

UNIVERSITEIT GENT

FACULTEIT DIERGENEESKUNDE

Academiejaar 2014 - 2015

Serum als matrix voor de diagnose van *Fusarium* mycotoxicosis bij varkens

door

Karen VAN NESTE

Promotoren: Drs. Tommy Van Limbergen
Prof. Dr. Dominiek Maes
Prof. Dr. Siska Croubels

Onderzoek in het kader
van de Masterproef

© 2015 Karen Van Neste

Universiteit Gent, haar werknemers of studenten bieden geen enkele garantie met betrekking tot de juistheid of volledigheid van de gegevens vervat in deze masterproef, noch dat de inhoud van deze masterproef geen inbreuk uitmaakt op of aanleiding kan geven tot inbreuken op de rechten van derden.

Universiteit Gent, haar werknemers of studenten aanvaarden geen aansprakelijkheid of verantwoordelijkheid voor enig gebruik dat door iemand anders wordt gemaakt van de inhoud aan de masterproef, noch voor enig vertrouwen dat wordt gesteld in een advies of informatie vervat in de masterproef.

UNIVERSITEIT GENT

FACULTEIT DIERGENEESKUNDE

Academiejaar 2014 - 2015

Serum als matrix voor de diagnose van *Fusarium* mycotoxicosis bij varkens

door

Karen VAN NESTE

Promotoren: Drs. Tommy Van Limbergen
Prof. Dr. Dominiek Maes
Prof. Dr. Siska Croubels

Onderzoek in het kader
van de Masterproef

© 2015 Karen Van Neste

VOORWOORD

Graag zou ik een aantal mensen willen bedanken die mij hebben geholpen bij het verwezenlijken van dit onderzoek. Eerst en vooral gaat mijn dank uit naar Dr. Mathias Devreese en Prof. Dr. Siska Croubels voor de goede begeleiding in het destilleren van nuttige informatie en in het schrijven van deze masterproef in een goed gestructureerde tekst. Daarnaast wil ik ook Drs. Tommy van Limbergen en Drs. Annelies Michiels bedanken wat betreft de praktische kant van dit onderzoek. Het was altijd een leuk samenwerken tijdens de voorbereiding, de bedrijfsbezoeken en het verwerken van alle gegevens. Ook gaat mijn dank uit naar Prof. Dr. Dominiek Maes voor alle nuttige adviezen die mij verder hebben geholpen.

Voor het verwezenlijken van dit project wil ik zeker en vast ook de deelnemende varkenshouders bedanken. Door de vragenlijsten correct en volledig in te vullen en vaak ook mee te helpen aan de staalnamen verliepen de bedrijfsbezoeken telkens vlot en aangenaam.

Als laatst wens ik ook nog mijn ouders te bedanken voor hun steun gedurende deze drukke periode. En uiteraard wil ik ook mijn vriend Simon erg bedanken. Niet enkel voor zijn onvoorwaardelijke steun en zijn kostbare tijd die hij heeft gestoken in het meermaals nalezen van dit werk, maar ook voor zijn bijdrage in het aanbrengen van tal van controlebedrijven wat mij ongetwijfeld geholpen heeft in het verwezenlijken van een geslaagd onderzoek.

INHOUDSOPGAVE

Samenvatting	1
I. Literatuurstudie	2
1. Inleiding: Wat zijn mycotoxinen?	2
2. Bronnen en risicofactoren	3
3. Maximaal toegelaten concentraties in varkensvoeder	5
4. <i>Fusarium</i> mycotoxinen.....	7
4.1. Deoxynivalenol (DON)	7
4.2. T-2 toxine (T-2).....	9
4.3. Zearalenone (ZEN)	11
4.4. Overdracht van DON, T-2 en ZEN van moederdier naar nakomelingen	14
5. Predisponerende factoren.....	15
6. Behandeling van mycotoxicosis	15
7. Analyse van mycotoxinen	16
II. Eigen Onderzoek	18
1. Introductie	18
Mycotoxinen in de differentiaaldiagnose van staartnecrose bij neonatale biggen.....	19
2. Materialen en methoden	21
2.1. Bedrijven, dieren en staalnamen	21
2.2. Mycotoxineanalyse van voeder	26
2.3. Mycotoxineanalyse van serum	28
2.4. Wateranalyse.....	29
2.5. Berekeningen en statistiek	29
3. Resultaten.....	30
3.1. Gegevens omtrent het management en de productieresultaten	30
3.2. Mycotoxinencontaminatie in het voeder	33
3.3. Mycotoxinen in het zeugenserum	36
3.4. Mycotoxinen in het biggenserum	39
3.5. Wateranalyse.....	41
4. Bespreking	45
Referentielijst	47
Bijlagen	51
Bijlage 1: Nieuwsbrief DGZ	51
Bijlage 2: Vragenlijst voor de varkenshouder.	52
Bijlage 3: Invulformulier van bemonsterde zeugen en biggen.....	57
Bijlage 4: Overzicht van de detectielimieten, kwantificatielimieten en MRM transities van de onderzochte mycotoxinen bij de analyse op het voeder m.b.v. LC-MS/MS.	60
Bijlage 5: Overzicht van de detectielimieten, kwantificatielimieten en MRM transities van de onderzochte mycotoxinen bij de analyse op het serum m.b.v. LC-MS/MS.	61
Bijlage 6: Resultaten van de mycotoxinenanalyse op het zeugen- en biggenserum.....	62

Samenvatting

Een frequente contaminatie van veevoeders met *Fusarium* toxinen waaronder deoxynivalenol (DON), T-2 toxine (T-2) en zearalenone (ZEN) is algemeen geweten. Echter is de exacte impact in de varkenssector een vaag gegeven. Allerlei moeilijk verklaarbare symptomen met een gebrekkige wetenschappelijke kennis zoals neonatale staartnecrose worden daarom al snel toegekend aan de effecten van mycotoxinen. Een diagnose stellen op basis van voederanalyse is niet eenvoudig omdat negatieve resultaten niet altijd sluitend zijn wegens de focale groei van deze toxine-producerende schimmels en het feit dat het dus niet vanzelfsprekend is om de toxinen aanwezig in de batch ook in de staalname te betrekken. Gelukkig zijn de kennis en de literatuur omtrent de diagnose van mycotoxicosis de laatste jaren volop in uitbreiding waarbij niet enkel voeders, maar ook dierlijke matrices zoals serum aangewend kunnen worden als mogelijke diagnostische tools. Terwijl voeder geen indicatie van de individuele blootstelling geeft, kan een analyse op serum hier wel een mogelijk antwoord op bieden. Daarom werden in deze studie zowel mycotoxinegehalten in het voeder als concentraties in het serum van zeugen en biggen bepaald m.b.v. LC-MS/MS en vergeleken tussen 10 probleembedrijven (bedrijven met staartnecrose bij neonatale biggen) en 10 controlebedrijven om zo een mogelijk verband te vinden tussen neonatale staartnecrose en bepaalde mycotoxinen.

Deze studie heeft aangetoond dat de concentraties aan DON in het zeugenvoeder significant hoger liggen bij de probleembedrijven met gemiddeld $482,27 \pm 201 \mu\text{g.kg}^{-1}$ t.o.v. controlebedrijven met gemiddeld $257,40 \pm 85 \mu\text{g.kg}^{-1}$. Ook is er een significant verschil tussen de concentraties aan DON in het serum van de zeugen tussen deze bedrijven. De gemiddelde concentratie in het zeugenserum bij de probleembedrijven bedraagt $0,967 \pm 0,763 \text{ ng.mL}^{-1}$ terwijl deze op de controlebedrijven slechts $0,504 \pm 0,331 \text{ ng.mL}^{-1}$ bedraagt. Tussen de DON gehalten in het voeder en de concentraties in het zeugenserum werd een positieve correlatie aangetoond waarbij de correlatiecoëfficiënt gelijk was aan 0.703 ($p < 0,01$). Verder werd er ook een verschil waargenomen tussen de concentraties aan DON in het biggenserum tussen de probleem- en controlebedrijven, maar dit verschil kon niet significant worden vastgelegd. Van de andere gedetecteerde mycotoxinen waren er te veel lage concentraties waardoor geen verdere correlaties konden aangetoond worden. Naast de reeds genoemde bevindingen, werd er ook een significant verschil vastgesteld tussen de probleem- en controlebedrijven op basis van het productiegetal.

Sleutelwoorden: DON, LC-MS/MS, mycotoxinen, serum, staartnecrose, varkens

I. Literatuurstudie

1. Inleiding: Wat zijn mycotoxinen?

Zoals de naam reeds doet vermoeden, zijn mycotoxinen giftige stoffen gevormd door schimmels. Het is een combinatie van het Griekse woord voor paddenstoel 'mykes' en het Latijnse woord 'toxicum' dat vertaald kan worden als vergif. Meer bepaald zijn mycotoxinen secundaire metaboliëten geproduceerd door bepaalde schimmels zoals *Aspergillus spp.*, *Penicillium spp.* en *Fusarium spp.* en kunnen ze uiteenlopende effecten teweegbrengen. Mycotoxine-intoxicaties kunnen velerlei effecten hebben op de diergezondheid, variërend van acute tot subklinische effecten. Sommige van deze toxinen kunnen mutagene, carcinogene of zelfs teratogene effecten zoals splayleg veroorzaken, anderen geven meer immunosuppressieve of oestrogene verschijnselen (IARC, 1993; JECFA, 1998; Mishra en Chitragada, 2003). De effecten, die ook sterk beïnvloed worden door velerlei factoren waaronder het type toxine en de duur van de blootstelling, hebben een grote invloed op de prestaties van de dieren. De belangrijkste parameters die betrekking hebben op de prestaties van de dieren en dus op de rendabiliteit in de varkenshouderij zijn het productiegetal (aantal gespeende biggen per zeug per jaar) en de voederkosten. In verband met de voederkosten zijn het de voederopname en de voederconversie die doorslaggevend zijn. Het zijn dus deze parameters die ongunstig worden beïnvloed door tal van factoren, waaronder mycotoxicosis (Rodrigues en Schuh, 2013). Omwille van de mogelijke toxiciteit bestaan er in de Europese Unie richtlijnen met de toegelaten concentraties voor de meest toxische mycotoxinen in veevoeders voor verschillende diersoorten waaronder varkens. Mycotoxinen kunnen enerzijds gevormd worden door zogenaamde veldschimmels en anderzijds door zogenaamde bewaarschimmels. De veldschimmels, waaronder de *Fusarium ssp.*, kunnen gewassen infecteren vóór het oogsten en *Aspergillus spp.* en *Penicillium ssp.*, behorend tot de bewaarschimmels zijn voornamelijk actief na de oogst en gedurende de opslag. De schimmels houden van een vochtig, zuurstofrijk milieu met hoge concentraties aan koolhydraten en een lage zuurtegraad. Kleine variaties in deze factoren bepalen grotendeels het soort schimmel en de mate van mycotoxineproductie. In tabel 1 zijn een aantal schimmels weergegeven met de bijhorende gunstige condities voor de schimmelgroei en mycotoxinesynthese.

Tabel 1

Gunstige condities voor schimmelgroei en synthese van mycotoxinen met invloed op de vruchtbaarheid van varkens (naar Osweiler, 2006).

Schimmel (bron)	Gevoelige graansoort	Optimale temperatuur (°C)	Mycotoxine	Omgevingsfactoren
<i>Fusarium roseum</i>	Maïs, Tarwe Gerst	7-21	Deoxynivalenol	Afwisselend warmte en koude tijdens de groei
<i>Fusarium sporotrichioides</i>	Maïs, Gerst Milo, Tarwe	8-15	T-2 toxine	Afwisselend warmte en koude, overwinterde gewassen
<i>Fusarium roseum</i>	Maïs, Tarwe Gerst	7-15	Zearalenone	Afwisselende hoge en lage temperaturen tijdens de maturatie

Eenmaal schimmels aanwezig zijn in het voeder, groeien deze organismen lokaal uit in 'hot spots' wat het opsporen in het voeder sterk kan bemoeilijken (Veldman, 2003a, Seeling et al., 2006; Gajecki, 2010). Tot op heden zijn er meer dan 400 mycotoxinen geïdentificeerd, maar slechts een paar hebben een uitgesproken toxiciteit. Varkens worden beschouwd als de meest gevoelige diersoort voor vele *Fusarium* mycotoxinen. Dit verklaart waarom deze thesis vooral is gefocust op deze toxinen (Devreese et al., 2013).

