für Roquefortin mittels Plattendiffusionstest. Die Ursache für diese Differenz ist einerseits auf die andere Methodik

---

(Reihenverdünnungstest - Plattendiffusionstest), andererseits aber auch auf die Art des Testkeimes zurückzuführen.

Die durchschnittliche Ausbeute an gereinigtem Roquefortin betrug ca. 43 mg pro Liter Nährmedium. Vergleicht man diesen Wert mit den von SCOTT et al. (1977) bzw. WAGENER et al. (1980) publizierten Roquefortinkonzentrationen, so erscheint das bei diesen Untersuchungen erzielte Resultat zunächst als gering. Sicherlich mag dies auf das Toxinbildungsvermögen des jeweiligen *P. roqueforti*- bzw. des bei WAGENER et al. (1980) verwendeten *P. commune*-Stammes zurückzuführen sein. Hinzu kommt jedoch noch, dass die vorher genannten Autoren den Roquefortingehalt im Rohextrakt bestimmten, so dass die bei der weiteren Reinigung zwangsläufig auftretenden Verluste nicht berücksichtigt wurden.

## 5.2 Fütterungsversuch

### 5.2.1 Allgemeinbefinden, klinisch-chemische und hämatologische Daten

Die Verabreichung von Roquefortin führte zu keiner Beeinträchtigung des Allgemeinbefindens der Schafe. Die von HÄGGBLOM (1990) beschriebenen Symptome wie Ketose, Inappetenz oder Paralysen konnten zu keiner Zeit beobachtet werden.

Während des gesamten Versuchszeitraums änderte sich das Körpergewicht der Schafe nur geringfügig. Mit wenigen Ausnahmen, die bei gleicher Fütterung überwiegend die Kontrolltiere betrafen, waren sogar leichte Zunahmen (bis zu 7,0 kg) zu verzeichnen. Diese Zunahmen sind durch die ausgewogene und energiereiche Rationsgestaltung während Vor- und Behandlungsperiode zu erklären.

Dieses Ergebnis wird auch durch die Versuche von SCHOCH et al. (1984c) bestätigt, die roquefortinhaltigen Käse (Tagesdosis: 238 µg Roquefortin / kg KGW) an Mäuse verfütterten. Dabei ist zu berücksichtigen, dass aufgrund der antimikrobiellen Eigenschaften von Roquefortin bei Wiederkäuern eine veränderte Pansenfermentation auftreten könnte, die zu einer veränderten Nährstoffversorgung führt. Anhaltspunkte für diese Überlegungen sind durch die in vitro Versuche von MAIWORM et al. (1995) und HÖLTERSHINKEN et al. (1995) mit Hilfe des RUSITEC-Systems gegeben.

Die klinisch-chemischen Resultate wiesen im Durchschnitt keine auffällig erhöhten oder erniedrigten Werte auf. Jedoch überschritten Einzelwerte der bestimmten Plasmaenzyme ALT, AST und GLDH den jeweiligen Normbereich teilweise deutlich, wie der Tabelle 26 entnommen werden kann. Besonders die GLDH-Werte der Behandlungsgruppe **M** wichen im Durchschnitt von der Norm ab, wobei ein Anstieg von Vor- zur Behandlungsperiode zu verzeichnen war. Steigende Konzentrationen dieses Enzyms traten auch bei den Tiergruppen **H** und **K** während der Behandlungsperiode auf, wobei der Anstieg bei den Kontrolltieren weniger stark ausgeprägt war. Insgesamt bewegten sich die GLDH-Mittelwerte dieser beiden Behandlungsgruppen aber noch im Normbereich (KRAFT u. DÜRR, 1985). Aufgrund der fehlenden Dosis-Wirkungs-Korrelation kann Roquefortin nicht die Ursache für dieses Geschehen sein (vergl. Abbildung 20).

Als Folgeerscheinung der frequenten Blutentnahmen sind die geringen Hämatokritwerte zu werten, die ausserhalb des physiologischen Normbereich lagen.

Bei allen Versuchstiergruppen sowie bei den Kontrollen wurden in der Versuchsperiode durchschnittliche Thrombozytenzahlen bestimmt., die den physiologischen Normbereich unterschritten. Da diese verminderten Thrombozytenzahlen auch bei den Kontrolltieren festzustellen waren, kann Roquefortin als Ursache dafür ausgeschlossen werden..

Die Lymphozytenzahlen lagen weitestgehend im physiologischen Bereich. Wie anhand der in Tabelle 26 aufgeführten Spannweiten festgestellt werden kann, wurde dieser Normbereich teilweise unter- bzw. überschritten. Dies kann durch verschiedene entzündliche Prozesse erklärt werden, die im Rahmen der Sektion diagnostiziert wurden.

Unter Berücksichtigung der durch die Versuchsanstellung beeinflussten hämatologischen Parameter stimmen die in diesem Versuch ermittelten klinisch-chemischen und hämatologischen Daten mit den Resultaten von SCHOCH et al. (1984c) überein. Diese Arbeitsgruppe konnte nach 28-tägiger Verfütterung von Roquefortin-haltigem Käse an Mäuse keine Veränderungen der Plasmaenzyme oder hämatologischen Parametern feststellen.

Eine gesundheitliche Beeinträchtigung durch die orale Aufnahme von bis zu 50 mg Roquefortin pro Tag kann anhand klinisch.-chem. und hämatologischer Parameter nicht diagnostiziert werden.

**Tabelle 26. Bereich der gemessenen klin.-chem. und hämatologischen Parameter im Vergleich zu Normbereichsangaben (KRAFT u. Dürr,1985).- Mittelwerte der Durchgänge I und II**

Parameter	Referenz	Grp.	Vorperiode (Bereich)	Behandlungsp. (Bereich)
Erythrozyten (T/l)	6,5 ... 11,3	K	6,99 (6,20 - 7,80)	6,7 (5,60 - 8,00)
		M	7,46 (6,30 - 8,50)	7,31 (6,50 - 9,10)
		H	7,2 (5,80 - 9,00)	7,05 (5,90 - 8,40)
Leukozyten (G/l)	4,2 ... 6,2	K	5,17 (2,90 - 9,20)	5,03 (2,90 - 8,60)
		M	5,05 (3,10 - 8,80)	4,51 (3,10 - 6,40)
		H	6,48 (4,00 - 12,00)	6,02 (4,00 - 9,80)
Thrombozyten (k/ $\mu$ l)	280...650	K	276,1 (34 - 1014)	167,33 (48 - 305)
		M	317,15 (26 - 1070)	161,91 (32 - 699)
		H	260 (33 - 929)	185,83 (48 - 493)
Hämatokrit (%)	30 ... 38	K	24,21 (22,00 - 29,00)	24,75 (21,00 - 29,00)
		M	25,53 (21,00 - 31,00)	26,69 (23,00 - 32,00)
		H	25,13 (22,00 - 29,00)	26,33 (22,00 - 32,00)
Hämoglobin (g/dl)	8,7 ... 12,8	K	8,58 (7,70 - 10,40)	8,62 (7,30 - 9,70)
		M	8,94 (7,80 - 10,90)	9,21 (8,30 - 10,60)
		H	8,78 (7,40 - 10,00)	9,07 (8,20 - 10,10)
ALT (U/l)	bis 15	K	6,95 (3,50 - 15,40)	7,36 (4,40 - 13,50)
		M	8,05 (5,70 - 12,90)	8,44 (5,0 - 15,70)
		H	7,61 (5,90 - 10,70)	7,45 (4,60 - 9,90)
AST (U/l)	bis 75	K	37,27 (23,40 - 63,90)	30,43 (19,50 - 47,90)
		M	38,04 (23,80 - 64,20)	33,63 (3,30 - 59,40)
		H	32,6 (21,90 - 53,2)	28,74 (19,90 - 46,50)
G-Bilirubin ( $\mu$ mol/l)	bis 6,8	K	2,15 (1,00 - 4,50)	1,95 (0,90 - 3,20)
		M	1,73 (1,20 - 2,90)	1,66 (0,70 - 3,30)
		H	1,77 (0,40 - 2,30)	1,83 (0,60 - 2,80)
GLDH (U/l)	bis 6,5	K	6,33 (1,60 - 25,30)	6,96 (1,40 - 22,60)
		M	10,05 (3,90 - 23,90)	14,31 (3,10 - 41,80)
		H	4,84 (0,80 - 19,30)	8,26 (1,00 - 103,00)
Glukose (mmol/l)	2,2 ... 3,3	K	3,74 (3,14 - 4,70)	3,53 (3,07 - 4,23)
		M	3,99 (3,24 - 5,82)	3,89 (3,19 - 4,20)
		H	3,65 (2,62 - 4,41)	3,42 (2,85 - 4,02)

### 5.2.1.1 Pansensaft

Im Vergleich mit den von ROSENBERGER (1977) publizierten Normwerten für Rinderpansensaft konnten keine abnormalen Parameter beobachtet werden. Lediglich die fehlende Sedimentation des Pansensaftes beim Schaf H-472 würde auf eine Inaktivität der Vormagenflora und -fauna bzw. auf eine Pansensazidose hinweisen. Dieser Verdacht lässt sich jedoch nicht anhand der zusätzlich bestimmten Parameter wie pH-Wert, Geruch oder Protozoengehalt bestätigen.

Beim Vergleich der Pansensaft-pH-Werte zwischen den Behandlungsgruppen war mit steigender Roquefortindosierung allerdings ein kontinuierlicher Rückgang der  $\text{H}_3\text{O}^+$ -Ionenkonzentration von bis zu 0,42 pH-Einheiten zu verzeichnen (s. Tabelle 17).

Die varianzanalytische Auswertung zeigte, dass signifikante Unterschiede ( $\alpha=5\%$ ) zwischen den Pansensaft pH-Werten der Versuchsgruppe **K** und **H** vorlagen. Die Differenzen zwischen den Gruppen **K** und **M** bzw. **M** und **H** konnten mit dieser Methodik nicht statistisch gesichert werden, liegen aber dennoch im beobachteten Trend.

Über den Einfluss des Roquefortins auf den pH-Wert des Pansensaftes ist zur Zeit nur wenig bekannt. 1995 beobachteten MAIWORM et al. eine Verschiebung des pH-Wertes um 0,3 bis 0,6 Einheiten in den alkalischen Bereich, wenn RUSITEC-Fermenter mit verschimmelter bzw. verfaulter Maissilage beladen wurden. Auch HÖLTERSHINKEN et al. (1995) beobachteten im RUSITEC-System einen Anstieg des pH-Wertes um bis zu 0,4 Einheiten, wenn die Fermenter mit *P. roqueforti* kontaminierter Maissilage beschickt wurden. Die pH-Wert-Verschiebungen konnten jedoch nicht bei Zugabe von Roquefortin-Rohextrakten festgestellt werden, so dass dieser Effekt auf nicht näher charakterisierte Begleitsubstanzen der verschimmelten Maissilagen zurückzuführen ist (HÖLTERSHINKEN et al., 1995). Unter Berücksichtigung des Sachverhaltes, dass der hier beobachtete Rückgang der pH-Werte nur bei der Versuchsgruppe **H** statistisch abgesichert werden konnte, ist die Diskrepanz der Ergebnisse entweder auf die unterschiedlich hohen Roquefortindosierungen (78 - 180:g pro Inkubator – 50 mg Pro Tier u. Tag ) oder auf das in vitro-Testsystem zurückzuführen. Ebenso denkbar ist, dass die erniedrigten pH-Werte erst nach längerfristiger und hochdosierter Roquefortinaufnahme bestimmt werden können. Aufgrund der antimikrobiellen Eigenschaften von Roquefortin kann in einer solchen

Situation von einer Florverschiebung ausgegangen werden, die letztendlich zu einer Veränderung des pH-Wertes führt.

Allerdings bewegten sich die beobachteten pH-Wert Verschiebungen noch im physiologischen Bereich, so dass in diesen Fällen nicht von einer gesundheitlichen Beeinträchtigung der Tiere ausgegangen werden kann.

### 5.2.2 Endokrinologische Daten

Die Zykluslängen der Schafe (s. Tabelle 18), die anhand des Abstandes aufeinanderfolgender LH-Peaks bestimmt wurden, lagen mit 16 bis 19 Tagen in dem für Schafe typischen Bereich (KOLB, 1989). Lediglich das Tier M-489 wich mit einer Zykluslänge von 23 Tagen während der Vorperiode von der Norm ab. Diese Abweichung kann jedoch nicht mit der Roquefortinverabreichung erklärt werden; die Ursache hierfür dürfte entweder in einer tierindividuellen Abweichung oder in dem schlecht erfassten LH-Peak zu diesem Zeitpunkt zu suchen sein.

Vergleicht man die durchschnittlichen Zykluslängen der einzelnen Tiergruppen, so kann kein signifikanter Unterschied zwischen den roquefortinbehandelten Tieren gegenüber der Kontrollgruppe während der Behandlungsperiode festgestellt werden. Dies gilt ebenso für den Vergleich von Vor- und Behandlungsperiode innerhalb einer Versuchsgruppe, wobei zu berücksichtigen ist, dass die mittlere Zykluslänge der Gruppe **M** durch das Ergebnis des Tieres M-489 während der Vorperiode verzerrt wurde.

Auch der tierindividuelle Vergleich der Zykluslängen lässt keinen Effekt der Roquefortingaben erkennen. Es treten zwar Unterschiede zwischen den beiden Zyklen auf; diese sind allerdings nicht gerichtet sondern scheinen eher zufällig zu sein: Bei den Tieren H-486 und M-490 wurde ein um einen Tag verkürzter Zyklus während der Behandlungsperiode festgestellt, bei den Tieren H-486 und M-477 war dagegen ein um einen Tag verlängerter Zyklus in diesem Versuchsabschnitt festzustellen.

Die Progesteronprofile der Tiere wiesen keine Unterschiede zwischen Kontroll- und Behandlungsperiode auf, die in Zusammenhang mit der Roquefortinapplikation gebracht werden könnten. Bei allen Schafen war während des zweiten Zyklusses (Behandlungsperiode) ein „unruhiger“ Verlauf der Progesteronprofils feststellbar.

Allerdings wurden in diesem Versuchsabschnitt täglich mindestens zwei Proben ausgewertet, so dass tageszeitliche Konzentrationsschwankungen in den Zyklusprofilen sichtbar werden.

Insgesamt sind die endokrinologischen Daten dahingehend zu werten, dass praxisrelevante Roquefortinmengen keinen Einfluss auf die Progesteronsekretion beim Schaf haben.

### 5.2.3 Pathologisch-anatomische und histologische Befunde

Die bei der Sektion diagnostizierten Organveränderungen waren entweder parasitär bedingt oder dem Formenkreis der Spontanpathologie zuzuordnen. Zudem wurden in Einzelfällen auch Veränderungen beobachtet, die in Zusammenhang mit der Implantation der Venenverweilkatheter standen. Diese betrafen jedoch lediglich die Tiere H-479 und K-481, die Abszesse an der Katheterausführungsstelle bzw. im weiteren Katheterverlauf aufwiesen.

Größere Abszesse, die nicht in direktem Zusammenhang mit der Venenkatheterimplantation standen, waren bei den Schafen M-475, M-477, H-480 und H-479 zu finden. Ob diese Veränderungen auf die Applikation von Roquefortin zurückzuführen sind, bleibt fraglich, denn bisher wurden keine immunsuppressive Wirkungen von Roquefortin berichtet. Auch ist zu berücksichtigen, dass nur wenige Tiere diese Symptome zeigten und zudem eine fünffach höhere Tagesdosis dieser Substanz zu keinem vermehrten Auftreten von Entzündungen bei der Behandlungsgruppe **H** führte.

Auffallend häufig wiesen auch die Atemwegsorgane der untersuchten Tiere pathologische Veränderungen in Form von Parasitenbefall, Lungenentzündungen und Bronchopneumonien auf. Dies betraf sowohl Kontroll- als auch roquefortinbehandelte Tiere. Somit kann ein Einfluss der verabreichten Substanz auf dieses Geschehen ebenfalls ausgeschlossen werden.

Bei zwei Tieren der Behandlungsgruppe **H** (H-476, H-479) wurden Veränderungen an den Reproduktionsorganen in Form von zystisch erweiterten Uterindrüsen bzw. Ovarienzysten

festgestellt. Diese hatten jedoch offensichtlich keinen endokrinologisch bzw. klinisch faßbaren Einfluss auf das Zyklusgeschehen.

Die beobachteten Häufigkeiten dieser Veränderungen lassen jedoch nicht den Schluss zu, dass die Applikation von Roquefortin zu diesen Befunden führte.

## **5.2.4 Roquefortinnachweis**

### **5.2.4.1 Methodik**

Mit den im Rahmen dieses Forschungsvorhabens entwickelten Verfahren zum Nachweis von Roquefortin in Probenmaterial tierischen Ursprungs war eine Konzentration von 0,1 µg/ml bzw. µg/g noch sicher erfassbar; die Chromatogramme nicht kontaminierter Proben wiesen zur Retentionszeit von Roquefortin keine interferierenden Substanzen auf, so dass dadurch die Interpretation erleichtert wurde. Die durchschnittliche Wiederfindungsrate betrug meist mehr als 60 %.

Als problematisch erwiesen sich Emulsionsbildungen, die während der Extraktion des Probenmaterials auftraten. Der von Scott et al. (1977) empfohlene Zusatz von Kaliumchlorid zur Klärung störender Emulsionen führte nur zu unbefriedigenden Ergebnissen. Der Zusatz von wasserfreiem Natriumsulfat erwies sich dagegen, insbesondere bei Gewebe- und Kotproben, als wirksamstes Mittel zur Verhinderung von Emulsionen. Zudem trug der Mazerationseffekt gerade bei den Körpergeweben zu einem verbesserten Aufschluss des Probenmaterials bei. Gänzlich konnten diese Emulsionen jedoch nie vermieden werden; vermutlich wurden die teilweise etwas hohen Standardabweichungen (< 10) bei den Kot-, Plasma-, Milz- und Herzanalysen durch diese Emulsionen hervorgerufen.

### **5.2.4.2 Gehalte in Geweben, Körperflüssigkeiten und Exkreten**

Roquefortin wurde in Leber, Galle, Nieren, Lunge und Herz sowie in Pansensaft und Faeces der mit dieser Substanz behandelten Tiere wiedergefunden.

Erwartungsgemäß waren die höchsten Roquefortinkonzentrationen im Pansensaft (bis zu 366,94 µg/ml) zu analysieren. Allerdings fällt auf, dass zwischen den einzelnen Tieren - auch innerhalb einer Behandlungsgruppe - beträchtliche Unterschiede (366,94 µg/ml bis nicht nachweisbar) bestehen. Diese Diskrepanz kann nicht mit der methodisch bedingten Variation der Analyseergebnisse ( $\pm 5\%$ ) erklärt werden, vielmehr dürfte die Ursache hierfür im tierindividuellen Ablauf pansenphysiologischer Vorgänge zu suchen sein. Dies betrifft sowohl die unterschiedliche Verweildauer des Futters im Pansen als auch die verschiedenartige Zusammensetzung der Pansenflora. Allerdings konnten bei der mikrobiologischen Untersuchung des Pansensaftes keine offensichtlichen Unterschiede in der Zusammensetzung der Pansenflora festgestellt werden; dabei ist aber auch das grobe Differenzierungsschema dieser Untersuchungen zu berücksichtigen.