2. Bronnen en risicofactoren

In Tabel 2 wordt een overzicht gegeven van de meest voorkomende mycotoxinen bij varkens. Het zijn de *Fusarium* schimmels die o.a. deoxynivalenol (DON), zearalenone (ZEN) en T-2 toxine (T-2) produceren die in het kader van dit onderzoek van groot belang zijn. Zowel de schimmels als de toxinen komen voor in granen, gras, hooi, kuilvoer, stro en in hun bijproducten en in de aldus bereide brijvoerders. Door contaminatie van deze grondstoffen sluipen ze als het ware onopgemerkt via het voeder het bedrijf binnen (Rodrigues en Schuh, 2013).

Tabel 2

De meest belangrijke mycotoxinen met hun producerende schimmels (Rodrigues en Schuh, 2013).

Hoofdklasse van mycotoxine- producerende schimmel	Species	Mycotoxine	
<i>Aspergillus</i>	<i>A. flavus</i>	Aflatoxines B1, B2, G1, G2 (AFB1; AFB2, AFG1, AFG2)	
	<i>A. parasiticus</i>		
	<i>A. nomius</i>		
	<i>A. pseudotamarii</i>		
	<i>A. ochraceus</i>		Ochratoxine A (OTA)
<i>Claviceps</i>	<i>C. purpurea</i>	Ergot alkaloiden waaronder Clavines (Agroclavine) Lyserginezuur Lyserginezuur amiden (Ergine) Ergopeptiden: Ergotamine en Ergovaline	
	<i>C. fusiformis</i>		
	<i>C. paspali</i>		
	<i>C. africana</i>		
<i>Fusarium</i>	<i>F. verticillioides</i> (syn. <i>F. moniliforme</i>)	Fumonisine B1, B2, B3 (FB1, FB2, FB3)	
	<i>F. proliferatum</i>		
	<i>F. framinearum</i>		<u>Type A Trichothecen</u>
	<i>F. avenaceum</i>	T-2 toxine (T-2)	
	<i>F. culmorum</i>		
	<i>F. poae</i>	<u>Type B Trichothecen</u>	
	<i>F. equiseti</i>		Nivalenol
	<i>F. crookwellense</i>		Deoxynivalenol (DON)
	<i>F. acuminatum</i>		
	<i>F. sambucinum</i>	Zearalenone (ZEN)	
	<i>F. sporotrichioides</i>		
	<i>F. graminearum</i>		
	<i>F. culmorum</i>		
	<i>F. sporotrichioides</i>		
<i>Penicillium</i>	<i>P. verrucosum</i>	Ochratoxine A (OTA)	
	<i>P. viridicatum</i>		

Het probleem met mycotoxinen is dat zij de dag van vandaag in heel veel voeders voorkomen zonder dat dit steeds gepaard gaat met klinische symptomen. Er worden veel gecontamineerde granen of graanbijproducten verwerkt in varkensmengvoer en ondanks de bewerkings- en verwerkingsprocessen is er geen garantie dat ze mycotoxinevrij zijn. Mycotoxinen zijn behoorlijk stabiel, wat wil zeggen dat de schimmels dan wel numeriek mogen afnemen tijdens deze processen, het gehalte aan de mycotoxinen zelf ongewijzigd kan blijven (Mul et al., 2006). Zo kan DON in ongeveer 50 % van de Europese voeders terug gevonden worden aan concentraties tussen 1 en 500 $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ volgens een studie uitgevoerd door Streit et al. (2012). Daarnaast waren 75 tot 100 % van de onderzochte stalen gecontamineerd met één of meerdere mycotoxinen (JECFA, 1998; Monbaliu et al., 2010; Streit et al., 2012). Omwille van de schadelijke effecten van de beschreven mycotoxinen, werden er voor deze mycotoxinen maximaal toegelaten concentraties in grondstoffen en veevoeders vastgelegd. Hierdoor zouden klinische problemen ten gevolge van deze stoffen in principe kunnen worden voorkomen (Mul et al., 2006). Het al dan niet voorkomen van mycotoxinen in de grondstoffen hangt sterk af van risicofactoren waaronder het weer, de variëteit en de voeding van de plant en de eventuele restanten uit vorige gewassen zoals maïs. Planten zijn meer vatbaar voor schimmels als zij blootgesteld zijn aan stress en dit verklaart waarom o.a. droogte, gebruik van gewasbeschermingsmiddelen, overvloed aan water en schade door insecten vaak de mycotoxineproductie vooraf gaan. Mycotoxinen dienen namelijk ter bescherming van de schimmel zodat deze zich in een ongunstige situatie kan verweren. Ook regen beïnvloedt het voorkomen van mycotoxinen daar schimmels houden van vocht en omdat regendruppels de conidiën van de schimmel doen opspatten vanaf de grond naar de hogere delen van de plant en zo de aar kunnen besmetten. Honderd procent zekerheid op het voorkomen van mycotoxinen kan echter aan de hand van deze factoren niet worden gegeven waardoor het moeilijk is om te voorspellen welke oogsten mycotoxinen bevatten en welke niet (Jenkinson en Parry, 1994; Smiley et al., 1996; Fink-Gremmels, 1999). Niettegenstaande het weer een factor is dat weinig of niet kan beïnvloed worden, zijn teelmaatregelen wel effectief om andere factoren bij te sturen. Dit is mogelijk door o.a. de plantenresten na het oogsten te verwijderen of in te werken, door het correct omspringen met gewasbeschermers, door rotatie van gevoelige en niet-gevoelige gewassen zoals aardappelen, of door gebruik te maken van *Fusarium*-resistente graanrassen (Mul et al., 2006).

Zoals reeds vermeld kunnen ook tijdens de opslag mycotoxinen massaal geproduceerd worden en daarom is het van groot belang om granen eerst goed te drogen en vervolgens snel te koelen. Ook is een goede verluchting noodzakelijk om groei en broei van schimmels tegen te gaan (Kan et al., 1985). Naast anaërobe omstandigheden, kunnen schimmels ook onder aërobe omstandigheden groeien zoals in de voederrestanten in de valpijpen van o.a. brijvoersystemen. Met elke voerbeurt zou deze schimmelpopulatie zich verder kunnen uitbreiden en mycotoxinen produceren. Dit verdient dus extra aandacht want deze vorm van contaminatie zou wel eens de oorzaak kunnen zijn van soms moeilijk verklaarbare, tegenvallende technische resultaten (Veldman, 2003a).

3. Maximaal toegelaten concentraties in varkensvoeder

In Europa zijn er verschillende aanbevelingen omtrent mycotoxinen van kracht. Zoals geïllustreerd in tabel 3 zijn er maximale richtwaarden voor de mycotoxinen DON, ZEN, ochratoxine A (OTA), fumonisine B1 en B2 (FB1, FB2) en is er een maximaal toegelaten gehalte voor aflatoxine B1 (AFB1) en een actienorm voor T-2 en HT-2 toxine (2002/32/EC, 2006/567/EC, 2013/165/EU). Deze reglementering heeft voornamelijk tot doel om de voedselveiligheid te waarborgen, terwijl de dierenproducenten ook de door mycotoxine veroorzaakte subklinische effecten met invloed op de winstgevendheid willen elimineren. Het zijn echter niet enkel de mycotoxinen die leiden tot het ontstaan van een klinisch probleem, maar het probleem wordt ook beïnvloed door omgevingsfactoren en dierlijke factoren. Zoals weergegeven in figuur 1 zijn ook het ras, de leeftijd, het geslacht, de algemene gezondheid, de immuniteit en de conditie van het dier, alsook het management, de bioveiligheid, de hygiëne en de temperatuur die de omgeving beïnvloeden minstens even belangrijk als het type mycotoxine, de concentratie en de duur van opname (Heidler, 2004).

Tabel 3

Maximaal toegelaten gehalte voor aflatoxine B1 (AFB1) (2002/32/EC) en maximale richtwaarden voor de mycotoxinen deoxynivalenol (DON), zearalenone (ZEN), ochratoxine A (OTA), fumonisine B1 en B2 (FB1, FB2) (2006/567/EC) en de actienorm voor T-2 en HT-2 toxine (2013/165/EU).

Mycotoxine	Product	Gehalte (mg.kg⁻¹)
DON	Granen en graanbijproducten met uitzondering van maïs bijproducten	8
	Maïs bijproducten	12
	Complete voeders en aanvullende diervoeders	0,9
ZEN	Granen en graanbijproducten met uitzondering van maïs bijproducten	2
	Maïs bijproducten	3
	Complete voeders en aanvullende diervoeders biggen en jonge zeugen	0,1
	Complete voeders en aanvullende diervoeders zeugen en mestvarkens	0,25
OTA	Granen en graan producten	0,25
	Complete voeders en aanvullende diervoeders varkens	0,05
FB1 en FB2	Maïs en maïs bijproducten	60
	Complete voeders en aanvullende diervoeders varkens	5
AFB1	Alle grondstoffen	0,02
	Volledige voeder varkens	0,02
	Aanvullende diervoeders varkens	0,02
T-2 en HT-2	Haver	2,0
	Andere granen	0,5
	Mengvoeders voor o.a. varkens	0,25

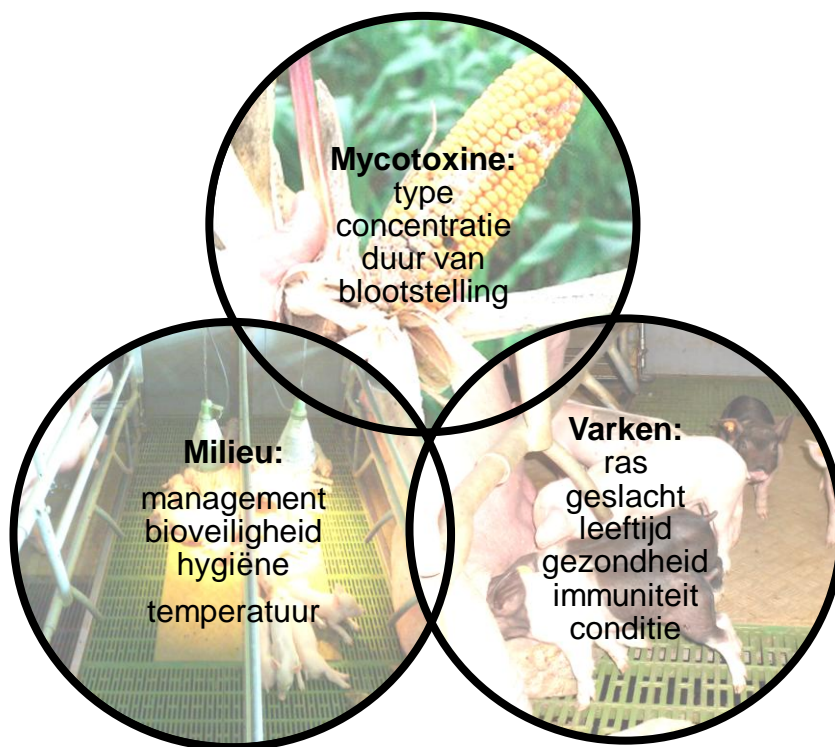


Fig. 1. Invloeden op de toxiciteit van mycotoxinen (naar Heidler, 2004).