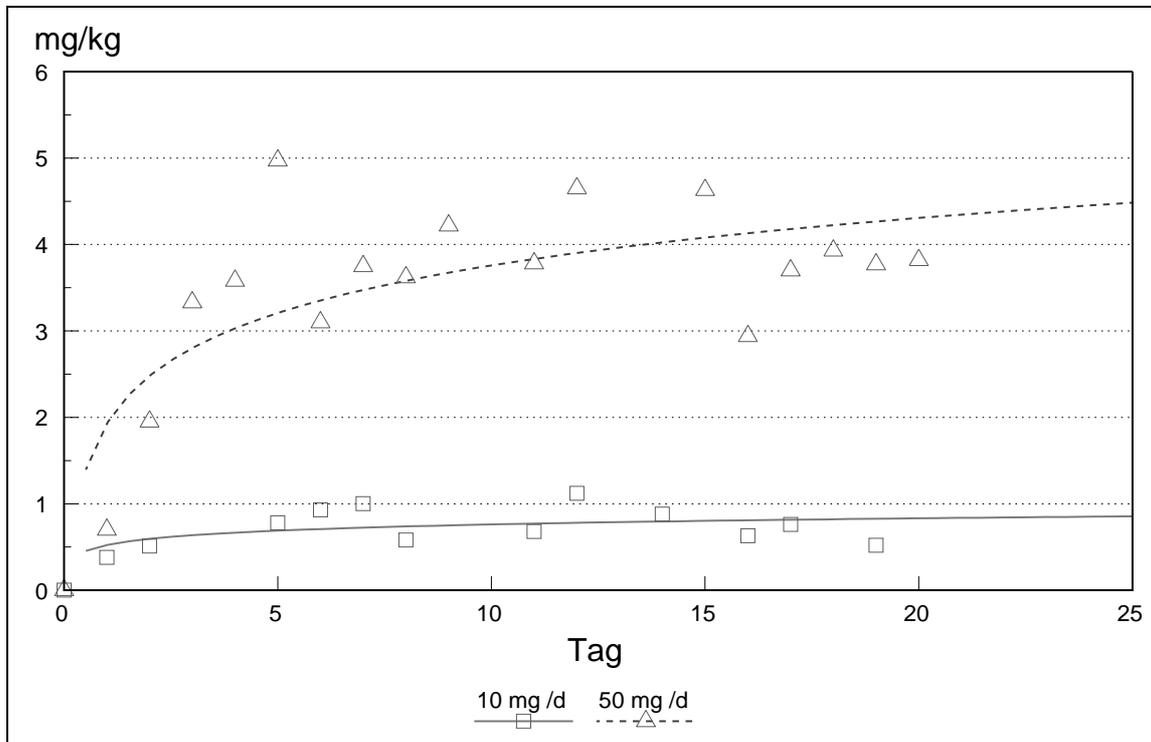
Der Sachverhalt, dass bei zwei Tieren der Behandlungsgruppe **H** und einem Tier der Behandlungsgruppe **M** kein Roquefortin im Pansensaft nachgewiesen werden konnte, kann nicht auf einen Applikationsfehler zurückzuführen sein, da Roquefortin in anderen Kompartimenten detektiert wurde; nicht ganz auszuschließen ist, dass bei der Verabreichung der Gelatine kapsel der Schlundrinnenreflex ausgelöst wurde und somit diese unter Umgehung des Pansens direkt in den Labmagen gelangte.

Die in Abbildung 24 dargestellten Regressionkurven zeigen den Verlauf der Roquefortinausscheidung in Faeces über die Zeit der Verabreichung hinweg. Die Faecesproben der Kontrollperiode enthielten keine analysierbaren Roquefortinmengen. Dagegen war in den Kotproben der behandelten Tiere ab dem ersten Tag der Roquefortinverabreichung diese Verbindung nachweisbar. Die Gehalte stiegen ca. bis zum 12. Tag an und blieben dann nahezu auf gleichem Niveau. Bei Tieren der Behandlungsgruppe H betrug diese etwa 4 mg/kg, bei den der Behandlungsgruppe M 0,8 mg/kg.

Die Elimination von Roquefortin in Reinform erfolgt vor allem mit den Faeces, wie die Resultate der Kot- und Harnuntersuchungen zeigen. Dies stimmt weitgehend mit den von LAWS und MANTLE (1987) an Ratten erzielten Ergebnissen überein. Die Autoren dieser Studie wiesen allerdings auch geringere Mengen von Roquefortin im Harn der Ratten nach, was bei den roquefortinbehandelten Schafen nicht der Fall war.

Insgesamt waren größere Variationen bei den Roquefortinkonzentrationen einzelner Schafkotproben festzustellen. Dies kann einerseits durch die Probennahme verursacht worden sein, andererseits ist auch eine mikrobielle Metabolisierung denkbar. Letzteres

wurde von LAWS und MANTLE (1987) diskutiert, da im Kot der roquefortinbehandelten Ratten ein polares Abbauprodukt nachgewiesen wurde. Da in den hier angestellten Versuchen kein radioaktiv markiertes Roquefortin eingesetzt wurde, konnte der Nachweis eines solchen Transformationsproduktes nicht durchgeführt werden.



**Abbildung 24. Ausscheidung von Roquefortin in den Faeces von Schafen (n=6/Gruppe).**

*Behandlungsgruppe M (---):  $y = 0,526 + 0,100 \ln x$  ( $r=0,405$ )*

*Behandlungsgruppe H(- -):  $y = 1,986 + 0,0821 \ln x$  ( $r=0,547$ )*

Die höchsten Roquefortingehalte in Geweben wurden in den Lebern festgestellt. Während die darin gemessenen Konzentrationen nur geringfügig variierten, waren die Gehalte in den Gallen weit weniger homogen, wobei diese Variationen nicht durch den analytisch bedingten Fehler ( $\pm 2,80\%$ ) erklärt werden können. Eine Metabolisierung von Roquefortin durch enzymatische Prozesse in der Leber ist nicht zu erwarten, wie die Untersuchungen von LAWS und MANTLE (1987) zeigen: Ein Abbau von Roquefortin war nach bis zu 4-stündiger Inkubation mit Rattenleberhomogenisaten nicht nachzuweisen. Ebenfalls kann ausgeschlossen werden, dass eine Konjugation von Roquefortin an Glucuronsäure vorlag, denn die Behandlung der Gallen mit  $\beta$ -Glucuronidase führte zu keiner Änderung der Roquefortingehalte. Die abweichenden Resultate des Roquefortinnachweises in der Galle sind daher auf den Zeitpunkt der Probennahme zurückzuführen.

Des Weiteren wurden geringe Mengen an Roquefortin in den Nieren sowie in Herz- und Lungenproben behandelter Tiere festgestellt. Damit wurde ein Übergang von Roquefortin aus dem Futtermittel in Gewebe, die der Lebensmittelgewinnung dienen, einwandfrei nachgewiesen. Hier muss allerdings berücksichtigt werden, dass mit einer täglich verabreichten Höchstmenge von 50 mg Roquefortin pro Schaf bewusst Verhältnisse simuliert wurden, wie sie in einer extrem mit *P. roqueforti* kontaminierten Silage anzutreffen sind. Dennoch wurden in der Leber nur Konzentrationen (Höchstgehalt: 2,22 µg/g) gefunden, wie sie größenordnungsmäßig auch in handelsüblichen Blauschimmelkäsen nachgewiesen wurden.

### 5.2.5 Antibiotische Aktivität

Roquefortin hat antibiotische Aktivitäten. Es wird immer wieder diskutiert, ob nicht „natürlicherweise“ in Futtermitteln vorkommende antibiotisch wirkende Substanzen zu einem positiven Hemmstofftest führen. Bei den Untersuchungen von Nieren- und Muskelproben war keine antibiotische Aktivität nachweisbar, die auf die Verabreichung von Roquefortin zurückgeführt werden konnten. In Anbetracht der mittels HPLC bestimmten Roquefortingehalte sind diese Ergebnisse erklärbar, da der Routine-Hemmstoff-Test zu unsensibel auf Roquefortin reagiert.

Auf der Basis des von KOPP und REHM (1979b) beschriebenen Roquefortinnachweises mittels Agardiffusionstest, sind Konzentrationen dieser Substanz ab 25 µg/ml nachweisbar. In der Skelettmuskulatur waren Roquefortinhöchstgehalte bis zu 0,03 µg/g und in der Niere bis zu 0,46 µg/g nachweisbar. Erst ab 50-fach höheren Konzentration an Roquefortin könnten mit diesem Verfahren antimikrobielle Wirkungen beobachtet werden. Fernerhin ist zu berücksichtigen, dass im Routine-Hemmstofftest *B. subtilis* als Testkeim verwendet wird. Dieser Keim ist gegenüber Roquefortin wesentlich unempfindlicher als der von KOPP und REHM (1979b) eingesetzte Testkeim *B. stearothermophilus* (KOPP-HOLTWIESCHE und REHM, 1990).

## 6 ZUSAMMENFASSUNG

Das Ziel der vorliegenden Arbeit war festzustellen, in welchem Ausmaß praxisrelevante Roquefortindosierungen die Tiergesundheit von Wiederkäuern (Schafen) beeinträchtigen. Darüber hinaus wurde überprüft, in welchem Umfang ein 'carry over' dieser Substanz in die Nahrungskette zu erwarten ist. Zu diesem Zweck wurden 18 weibliche Schafe der Rasse Merinolandschaf nach dem Zufallsprinzip in drei Gruppen (M, H, K) aufgeteilt. Während der Behandlungsperiode wurden den Tieren der Gruppe „M“ und „H“ täglich 10,00 mg bzw. 50 mg Roquefortin oral verabreicht.

Für die Durchführung des Versuchsvorhabens mussten zunächst 10 g Roquefortin produziert werden. Dazu wurden zunächst die optimalen Kulturbedingungen für *P. roqueforti*-Oberflächenkulturen ermittelt sowie die Roquefortinsyntheseleistung verschiedener *P. roqueforti*-Stämme überprüft. Parallel zu diesen Versuchen wurden geeignete Analysenverfahren zum Nachweis dieser Verbindung aus tierischen Geweben und Exkreten entwickelt und diese Methoden validiert.

Die Untersuchungen zur Produktion von Roquefortin ergab signifikante Unterschiede zwischen den untersuchten *P. roqueforti*-Stämmen hinsichtlich der Roquefortinsynthese. Eine Stimulierung der Roquefortinsynthese konnte bei einer Senkung des Nährmedien-pH beobachtet werden, dagegen hatte der Zusatz von L-Tryptophan und L-Histidin keinen signifikanten Einfluß auf die Roquefortinbildung. Die Extraktion von Roquefortin aus den *P. roqueforti*-Kulturen wurde mit Ethylacetat (Medium) und Chloroform (Mycel) durchgeführt und die gewonnenen Rohextrakte mit Hilfe einer Flüssig/Flüssig-Extraktion in Kombination mit Säure-Base-Schritt gereinigt. Das gewonnene Produkt war weitgehend frei von störenden Begleitsubstanzen, wie die Untersuchungen mittels HPLC, HPTLC und MS zeigten. Auch waren keine Unterschiede in der antibiotischen Aktivität zwischen dem produzierten Roquefortin und der Roquefortin-Referenzsubstanz zu beobachten.

Der Einfluß von Roquefortin auf die Tiergesundheit von Schafen wurde in einer 20tägigen Verabreichung von Roquefortin an Schafe überprüft. Dabei konnte keine Beeinträchtigung des Allgemeinbefindens der Tiere festgestellt werden. Die Untersuchung hämatologischer, klinisch-chemischer und endokrinologischer Parameter gab weder einen Hinweis für ein toxisches Geschehen noch für eine Beeinflussung reproduktionsbiologischer Vorgänge. Die pathologisch-anatomischen und histologischen Untersuchungen bestätigen dieses Resultat.

Bei der Untersuchung des Pansensaftes fiel jedoch auf, dass ein signifikanter Abfall der Pansensaft-pH-Werte (0,4 Einheiten) bei Tieren der Versuchsgruppe **H** gegenüber der Kontrollgruppe vorlag. Tendenziell konnte dieser Effekt auch bei Tieren der Versuchsgruppe **M** beobachtet werden.

Die Untersuchungen von Körperflüssigkeiten, Geweben und Exkreten ergaben, dass Roquefortin in Pansensaft, Leber, Galle und Nieren nachweisbar war. In Einzelfällen waren Spuren von Roquefortin auch in Herz, Lunge und Skelettmuskulatur anzutreffen. Im Blutplasma konnte diese Verbindung allerdings in keinem Fall nachgewiesen werden. Die Elimination von Roquefortin erfolgt vor allem mit den Faeces; im Harn lag die Roquefortin-Konzentration unterhalb der Nachweisgrenze.

## 7 SUMMARY

The intention of this study has been to obtain practical knowledge about the dosis of roquefortine injuriously affecting the health of ruminants (sheep). Moreover, it has been examined which degree of “carry over” effect into the food chain will have to be expected. For the test, eighteen female sheep, race Merinolandschaf, have been casually divided into three groups (M, H, K). During the testing period groups M and H received 10,00 and 50,00 mg of roquefortine, respectively, both orally and daily.

To carry out the study, 10 g of roquefortine had to be produced at first. Therefore, optimum cultivation conditions for surface cultures had to be ascertained as well as knowledge about the synthesis performance of different mould strains of *P. roqueforti*. Parallel to these tests, suitable analytical methods had to be developed in order to detect roquefortine in animal tissues and excreta. In the end, all methods of detection had to be validated.

The experiments regarding roquefortine synthesis showed significant differences among the tested strains of *P. roqueforti*. Stimulation of roquefortine synthesis has been achieved by reducing the pH of nutrition media. On the other hand, adding L-tryptophan and L-histidin did not significantly influence the production of roquefortine. Ethyl acetate (media) and chloroform (mycel) have been used to extract roquefortine out of *P. roqueforti* cultures. The raw extracts have been purified by the method of liquid/liquid-extraction combined with acid-base-step. The product gained has been relatively free of interfering substances, as shown by tests with HPLC, HPTLC and MS. Moreover, no differences have been found in the antibiotic activities between roquefortine produced and referential substances.

The influence of roquefortine on health of sheep was examined in an application of roquefortine to sheep for twenty days. No adverse effects on the health of animals in general could be observed. Moreover, testing the haematological, clinic-chemical und endocrinological parameters did neither provide hints to toxicological processes nor to reproductive-biological processes being influenced. Pathological-anatomical and histological tests confirmed the result. Examining the pH factor of rumen liquid, however, revealed significantly lower values ( 0,4 units) in animals of test group H, in comparison with the test control group. In animals of the test group M a tendency to this effect could be observed.

---

The examinations of animal body fluids, tissues and excreta showed that roquefortine has been detectable in rumen fluid, liver, bile and kidney. In individual cases, traces of roquefortine have been found in heart, lungs and skeleton musculature. However, in no case such traces have been observed in blood plasma. Elimination of roquefortine especially take places via faeces; concentration of roquefortine in urine has been below the detection limit.

## 8 LITERATUR

ARMBRUSTER, G., 1994: Futtermittelhygienische Untersuchungen von Silagen: Nachweis und Vorkommen des Mykotoxins Roquefortin.  
Diss. Med. Vet., Ludwig-Maximilians-Universität München

ARNOLD, D.L., SCOTT, P.M., MCGUIRE, P.F., HARWIG, J., NERA, E.A., 1978: Acute toxicity studies on roquefortine and PR-toxin, metabolites of *Penicillium roqueforti*, in the mouse.  
Food. Cosmet. Toxicol., 16, 369-371

AUERBACH, H., GEISLER, C., 1992: Mykotoxine in Rauh- und Saftfuttermitteln für Wiederkäuer.  
Übers. Tierernährung, 20, 167-208

AUERBACH, H., OLDENBURG, E., 1993: Zum Vorkommen von *Penicillium roqueforti* in Silagen.  
15. Mykotoxin-Workshop, 17. bis 19. Mai 1993, Jena

AUERBACH, H., OLDENBURG, E., WEISSBACH, F., 1998: Incidence of *Penicillium roqueforti* and roquefortine in silages.  
J. Sci. Food Agric. 76, 369-371.

BAUER, J., 1980: Zur Leistungsfähigkeit mykotoxikologischer Untersuchungsmethoden.  
Berl. Münch. Tierärztl. Wochenschr., 93, 354-359

BAUER, J., GAREIS, M., 1989: Untersuchungsmethoden für Mykotoxine.  
Dtsch. tierärztl. Wschr., 96, 346-350

BJELDANES, L.F., CHANG, G.W., THOMSON, S.V., 1978: Detection of mutagens produced by fungi with *Salmonella typhimurium* assay.  
Microbiol., 35, 1150-1154

- COLE R.J., DORNER, J.W., COX, R.H., RAYMOND, L.W., 1983: Two classes of alkaloid mycotoxins produced by *Penicillium crustosum* THOM isolated from contaminated beer.  
J. Agric. Food. Chem., 31, 655-657
- EL-BANNA, A.A., PITT, J.I., LEISTNER, L., 1987: Production of mycotoxins by *Penicillium* species.  
System. Appl. Microbiol., 10, 42-46
- ENGEL, G., 1979: UV-densitometrische Analyse von Roquefortin und PR-Toxin.  
J. Chromatogr., 170, 288-291
- ENGEL, G., KINDER, E., 1976: Untersuchungen über das Vorkommen von Roquefortin und Isfumigaclavin A und B in Blauschimmelkäse.  
Jahresbericht der Bundesanstalt für Milchforschung, Kiel, 1976, B 29
- ESCOULA, L., 1977: Moissures des ensilages et conséquences toxicologiques.  
Fourrages, 69, 97-105
- FRANCK, B., 1984: Mycotoxine aus Schimmelpilzen - Waffen ungebeter Tischgenossen von Mensch und Tier: Strukturen, Wirkungen, Biosynthese und Schutzmöglichkeiten.  
Angew. Chem., 96, 462-474
- FRANK, H.K., 1986: Verhalten von Mykotoxinen in der Nahrungskette. In: Probleme des Übergangs unerwünschter Stoffe in und auf Futtermitteln in die Nahrungskette. Informationsveranstaltung der Arbeitsgruppe "Carry over", am 7. und 8. Oktober 1986, in der Bundesforschungsanstalt für Landwirtschaft, Braunschweig-Völkenrode
- FRISVAD, J.C., 1987: High-performance liquid chromatographic determination of profiles of mycotoxins and other secondary metabolites.  
J. Chromatogr., 393, 333-347

- FRISVAD, J.C., 1988: Fungal species and their specific production of mycotoxins. In: SAMSON, R.A., VAN REENEN-HOEKSTRA, E., Introduction to food-born fungi. 3rd edition, Centraalbureau voor Schimmelcultures, Baarn, Delft, 239-249
- FRISVAD, J.C., FILTENBORG, O., 1983: Classification of terverticillate penicillia based on profiles of mycotoxins and other secondary metabolites. Appl. Environ. Microbiol., 46, 1301-1310
- FRISVAD, J.C., FILTENBORG, O., THRANE, U., 1989: Analysis and screening for mycotoxins and other secondary metabolites in fungal cultures by thin-layer chromatography and highperformance liquid chromatography. Arch. Environ. Contam. Toxicol., 18, 331-335
- FRISVAD, J.C., THRANE, U., 1987: Standardized high-performance liquid chromatography of 182 mycotoxins and other fungal metabolites based on alkylphenone retention indices and UV-VIS Spectra (Diode Array Detection). J. Chromatogr., 404, 195-214
- GEDEK, B., 1980: Kompendium der medizinischen Mykologie. Paul Parey Verlag, Berlin und Hamburg
- GEDEK, B., 1985: Toxine, insbesondere Mykotoxine, in Futtermitteln. Dtsch. tierärztl. Wschr., 92, 215-218
- GEDEK, B., BAUER, J., SCHREIBER, H., 1981: Zur Mykotoxinbildung Silage-verderbender Schimmelpilze. Wien. tierärztl. Monatsschr., 68, 299-301
- GORST-ALLMAN, C.P., STEYN, P.S., 1979: Screening methods for the detection of thirteen common mycotoxins. J. Chromatogr., 175, 325-331

HÄGGBLOM, P., 1990: Isolation of roquefortine C from feed grain.