Daarnaast houdt de wetgeving geen rekening met synergetische of additieve werkingen tussen mycotoxinen. Dit is te wijten aan de gebrekkige wetenschappelijke kennis hieromtrent. In tabel 4 wordt een overzicht gegeven van mogelijke interacties die beschreven zijn in de literatuur. Bepaalde mycotoxinen kunnen ook ontsnappen aan detectie doordat ze bijvoorbeeld worden gebonden aan een suiker, zogenaamde 'gemaskeerde mycotoxinen'. Deze gemaskeerde mycotoxinen kunnen dan door hydrolyse in de darm opnieuw het natieve mycotoxine vrijstellen en zo toch bijdragen aan de toxiciteit (Versilovskis et al., 2012, Broekaert et al., 2015). Ook zouden sommige gemaskeerde mycotoxinen minstens even toxisch zijn als het oorspronkelijke mycotoxine zoals 15-acetyl-DON ten opzichte van DON (Pinton et al., 2012).

Tabel 4

Synergetische en additieve effecten van mycotoxinen bij varkens (Rodrigues en Schuh, 2013)

Mycotoxine	Geteste groep	Effect	Referentie
AFB1 + OTA	Varkens	Synergetisch	D'Mello et al., 1999; Huff et al., 1988a
AFB1 + FB1	Groeierende varkens	Synergetisch	Harvey et al., 1995; Liu et al., 2002
AFB1 + T-2	Varkens	Synergetisch	D'Mello et al., 1999;
OTA + DON	Gespeende biggen	Synergetisch	Speijers et al., 2004
OTA + FB1	Gespeende biggen	Synergetisch	Creppy et al., 2004; Speijers et al., 2004
OTA + T-2	Gespeende biggen	Additief	Speijers et al., 2004

DON + ZEN	Gespeende biggen	Synergetisch	Zielonka et al., 2009
FB1 + DON	Varkens	Synergetisch	D'Mello et al., 1999; Huff et al., 1988a; Speijers et al., 2004
FB1 + T-2	Varkens	Additief	D'Mello et al, 1999; Schwarzer, 2009

4. *Fusarium* mycotoxinen

Zoals reeds vermeld zijn varkens uiterst gevoelig voor bepaalde mycotoxinen geproduceerd door *Fusarium*schimmels (Mul et al., 2006). Zo zijn bijvoorbeeld DON, ZEN en T-2 reeds bij een lage dosis toxisch en kunnen ze inwerken op het immuunsysteem waardoor men ondermeer volgende zaken kan vaststellen: verminderde groei, gedaalde fertiliteit en een verhoogde gevoeligheid voor infectieziekten. Dit alles kan aanleiding geven tot slechtere productieresultaten (Stoev et al., 2000). Er kan ook een belangrijke hormonale invloed zijn op de geslachtsorganen waardoor niet enkel de zeug, maar ook de embryo of de foeti nadelige effecten kunnen ondervinden zoals embryonale sterfte, abortus en inhibitie van de foetale ontwikkeling (CAST, 2003; Zinedine et al., 2007). Daarnaast kan een gelijktijdige blootstelling aan meerdere mycotoxinen andere effecten teweegbrengen dan de enkelvoudige mycotoxinen, vb. door tegengestelde of additieve werking (Fink-Gremmels, 1999). Zo lijkt ZEN de gevoeligheid voor DON en T-2 te verhogen terwijl deze laatste twee elkaar lijken te versterken in hun schadelijke effecten (Kloet et al., 2002; Veldman, 2003a).

Men moet er echter op bedacht zijn dat schimmels meestal meer dan één mycotoxine produceren en dat voeders meerdere soorten schimmels kunnen bevatten. Dit zal er uiteraard toe leiden dat eenzelfde voeder meerdere soorten mycotoxinen kan bevatten en dat varkens dus zullen blootgesteld worden aan een combinatie van mycotoxinen. Hierdoor kunnen de symptomen gaan afwijken van de typische verschijnselen die worden toeschreven aan blootstelling van slechts één bepaald mycotoxine (Wyatt, 2005).

4.1. Deoxynivalenol (DON)

Binnen de groep van de trichothecenen is DON het meest bestudeerde mycotoxine daar het één van de meest prevalentie mycotoxinen in het gematigde West-Europese klimaat is en de meeste economische verliezen in de varkensproductie met zich meebrengt (Rodrigues en Schuh, 2013). Samen met T-2 behoort DON tot de trichothecenen. Bij deze moleculen komt de toxiciteit voort uit de aanwezigheid van een epoxide ring dat samen met de sesquiterpeen ring de typische basisstructuur vormt van een trichothecene. Afhankelijk van de functionele groepen kunnen ze onderverdeeld worden in A, B, C en D toxinen. In figuur 2 wordt de chemische structuur van DON weergegeven waarbij de carbonylgroep op C-8 kenmerkend is voor de type B trichothecenen (Ueno, 1977). Een typische eigenschap van DON is de goede oplosbaarheid in polaire solventen zoals alcohol, maar ook in water. DON wordt geproduceerd door onder andere *F.*

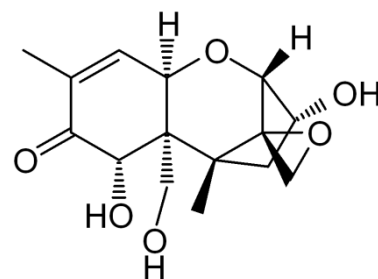


Fig. 2. De chemische structuur van DON

culmorum en *F. graminearum* (Mul et al., 2006). Omdat DON vaak braken kan induceren wordt dit mycotoxine ook wel eens als het vomitoxine aangeduid (Trenholm et al., 1985). DON is terug te vinden in grondstoffen van varkensvoerders waaronder graan, stro, maïs en graskuilvoeder.

Trichothecenen zijn inhibitoren van de proteïne-, RNA - en DNA-synthese. Specifiek kan DON de elongatie-terminatie stap inhiberen, voornamelijk in cellen met een hoge mitotische activiteit (Pestka et al., 2007). Hierdoor kan DON enerzijds het immuunsysteem onderdrukken en anderzijds aanleiding geven tot necrose van de huid. Ter hoogte van de maagdarm-mucosae functioneert de epitheel barrière niet meer naar behoren door de ongunstige invloeden op de proteïne-synthese waardoor ook de darm-permeabiliteit toeneemt. Dit verklaart dan ook de hogere gevoeligheid voor infecties en inflammatie waaronder enteritis (Pinton, 2009). De absorptie van DON gebeurt in het duodenum en vervolgens wordt het verspreid over meerdere weefsels en organen. Zo werden er residuen van DON in verschillende varkensweefsels geanalyseerd na tal van experimenten, doch gaat het steeds om lage concentraties (Döll et al., 2008). Ook de structuuranalogen van DON, 3-acetyldeoxynivalenol (3-ADON), 15-acetyldeoxynivalenol (15-ADON) en de de-epoxide metaboliet, de-epoxydeoxynivalenol (DOM-1) hebben allen een inhibitorische potentieel, doch remmen ze niet allemaal even krachtig. Zo heeft 15-ADON het grootste inhibitorische potentieel, gevolgd door DON, 3-ADON en DOM-1 als laatste met haast geen inhiberende capaciteit (Ueno, 1985; Pinton et al., 2012).

Van alle onderzochte dieren blijken varkens het meest gevoelig voor de effecten van DON (Pestka et al., 2007). Ook al is het één van de minder toxische trichothecenen, toch kan DON klinische symptomen bij varkens uitlokken waaronder braken, voederweigering en anorexie (Rotter et al., 1996). In tabel 5 worden de effecten van DON weergegeven bij verschillende concentraties. Daar deze verschijnselen ook sterk afhankelijk zijn van de leeftijd van de varkens, de mogelijk optredende gewenning en het mogelijke effect van andere componenten, is er in de literatuur een grote variatie aan effecten terug te vinden. Effecten kunnen zich uiten in voerweigering, dalende voeropname en verminderde groei bij een inname tussen de 0,5 en 5,0 mg.kg⁻¹ (Hochsteiner, 2001; Eriksen en Pettersson, 2004). De aldus verminderde eetlust is een gevolg van de stimulatie van de cytokinesynthese die door DON wordt geïnduceerd vooral bij lage contaminatiegehalten. Vanaf 20 mg.kg⁻¹ kan braken optreden door de interactie met serotonine en dopaminerge receptoren (EFSA, 2004).

Tabel 5

De concentraties aan DON waarbij bepaalde verschijnselen optreden.

Concentratie (mg.kg⁻¹)	Effect	Bron
Vanaf 0,5 - 5,0	Voedselweigering	Hochsteiner, 2001
Vanaf 20	Braken	Young et al., 1983
Vanaf 0,5 - 5,0	Verminderde voeropname	Hochsteiner, 2001; Eriksen en Pettersson, 2004
Vanaf 0,6 – 2	Verminderde groei	Eriksen en Pettersson, 2004

4.2. T-2 toxine (T-2)

T-2 is net zoals DON een trichotheceen, maar dan wel van het A type. Deze groep trichothecenen bezit geen carbonylgroep op C-8. T-2 bestaat net zoals alle andere trichothecenen uit een sequiterpeen ring en een C-12, 13-epoxide ring. De chemische structuur is weergegeven in figuur 3. Het is voornamelijk de epoxide ring dat de toxiciteit veroorzaakt en kenmerkend voor T-2 en sommige andere trichothecenen is dat ze

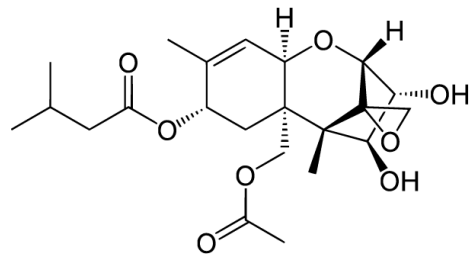


Fig. 3. De chemische structuur van het T-2 toxine

oplosbaar zijn in non-polaire solventen (Rodrigues en Schuh, 2013). Net zoals de andere trichothecenen kan ook T-2 als een inhibitor van de proteïne-, de RNA- en de DNA-synthese optreden. In tegenstelling tot DON is T-2 meer acuut toxisch en werkt het niet in op de elongatie-terminatie stap, maar wel op de initiële stap van de proteïne-synthese. De cellen die het meest vatbaar zijn voor trichothecenen, zijn die met een hoge celdeling. Daardoor zal bij een T-2 intoxicatie voornamelijk het immuunsysteem worden beïnvloed, wat kan resulteren in wijzigingen in het aantal leucocyten en een daling van de antistoffenproductie (Rodrigues en Schuh, 2013). De voornaamste metaboliet van T-2, namelijk het gehydrolyseerd T-2 (HT-2) heeft een minder inhiberende potentieel waardoor deze minder toxiciteit veroorzaakt (Ueno, 1985; Pinton et al. 2012)

T-2 veroorzaakt na contact necrose van de huid of de mucosa en wordt daarom ook als het dermatoxine aangeduid (Veldman, 2003b). Algemeen kan men besluiten dat via contact met stof en via inname van besmet voeder een vertraagde groei en een daling van de immuniteit kan vastgesteld worden (Fink-Gemmels, 1999; Veldman, 2003b). De mogelijke effecten van T-2 worden weergegeven in tabel 6. Al bij een lage concentratie van slechts 0,5 mg.kg⁻¹ LG kan T-2 aanwezig in stof van voeder huidlaesies veroorzaken. Dit in tegenstelling tot het voeder, waar hogere concentraties aan T-2 nodig zijn om enig effect teweeg te brengen bij mestvarkens (Fink-Gremmels, 1999). Ook zeugen zijn gevoelig aan T-2. Zo kan degeneratie van de ovaria vastgesteld worden bij inname via het voeder wat onvermijdelijk leidt tot een verminderde fertiliteit (Fink-Gremmels, 1999). In tabel 7 is een overzicht gegeven van de effecten veroorzaakt door bepaalde concentraties T-2 in het voeder op varkens.

Tabel 6

De effecten van T-2 op varkens.

Gevoelige groep	Contact via	Verschujselen
Algemeen	Stof (<0,5 mg.kg ⁻¹ LG):	Huidlaesies, waaronder staartnecrose
	Stof en voeder:	Vertraagde groei en daling van de afweer (Veldman, 2003b; Fink-Gremmels, 1999)
Mestvarkens	Voeder (< 0,5 mg.kg ⁻¹)	Geen effect
Zeugen	Voeder	Verminderde fertiliteit Degeneratie van de ovaria (Fink-Gremmels, 1999)

Tabel 7

Overzicht van effecten veroorzaakt door bepaalde concentraties aan T-2 in het voeder (naar Eriksen en Pettersson, 2004).