Appl. Environ. Microbiol., 56, 2924-2926

HONG, S.L., ROBBERS, J.E., 1985: Genetics of ergoline alkaloid formation in *Penicillium roqueforti*.

Appl. Environ. Microbiol., 50, 558-561

HÖLTERSINKEN, M., MAURUSCHAT, A., BAUER, J., BÖHM, K.H., SCHOLZ, H., 1995: Untersuchungen zum Einfluss von *Penicillium roqueforti* und dessen Mykotoxin Roquefortin auf die Pansenfermentation in vitro.

21. DVG-Kongress, Bad Nauheim, 21-24. März 1995

KELLER, N.P., NESBITT, C., SARR, B., PHILLIPS, T.D., BURROW, E.B., 1997A: pH regulation of sterigmatocystin and aflatoxin biosynthesis in *Aspergillus spp.*

Phytopathology, 87, 643-648

KELLER, S.E., SULLIVAN, T.M., CHIRTEL, S., 1979b: Factors affecting the growth of *Fusarium* proliferation and production of fumonisin B<sub>1</sub>: oxygen and pH.

J. Industrial Microbiology and Biotechnology, 19, 305-309

KOLB, E., 1989: Lehrbuch der Physiologie der Haustiere, Teil II.

G: Fischer Verlag, Stuttgart

KOPP, B., REHM, H.J., 1979a: Antimicrobial action of roquefortine.

European J. Appl. Microbiol. Biotechnol., 6, 397-401

KOPP, B., REHM, H.J., 1979b: Ein biologischer Test zur quantitativen Bestimmung von Roquefortin.

Z. Lebensm. Unters. Forsch., 169, 90-91

KOPP, B., REHM, H.J., 1990: Studies on the inhibition of bacterial macromolecule synthesis by roquefortine, a mycotoxin from *Penicillium roqueforti*.

European J. Appl. Microbiol. Biotechnol., 13, 232-235

- KOPP, B., REHM, H.J., 1981: Studies on the inhibition of bacterial macromolecule synthesis by roquefortine, a mycotoxin from *Penicillium roqueforti*.  
European J. Appl. Microbiol. Biotechnol., 13, 232-235
- KOPP-HOLTWIESCHE, B., REHM, H.J., 1990: Antimicrobial action of roquefortine.  
J. Environ. Pathol. Toxicol. Oncol., 10, 41-44
- KOZLOVSKY, A.G., SOLOVIEVA, T.F., RESHETILOVA, T.A., SKRYABIN, G.K., 1981: Biosynthesis of roquefortine and 3,12-dihydroroquefortin by the culture *Penicillium farinosum*.  
Experientia, 37, 472-473
- KRAFT, W., DÜRR, U.M., 1985: Klinische Labordiagnostik in der Tiermedizin (5. Auflage).  
Schuttauverlag, Stuttgart-NewYork
- KRUSCH, U., LOMPE, A., ENGEL, G., v. MILCZEWSKI, K.E., 1977: Die gesundheitliche Unbedenklichkeit von *Penicillium caseicolum*, *P. camemberti* und *P. roqueforti*. II. Biologische Prüfung auf Toxinbildungsvermögen an Zellkulturen.  
Milchwissenschaft, 32, 394-399
- KUSCH, J., REHM, H.J., 1986: Regulation aspects of roquefortine production by free and Ca-alginate immobilized mycelia of *Penicillium roqueforti*.  
Appl. Microbiol. Biotechnol., 23, 394-399
- KYRIAKIDIS, N., WAIGHT, E.S., DAY, J.B., MANTLE, P.G., 1981: Novel metabolites from *Penicillium crustosum*, including penitrem E, a tremorgenic mycotoxin.  
Appl. Environ. Microbiol., 42, 61-62
- LAWS, I., MANTLE, P.G., 1987: Elimination of roquefortine in the rat.  
Mycotoxin Research, 3, 3-6
- LOMPE, A., v. MILCZEWSKI, K.E., 1979: Ein Zellkulturtest für den Nachweis von Mykotoxinen. I. Untersuchungen an Reinsubstanzen.

Z. Lebensm. Unters. Forsch., 169, 249-254

LOWES, N.R., SMITH, R.A., BECK, B.E., 1992: Roquefortine in the stomach contents of dogs suspected of strychnine poisoning in Alberta.

Can. Vet. J., 33, 535-538

MAIWORM, K., HÖLTERSINKEN, M., SCHOLZ, H., 1995: Auswirkungen verdorbener Maissilage auf Fermentationsvorgänge im Pansensaft des Rindes (in vitro).

Tierärztl. Umschau, 50, 283-290

MANTLE, P.G., PERERA, K.P.W.C., MAISHMAN, N.J., MUNDY, G.R., 1983: Biosynthesis of penitrems and roquefortine by *Penicillium crustosum*.

Appl. Environ. Microbiol., 45, 1486-1490

MEDINA, M., GAYA, P., NUÑEZ, M., 1985: Production of PR-Toxin and roquefortine by *Penicillium roqueforti* isolates from cabrales blue cheese.

J. Food. Prot., 48, 118-121

MOREAU, C., 1980: Le *Penicillium roqueforti*, morphologie, physiologie, intérêt en industrie fromagère, mycotoxines (Révision bibliographique).

Le Lait, LX, 254-271

MOSMANN, T., 1983: Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays.

J. Immunol. Methods, 69, 55-63

OHMOMO, S., ŌHASHI, T., ABE, M., 1980: Isolation of biogenetically correlated four alkaloids from the cultures of *Penicillium corymbiferum*.

Agric. Biol. Chem., 44, 1929-1930

OHMOMO, S., ŌHASHI, T., ABE, M., 1979: On the mechanism of the formation of indole alkaloids in *Penicillium roqueforti*.

Agric. Biol. Chem., 43, 2035-2038

- OHMOMO, S., OGUMA, K., OHASHI, T., ABE, M., 1978: Isolation of a new indole alkaloid, roquefortine D, from the cultures of *Penicillium roqueforti*.  
Agric. Biol. Chem. 42, 2387-2389
- OHMOMO, S., SATO, T., UTAGAWA, T., ABE, M., 1975: Isolation of festuclavine and three new indole alkaloids, roquefortine A, B and C from cultures of *Penicillium roqueforti*.  
Agric. Biol. Chem., 39, 1333-1334
- OHMOMO, S., UTAGAWA, T., ABE, M., 1977: Identification of roquefortine C produced by *Penicillium roqueforti*.  
Agric. Biol. Chem., 41, 2387-2389
- OLDENBURG, E., 1991: Mycotoxins in conserved forage.  
Landbauforschung Völkenrode, Sdh. 123, 191-205
- PATERSON R.R.M., 1986: Standardized one- and two-dimensional thin-layer chromatographic methods for the identification of secondary metabolites in *Penicillium* and other fungi.  
J. Chromatogr., 368, 249-264
- PELHATE, J., 1977: Maize silage: incidence of moulds during conservation.  
Folia Vet. Lat., 7, 1-16
- POLONSKY, J., MERRIEN, M-A., FRANGÉ, T., PASCARD, C., 1980: Isolation and structure (X-ray analysis) of marcfortine A, a new alkaloid from *Penicillium roqueforti*.  
J. Chem. Soc., Chem. Commun., 1980, 601-602
- PULS, R., LADYMAN, E., 1988: Roquefortine toxicity in a dog.  
Can. Vet. J., 29, 569
- RAPER, K.B., THOM, C., 1949: A manual of the Penicillia.  
Baillière, Tindall & Cox, London

- REISS, J., 1986: Schimmelpilze: Lebensweise, Nutzen, Schaden, Bekämpfung.  
Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York, Tokyo
- ROSENBERGER, G. (ed.), 1970: Krankheiten des Rindes.  
Paul Parey Verlag, Berlin und Hamburg
- SAMSON, R.A., VAN REENEN-HOEKSTRA, E.S., 1988: Introduction to food-born fungi. 3rd  
edition,  
Centraalbureau voor Schimmelcultures, Baarn, Delft
- SCHOCH, U., LÜTHY, J., SCHLATTER, C., 1983: Mykotoxine in schimmelgereiften Käsen.  
Mitt. Geb. Lebensmittelunters. Hyg., 74, 50-59
- SCHOCH, U., LÜTHY, J., SCHLATTER, C., 1984a: Mykotoxine von *P. roqueforti* und *P. camemberti* in Käse. I. Vorkommen chemisch identifizierter Mykotoxine.  
Milchwissenschaft, 39, 76-80
- SCHOCH, U., LÜTHY, J., SCHLATTER, C., 1984B: Mutagenitätsprüfung industriell  
verwendeter *P. camemberti*- und *P. roqueforti*-Stämme.  
Z. Lebensm. Unters. Forsch., 178, 351-355
- SCHOCH, U., LÜTHY, J., SCHLATTER, C., 1984C: Subchronische Toxizitätsprüfung von  
schimmelgereiften Käsen.  
Z. Lebensm. Unters. Forsch., 179, 99-103
- SCOTT, P.M., KENNEDY, B.P.C., 1976: Analysis of blue cheese for roquefortine and other  
alkaloids from *Penicillium roqueforti*.  
J. Agric. Food Chem., 33, 249-253
- SCOTT, P.M., KENNEDY, B.P.C., HARWIG, J., BLANCHFIELD, B.J., 1977: Study of conditions  
for production of roquefortine and other metabolites of *Penicillium roqueforti*.  
Appl. Environ. Microbiol., 33, 249-253

- SCOTT, P.M., 1984: Roquefortine. In: BETINA, V. (ed), Mycotoxins – Production, Isolation, Separation and Purification.  
Elsevier Science Publishers B.V., Amsterdam, 463-468.
- SCOTT, P.M., MERRIEN, M-A., POLONSKY, J., 1976: Roquefortine and isofumigaclavine A, metabolites from *Penicillium roqueforti*.  
Experientia, 32, 140-142
- SCOTT, P.M., POLONSKY, J., MERRIEN, M-A., 1979: Configuration of the 3,12 double bond of roquefortine.  
J. Agric. Food Chem., 27, 201-202
- SIEBER, R., 1978: Zur Frage der gesundheitlichen Unbedenklichkeit von in der Käsefabrikation verwendeten Schimmelpilzkulturen.  
Z. Ernährungswiss., 17, 112-113
- SMITH, R., 1987: Roquefortine in dead dogs.  
Vet. Hum. Toxicol., 29, 322
- STEYN, P.S., VLEGAAR, R., 1983: Roquefortine, an intermediate in the biosynthesis of oxaline in cultures of *Penicillium oxalicum*.  
J. Chem. Soc., Chem. Commun., 1983, 560-561
- ŠKRINJAR, M., STUBBLEFIELD, R.D., VUJIČIĆ, I.F., 1992: Ochratoxigenic moulds and ochratoxin A in forages and grain feeds.  
Acta Veterinaria Hungarica, 40, 185-190
- VESONDER, R.F., TJARKS, L., ROHWEDDER, W., KIESWETTER, D.O., 1980: Indole metabolites of *Penicillium cyclopium* NRRL 6093.  
Experientia, 36, 1308
- VLEGGAR, R., WESSELS, P.L., 1980: Stereochemistry of the dehydrogenation of (2S)-histidine in the biosynthesis of roquefortine and oxaline.  
J.Chem. Soc., Chem. Commun., 1980, 160-162

- 
- WAGENER, R.E., DAVIS, N.D., DIENER, U.L., 1980: Penitrem A and roquefortine production by *Penicillium commune*.  
Appl. Environ. Microbiol., 39, 882-887
- WALTERS, D.L., SCHAMS, D., SCHALLENBERGER, E., 1984: Pulsatile secretion of gonadotropins, ovarian steroids and ovarian oxytocin during the luteal phase of the oestrus cycle in the cow.  
J. Reprod. Fert. , 71, 479-491
- WARE, G.M., THORPE, C.W., POHLAND, A.E., 1980: Determination of roquefortine in blue cheese and blue cheese dressing by high pressure liquid chromatography with ultraviolet and electrochemical detectors.  
J. Assoc. Off. Anal. Chem., 63, 637-641

## **9 ANHANG**

## 9.1 Pathologisch-Anatomische Befunde

**Tier: K-473**

Ernährungszustand: gut

### Makroskopische Befunde

- Ösophagus: mittelgradig *Sarcocystis tenella*
- multiple Lungenwurmbrotknoten
- akuter Gallestau
- linsengroßer, weißer Herd am kranialen Pol der rechten Niere
- geringgradig *Chabertia ovina* im Zäkum
- Gehirn: o.b.B.
- Hypophyse: o.b.B.

### Histologische Befunde

- 1. Ovar: Follikel und Gelbkörper
- 2. Ovar: Follikel
- Uterus: o.b.B.
- Muskel: o.b.B.
- Leber: geringgradige, ungleichmäßig auf die Läppchen verteilte, feintropfige Verfettung zahlreicher Leberzellgruppen
- Lunge: interstitielle Herdpneumonie
- Niere, Milz: o.b.B.
- Pankreas und Inselapparat: o.b.B.
- Nebenniere, Schilddrüse: o.b.B.
- Sternalmark: o.b.B.
- Herz, Niere: Fett negativ
- Leber, Niere, Milz: Eisen negativ
- Gehirn: vereinzelt perivaskuläre Rundzellinfiltrate
- Hypophyse: o.b.B.

**Tier: M-485**

Ernährungszustand: gut

#### Makroskopische Befunde

- Ösophagus: geringgradig *Sarcocystis tenella*
- Lunge: einzelne Parasitengranulome, chronisch abszendierende Bronchopneumonie im rechten Mittel- und Hauptlappen
- geringgradiges Hydroperikard
- fibroplastische und adhaesive Periheptitis an der Facies diaphragmatica
- Nieren: beide vergrößert, weiße Streifen in der Rinde, hochgradige rötlich-weiße Zubildung im gesamten Mark mit erhabener Schnittfläche.
- Gehirn: o.b.B.
- Hypophyse: o.b.B.

#### Histologische Befunde

- 1. Ovar: Follikel und Gelbkörper
- 2. Ovar: Follikel und Gelbkörper
- Uterus: o.b.B.
- Herz: geringgradig *Sarcocystis*
- Muskel: geringgradig *Sarcocystis*
- Leber: herdförmig interstitielle lymphozytäre Infiltrate
- Lunge (in unveränderten Arealen): interstitielle Pneumonie
- Niere: hochgradige chronische interstitielle Nephritis, im Markbereich chronisch-eitrig
- Milz: o.b.B.
- Pankreas und Inselapparat: o.b.B.
- Nebenniere, Schilddrüse: o.b.B.
- Sternalmark: o.b.B.
- Herz, Niere: Fett negativ
- Leber: Itozellen verfettet
- Leber, Niere, Milz: Eisen negativ
- Gehirn: vereinzelt perivaskuläre Rundzellinfiltrate sowie geringgradige lymphomonozytäre Infiltration der Meninx unter besonderer Betonung des periarteriolen Gewebes
- Hypophyse: o.b.B.

**Tier K-482**

Ernährungszustand: gut

Makroskopische Befunde

- Lunge: multiple Parasitengranulome
- Gehirn: o.b.B.
- Hypophyse: o.b.B.

Histologische Befunde

- 1. Ovar: Follikel und Gelbkörper
- 2. Ovar: Follikel und Gelbkörper
- Uterus: o.b.B.
- Herz: geringgradig Sarcocystis
- Muskel: o.b.B.
- Leber: o.b.B.
- Lunge: herdförmig interstitielle Pneumonie
- Niere: ein Mikrogranulom in der Rinde
- Milz: o.b.B.
- Pankreas und Inselapparat: o.b.B.
- Nebenniere, Schilddrüse: o.b.B.
- Sternalmark: o.b.B.
- Herz, Leber, Niere: Fett negativ
- Leber, Niere, Milz: Eisen negativ
- Gehirn: vereinzelt perivaskuläre Rundzellinfiltrate
- Hypophyse: o.b.B.

**Tier M-477**

Ernährungszustand: gut

Makroskopische Befunde

- Ösophagus: geringgradig Sarcocystis tenella
- Lunge: multiple Parasitengranulome, einzelne Lungenwurmbrotknotten
- Leber: einzelne Parasitengranulome
- Mamma: chronisch abszedierende Mastitis links
- Gehirn: o.b.B.
- Hypophyse: o.b.B.

Histologischen Befunde

- 1. Ovar: Follikel und Gelbkörper
- 2. Ovar: Follikel und Gelbkörper
- Uterus: o.b.B.
- Herz: geringgradig Sarcocystis
- Muskel: o.b.B.
- Leber: herdförmige interstitielle Hepatitis mit Eosinophilen
- Lunge: herdförmige interstitielle Pneumonie
- Niere: geringgradige feintröpfige Verfettung in Epithelien nahezu aller Tubusabschnitte
- Milz: o.b.B.
- Pankreas und Inselapparat: o.b.B.
- Nebenniere, Schilddrüse: o.b.B.
- Sternalmark: o.b.B.
- Herz, Leber: Fett negativ
- Leber, Niere, Milz: Eisen negativ
- Gehirn: vereinzelt perivaskuläre Rundzellularinfiltrate; eine intakte Sarcocystiszyste im Bereich der Großhirnrinde reaktionslos im umgebenden Gewebe
- Hypophyse: o.b.B.

**Tier M-475**

Ernährungszustand: gut

Makroskopische Befunde

- Ösophagus: mittelgradig Sarcocystis tenella
- Lunge: hochgradige chronisch-abszedierende Bronchopneumonie, multiple Lungenwurmknotten
- Leber: multiple chronische Abszesse bis 2cm
- Mamma: hühnereigroßer Abszeß in der rechten Mamma
- Sonstiges: hochgradige Pleuritis adhaesiva (linke Thoraxwand); verkalkte und verknöcherte Parasitengranulome im Netz (Cysticerken)
- Gehirn: o.b.B.
- Hypophyse: o.b.B.

Histologische Befunde

- 1.Ovar: Follikel und Gelbkörper
- 2. Ovar: Follikel und Gelbkörper
- Uterus: o.b.B.
- Herz: mittelgradig Sarcocystis
- Muskel: o.b.B.
- Leber (unverändertes Areal): o.b.B.
- Lunge (Makroskopisch unverändertes Areal): hochgradige chronische interstitielle Pneumonie
- Nier, Milz: o.b.B.
- Pankreas und Inselapparat: o.b.B.
- Nebenniere, Schilddrüse: o.b.B.
- Sternalmark: o.b.B.
- Herz, Leber, Niere: Fett negativ
- Leber, Niere, Milz: Eisen negativ
- Gehirn: vereinzelt perivaskuläre Rundzellinfiltrate
- Hypophyse: o.b.B.

**Tier M-007**

Ernährungszustand: gut

Makroskopische Befunde

- Ösophagus: mittelgradig Sarcocystis tenella
- Lunge: multiple Parasitengranulome
- Gehirn: o.b.B.
- Hypophyse: o.b.B.

Histologische Befunde

- 1. Ovar: Follikel
- 2. Ovar: Follikel und Gelbkörper
- Uterus: o.b.B.
- Herz: einzelne Sarcocystis
- Muskel: o.b.B.
- Leber: geringgradige Pericholangitis mit Beteiligung von eosinophilen Granulozyten
- Lunge: chronische interstitielle Pneumonie; Fibroseherde mit Alveolarzellhyperplasie
- Niere, Milz: o.b.B.
- Pankreas und Inselapparat: o.b.B.
- Nebenniere, Schilddrüse: o.b.B.
- Sternalmark: o.b.B.
- Herz, Leber, Niere: Fett negativ
- Leber, Niere, Milz: Eisen negativ
- Gehirn: vereinzelt perivaskuläre Rundzellinfiltrate
- Hypophyse: o.b.B.

**Tier K-488**

Ernährungszustand: gut

Makroskopische Befunde

- Sternum: Fettmark
- Ösophagus: mittelgradig Sarcocystis tenella
- Nebennieren: o.b.B.
- Niere: Durchsetzung der Rinde mit feinen, kleinen Stippchen, grobgranulierte Schrumpfnieren links
- Gehirn: o.b.B.
- Hypophyse: o.b.B.

Histologische Befunde

- 1. Ovar: Follikel
- 2. Ovar: Follikel und Gelbkörper
- Uterus: o.b.B.
- Herz: geringgradig Sarcocystis
- Muskel: vereinzelt Sarcocystis
- Leber: o.b.B.
- Lunge: geringgradige parasitäre Herdpneumonie
- Niere: chronische interstitielle Nephritis, in Entzündungsbereichen verfettete Kanälchengruppen
- Milz: o.b.B.
- Nebenniere: Rindenadenom
- Schilddrüse: o.b.B.
- Sternalmark: o.b.B.
- Herz, Leber: Fett negativ
- Leber, Niere, Milz: Eisen negativ
- Gehirn: vereinzelt perivaskuläre Rundzellinfiltrate
- Hypophyse: o.b.B.

**Tier: H-487**

Ernährungszustand: gut

Makroskopische Befunde

- Ösophagus: geringgradig Sarcocystis tenella
- Sonstiges: hochgradige lobäre chronisch-abszedierende Bronchopneumonie; fibroplastische adhäsive Pleuritis
- Gehirn: o.b.B.
- Hypophyse: o.b.B.

Histologische Befunde

- 1. Ovar: Follikel und Gelbkörper
- 2. Ovar: Follikel und Gelbkörper
- Uterus: o.b.B.
- Herz: geringgradig Sarcocystis
- Muskel: geringgradig Sarcocystis
- Leber: o.b.B.
- Lunge (makroskopisch nicht verändertes Areal): o.b.B.
- Niere: o.b.B.
- Milz: Spuren von Eisenpigment
- Pankreas und Inselapparat: o.b.B.
- Nebenniere und Schilddrüse: o.b.B.
- Sternalmark: o.b.B.
- Herz, Leber, Niere: Fett negativ
- Leber, Niere: Eisen negativ
- Gehirn: o.b.B.
- Hypophyse: o.b.B.

**Tier: H-480**

Ernährungszustand: gut

Makroskopische Befunde

- Ösophagus: geringgradig Sarcocystis tenella
- Lunge: einzelne Parasitengranulome und Lungenwurmbrotknoten
- Leber: Weißer Herd (1,5 mm Durchmesser), einzelne Parenchymnarben
- Mamma: chronisch-abszedierende Mastitis der rechten Gesäugehälfte
- Gehirn: tötungsbedingte Meninxblutung im Kleinhirnbereich
- Hypophyse: o.b.B.

Histologische Befunde

- 1. Ovar: Follikel
- 2. Ovar: Follikel
- Uterus: o.b.B.
- Herz: hochgradig Sarcocystis
- Leber: Parasitengranulom
- Lunge: interstitielle und eitrige Herdpneumonie
- Niere: o.b.B.
- Milz: o.b.B.
- Pankreas und Inselapparat: o.b.B.
- Nebenniere und Schilddrüse: o.b.B.
- Sternalmark: o.b.B.
- Herz, Leber, Niere: Fett negativ
- Leber, Niere, Milz: Eisen negativ
- Gehirn: vereinzelt perivaskuläre Rundzellinfiltrate; Epiphyse: Vakuolen der Pituizyten mit exzentrischer Kernverlagerung
- Hypophyse: o.b.B.

**Tier: H-486**

Ernährungszustand: gut

Makroskopische Befunde

- Ösophagus: hochgradig Sarcocystis tenella
- Lunge: einzelne Brutknoten
- Gehirn: o.b.B.
- Hypophyse: o.b.B.

Histologische Befunde

- 1. Ovar: Follikel
- 2. Ovar: Follikel und Gelbkörper
- Uterus: o.b.B.
- Herz: mittelgradig Sarcocystis
- Muskel: geringgradig Sarcocystis
- Leber: geringgradige chronische lymphozytäre Pericholangitis
- Lunge: Hyperplasie des bronchusassoziierten Lymphgewebes
- Niere: o.b.B.
- Milz: o.b.B.
- Pankreas und Inselapparat: o.b.B.
- Nebenniere und Schilddrüse: o.b.B.
- Sternalmark: o.b.B.
- Herz, Leber, Niere: Fett negativ
- Leber, Niere, Milz: Eisen negativ
- Gehirn: vereinzelt perivaskuläre Rundzellinfiltrate
- Hypophyse: o.b.B.

**Tier: K-481**

Ernährungszustand: gut

Makroskopische Befunde

- rechte Schulter: chronische Entzündung (Ödem und Granulationsgewebsbildung) im Katheterverlauf, fingerförmiger Abszeß in diesem Bereich
- Ösophagus: geringgradig Sarcocystis tenella
- Lunge: einzelne Parasitengranulome
- Gehirn: tötungsbedingte Meninxblutung im Kleinhirnbereich
- Hypophyse: o.b.B.

Histologische Befunde

- 1. Ovar: Follikel und Gelbkörper
- 2. Ovar: Follikel und Gelbkörper
- Uterus: o.b.B.
- Herz: geringgradig Sarcocystis
- Muskel: o.b.B.
- Leber: o.b.B.
- Niere: o.b.B.
- Milz: o.b.B.
- Pankreas und Inselapparat: o.b.B.
- Nebenniere und Schilddrüse: o.b.B.
- Sternalmark: o.b.B.
- Herz, Leber, Niere: Fett negativ
- Leber, Niere, Milz: Eisen negativ
- Gehirn: o.b.B.
- Hypophyse: o.b.B.

**Tier: M-490**

Ernährungszustand: gut

Makroskopische Befunde

- Lunge: mittelgradig miliare Parasitengranulome in den Hauptlappen
- Leber: einzelne kleine Kapselnarbe
- Gehirn: o.b.B.
- Hypophyse: o.b.B.

Histologische Befunde

- 1. Ovar: Follikel
- 2. Ovar: Follikel
- Uterus: o.b.B.
- Muskel: geringgradig Sarcocystis; kleinherdig lymphozytäre interstitielle Infiltrate
- Leber: o.b.B.
- Lunge: kleinherdig interstitielle Infiltrate mit eosinophilen Granulozyten (parasitär); Granulom
- Niere: o.b.B.
- Milz: o.b.B.
- Pankreas und Inselapparat: o.b.B.
- Nebenniere und Schilddrüse: o.b.B.
- Sternalmark: o.b.B.
- Herz, Niere: Fett negativ
- Leber, Niere, Milz: Eisen negativ
- Gehirn: subarachnoidale Blutung im Bereich des Stammhirns ohne Reaktion innerhalb der umgebenden Strukturen
- Hypophyse: o.b.B.

**Tier: M-489**

Ernährungszustand: gut

Makroskopische Befunde

- Ösophagus: mittelgradig Sarcocystis tenella
- Lunge: einzelne Lungenwurmbrotknoten; einzelne miliare Parasitengranulome
- Leber: einzelne Kapselnarben, einzelne Parasitengranulome
- Gehirn: o.b.B.
- Hypophyse: o.b.B.

Histologische Befunde

- 1. Ovar: Follikel
- 2. Ovar: Follikel
- Uterus: o.b.B.
- Herz: kleinherdig lymphozytäre interstitielle Infiltrate, herdförmig auch im Epikard; geringgradig Sarcocystis
- Muskel: geringgradig lymphozytäre interstitielle Infiltrate
- Leber: o.b.B.
- Lunge: parasitäre Herdpneumonie (Brutknoten)
- Niere: kleinherdig interstitielle Infiltrate, Verkalkungen distal im Mark
- Milz: o.b.B.
- Pankreas und Inselapparat: o.b.B.
- Nebenniere, Schilddrüse: o.b.B.
- Sternalmark: o.b.B.
- Herz, Niere: Fett negativ
- Leber, Niere, Milz: Eisen negativ
- Gehirn: vereinzelt perivaskuläre Rundzellinfiltrate v.a. im Bereich des Stammhirns
- Hypophyse: o.b.B.

**Tier: H-472**

Ernährungszustand: gut

Makroskopische Befunde

- Zäkum: Trichuris sp.
- Gehirn: o.b.B.
- Hypophyse: o.b.B.

Histologische Befunde

- 1: Ovar: Follikel und Gelbkörper
- 2. Ovar: Follikel und Gelbkörper
- Uterus: o.b.B.
- Herz: kleine lymphozytäre Infiltrate im Interstitium; geringgradig Sarcocystis
- Muskel: Infiltrat mit Makrophagen im Interstitium; geringgradig Sarcocystis
- Leber: o.b.B.
- Lunge: Mikrogranulom mit Siderophagen
- Niere: Spuren von Fett in den Rindentubuli
- Milz: o.b.B.
- Pankreas und Inselapparat: o.b.B.
- Nebenniere, Schilddrüse: o.b.B.
- Sternalmark: o.b.B.
- Herz: Fett negativ
- Leber, Niere, Milz: Eisen negativ
- Gehirn: im Großhirn vereinzelt perivaskuläre Rundzellinfiltrate
- Hypophyse: o.b.B.

**Tier: K-474**

Ernährungszustand: gut

Makroskopische Befunde

- Ösophagus: mittelgradig Sarcocystis tenella
- Lunge: mehrere Parasitengranulome
- Zäkum: Trichuris sp.
- Gehirn: o.b.B.
- Hypophyse: o.b.B.

Histologische Befunde

- 1. Ovar: Follikel und Gelbkörper
- 2. Ovar: Follikel und Gelbkörper
- Uterus: o.b.B.
- Herz: kleine lymphozytäre interstitielle Infiltrate, geringgradig Sarcocystis
- Muskel: geringgradig Sarcocystis
- Leber: Lipofuscin in Hepatozyten
- Lunge: multifokal Adenomastose im Anfangsstadium
- Niere: o.b.B.
- Milz: o.b.B.
- Pankreas und Inselapparat: o.b.B.
- Nebenniere, Schilddrüse: o.b.B.
- Sternalmark: o.b.B.
- Herz, Niere: Fett negativ
- Leber, Niere, Milz: Eisen negativ
- Gehirn: geringgradige Vakuolisierung innerhalb der weißen Substanz des Kleinhirns
- Hypophyse: o.b.B.

**Tier: H-476**

Ernährungszustand: gut

Makroskopische Befunde

- Ösophagus: mittelgradig Sarcocystis tenella
- Lunge: zahlreiche Parasitengranulome
- Zäkum: Trichuris sp.
- Ovarien: beidseits kirschgroße Zysten
- Gehirn: o.b.B.
- Hypophyse: o.b.B.

Histologische Befunde

- 1. Ovar: Follikel und Gelbkörper, daneben von luteinisierendem Gewebe umgebene Zysten
- 2. Ovar: Follikel und Gelbkörper, daneben von luteinisierendem Gewebe umgebene Zysten
- Uterus: o.b.B.
- Herz: geringgradig lymphozytäre interstitielle Infiltrate in Myokard und Epikard; geringgradig Sarcocystis
- Muskel: o.b.B.
- Leber: Lipofuscin in Hepatozyten
- Lunge: varkalkte Parasitengranulome
- Niere: ein interstitielles lymphozytäres Infiltrat
- Milz: o.b.B.
- Pankreas und Inselapparat: o.b.B.
- Nebenniere, Schilddrüse: o.b.B.
- Sternalmark:
- Herz, Niere: Fett negativ
- Leber, Niere, Milz: Eisen negativ
- Gehirn: vereinzelt perivaskuläre Rundzellinfiltrate in Epiphyse und Plexus chorioideus; geringgradige Vakuolisierung innerhalb der Weißen Substanz des Kleinhirns
- Hypophyse: o.b.B.

**Tier: H-479**

Ernährungszustand: gut

Makroskopische Befunde

- Ösophagus: mehrere Sarcocystis tenella
- Lunge: mehrere Lungenwurmbrotknoten; herdförmige Parenchymnarben
- Zäkum: Trichuris sp.
- Leber: 9 cm großer Leberabszeß, Wandstärke bis zu 1 cm
- Gehirn: o.b.B.
- Hypophyse: o.b.B.
- Sonstiges: Abszeß in der Unterhaut rechts lateral an der Basis des Halses

Histologische Befunde

- 1. Ovar: Follikel und Gelbkörper
- 2. Ovar: Follikel und Gelbkörper
- Uterus: zwei zystisch erweiterte Uterindrüsen im Endometrium
- Herz: herdförmig kleine lymphozytäre interstitielle Infiltrate, mittelgradig Sarcocystis
- Muskel: geringgradig Sarcocystis
- Leber: o.b.B.
- Lunge: parasitäre Herdpneumonie, Granulom
- Niere: kleinherdig lymphozytäre interstitielle Infiltrate; Lipofuscin in Tubusepithelien
- Milz: geringgradig Lymphklasie in den Zentren einzelner Follikel (tötungsbedingt)
- Pankreas und Inselapparat: o.b.B.
- Nebenniere: o.b.B.
- Schilddrüse: herdförmig perivaskuläre Entzündung mit Eosinophilen,; einzelne Follikel mit vielen Siderophagen
- Sternalmark: o.b.B.
- Herz, Niere: Fett negativ
- Leber, Niere, Milz: Eisen negativ
- Gehirn: vereinzelt perivaskuläre Rundzellinfiltrate; eine intakte Sarcocystiszyste im Bereich der Großhirnrinde ohne Reaktion innerhalb des umgebenden Gewebes; geringgradige Vakuolisierung innerhalb der weißen Substanz des Kleinhirns
- Hypophyse: o.b.B.

**Tier: K-471**

Ernährungszustand: gut

Makroskopische Befunde

- Ösophagus: multiple Sarcocystis-Zysten
- Lunge: speckiger Verdichtungsherd im Parenchym; Granulom
- Zäkum: Trichuris sp.
- Gehirn: o.b.B.
- Hypophyse: o.b.B.

Histologische Befunde

- 1. Ovar: Follikel und Gelbkörper
- 2. Ovar: Follikel und Gelbkörper
- Uterus: o.b.B.
- Herz: gering- mittelgradig Sarcocystis
- Muskel: geringgradig Sarcocystis
- Leber: o.b.B.
- Lunge: interstitielle Pneumonie vom Typ Maedi mit hochgradiger Alveolarzellhyperplasie; multiple Parasitengranulome
- Niere: kleinherdig lymphozytäre interstitielle Infiltrate
- Milz: o.b.B.
- Pankreas und Inselapparat: o.b.B.
- Nebenniere, Schilddrüse: o.b.B.
- Sternalmark: o.b.B.
- Herz, Niere: Fett negativ
- Leber, Niere, Milz: Eisen negativ
- Gehirn: o.b.B.
- Hypophyse: o.b.B.