Ras (geobserveerde leeftijdsgroep)	Concentratie (mg.kg ⁻¹)	Duur van blootstelling	Waargenomen effecten	NOAEL (LOAEL) mg.kg ⁻¹	Referentie
Landras (biggen)	8	laatste 4 weken van de dracht tot 3 weken na de partus	- meer uitval na geboorte - Pathologische veranderingen in de lever, maag en bijnier - Minder lymfocyten in milt - Toegenomen infectiepercentage	< 8	Vanyi et al. (1991)
Landras x Large White (biggen 9 kg)	0-15,0	3 weken	- Verminderde voederopname - Verminderde gewichtsaanzet - Histologische veranderingen in subepitheliale lagen in de lippen, snoet en mond - Gewichtsverlies - Huidinflammatie en wijzigingen in de mucusmembraan van de mondholte en tong	0,5 4,0	Rafai et al. (1995a)
Landras x Yorkshire (12-13 weken)	0-3,2	5 weken	- Geen significante effecten	?	Friend et al. (1992)
Landras x Yorkshire (7 weken)	0 en 8	30 dagen	- Verminderde voederopname - Verminderde gewichtsaanzet	< 8	Harvey et al. (1994)
Castraten	60 en 10	28 dagen	- Verminderd lichaamsgewicht - Verminderde gewichtsaanzet	< 10	Harvey et al. (1990)
?	0, 13 en 52 T- 2 + 5 en 42 HT-2	?	- Verminderde voederopname - Verminderde gewichtsaanzet - Uterus en ovariumatrofie - Follikel atresie	?	Palyusik et al. (1990)
Large White x Duroc	0 en 5	25 dagen	- Voederweigering - Verminderde gewichtsaanzet	< 5	Rafai et al. (1989)
Hongaarse Large White x Durco	0 en 5 ad lib	25 dagen	- Verminderde voederopname - Verminderde gewichtsaanzet - Toegenomen immuunrespons	< 5	Rafai and Tuboly (1982)
?	12	80 – 220 dagen	- Terugkeerders - Kleinere worpgrootte en worpgewicht - Geen effect op nakomelingen	< 12 > 12	Weaver et al. (1978a)

Nota; NOAEL = No Observed Adverse Effect Level, LOAEL = Lowest Observed Adverse Effect Level.

4.3. Zearalenone (ZEN)

ZEN is een belangrijk mycotoxine dat voornamelijk voorkomt in warme en gematigde klimaatsregio's en wordt o.a. geproduceerd door *F. graminearum* (Gajęcki et al., 2010). ZEN is een myco-oestrogeen en wordt vooral geassocieerd met voortplantingsstoornissen en hyperestrogeniciteit bij landbouwhuisdieren. De oestrogene effecten zijn te verklaren door de structurele gelijkenissen tussen ZEN en estradiol, een belangrijk vrouwelijke sekshormoon.

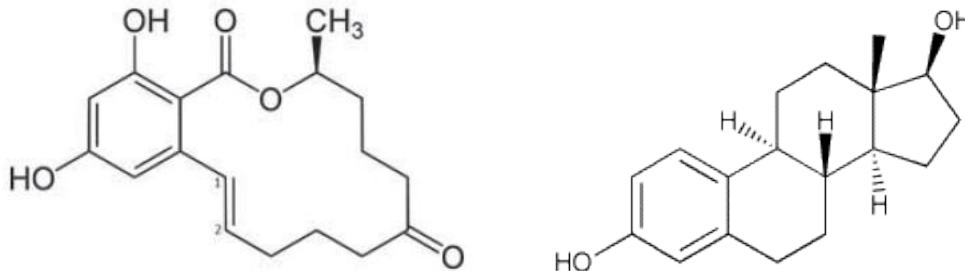


Fig. 4. De chemische structuren van zearalenone (links) en estradiol (rechts).

ZEN bestaat uit meerdere zesringen, 18 koolstof-, 22 waterstof- en 5 zuurstofatomen zoals in figuur 4 weergegeven. Op de basisstructuur zijn er 2 hydroxyl-, 2 carbonyl- en 1 methylgroep aanwezig. ZEN komt het meest voor in maïs, tarwe, haver, gerst, rogge, rijst, sorghum, sesam, sojabonen, suikerbieten en hooi. Daarbij is vooral het vochtgehalte van de plant van groot belang. Vermits ZEN hittebestendig en extreem wateroplosbaar is kunnen commerciële voeders die samengesteld zijn uit één of meerdere van deze grondstoffen ook een hoeveelheid ZEN bevatten (Hollinger en Ekperigin, 1999; EFSA, 2004).

ZEN bindt op de oestrogeenreceptoren met een hogere affiniteit dan het natuurlijke 17 β -estradiol (Katzenellenbogen et al., 1979). Metabolisatie van ZEN vindt primair plaats in de lever, maar ook de darm, de nieren, de ovaria en de testis zouden in staat zijn ZEN om te zetten naar metabolieten (Malekinejad et al., 2006). Enerzijds kan er een hydroxylatie van ZEN naar α -zearalenol (α -ZOL) en β -zearalenol (β -ZOL) gebeuren en anderzijds kunnen deze metabolieten geconjugeerd worden met glucuronzuur (Minervini en Dell'Aquila, 2008). Studies hebben aangetoond dat de dehydroxylatieprocessen diersoortspecifiek zijn en dat bij varkens ZEN voornamelijk wordt omgezet tot het α -ZOL. Het is vooral deze metaboliet die grote schadelijke effecten kan teweegbrengen daar het een bindingsaffiniteit bezit voor de oestrogeenreceptoren dat wel 92 maal sterker is dan het ongehydroxyleerde ZEN. Daarentegen heeft β -ZOL een 2,5 keer lagere affiniteit dan ZEN waardoor deze minder schadelijk is (Malekinejad et al., 2006). Door de binding van ZEN of α -ZOL aan de oestrogeenreceptor ondergaat deze een conformatieverandering die resulteert in een interactie met het chromatine waardoor de transcriptie van de targetgenen van start kan gaan en aldus leidt tot de vorming van eiwitten (Kuiper et al., 1998). Zoals reeds vermeld kan er ook glucuronidatie optreden waardoor de wateroplosbaarheid toeneemt en aldus de renale eliminatie wordt bevorderd. ZEN en zijn metabolieten doorlopen de entero-hepatische cyclus waardoor ze kunnen accumuleren (Biehl et al., 1993). Ondanks het feit dat dit mycotoxine snel wordt omgezet en geëlimineerd, kunnen ZEN en zijn metabolieten toch in de melk van de zeug terecht komen als de concentratie in het voer hoger is

dan 25 mg.kg⁻¹ (Kuiper-Goodman, 1987). Hierdoor vertonen pasgeboren biggen reeds na 24 uur oestrogene verschijnselen. Deze oestrogene verschijnselen zijn weergegeven in de tabel 8. Oestrogeenreceptoren komen voor in o.a. het endometrium, de ovaria, de hypothalamus, de nieren, de lever en het hart. Hoge dosissen of langdurige chronische opname van ZEN veroorzaakt voornamelijk hyperoestrogenisme of het oestrogeen syndroom, waarbij het vooral een invloed heeft op het voortplantingsstelsel en de melkklieren (Greenman et al., 1979, Zinedine et al., 2007). De specifieke effecten zijn afhankelijk van de dosis, de leeftijd en de fase in de oestruele cyclus waarbij het de zeug vooral gevoelig is tijdens de oestrus en de dracht (Zinedine et al., 2007, Gajęcki et al., 2010). In tabel 8 zijn de meest voorkomende effecten weergegeven bij varkens. Vooral jongere zeugen waaronder de gelten zijn het meest gevoelig. Oudere zeugen lijken minder last te ondervinden van de blootstelling aan ZEN, hoewel ook bij deze dieren verminderde vruchtbaarheid kan optreden (Veldman, 2003b). Net zoals bij zeugen, kunnen ook bij beren symptomen optreden en dit onder de vorm van tepelzwellings (Fink-Gremmels, 1999). Daarnaast zijn ook de biggen vatbaar voor een ZEN mycotoxicose waarbij zwelling van de vulva en vulvovaginitis kan waargenomen worden. Deze kunnen verder evolueren naar een vaginale prolaps (Fink-Gremmels, 1999). Ook valt op dat de biggen van besmette zeugen zich minder goed gaan ontwikkelen en dat productiegelte van deze zeugen (aantal gespeende biggen per zeug) lager is (Veldman, 2003b).

Tabel 8

Overzicht van de effecten van ZEN bij verschillende leeftijden van varkens (naar Mul et al., 2006).

Diercategorie	Effecten van ZEN na voeropname	ZEN gehalten (mg.kg ⁻¹ / ppm voer)	Referentie
Opfokbiggen	Verminderde voeropname Zwaardere en grotere baarmoeder	0,42 (en 3,9 DON)	Döll et al., 2003.
Gelten 5-6 maanden	Hyperemie en zwelling van de vagina Vergroting van de vulva en tepels Zwaardere en grotere baarmoeder Prolaps rectum/vagina Krampachtige aandrang tot lozing ontlasting of urine (ontsteking enkeldarm/urineblaas) Roodheid van de vulva Zwelling van de melkklieren Vesiculaire en cysteuze follikels op de ovaria	10-40 ± 0,05 ± 0,05 ± 0,05	Hollinger en Ekperigin, 1999 Bauer et al., 1987
Gelten in cyclus (> 240 dagen)	Langere inter-oestrus intervallen Schijndracht Onvruchtbaarheid Geen invloed op oestrus Nymfomanie	3,6 – 20 ; 25-100 3,61 en 4,33 /	Etienne en Jemmali, 1982; Chang et al., 1979 Etienne en Jemmali, 1982
Drachtige gelten en zeugen	Lager baarmoeder- en foetusgewicht Spreiding geboorte gewicht groter	3,61 en 4,33	Etienne en Jemmali, 1982

Diercategorie	Effecten van ZEN na voeropname	ZEN gehalten (mg.kg ⁻¹ / ppm voer)	Referentie
Drachtige gelten en zeugen	Kleinere tomen	25-200	Diekman en Green, 1992
	Lichtere biggen		
	Splay-leg	5 mg / zeug	
	Schijndracht	6 en 9	Young en King, 1986
	Onderbreken van de dracht tijdens eerste periode	108 in voer 1 week na inseminatie	Long en Diekman, 1986
	Onderbreken van de dracht tijdens eerste 43 dagen van de dracht	60 en 90	
	Geen effect op eerste 43 dagen van de dracht	5,15,30	
Eerste en tweede worpszeugen	Geen reproductieproblemen	< 5	Young et al., 1990
	Interval spenen-oestrus groter	> 10	
	Kleinere tomen Groter aantal guste zeugen		
Meerdere worpszeugen	Constante oestrus	25, 50 en 100	Chang et al., 1979
	Onvruchtbaarheid		
	Schijndracht		
	Kleinere tomen		
	Kleinere biggen		
	Misvormde biggen Hyperoestrogenisme bij biggen		
Foeti	Hoger embryonaal sterfte	/	Veldman, 2003b
	Teratogene abnormaliteiten		
	Daling van het foetaal gewicht		D'Mello et al., 2000
Zogende biggen	Slechte ontwikkeling	/	Veldman, 2003b
	Lager aantal gespeende biggen		
	Vulvovaginitis		Fink-Gremmels, 1999
	Staartnecrose, vergrootte vulva's, opgezette tepels		CAST, 2003; Dacasto et al., 1995
Beren	Vergrote tepels	/	Fink-Gremmels, 1999
	Verminderd libido		Zinedine et al., 2007
	Daling testisgewicht		
	Daling spermatogenese		
	Verminderde productie van testosteron		

Het is bewezen dat jonge gelten met een opname van > 1-5 mg ZEN.kg⁻¹ voeder hyperemie, een oedemateuze zwelling van de vulva en een vaginale of rectale prolaps kunnen vertonen (Minervini en Dell'Aquila, 2008). Lagere dosissen van ± 0,05 mg.kg⁻¹ veroorzaken roodheid van de vulva, zwelling van de melkklieren en vesiculaire en cysteuze follikels op de ovaria (Bauer et al., 1987). De effecten op cyclerende dieren kunnen zich uiten in nymfomanie, schijnzwangerschap, ovariumatrofie en endometriumwijzigingen. Bij drachtige zeugen kan het ondermeer leiden tot embryonale sterfte, daling van het foetaal gewicht en teratogene genitale abnormaliteiten (D'Mello et al., 2000). Ook zijn er bij beren symptomen waarneembaar zoals een daling van o.a. het testesgewicht, de spermatogenese en de testosteronproductie. Er kan soms ook een duidelijke feminisatie en een verminderd libido vastgesteld worden (Zinedine et al., 2007).

Naast de negatieve invloeden op de reproductie en de hormoonregulatie, kan ZEN ook hemotoxische verschijnselen veroorzaken. Het verstoort het coagulatieproces, interfereert met hematologische parameters (het hematocriet, het gemiddeld cel volume en het aantal trombocyten) alsook met biochemische parameters (het aspartaat aminotransferase, het alanine aminotransferase, het serum creatine en het bilirubine) (Maaroufi et al., 1996). Naast de reeds besproken effecten dient ook te worden vermeld dat dit toxine hepatotoxisch is (Zinedine et al., 2007) en dat bij muizen ook genotoxische en immunotoxische effecten zijn gevonden. Verdere studies zijn nodig om na te gaan of deze ook bij varkens optreden (JECFA, 2000).

4.4. Overdracht van DON, T-2 en ZEN van moederdier naar nakomelingen

Mycotoxinen worden, net zoals veel andere giftige stoffen, grotendeels omgezet en onschadelijk gemaakt door de lever. Vervolgens kunnen zij via de gal in de feces of via urine uitgescheiden worden. Een klein deel van deze nog schadelijke mycotoxinen die niet worden uitgescheiden, worden in weefsels opgestapeld. De twee besproken trichothecenen DON en T-2 worden snel gemetaboliseerd en uitgescheiden via urine en feces zonder veel accumulatie in de weefsels (Eriksen en Petterson, 2004). ZEN daarentegen wordt ook wel snel gemetaboliseerd en uitgescheiden, maar kan toch samen met zijn metabolieten waaronder α -ZOL, achterblijven in de lever of accumuleren in het vetweefsel (Veldman, 2003b). Daarnaast hebben studies ook aangetoond dat de toxinen en hun metabolieten (met als bekendste voorbeeld aflatoxine M1) ook worden uitgescheiden met de melk. In onderstaande tabel wordt weergegeven op welke manier overdracht van mycotoxinen effecten kunnen hebben op de nakomelingen. In figuur 9 is een overzicht gegeven van de effecten van ZEN op nakomelingen.

Tabel 9

De invloed van ZEN op nakomelingen van de zeug.

Moment van blootstelling	Mycotoxine (toedieningsweg)	Effecten	Bron
Tijdens de dracht	ZEN (via het voeder)	- Hyperoestrogenisme - Vergrootte genitaliën en uterus - Afname van lichaamsgewicht	Osweiler, 1992
Laatste periode van de dracht	5 mg.kg ⁻¹ ZEN (via injectie)	- Doodgeboorte - Spreidzit	Osweiler, 1992
2 weken voor de partus	ZEN (via het voeder)	- Vulva en spenen: zwelling en roodheid - Vroeggeboorte - Spreidzit - Meer trilbiggen	Vanyi et al., 1994
1 week voor tot 1 week na de partus	40 mg.kg ⁻¹ ZEN (via het voeder)	Hyperoestrogenisme, reeds na 48 u verdwenen. (vulva en spenen: zwelling en roodheid) - Er is transplacentaire passage - De concentratie in de melk is te laag om symptomen te induceren - De gevoeligheid van de biggen neemt af naarmate ze ouder worden	Vanyi et al., 1994

In de literatuur zijn geen gegevens te vinden die bewijzen dat DON en T-2 via melk van het moederdier naar de nakomelingen kan worden doorgegeven. Zoals hierboven beschreven zijn er tal van studies die aantonen dat ZEN duidelijke effecten teweegbrengt bij nakomelingen. Vooral de overdracht in de baarmoeder zou deze verschijnselen verklaren (Vanyi et al., 1994).

5. Predisponerende factoren

In het overzichtsartikel van Hollinger en Ekperigin (1999) werd vermeld dat sommige factoren bepalen of een bepaalde dosis mycotoxine leidt tot het al dan niet optreden van mycotoxicosis. Het geslacht, het ras en de mate van blootstelling aan stress spelen hierbij een grote rol. Ook erg jonge of erg oude dieren lijken een verhoogd risico te hebben om klinisch symptomen te vertonen. Daarnaast zijn ook een aangetaste gezondheid en een verlaagde immuniteit predisponerend voor effecten ten gevolge van een mycotoxine-intoxicatie. De hierboven vermelde factoren spelen echter ook een grote rol in de algemene vatbaarheid voor ziekten, en beperken zich bijgevolg niet enkel tot mycotoxicosis.

In een artikel van Mul et al. (2006) werden gespecialiseerde varkensdierenartsen onderworpen aan een enquête. In tabel 10 zijn de factoren weergegeven die werden aangehaald als zijnde risicofactoren die kunnen bijdragen tot het ontstaan van mycotoxicosis.

Tabel 10

Benoemde risicofactoren van symptomen, die kunnen bijdragen tot het ontstaan van mycotoxicosis en het aantal respondenten dat deze risicofactor benoemde (Mul et al., 2006).

Risicofactor	Aantal respondenten die de factor vernoemden
Kwaliteit voeder	42
Ziekte/druk/overige infectieziekten	17
Biestvoorziening	13
Stalklimaat	8
Genetische factoren	6
Geen factoren genoemd	4
Algemene immuniteit	2
Vitamine A gebrek	1
Voersysteem en reiniging	1

6. Behandeling van mycotoxicosis

Een eenduidige oplossing in de behandeling van een mycotoxine-intoxicatie bestaat niet. Het meest effectief is het kunnen aantonen van de aanwezigheid van het mycotoxine en het vervolgens verwijderen. Echter is dit geen eenvoudige opdracht omdat mycotoxinen niet altijd in de staalname zijn terug te vinden, niettegenstaande ze dan toch aanwezig kunnen zijn in het voeder. Daarom is het van groot belang om bij een voederstaalname verschillende plaatsen in de batch te betrekken. Zo wordt de kans groter om de door de schimmel lokaal geproduceerde toxinen aan te treffen bij analyse.

Daarnaast leveren mycotoxinebinders wisselende resultaten op. Er zijn tal van binders op de markt en ook al geven zij in vitro mooie resultaten, het effect in vivo moet nog nader onderzocht worden. Mycotoxine binders zouden mycotoxinen binden der hoogte van de darm zodat de opname ervan niet meer mogelijk is. Echter worden de trichothecenen DON en T-2 moeilijk gebonden. Daarnaast kan ook worden overgestapt naar graanvrij voeder. Granen zijn namelijk de gewassen bij uitstek waarin de mycotoxineproducerende schimmels gaan groeien, vooral als zij niet optimaal worden bewaard. Toch moet vooral het management op het bedrijf worden aangepakt daar stress een van de grootste predisponerende factoren is (Mul et al., 2006).

7. Analyse van mycotoxinen

De diagnose van een mycotoxicosis en het nagaan van een mycotoxineblootstelling bij voedselproducerende dieren kan niet enkel en alleen op basis van symptomen omdat men het mag verdenken in alle ziektegevallen waar niet specifieke symptomen kunnen vastgesteld worden en waar bijkomend de behandeling niet aanslaat (Kolosova en Stroka, 2010; Marczuk et al., 2012). Bijkomende laboratoriumanalyses zoals van voederwaren zijn nodig om de contaminant te identificeren. Helaas zijn er verscheidene beperkingen wanneer men enkel deze matrix neemt om mycotoxinen te onderzoeken. Zo wordt er geen rekening gehouden met de individuele blootstelling en de gevarieerde distributie van de contaminatie, waardoor men nooit een sluitend bewijs kan voorleggen van mycotoxicosis. Dit probleem kan men weerleggen door specifieke biomerkers of bepaalde moleculen in lichaamsvloeistoffen zoals serum of urine te bepalen. De meting van targetverbindingen in bloed is eveneens de meest aangewezen manier om ook andere zaken te onderzoeken zoals toxicokinetische studies met mycotoxinen of de doeltreffendheid van mycotoxine reductie strategieën (Kolosova en Stroka, 2010).

Vloeistofchromatografie gekoppeld aan tandem massa spectrometrie (LC-MS/MS) is de meest gebruikte techniek om mycotoxinen te detecteren in voeder en andere matrices omwille van zijn hoge gevoeligheid en specificiteit. Dankzij deze techniek is het niet enkel mogelijk om de aanwezigheid van meerdere mycotoxinen in het voeder te bevestigen, ook mycotoxine metabolieten en gemaskeerde mycotoxinen kunnen opgespoord worden (Krska et al., 2008; Mol et al, 2008). Ook voor serum is er een multi-mycotoxine methode beschreven door Devreese et al. (2012). In dit artikel wordt een onderzoek beschreven waarbij DON, T-2, ZEN, OTA en AFB₁, allen aan een concentratie van 0.05 mg.kg⁻¹ LG in de vorm van maagbolus dat werd toediend aan 6 varkens. Vervolgens werd er bloed geïncubeerd op regelmatige tijdstippen om nadien te onderzoeken. Met behulp van de LC-MS/MS methode was het mogelijk om meerdere mycotoxinen tegelijkertijd te detecteren. Deze methode kan in de praktijk makkelijk aangewend worden voor screening en werd bijgevolg ook in dit onderzoek toegepast.

Tabel 11

De gedetecteerde concentraties van DON, ZEN, OTA, AFB1, T-2 en structuuranalogen DOM-1, zearalanone (ZAN), α -en β -zearalenol (α -, β -ZOL), en α - en β -zearalanol (α -, β -ZAL) na toediening via een maagbolus aan biggen (naar Devreese et al., 2012).

Toegediende en/of gedetecteerde mycotoxinen	Concentratie aanwezig in de maagbolus	Concentraties aan gedetecteerde mycotoxinen in het serum van de biggen
DON	0.05 mg.kg ⁻¹ LG	0 tot 30 ng.mL ⁻¹
ZEN	0.05 mg.kg ⁻¹ LG	< 5 ng.mL ⁻¹ (= LOQ)
OTA	0.05 mg.kg ⁻¹ LG	Tot 135 ng.mL ⁻¹
AFB1	0.05 mg.kg ⁻¹ LG	< 2 ng.mL ⁻¹ (= LOQ)
T-2	0.05 mg.kg ⁻¹ LG	< 0,22 ng.mL ⁻¹ (= LOD)
DOM-1	/	< 0,22 ng.mL ⁻¹ (= LOD)
		Verklaring: snelle metabolisatie T1/2 < 5 minuten bij braadkippen
ZAN	/	< 0,05 ng.mL ⁻¹ (= LOD)
α -, β -ZOL	/	< 0,02 ng.mL ⁻¹ (= LOD)
α -, β -ZAL	/	< 0,02 ng.mL ⁻¹ (= LOD)

Nota; LG = lichaamsgewicht, LOQ = limit of quantification (kwantificatiegrens), LOD = limit of detection (detectiegrens).