## 9.2 Ergebnisse der grobsinnlichen Pansensaftuntersuchung

Tier	Farbe	Konsistenz	Geruch	Sedimentation Und Flotation	pH- Wert	Protozoen (lg / ml)	gram+ zu gram-
H-472	ocker/hell- braun	leicht viskös	aromatisch	fehlt	5,6	5,07	20 : 80
H-476	Hellbraun	eher flüssig	aromatisch	< 10 min.	5,53	4,89	20 : 80
H-479	Hellbraun	eher flüssig	aromatisch, leicht stechend	< 10 min.	5,41	4,97	20 : 80
H-480	hellbraun/oliv	leicht viskös	aromatisch	< 10 min.	5,6	5,57	40 : 60
H-486	hellbraun/oliv	wässrig	aromatisch	< 10 min.	6,01	5,31	20 : 80
H-487	hellbraun/oliv	leicht viskös	aromatisch	< 10 min.	5,58	6,03	30 : 70
K-471	ocker/hell- braun	leicht viskös	aromatisch	> 10 min.	6,24	5,07	30 : 70
K-473	hellbraun/grün lich	wässrig	leicht dumpf und faulig	< 10 min.	6,27	5,07	20 : 80
K-474	Hellbraun	eher flüssig	aromatisch	< 10 min.	6,55	4,74	20 : 80
K-481	hellbraun/oliv	leicht viskös	aromatisch	< 10 min.	6,3	5,19	20 : 80
K-482	hellbraun/oliv	viskös/wässrig	aromatisch	< 10 min.	5,51	5,44	20 : 80
K-488	hellbraun/oliv	wässrig	aromatisch, leicht stechend	< 10 min.	6,04	5,29	20 : 80
M-007	hellbraun/oliv	leicht viskös	Aromatisch	< 10 min.	6	5,15	30 : 70
M-475	Hellbraun/oliv	wässrig	Aromatisch, leicht essigartig	> 10 min.	5,95	5,07	20 : 80
M-477	Hellbraun/oliv	leicht viskös	Aromatisch	< 10 min.	5,72	5,12	10 : 90
M-485	Hellbraun/oliv	leicht viskös	Aromatisch	< 10 min.	5,66	5,21	20 : 80
M-489	ocker/hell- braun	eher flüssig	Aromatisch	< 10 min.	6,06	5,17	10 : 90
M-490	ocker/hell- braun	leicht viskös	Aromatisch	> 10 min.	5,45	5,04	20 : 80

### 9.3 Roquefortinrückstände in Faeces

**Tabelle 27. Roquefortingehalte im Kot der mit 50 mg Roquefortin pro Tag behandelten Tiere.**

Rel. Tag	H-472 (µg/g)	H-476 (µg/g)	H-479 (µg/g)	H-480 (µg/g)	H-486 (µg/g)	H-487 (µg/g)	$\bar{x}$ (s)
-17	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø
-13	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø
-9	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø
-4	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø
-2	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø
-1	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø
0	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø
1	0,4	0,9	0,9	1,0	0,3	n.n.	0,70 (0,32)
2	1,8	2,9	2,6	2,3	0,8	1,3	1,95 (0,80)
3	3,1	2,9	2,9	5,0	4,9	1,2	3,33 (1,43)
4	5,1	2,3	5,2	2,4	3,7	2,8	3,58 (1,31)
5	7,6	3,4	6,1	4,2	5,7	2,8	4,97 (1,82)
6	4,5	1,2	4,1	2,4	2,7	3,7	3,10 (1,23)
7	6,9	2,4	2,1	4,6	4,9	5,5	3,75 (1,64)
8	5,2	1,6	3,1	4,4	2,1	3,7	3,62 (1,53)
9	8,5	4,0	5,9	2,6	1,3	3,0	4,22 (2,60)
11	4,9	n.u.	4,1	2,9	2,2	4,8	3,78 (1,19)
12	14,5	4,4	4,9	1,9	3,8	2,8	4,65 (3,44)
15	8,2	3,9	5,3	3,4	3,1	3,9	4,63 (1,90)
16	n.u.	2,2	1,6	3,2	3,7	4,0	2,94 (1,01)
17	6,0	2,2	n.u.	1,8	6,5	2,0	3,70 (2,34)
18	9,3	3,6	4,2	0,8	n.u.	2,9	3,93 (2,63)
19	6,4	2,1	3,9	1,8	2,6	4,2	3,77 (2,27)
20	9,1	3,6	5,5	1,8	1,7	2,1	3,82 (2,39)

n.u.: nicht untersucht

**Tabelle 28. RoquefortinGehalte im Kot der mit 10 mg Roquefortin pro Tag behandelten Tiere**

rel. Tag	M-007 (µg/g)	M-475 (µg/g)	M-477 (µg/g)	M-485 (µg/g)	M-489 (µg/g)	M-490 (µg/g)	$\bar{x}$	(s)
-17	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	
-13	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	
-9	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	
-4	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	
-2	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	
-1	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	
0	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	
1	0,4	0,6	0,4	0,1	0,5	0,4	0,38	(0,20)
2	0,5	0,4	1,7	0,5	0,7	0,5	0,51	(0,37)
5	1,0	0,6	1,5	0,4	n.u.	0,4	0,78	(0,47)
6	n.u.	n.u.	1,5	0,4	0,9	0,9	0,93	(0,43)
7	1,6	n.u.	1,0	0,7	0,6	1,1	1,00	(0,39)
8	0,8	0,4	0,2	0,9	0,3	0,9	0,58	(0,32)
11	1,0	0,8	n.u.	n.u.	0,7	0,2	0,68	(0,34)
12	1,7	0,7	1,8	1,3	0,7	0,5	1,12	(0,56)
14	0,9	0,6	1,7	0,3	0,7	1,1	0,88	(0,48)
16	0,6	1,0	1,0	0,4	0,4	0,4	0,63	(0,29)
17	1,4	0,3	1,4	1,1	0,5	0,6	0,76	(0,40)
19	0,4	0,4	0,7	0,3	0,5	0,8	0,52	(0,19)

n.u.: nicht untersucht

## **9.4 Ergebnisse der endokrinologischen Untersuchungen**

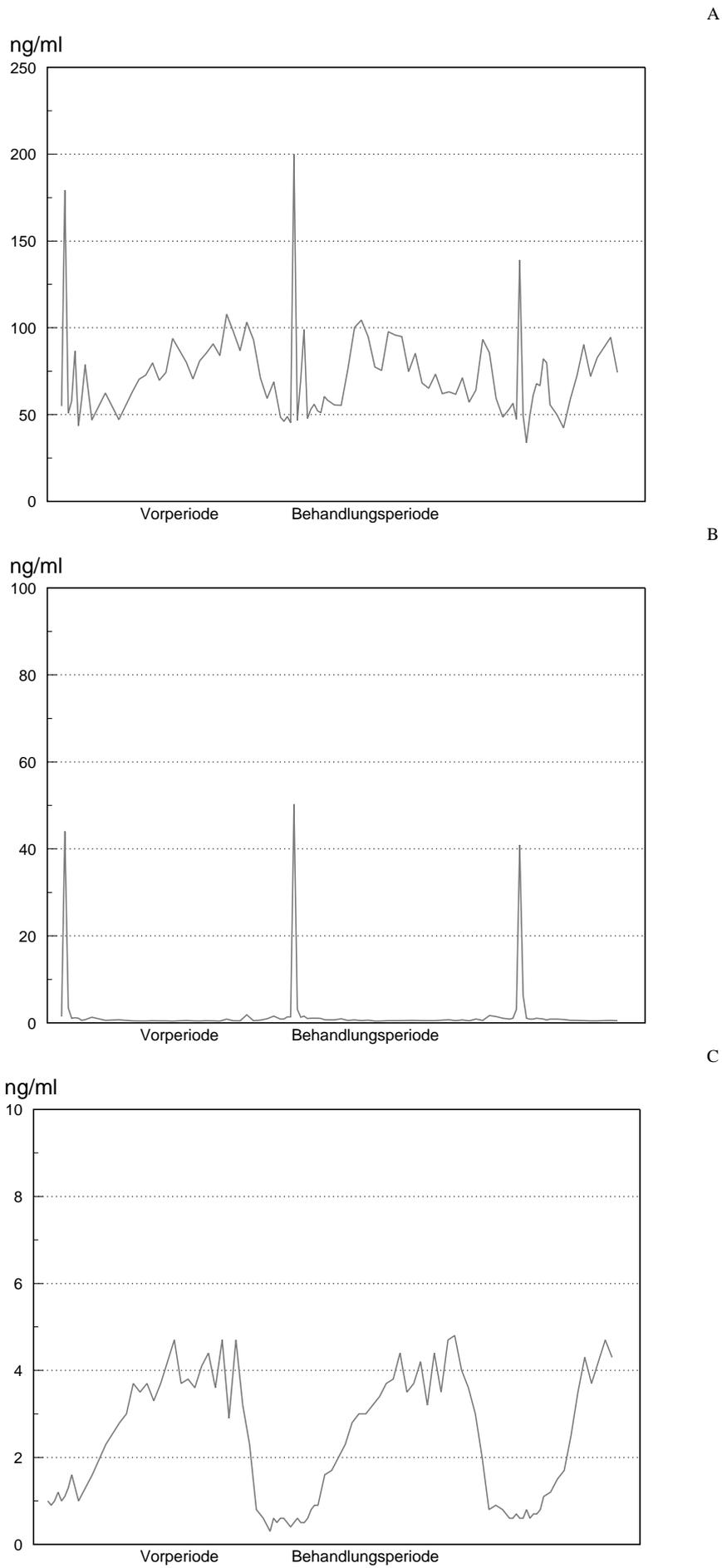
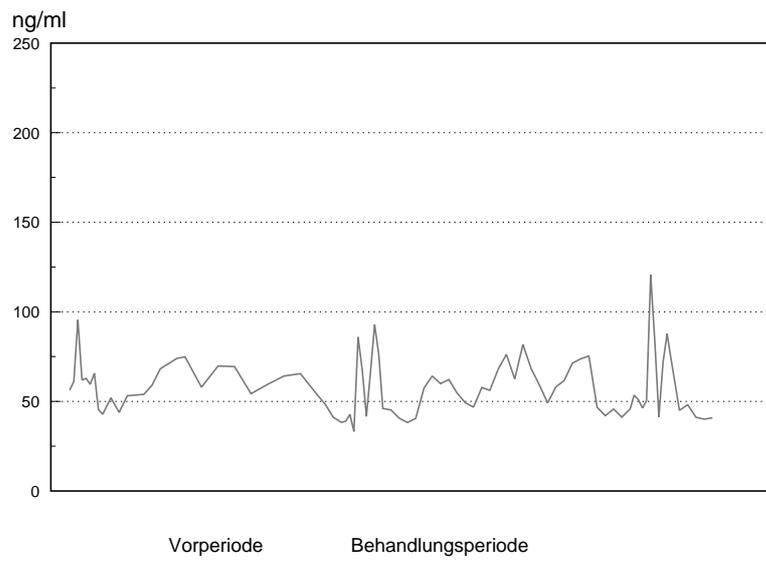
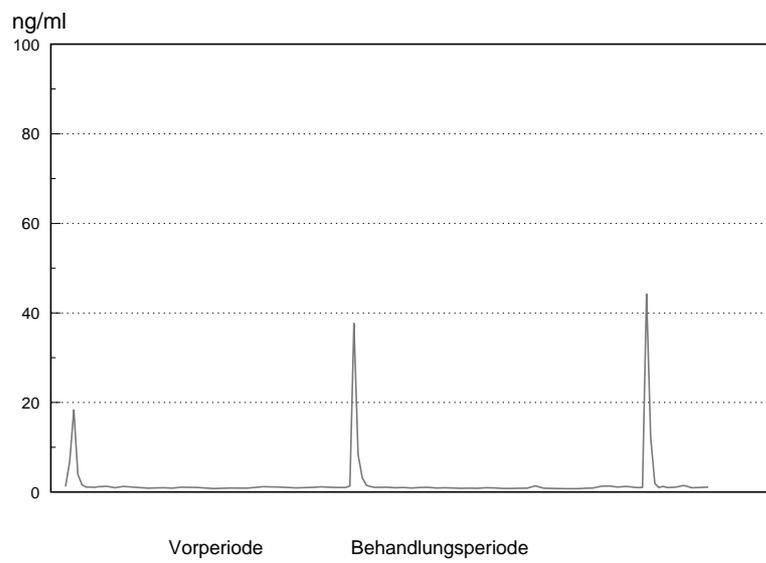


Abbildung 25. Hormonprofile Tier M-007 (Roquefortin C-Dosierung 10,0 mg/Tag ; A: FSH, B: LH, C: Progesteron).

A



B



C

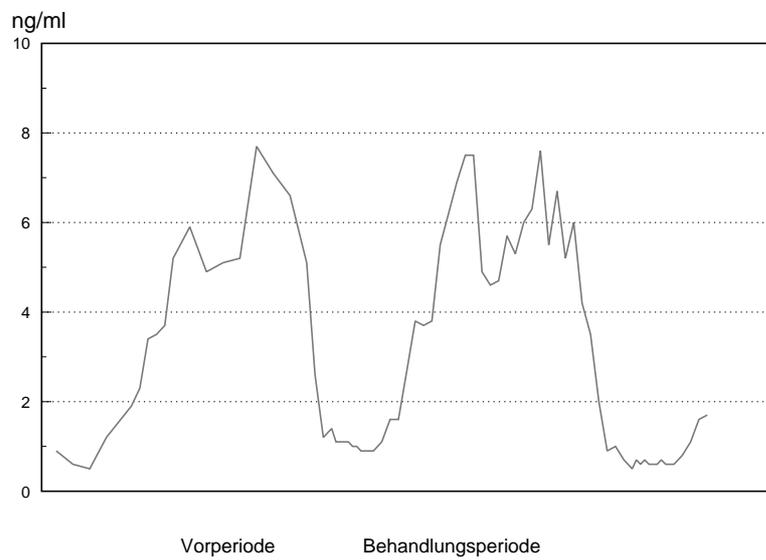
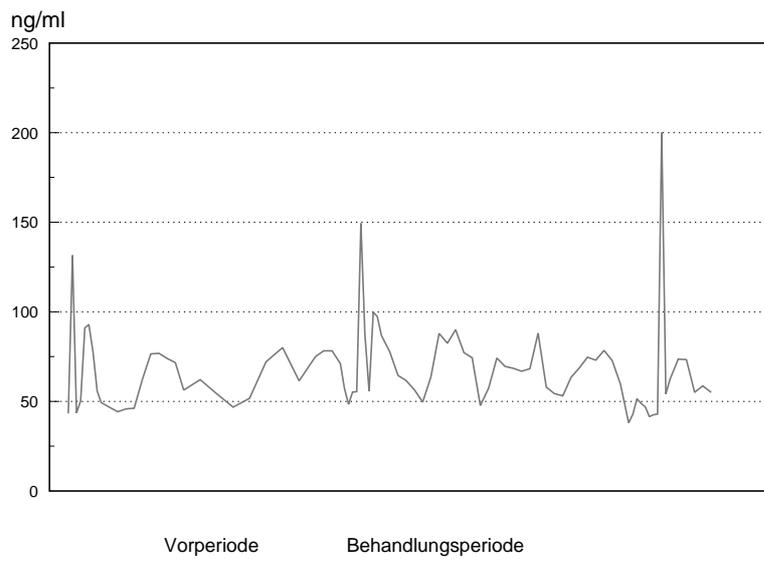
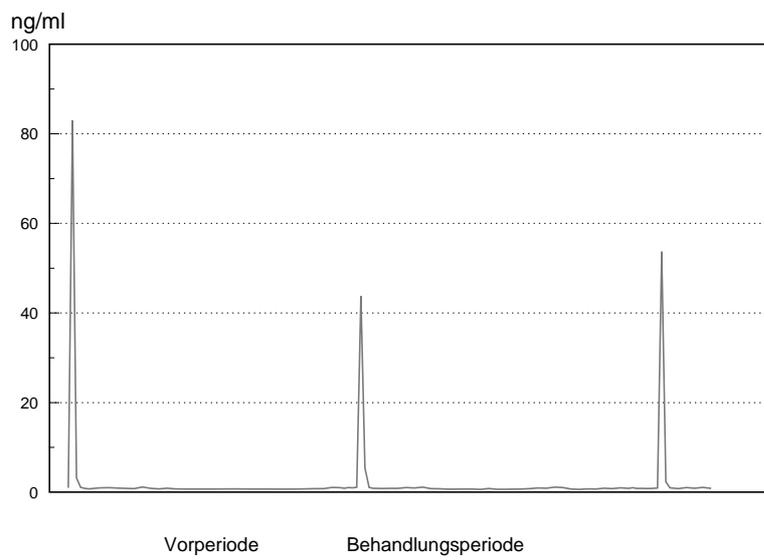


Abbildung 26. Hormonprofile Tier K-471 (Roquefortin C-Dosierung 0,0 mg/Tag ; A: FSH, B: LH, C: Progesteron).

A



B



C

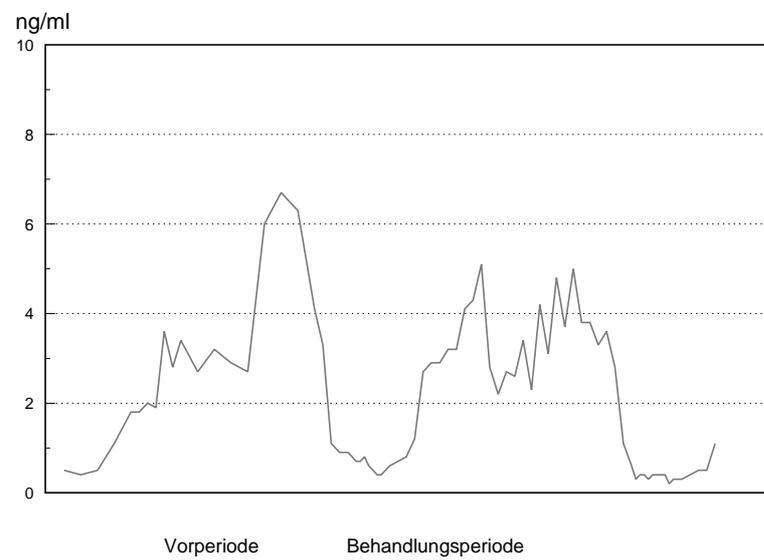


Abbildung 27. Hormonprofile Tier H-472 (Roquefortin C-Dosierung 50,0 mg/Tag ; A: FSH, B: LH, C: Progesteron).