In een artikel van Goyarts et al. (2007) werden ook reeds serumconcentraties beschreven voor mycotoxinen. Daar werd DON bepaald in het serum na opname van voeder gecontamineerd met 6,68 mg.kg⁻¹ DON gedurende de laatste 12 weken van de afmest. In het serum werden na deze 12 weken concentraties van gemiddeld 22,6 μ g.L⁻¹ DON gedetecteerd. Metabolieten waaronder DOM-1 konden in het serum niet gedetecteerd worden (< detectielimiet van 2 ng.mL⁻¹). Ook was in dit voeder 0,059 mg.kg⁻¹ ZEN aanwezig. Deze concentratie was echter te laag om detecteerbare concentraties van ZEN of zijn metabolieten vast te stellen in het serum van biggen. Uit deze gegevens kon besloten worden dat serum een betrouwbare matrix is om de blootstelling aan DON na te gaan, maar geen gepaste parameter is om ZEN blootstelling uit af te leiden. Hiervoor kan men best opteren om de concentraties te bepalen in de gal met behulp van HPLC met fluorescentie techniek. Ook andere matrices kunnen met LC-MS/MS onderzocht worden op mycotoxinen. Zo wordt in de humane geneeskunde urine (Ahn et al., 2010), maar ook melk als product voor de humane consumptie, gebruikt om mycotoxinen op te sporen (Aguilera-Luiz et al, 2010). Om met behulp van deze matrices een mycotoxicosis bij dieren vast te stellen, is meer onderzoek nodig.

II. Eigen Onderzoek

1. Introductie

Dit onderzoek werd uitgevoerd naar aanleiding van een frequent voorkomend probleem op zeugenbedrijven, met name neonatale staartnecrose. Na een uitgebreide bedrijfsbegeleiding van een probleembedrijf in 2014 werd al snel duidelijk dat neonatale staartnecrose ook op veel andere bedrijven voorkomt. Gezond geboren biggen vertonen kort na de geboorte een circulaire, rode zone op ongeveer 1 cm distaal van de staartbasis dat geleidelijk evolueert naar een necrotisch letsel, tot er enkel nog een stompje van de staart overblijft. De staartnecrose zelf is geen primaire oorzaak tot verhoogde uitval in de kraamstal maar wordt wel geassocieerd met minder vitale tomen en biggen. In figuur 5 is te zien dat volledige tomen kunnen aangetast zijn, zowel de beertjes als de zeugjes.



Fig. 5. Toom met duidelijke symptomen van staartnecrose.

Figuren 6, 7 en 8 illustreren dat staartnecrose soms gepaard kan gaan met necrotische hakjes en klauwulceraties, maar ook met een vergrote, rode glanzige of necrotische vulva. Dit laatste letsel resulteert in het afvallen van het necrotische stuk, waardoor de vulva nauwelijks nog uitwendig waarneembaar is.



Fig. 6. Aangetast zeugje met zowel staart-, vulva- en haknecrose.

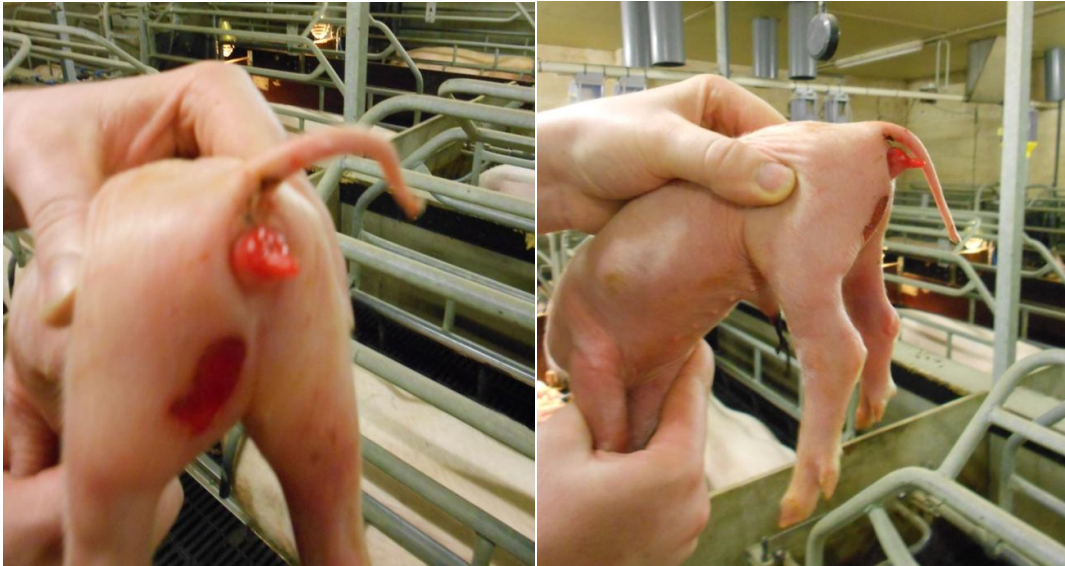


Fig. 7. Aangetast zeugje met duidelijk gezwollen glanzige vulva en staartnecrose.



Fig. 8. Aangetast zeugje met staartnecrose en klauwulceraties aan zowel de voor- als achterpootjes.

Mycotoxinen in de differentiaaldiagnose van staartnecrose bij neonatale biggen

De etiologie van het staartnecrose bij neonatale biggen is nog een groot raadsel, maar het is zeker dat verschillende factoren een invloed hebben op het optreden ervan. Er zijn indicaties die aantonen dat enerzijds mycotoxinen een rol kunnen spelen, maar dat anderzijds ook de conditie van de zeug, de genetica en de vitaliteit van de biggen in het algemeen een invloed kunnen hebben (Packet et al., 2014).

Mycotoxinen

Deze spelen ongetwijfeld een grote rol, maar er moet nog verder onderzoek gebeuren in welke omstandigheden en vanaf welke concentratie ze daadwerkelijk inspelen in de ontwikkeling van dit ziektebeeld. Het is echter niet eenvoudig om de aanwezige toxinen in de staalname te betrekken door de focale groei van de schimmels en de verschillende voeders die de zeugen krijgen tijdens hun dracht en lactatie. Ook hebben laboratoria elk hun eigen detectiemethoden en detectiegrenzen waardoor het vergelijken wordt bemoeilijkt. Niet alleen de staalname en de diagnostiek vormen een knelpunt, ook hebben bepaalde mycotoxinen een synergetische of additieve werking op elkaar.

Conditie van de zeug

Naast de mycotoxinen kan ook de conditie van de zeug een grote invloed hebben op het voorkomen van het probleem. Deze heeft namelijk een grote invloed op de vitaliteit en het geboortegewicht van de biggen. Deze conditie kan visueel beoordeeld worden of kan gemeten worden met een spekdiktemeter. Het is vooral het verloop van de spekdikte dat van belang is, en indien de spekdikte afneemt naar het einde van de dracht, dan is er een ongunstige correlatie met de vitaliteit van de biggen. Dit betekent dat zeugen naar het einde van de dracht toe moeten beschikken over voldoende voeder om de mobilisatie van de eigen energiereserves naar de foeti te kunnen beperken en om de lactatieperiode niet te laten uitlopen (Maes et al., 2004). Ook kunnen additieven de spekdikte van zeugen beïnvloeden. Zo werd in een studie van Musser et al. (1999) bewezen dat L-carnitine toegevoegd in drachtvoeder een gunstige invloed heeft op de spekdikte. Daarnaast waren ook de worpgrootte, het geboortegewicht en het speengewicht hoger. Ook het ras heeft een grote invloed op de variatie in spekdikte. In tabel 12 worden de normwaarden geïllustreerd omtrent de zeugenconditie naar het advies van Topigs20 verdelers.

Tabel 12

Normaalwaarden van de spekdikte bij Topigs20 zeugen bij inseminatie en werpen, gemeten op het einde van de laatste rib, 50 mm van het midden van de rug, ook wel de P2 positie genaamd (naar Topigs, 2013).

Tijdstip	Gelten	Zeugen
Inseminatie	13-14 mm	12-15 mm
Werpen	17-18 mm	16-19 mm

Genetica

Zoals reeds vermeld wordt het voorkomen van staartnecrose geassocieerd met minder vitale biggen. Hierbij is ook de keuze van een geschikte eindbeer belangrijk. Bepaalde beren zijn genetisch beter in het voortbrengen van meer vitale biggen dan anderen. In tabel 13 worden verschillende rassen vergeleken op basis van de eigenschappen die zij doorgeven aan hun nakomelingen.

Tabel 13

Kenmerken van de meest gebruikte beren in België (Preferent KI, 2014).

	Groei	Spier	Spek	Vitaliteit	Uni- formiteit	Voeder Conversie
Deense Duroc						
PIC 337						
PIC 408						
Hypor Maxter						
PIC 426						
Db 77						
German Piétrain						

Ongetwijfeld zijn er nog factoren die een invloed hebben op het voorkomen van staartnecrose. Zo werd in een artikel van Mul et al. (2006) specifiek vermeld dat er een associatie zou zijn tussen mycotoxinen en PRRSv. Echter werd een significant verband niet aangetoond. Verder onderzoek is noodzakelijk om hier een antwoord op te kunnen geven.

Om een beter inzicht te krijgen in de problematiek omtrent neonatale staartnecrose werd door de faculteit diergeneeskunde en het Dierengezondheidszorg Vlaanderen (DGZ) een veepeilerproject opgestart waarbij via een oproep op zoek werd gegaan naar bedrijven die interesse hadden om mee te werken (bijlage 1).

Het doel van deze studie was om na te gaan in welke mate mycotoxinen en management een rol spelen in de pathogenese van staartnecrose. Ook werd met behulp van LC-MS/MS niet alleen het voeder, maar ook het serum onderzocht. Het serum werd als dierlijke matrix onderzocht om na te gaan of deze een betere matrix kan zijn dan het voeder om blootstelling aan mycotoxinen vast te stellen.

2. Materialen en methoden

2.1. Bedrijven, dieren en staalnamen

Na een oproep in de nieuwsbrief van het DGZ (bijlage 1) en een goedkeuring door de ethische commissie (aanvraag EC 2014/123) werden 20 bedrijven gecontacteerd en bezocht. Tien van deze bedrijven hadden effectief problemen met staartnecrose bij neonatale biggen terwijl de 10 andere geen problemen hadden met staartnecrose en vervolgens werden aangewend als controlebedrijven. In tabel 14 is een overzicht gegeven van de deelnemende bedrijven met gegevens omtrent het bedrijf, de kraamstal, de zeugen, het management en de productieresultaten.

Bij aanvang van het collecteren van de stalen werden eerst, samen met de veehouder en bedrijfsdierenarts, de bedrijfsgegevens en -resultaten overlopen. Zo kon voor elk bedrijf een duidelijk beeld van de bedrijfsvoering worden verkregen. Vervolgens werden alle compartimenten van de kraamhokken overlopen om zo de prevalentie van het klinisch beeld "staartnecrose" in beeld te brengen. Na het uitselcteren van de meest aangetaste tomen (bij de probleembedrijven) kon worden overgaan tot de staalname. Zo werden er telkens 5 zeugen uitgezocht van minstens 1 dag tot maximum 6 dagen na de partus waarbij er geen biggen waren bijgelegd. Ook werd erop gelet dat de zeugen een verschillende pariteit hadden en dat ze niet allemaal uit hetzelfde compartiment kwamen. Bijkomend was het bij de probleembedrijven een vereiste dat er bij deze 5 zeugen minstens 2 aangetaste biggen aanwezig waren en liefst van een verschillend geslacht. Zo werden op alle 20 bedrijven ook 2 biggen per zeug voor de staalname geselecteerd. Figuur 9 geeft het aantal zeugen met een bepaalde pariteit weer en de verhouding tussen de probleem- en de controlebedrijven. Ook is er een schematisch overzicht weergegeven van het aantal biggen met een bepaald leeftijd per groep (controle versus probleembedrijven) (figuur 10). Gemiddeld zijn de biggen op de controlebedrijven 2,94 dagen oud en op de probleembedrijven 3,12 dagen. Na de selectie van de zeugen en de biggen werd overgegaan tot de staalname waarbij eerst minstens 1 mL melk werd genomen van de

lacterende zeugen. Omdat dit niet eenvoudig te verkrijgen is, werden de zeugen geïnjecteerd met 2 mL Oxytocine®. Na 10 minuten kon zo de melk vlotter worden bekomen zoals in figuur 11 is weergegeven. Bij de zeugen werd het bloed bekomen via punctie van de *vena jugularis* (figuur 12).

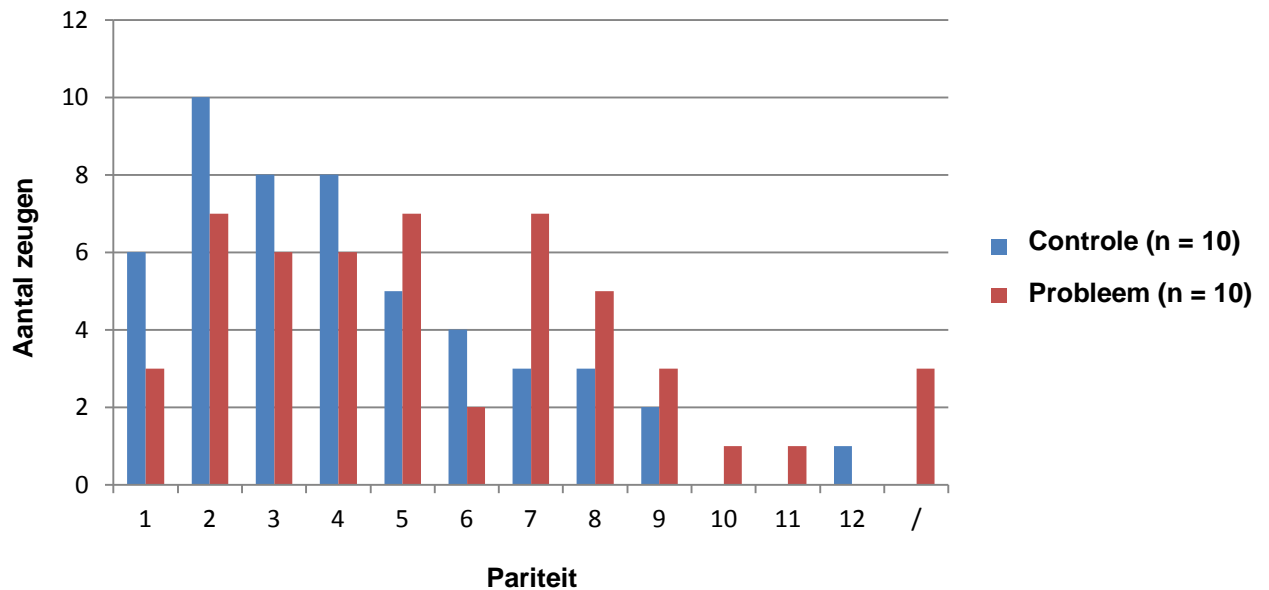


Fig. 9. Het aantal zeugen dat beantwoordt aan welbepaalde pariteit met onderscheid tussen probleem- en controlebedrijven; / = geen identificatie van de pariteit.

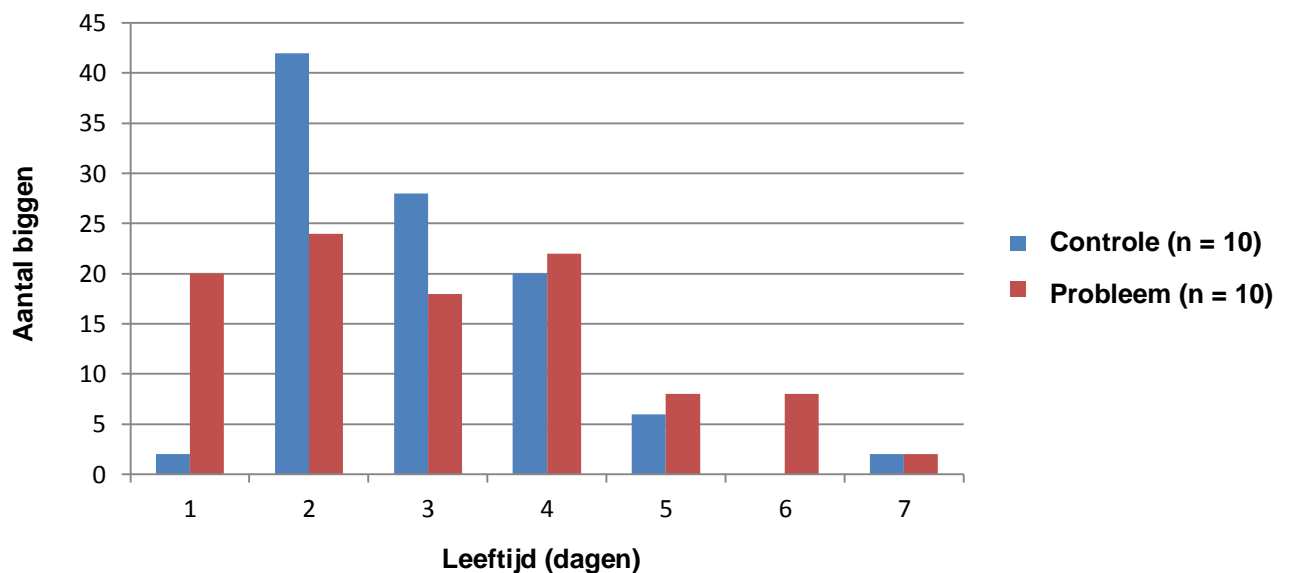


Fig. 10. Het aantal biggen dat beantwoordt aan welbepaalde leeftijd met onderscheid tussen probleem- en controlebedrijven.

Tabel 14

Bedrijfsgegevens van de deelnemende varkensbedrijven.

Bedrijf			Kraamstal	Zeugen		Management en productieresultaten			
N°	Soort	Provincie	Bouwjaar	Aantal	Rassen	WS	WI	PG	V%
1	Probleem	West-Vlaanderen	1985	200	PIC x DLR - Danbred	4	2,4	30	12,5
2	Probleem	West-Vlaanderen	1985	150	BN x ELR x LW	3	2,4	23	40
3	Probleem	West-Vlaanderen	1984	90	LW x BLR	3	2,38	26	45
4	Probleem	West-Vlaanderen	1996	340	Hermitage	3	2,39	27,5	45
5	Probleem	Limburg	1980	140	BN - BN x LW	1	2,37	24,5	30
6	Probleem	Antwerpen	1991	240	Hypor	5	2,3	24,09	49
7	Probleem	Antwerpen	2000	320	Hypor	1	2,29	24,55	38,4
8	Probleem	Oost-Vlaanderen	2008	280	Hypor	3	2,44	28	45
9	Probleem	Antwerpen	1989	200	LW x Hermitage	5	2,22	25	50
10	Probleem	West-Vlaanderen	1998	210	Hypor	3	2,21	27	40
11	Controle	Antwerpen	1999	200	Hypor	3	2,46	28,3	32,5
12	Controle	West-Vlaanderen	2008	105	TOPIGS 20	1	2,3	31	40
13	Controle	West-Vlaanderen	2001	170	Danbred - Danbred x ELR	3	2,4	29	40
14	Controle	West-Vlaanderen	1970	80	DLR x BN	4	2,35	24,5	40
15	Controle	West-Vlaanderen	2014	200	Danbred - LW x ELR - Hypor	4	2,3	28,5	40
16	Controle	Antwerpen	1975	1200	DLR - Topigs 20	4	2,43	34,04	45
17	Controle	West-Vlaanderen	2014	380	Topigs 20	4	2,45	34	27,9
18	Controle	West-Vlaanderen	1991	265	Topigs 20	1	2,29	26,81	27,74
19	Controle	West-Vlaanderen	2008	130	PIC	5	2,29	28	23
20	Controle	West-Vlaanderen	1013	210	FLR - ELR	4	2,34	27,74	40

Nota; BLR = Belgisch Landras, BN = Belgisch Negatief, DLR = Deens Landras, ELR = Engels Landras, FLR = Frans Landras, LW = Large White, PG = productiegetal, V% = vervangingspercentage, WI = worpindex, WS = weekstelsel.



Fig. 11. Het collecteren van de melk bij de zeugen.



Fig. 12. De bloedname bij de zeugen.

Bloed bij de biggen werd verkregen door het aanprikken van de *vena jugularis*. Hierbij werden de biggen met behulp van een helper in dorsale decubitus gebracht (figuur 13). Er werd telkens 1 tot 2 ml bloed per big en 8 ml per zeug verzameld in groene heparine buisjes. Heparine activeert de stollingsremmende factoren in het bloed zodat stolling vermeden wordt. Tijdens de activiteiten in de kraamhokken werden bijkomend ook urinestalen verzameld. Het urineren bij de zeug kan echter niet worden geïnduceerd en vergt daarom veel geduld. Wanneer een zeug spontaan urineerde, werd de mid-stream urine verzameld en zo 50 ml urine geïncubeerd. Na de staalname op de dieren, werden ook nog stalen genomen van het voeder. Er werd enkel voeder genomen dat op het moment van het bedrijfsbezoek aan de bemonsterde zeugen werd gevoederd. Telkens werd er op gelet om de staalname op verschillende plaatsen in de batch uit te voeren om zo een representatief staal te bekomen. Als laatste werden ook waterstalen van de drinknippel in het kraamhok verzameld voor bacteriologisch en chemisch onderzoek (figuur 14).



Fig. 13. De bloedname bij de jonge biggetjes.



Fig. 14. De staalname van het water aan de nippel in het kraamhok

Na elk bedrijfsbezoek werden alle gegevens nauwkeurig ingevoerd in een databasesysteem. Het water werd meteen onderzocht door DGZ terwijl de overige stalen in bewaring werden gehouden. Vooral de stalen in te vriezen naar -20°C werden alle monsters geïdentificeerd (figuur 15). Ook werd het bloed gecentrifugeerd ($2851 \times g$, 10 min, 4°C) om zo het serum te bekomen dat vervolgens zorgvuldig en accuraat werd over gepipetteerd naar epjes om aldus te kunnen bewaren. Figuur 16 en 17 illustreren het oogsten van het serum na de centrifugatie. Pas wanneer alle bedrijfsbezoeken en alle staalnamen waren uitgevoerd werden de stalen m.b.v. LC-MS/MS onderzocht op de aanwezigheid van mycotoxinen.



Fig. 15. Het identificeren van alle monsters.



Fig. 16. Het centrifugeren van de staalnamen (Hettich Zentrifugen®, Tuttlingen, Duitsland).

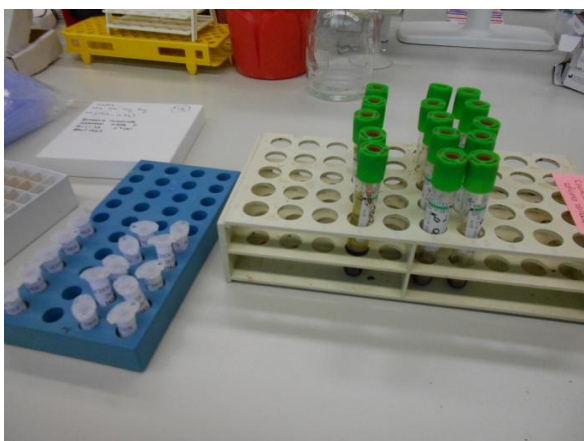


Fig. 17. Het serum wordt overgebracht in epjes om vervolgens in te vriezen.