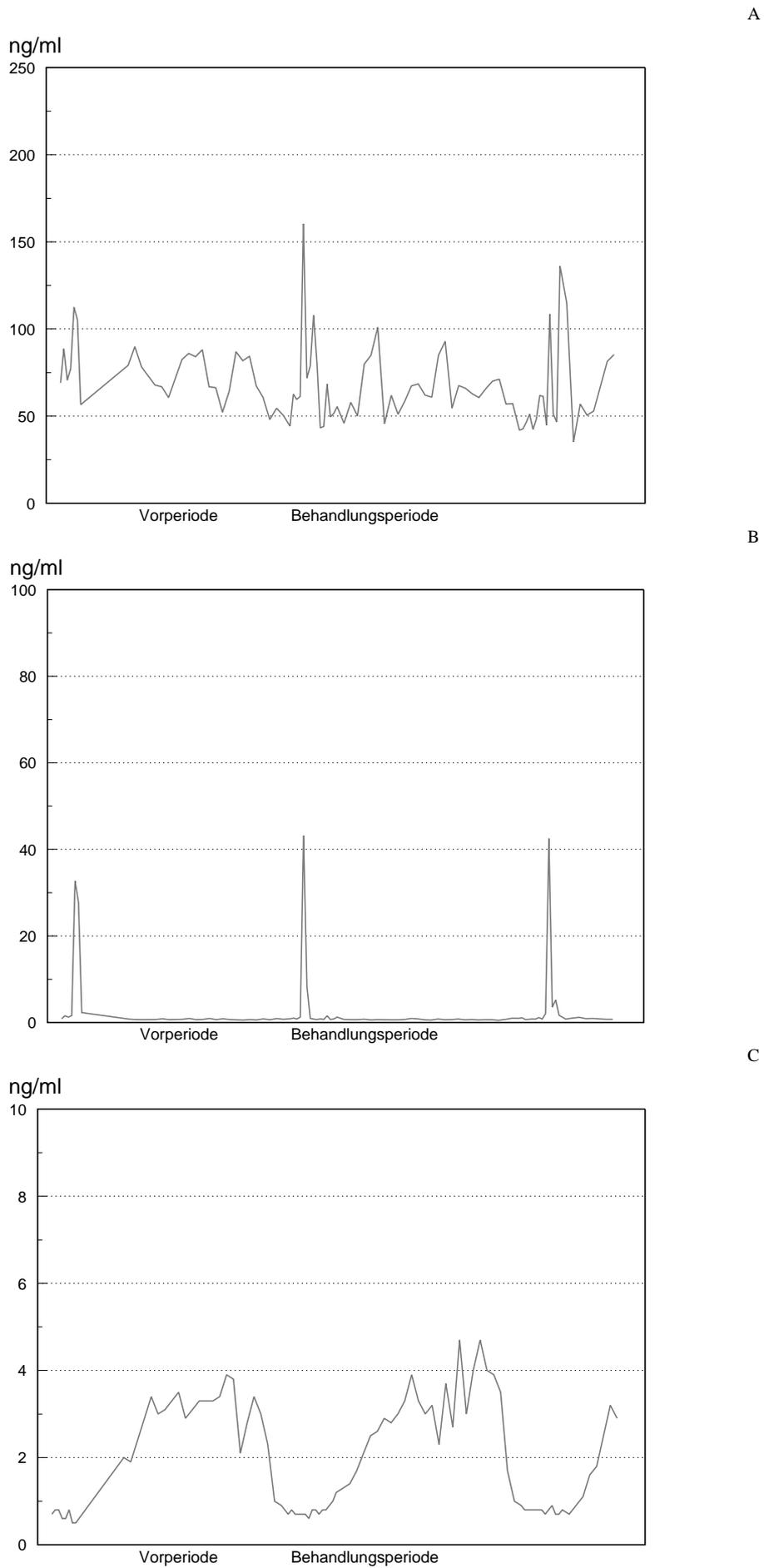
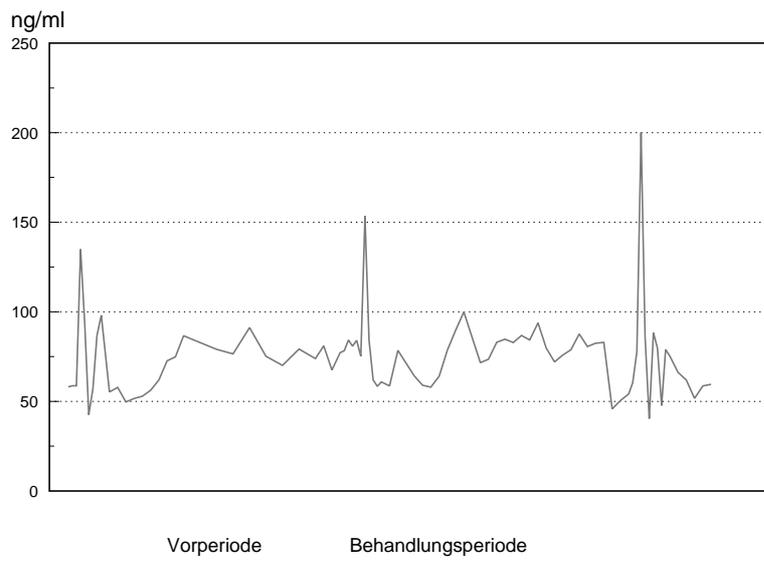
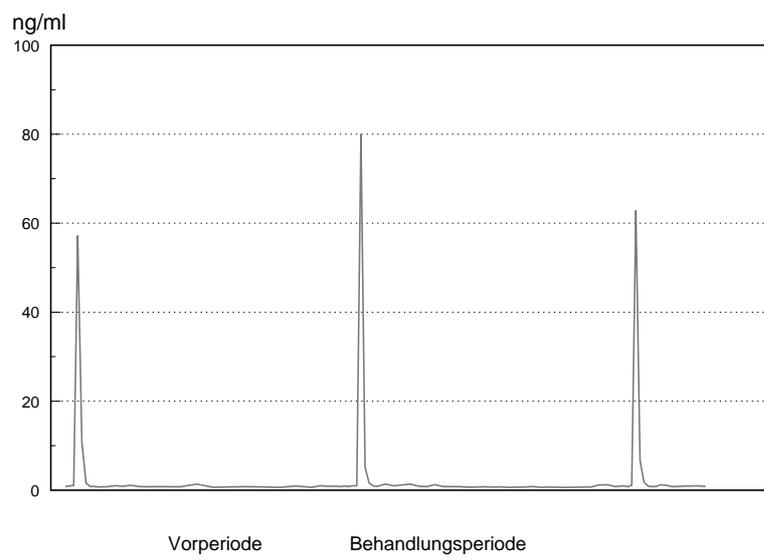


Abbildung 28. Hormonprofile Tier K-473 (Roquefortin C-Dosierung 0,0 mg/Tag ; A: FSH, B: LH, C: Progesteron).

A



B



C

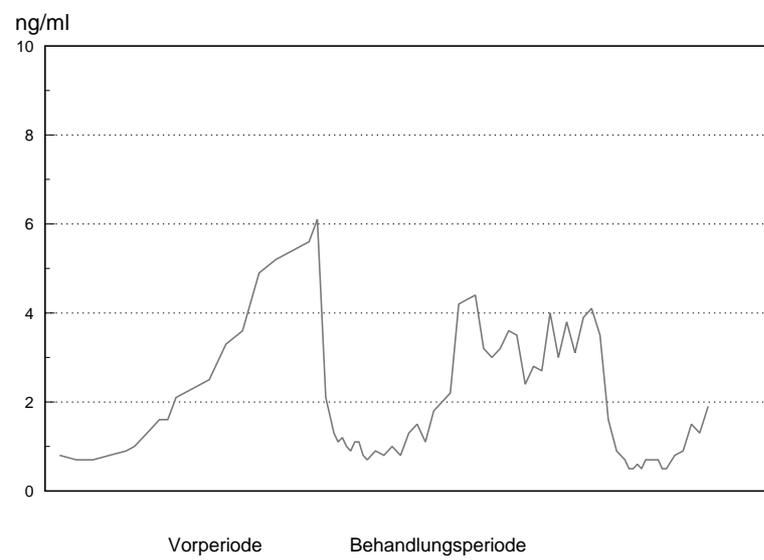


Abbildung 29. Hormonprofile Tier K-474 (Roquefortin C-Dosierung 0,0 mg/Tag ; A: FSH, B: LH, C: Progesteron).

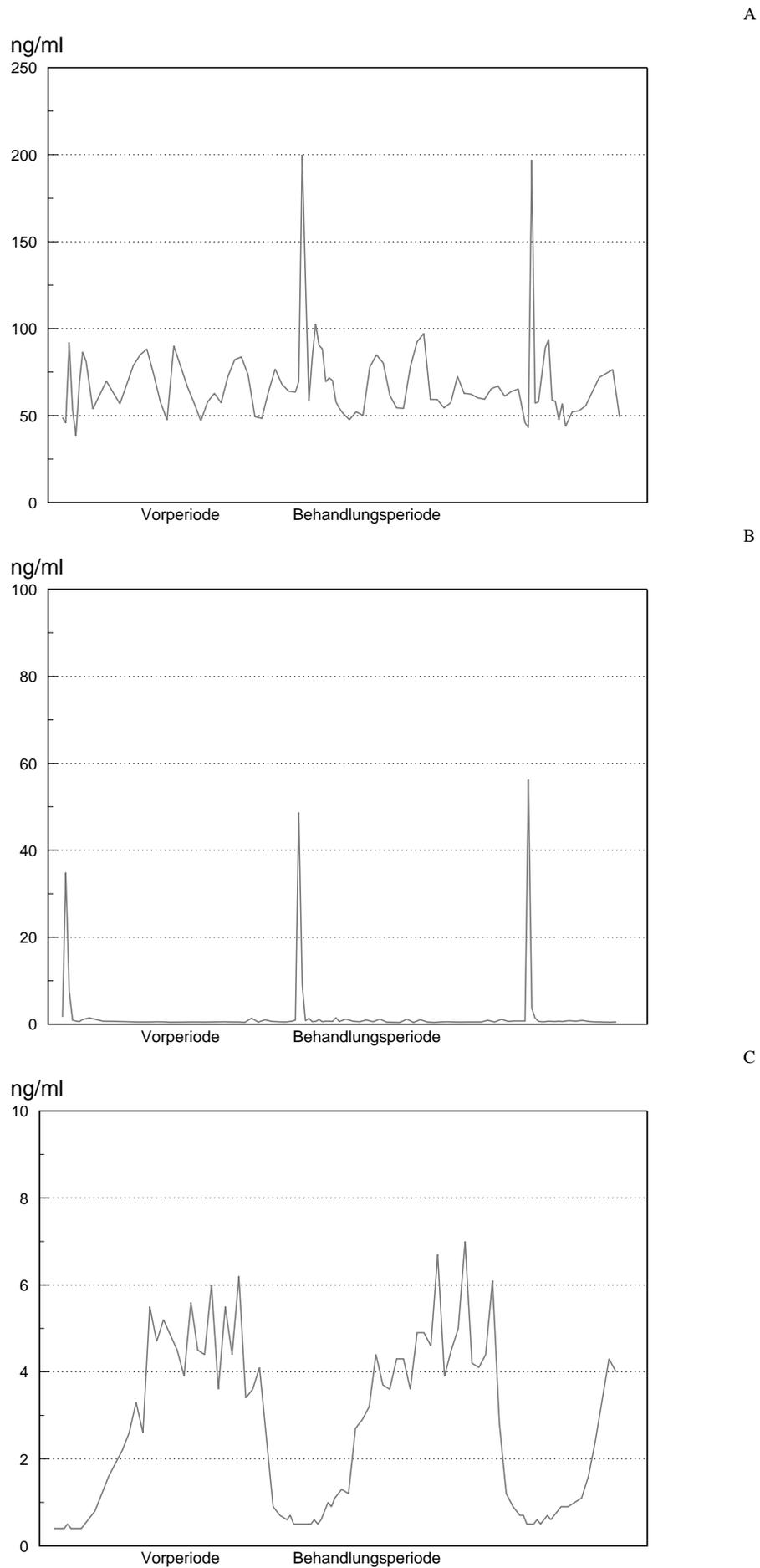
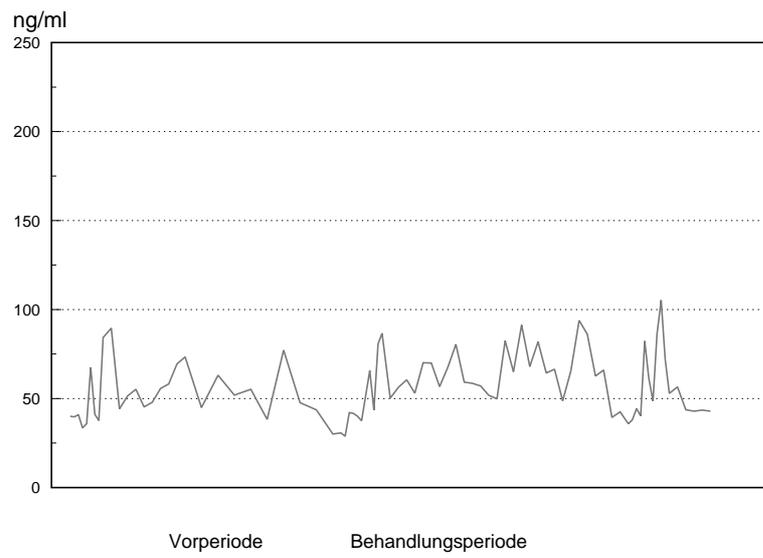
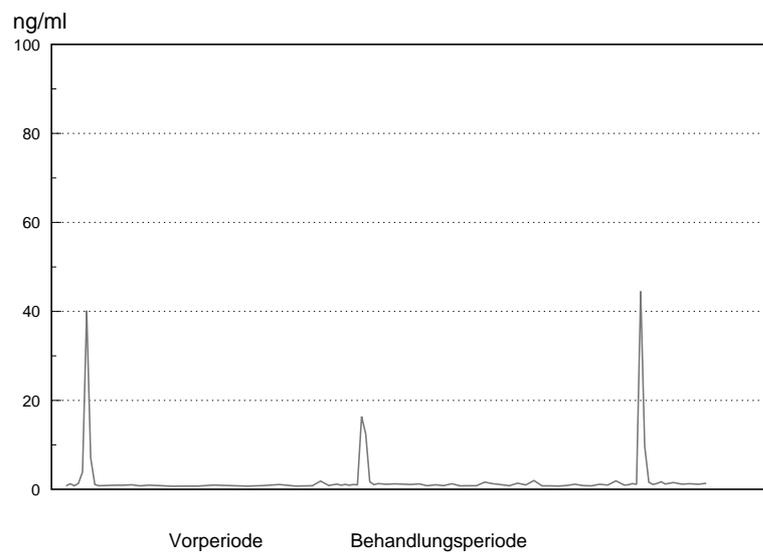


Abbildung 30. Hormonprofile Tier M-475 (Roquefortin C-Dosierung 10,0 mg/Tag ; A: FSH, B: LH, C: Progesteron).

A



B



C

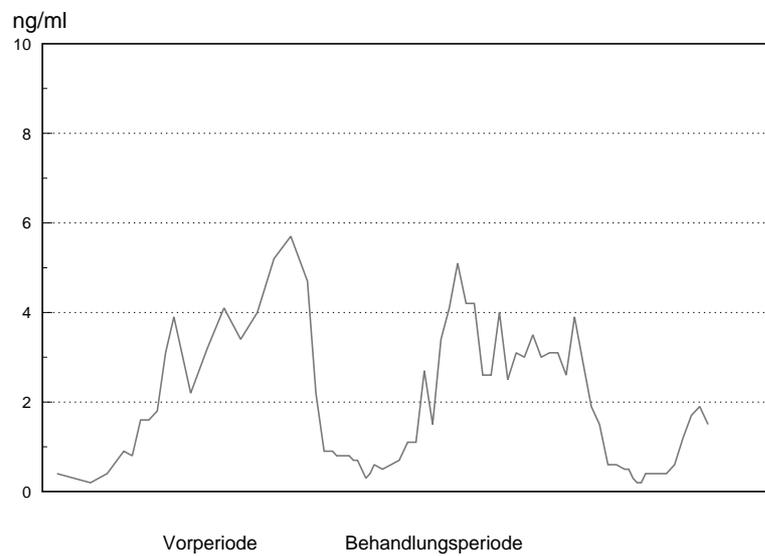


Abbildung 31. Hormonprofile Tier H-476 (Roquefortin C-Dosierung 50,0 mg/Tag ; A: FSH, B: LH, C: Progesteron).

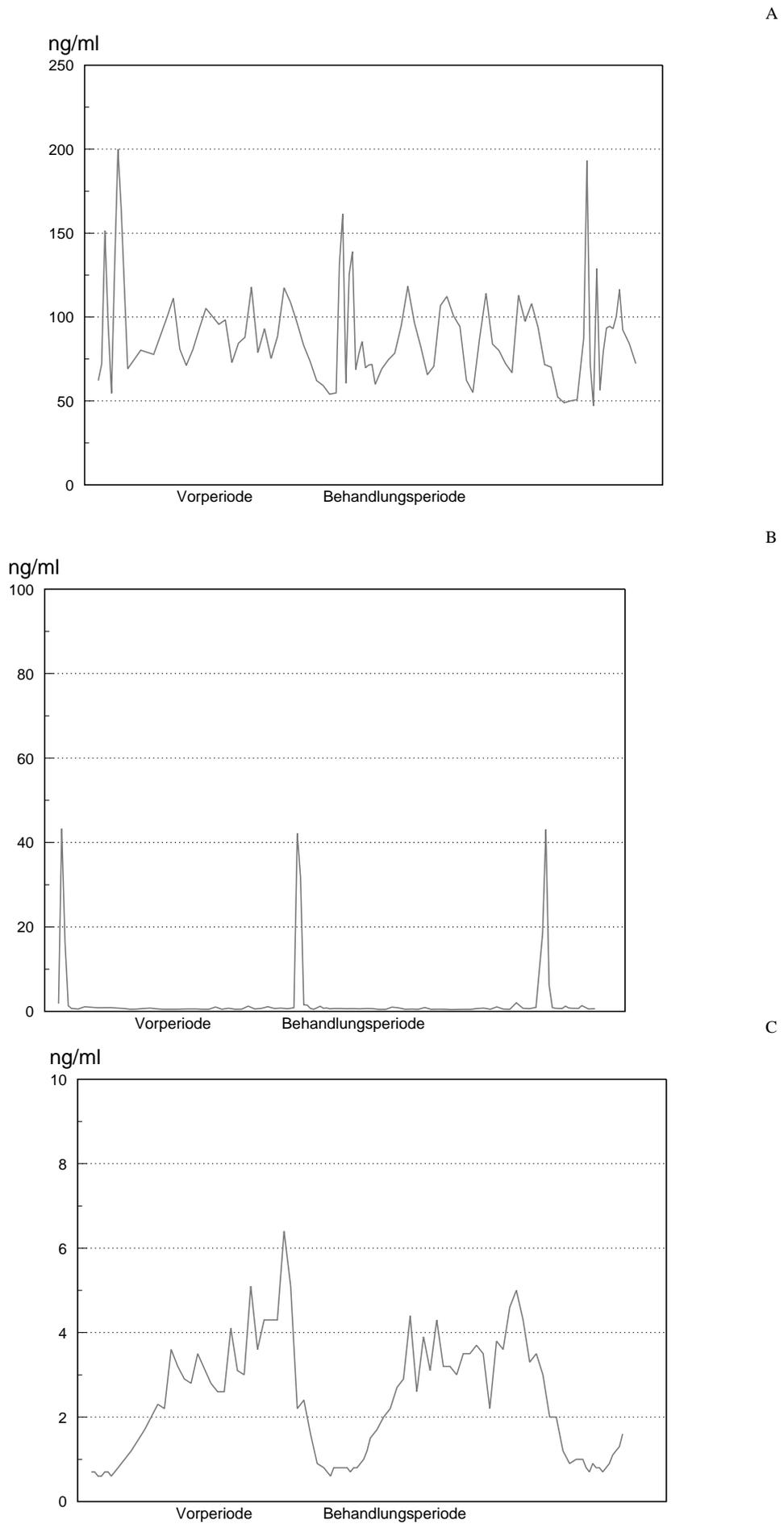


Abbildung 32. Hormonprofile Tier M-477 (Roquefortin C-Dosierung 10,0 mg/Tag ; A: FSH, B: LH, C: Progesteron).

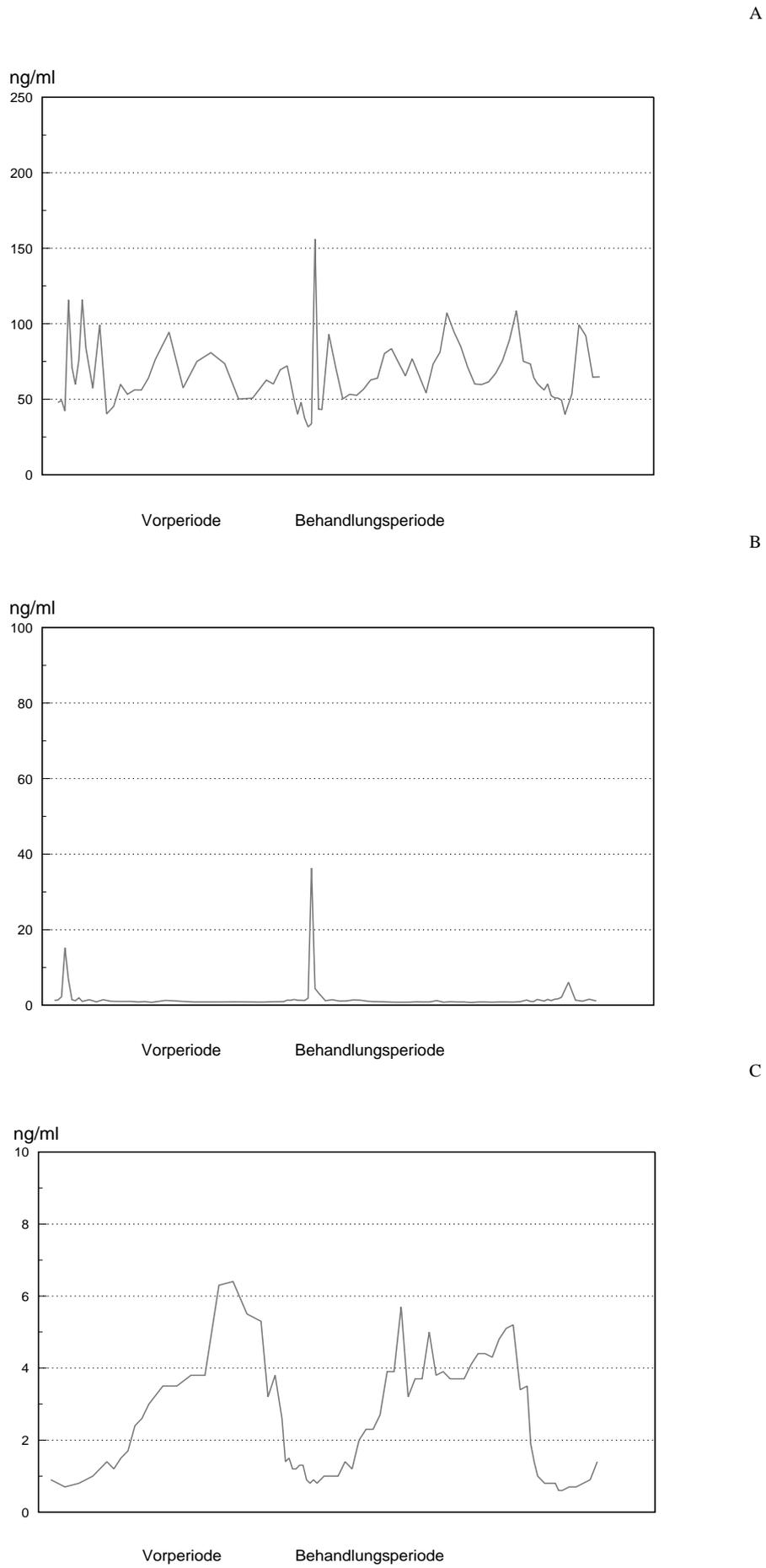


Abbildung 33. Hormonprofile Tier H-479 (Roquefortin C-Dosierung 50,0 mg/Tag ; A: FSH, B: LH, C: Progesteron).

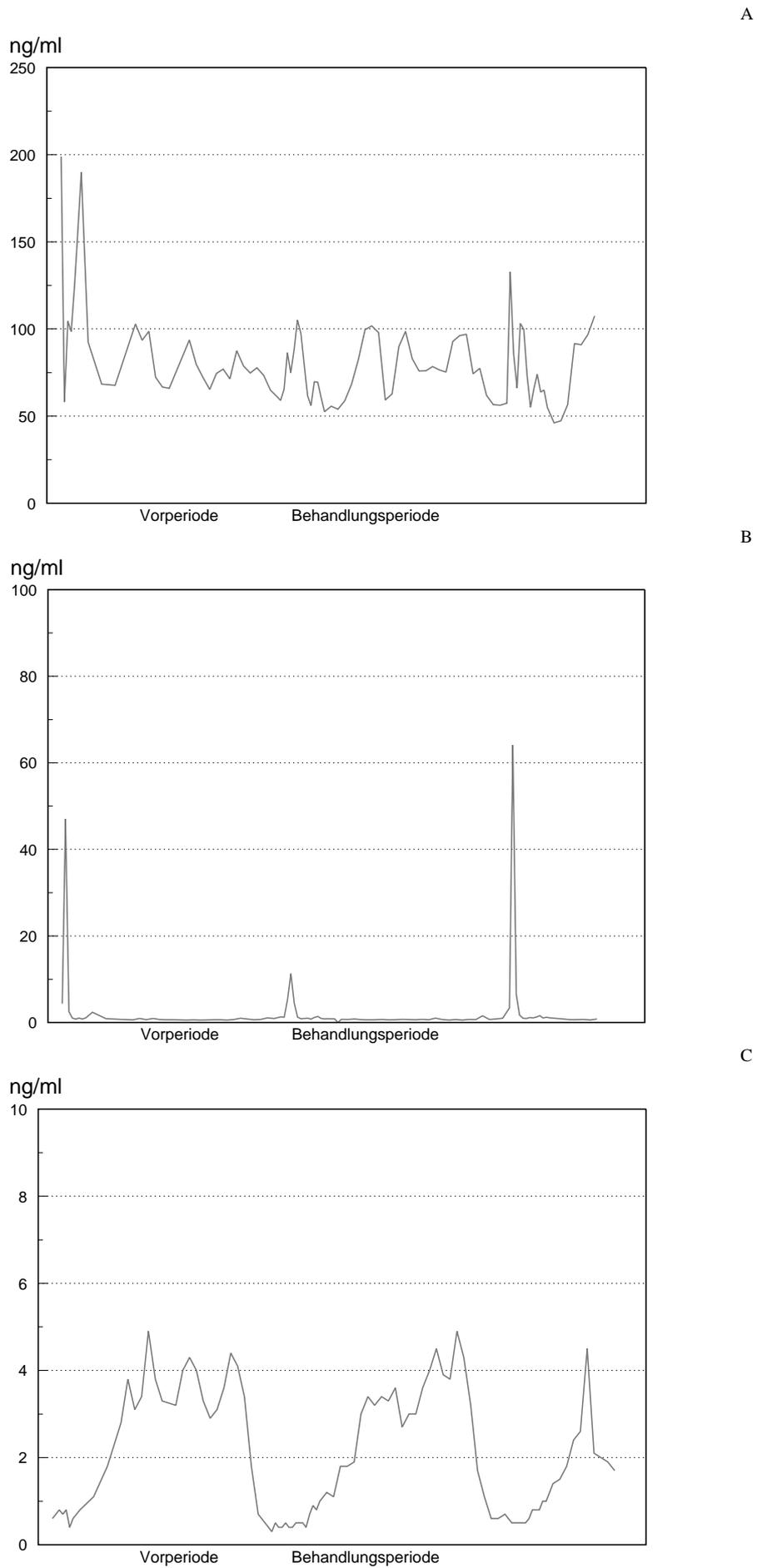


Abbildung 34. Hormonprofile Tier H-480 (Roquefortin C-Dosierung 50,0 mg/Tag ; A: FSH, B: LH, C: Progesteron).

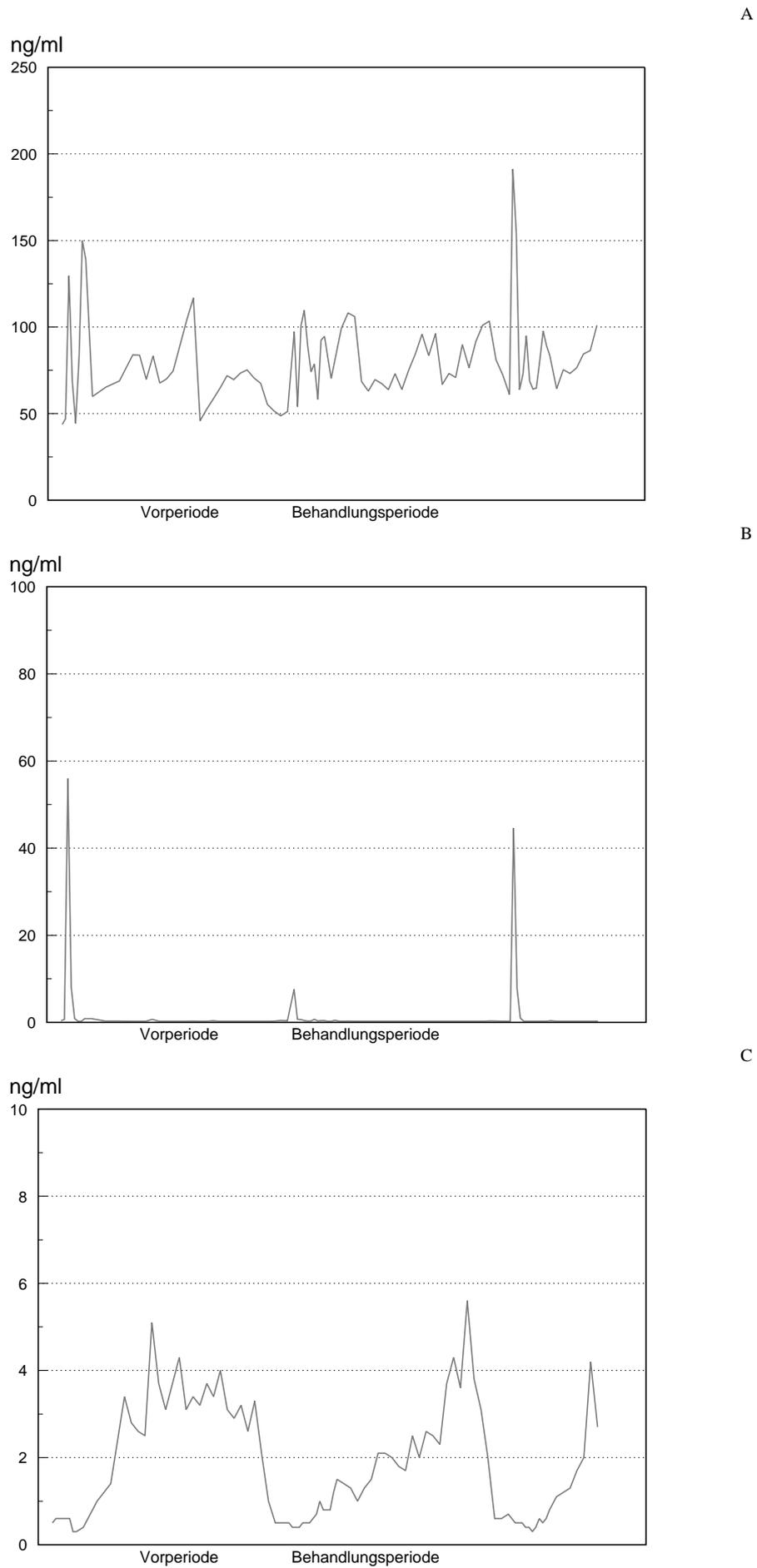


Abbildung 35. Hormonprofile Tier K-481 (Roquefortin C-Dosierung 0,0 mg/Tag ; A: FSH, B: LH, C: Progesteron).

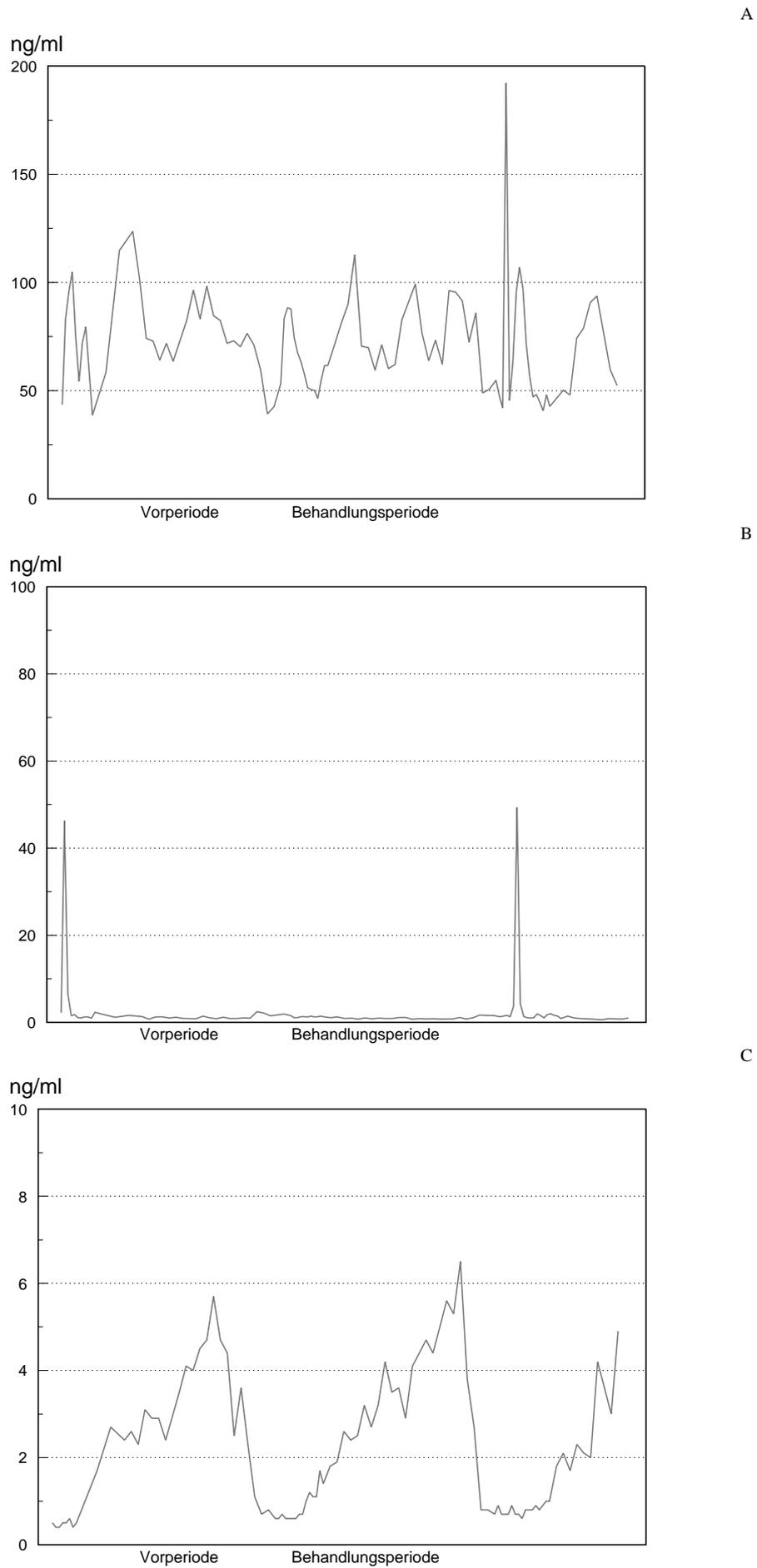


Abbildung 36. Hormonprofile Tier K-482 (Roquefortin C-Dosierung 0,0 mg/Tag ; A: FSH, B: LH, C: Progesteron).

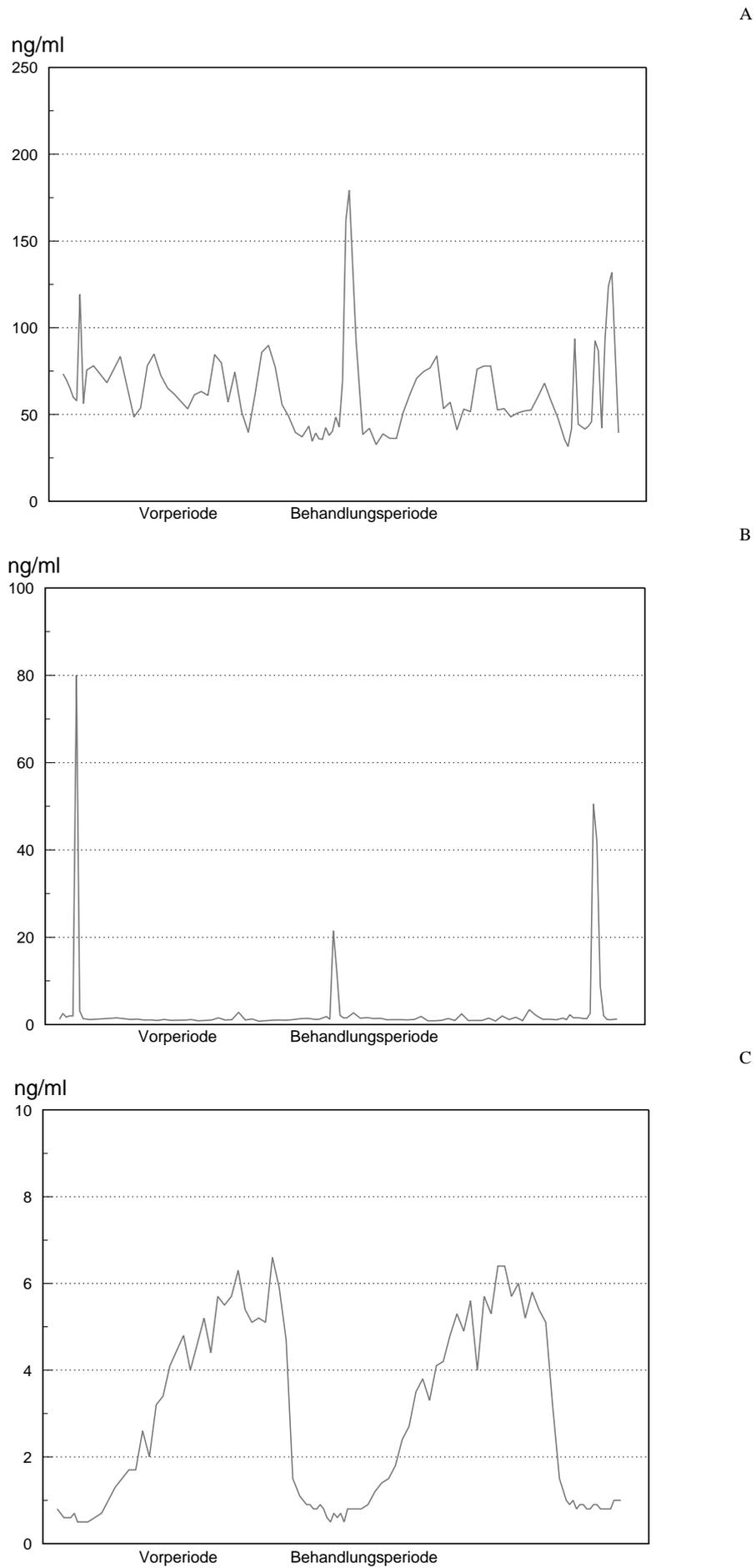
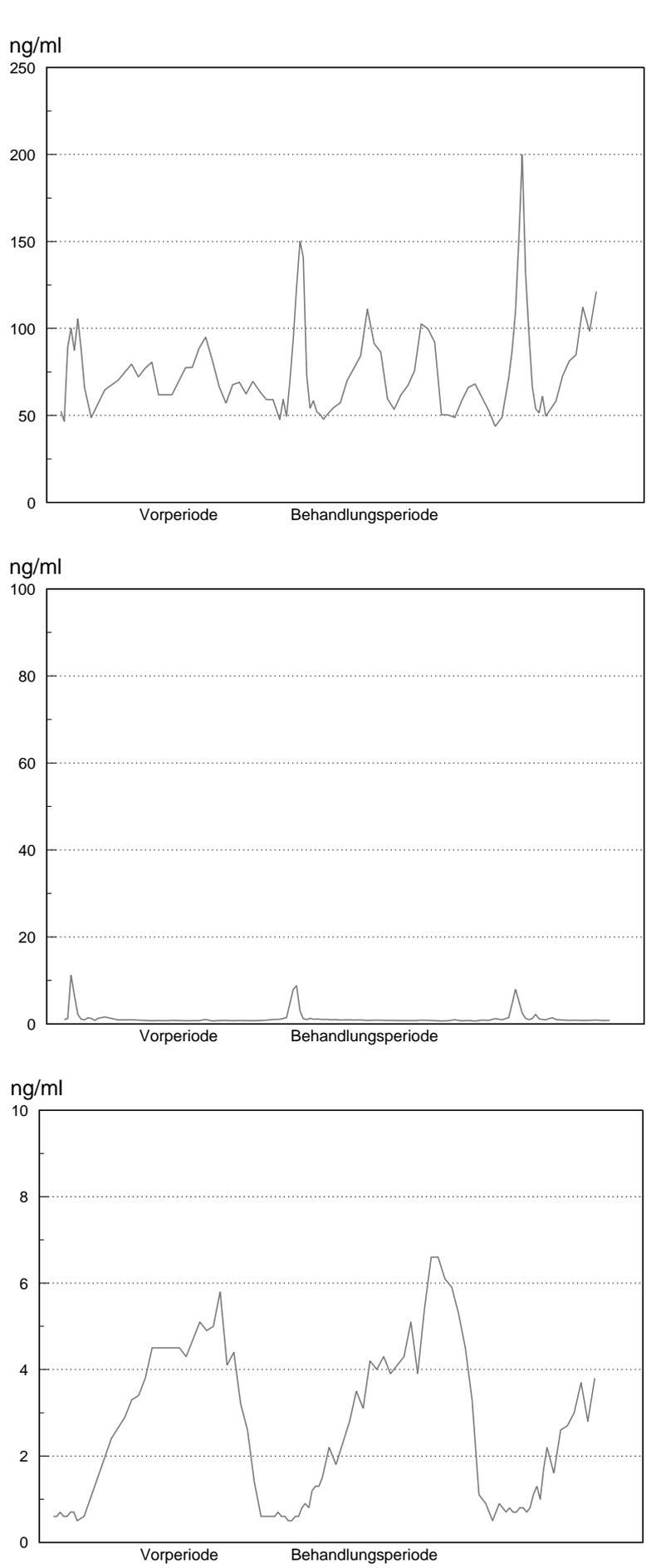


Abbildung 37. Hormonprofile Tier M-485(Roquefortin C-Dosierung 10,0 mg/Tag ; A: FSH, B: LH, C: Progesteron).



A

B

C

Abbildung 38. Hormonprofile Tier H-486 Roquefortin C-Dosierung -50,0 mg/Tag ; A: FSH, B: LH, C: Progesteron).

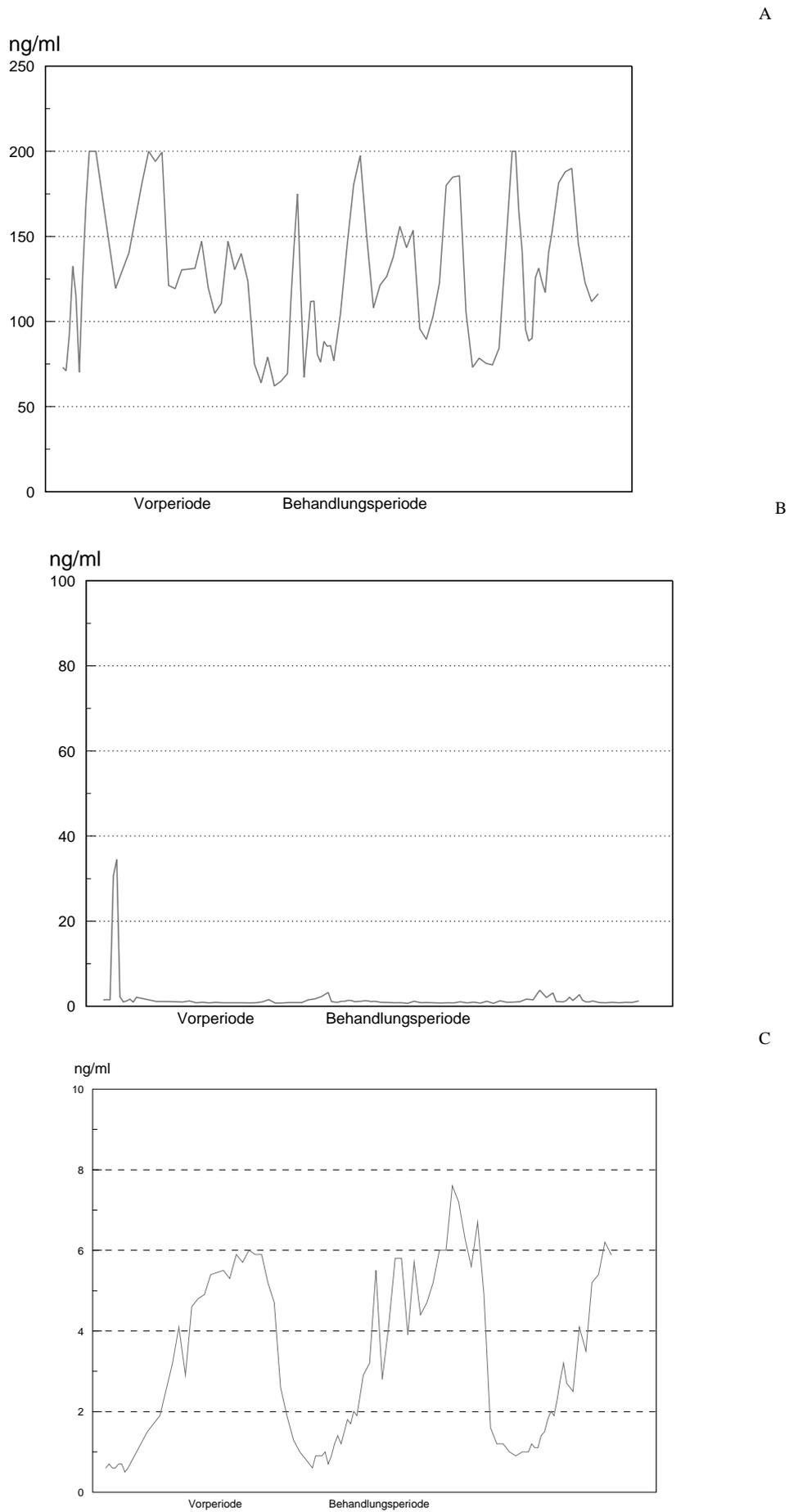


Abbildung 39. Hormonprofile Tier H-487 (Roquefortin C-Dosierung 50,0 mg/Tag ; A: FSH, B: LH, C: Progesteron).

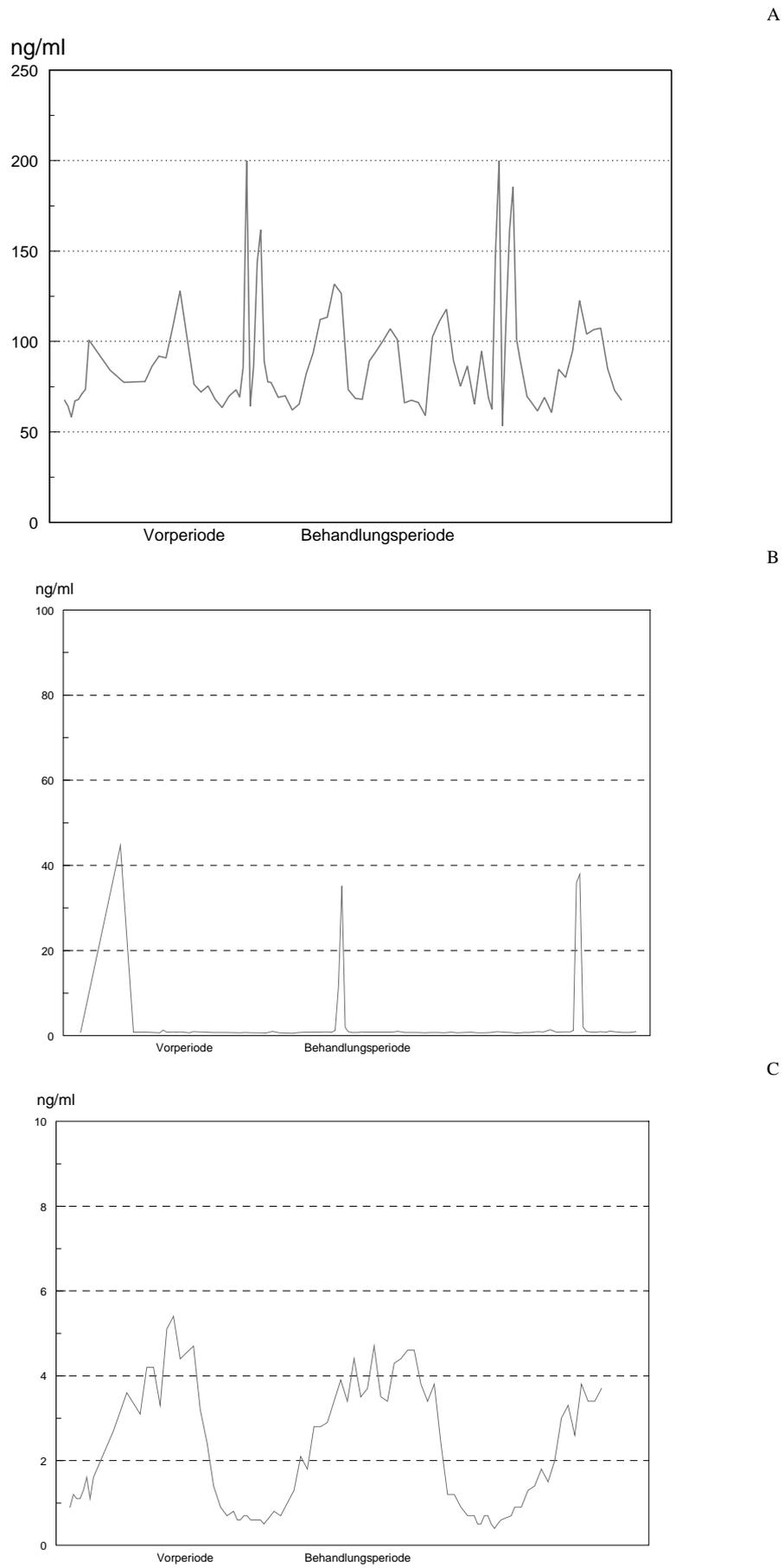
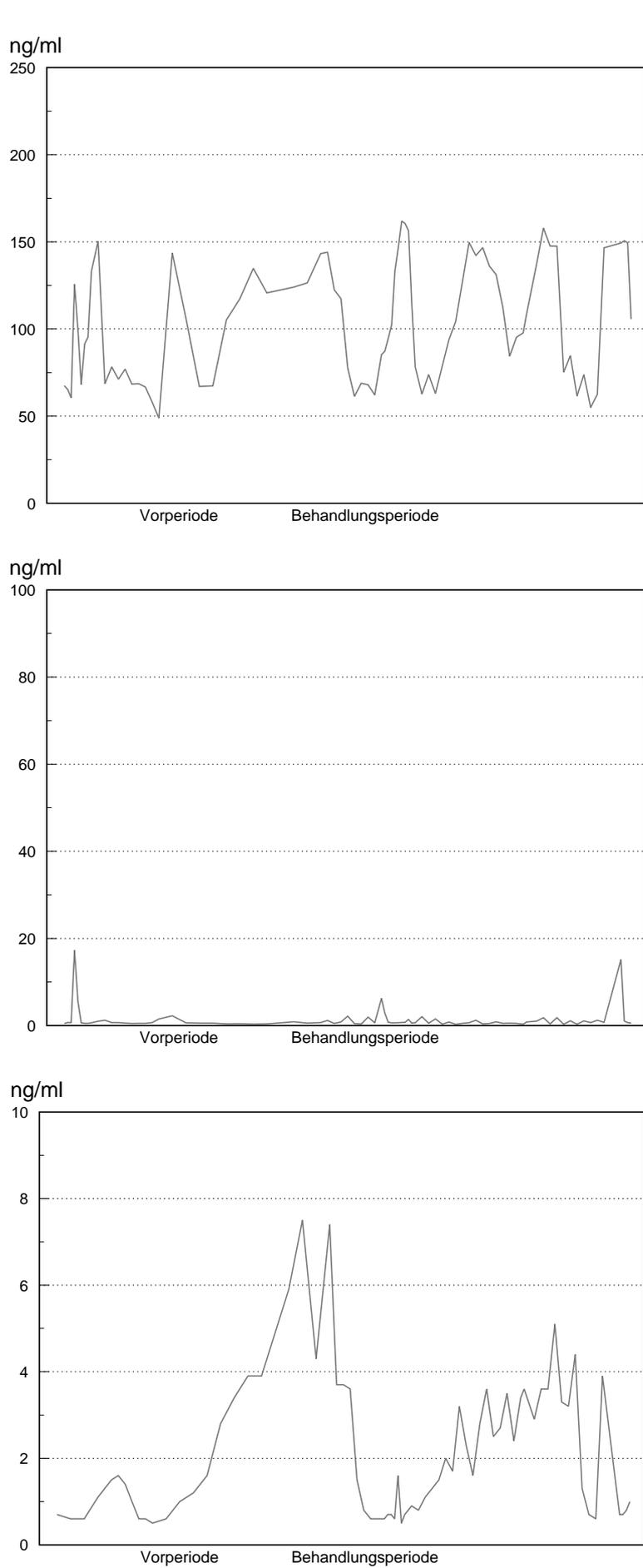


Abbildung 40. Hormonprofile Tier K-488 (Roquefortin C-Dosierung 0,0 mg/Tag ; A: FSH, B: LH, C: Progesteron).



A

B

C

Abbildung 41. Hormonprofile Tier M-489 (Roquefortin C-Dosierung 10,00 mg/Tag; A: FSH, B: LH, C: Progesteron).

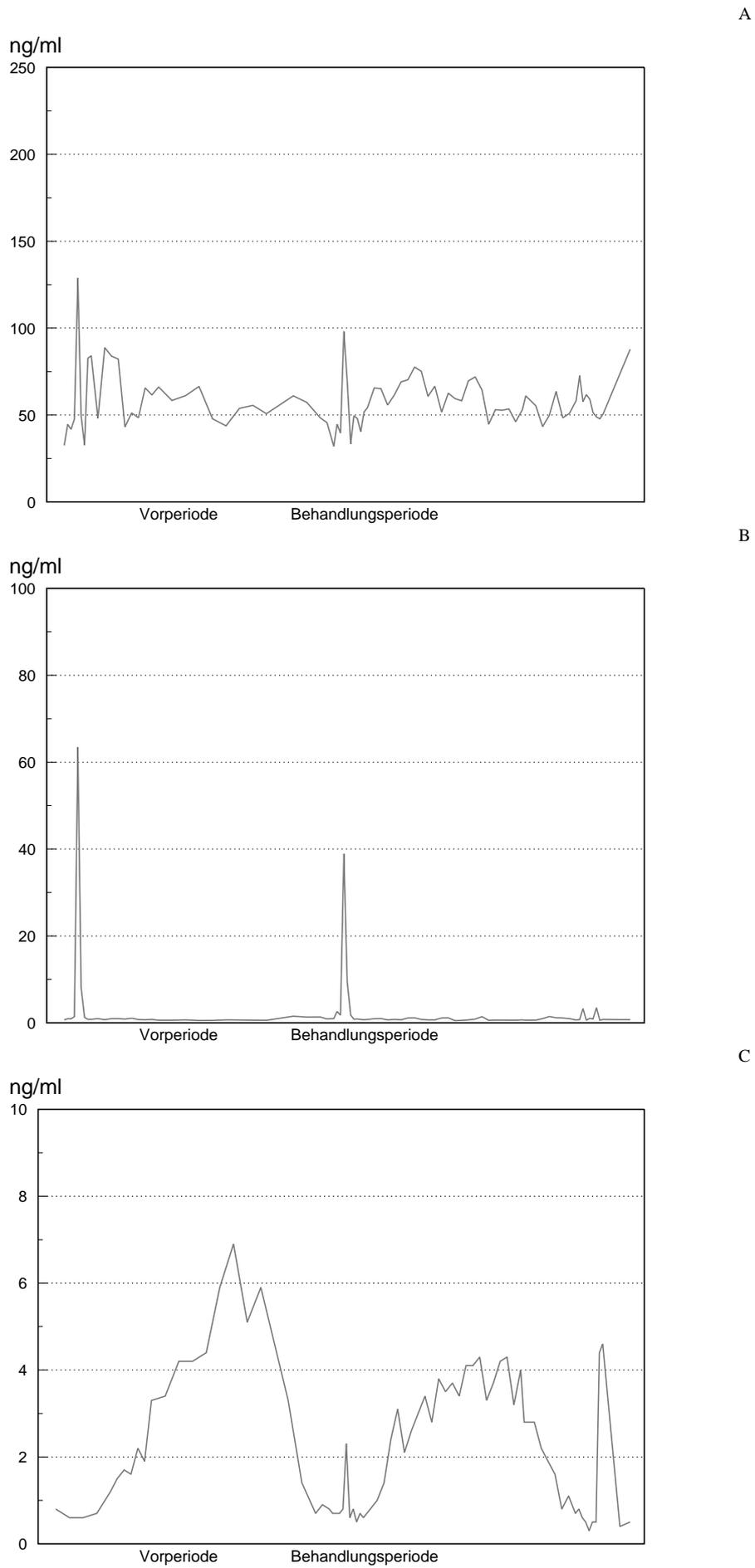


Abbildung 42. Hormonprofile Tier M- 490 (Roquefortin C-Dosierung 10,0 mg/Tag; A: FSH, B: LH, C: Progesteron).

# LEBENS LAUF

## **Persönliche Daten**

Georg Wilhelm Johannes Tüller  
Geb. 10.04.1965 in Hüls bei Krefeld  
Eltern Dr. Raimund Tüller, Melitta Tüller geb. Winzen  
Verheiratet, 3 Kinder

## **Schulbildung**

1971 – 1975 Besuch der katholischen Grundschule an der Burg in Hüls  
1975 – 1980 Gymnasium Horkesgath Krefeld  
1980 – 1985 Gymnasium Thomaeum in Kempen – Niederrhein  
1985 Abitur

## **Berufsausbildung**

1983 – 1986 Nebentätigkeit bei der Landwirtschaftlichen Lehr- und Versuchsanstalt  
Großhüttenhof in Krefeld

1986 – 1987 Grundwehrdienst LwAusbRgt2 (Budel, NL); 3./Flugabwehrraketenbataillon 24  
(Oldenburg)

1989 – 1993 Studium der Agrarwissenschaften, Fachrichtung Tierproduktion, in Freising-  
Weihenstephan

1994 – 1997 Wissenschaftlicher Mitarbeiter am Lehrstuhl für Tierhygiene der Technischen  
Universität München – Weihenstephan

Seit 1997 Produktmanager und Entwicklungsleiter für produktionstechnische Software im  
Bereich Tier bei Deutschlands führendem Landwirtschaftlichen Softwarehaus.