2.2. Mycotoxineanalyse van voeder

Het voeder van de 20 bedrijven werd onderzocht op de aanwezigheid van mycotoxinen aflatoxine B1, B2, G1 en G2 (AFB1, AFB2, AFG1, AFG2), OTA, DON, ZEN, FB1, FB2, FB3, T-2, HT-2, nivalenol (NIV), 3-acetyldeoxynivalenol (3-ADON), 15-acteyldeoxynivalenol (15-ADON), diactoxyscirpenol (DAS), fusarenon-X (F-X), neosolaniol (NEO), alternariol (AOH), alternariol methylether (AME), roquefortine-C (ROQ-C) en sterigmatocystine (STERIG). Hierbij werd net zoals bij het serum gebruik gemaakt van een LC-MS/MS analyse methode. Het gevolgde protocol is gebaseerd op Monbaliu et al. (2010). De voederstalen werden vernalen en gehomogeniseerd m.b.v. een blender (Moulinette, Moulinex, Frankrijk). Vijf gram van elk voederstaal werd geëxtraheerd met 20 mL acetonitrile/water/azijnzuur (79/20/1 v/v/v). Hierbij werd de suspensie 1 uur geschud, waarna het gecentrifugeerd (3300 x g, 15 min) werd teneinde een afgescheiden extract te bekomen. Vervolgens werd het bekomen extract opgezuiverd d.m.v. een vaste fase extractie (solid phase extraction, SPE) met C18 kolommen (Grace octadecyl, Grace Discovery Sciences, Lokeren, België). Deze kolommen werden op voorhand geconditioneerd met 2 maal 5mL acetonitrile/water/azijnzuur (79/20/1, v/v/v). Het eluaat werd opgevangen in een maatkolf van 25 mL om vervolgens de extractie en de opzuivering te herhalen met 5 mL extractiesolvent. Alles werd opgevangen in diezelfde maatkolf van 25 mL en met extractiesolvent aangelengd tot de ijkstreep. Nadat de inhoud van de maatkolf werd overgebracht in een plastic reageerbuis van 50 mL werd 10 mL hexaan toegevoegd. Na 10 minuten schudden en 15 minuten centrifugeren (3300 x g) werd de hexaan laag verwijderd. Voor de verdere opzuivering werd het ontvette extract gespist in twee delen. Aan 12,5 mL werd 27,5 mL acetonitrile/azijnzuur (99/1, v/v) toegevoegd. Na homogenisatie werd hiervan 30 mL over een MultiSep®226 kolom (MultiSep®226 AflaZon en Multifunctional kolom, Romer Labs, Tulln, Oostenrijk) gebracht. Deze kolom werd gewassen met 5 mL Acetonitrile/Azijnzuur (99/1, v/v) waarna alles werd opgevangen in een plasticen buis. Een tweede hoeveelheid van het ontvet extract werd gefiltreerd gebruik makend van een glasfilter (Glas-microfilters, diameter 125 mm, Whatman, Schleicher&Schuell, VWR, Zevenem, België). Twee mL gefiltreerd ontvet extract werd vervolgens toegevoegd aan het eluaat bekomen na opzuivering via de MultiSep®226kolom. Na droogdampen bij 40°C onder stikstofstroom werd het residu opgelost in 150 µL injectiesolvent bestaand uit mobiele fase A/mobiele fase B (60/40, v/v) en 5 mM ammoniumacetaat. Het mengsel werd een laatste keer gecentrifugeerd voor 10 minuten aan 14 000 x g en gefiltreerd m.b.v. een Millipore ultrafreeMC centrifugeer filter met poriëngrootte van 0,22 µm (Bedford, MA, VS) vooraleer over te gaan tot de LC-MS/MS analyse.

Scheiding van de componenten gebeurde op een HPLC kolom van het type Symmetrie C18 (150 x 2.1 mm i.d., 5 µm d.p.) met een gelijke prekolom (10 x 2.1 mm i.d., 5 µm d.p.) (Waters, Zellik, België). Volgende mobiele fasen werden gebruikt: A: water/methanol/azijnzuur (94/5/1, v/v/v) met 5 mM ammoniumacetaat (A) en B: water/methanol/azijnzuur (2/97/1, v/v/v) met 5 mM ammoniumacetaat (B) met een flow van 0,3 mL/min. over de kolom te pompen gebruikmakend van volgende gradiënt: 0 min: 95 % A, 5% B; 0-7.00 min: 35 % A, 65% B; 7.00-11.00 min: 25 % A, 75% B; 11.00-13.00 min: 0 % A, 100% B; 13.00-14.00 min: 0 % A, 100% B; 14.00-14.10 min: 95 % A, 5 % B; 14.10-17.60 min: 35 % A, 65 % B; 17.60-18.60 min: 25 % A, 75% B; 18.60-19.80 min: 0 % A, 100% B; 19.80-19.90 min: 95 % A, 5 % B; 19.90-22.40 min: 35 % A, 65 % B; 22.40-23.40 min: 25 % A, 75% B; 23.40-25.00 min: 0 % A, 100% B; 25.00 - 26.00 min: 95 % A, 5 % B; 26.00-28.00 min: 95 % A, 5 % B.

De detectie gebeurde met een Acquity® UPLC system (Waters, Zellik, België) gekoppeld aan een Quattro Premier LC-MS/MS (Micromass Quattro Premier XE triple quadrupool massaspectrometer, Waters, Zellik, België) waarbij de moleculen in positieve ionisatie mode werden gedetecteerd Deze wordt in figuur 18 weergegeven met een aantal afbeeldingen.

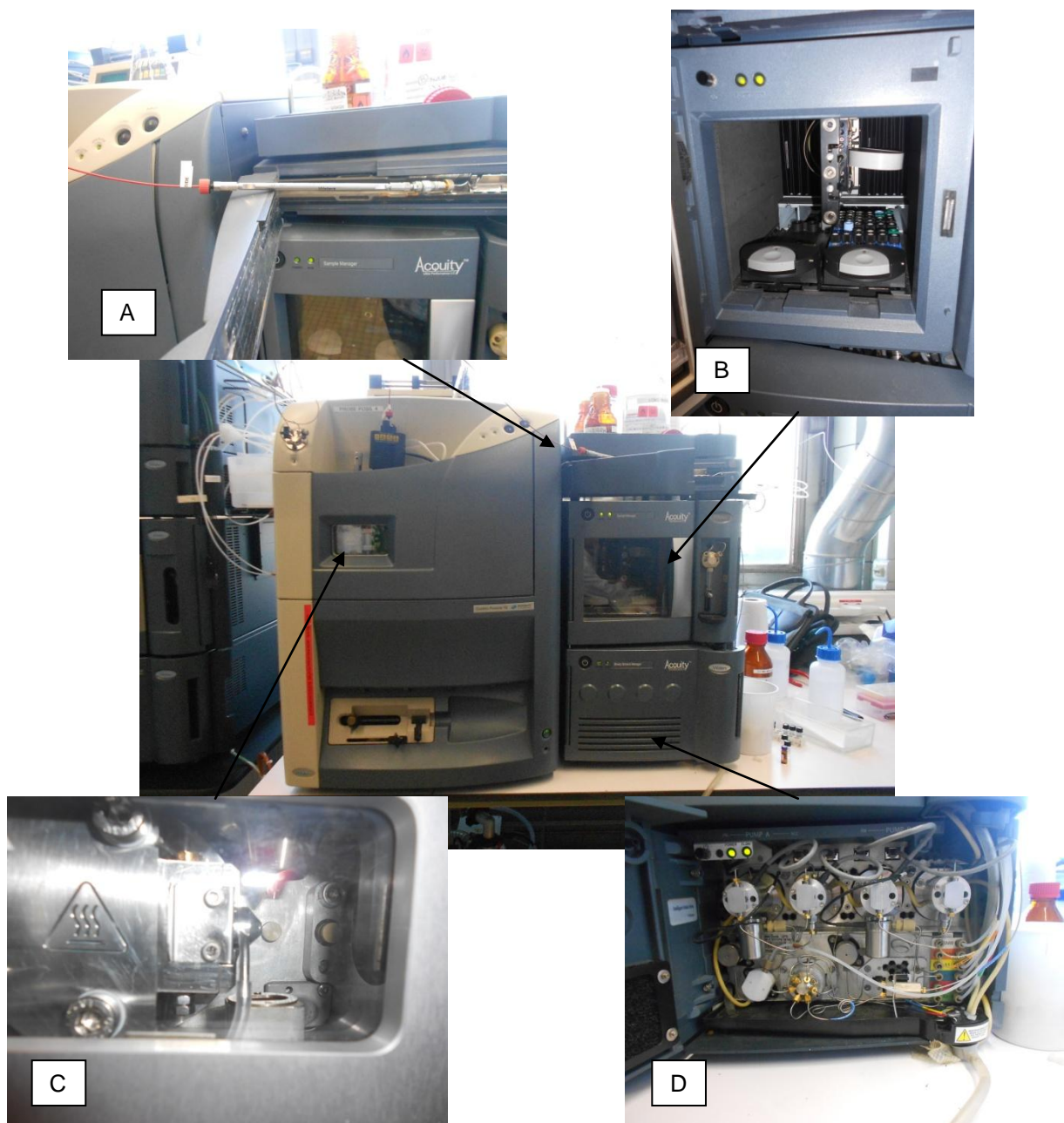


Fig. 18. De analyse van mycotoxinen in het voeder gebeurde met Acquity® UPLC system (Waters, Zellik, België) gekoppeld aan een Quattro Premier LC-MS/MS (Micromass Quattro Premier XE triple quadrupool massaspectrometer, Waters, Zellik, België). A = close-up van de kolom die instaat voor de scheiding van de componenten, B = auto-sampler met de injectievials, C = ionenbron waar de moleculen een lading krijgen, D = quaternair solvent mixer die toelaat om de mobiele fasen te mengen en een gradiëntelutie uit te voeren.

Volgende MRM transitities werden gevolgd voor de kwantificatie en kwalificatie van de componenten, respectievelijk: AFB1: 313 > 285.1*, 313 > 241.2; AFB2: 315 > 287.2*, 315 > 259.2; AFG1: 329 > 343.0*, 329 > 311.2; AFG2: 331 > 313.1 *, 331 > 245.2; OTA: 403.9 > 239.0*, 403.9 > 358.2; DON:

297.1 > 249.2*, 297.1 > 231.2; ZEN: 319.1 > 187.2*, 319.1 > 203.0; FB1: 722.1 > 352.4*, 722.1 > 704.4; FB2: 706.1 > 336.5*, 706.1 > 688.5; FB3: 706.1 > 336.5*, 706.1 > 688.5; T-2: 489.1 > 245.1*, 489.1 > 327.0; HT-2: 447.1 > 345.3*, 447.1 > 285.1; NIV: 313.1 > 125.0*, 313.1 > 205.0; 3-ADON: 339.0 > 231.2*, 339.0 > 203.2; 15-ADON: 339.0 > 137.1*, 339.0 > 321.2; DAS: 384.2 > 307.1*, 384.2 > 247; F-X: 355.0 > 174.9*, 355 > 137.0; NEO:400.0 > 305.3*, 400.0 > 185.0; AOH: 258.9 > 185.1*, 258.9 > 213.1; AME: 272.9 > 258.2*, 272.9 > 199.3; ROQ C: 390 > 193.2*, 390 > 322.2; STERIG: 325 > 310.2*, 325 > 281.1 (*= kwantificatie ion). De kwantificatielimiet was voor AFB1, AFB2, AFG1, AFG2, OTA, DON, ZEN, FB1, FB2, FB3, T-2, HT-2, NIV, 3-ADON, 15-ADON, DAS, F-X, NEO, AOH, AME, ROQ-C, STERIG 6.41, 5.59, 7.07, 8.74, 12.60, 221.74, 65.31, 116.47, 89.15, 84.81, 34.31, 33.79, 132.53, 17.91, 11.24, 2.45, 60.68, 31.45, 43.84, 64.96, 3.97, 17.38 respectievelijk. Bijlage 4 geeft een overzicht weer van de detectielimieten, de kwantificatielimieten en de MRM transitie per mycotoxine dat werd onderzocht met m.b.v LC-MS/MS op het voeder.

2.3. Mycotoxineanalyse van serum

Het gecollecteerde serum van zowel de zeugen als de biggen werd geanalyseerd voor de mycotoxinen DON, DOM-1, ZEN, α - β -ZOL, T-2 en HT-2 met behulp van LC-MS/MS gebaseerd op Devreese et al. (2012) en Broekaert et al. (2014). Aan 250 μ L serum werd 25 μ L interne standaard (^{13}C -DON, ^{13}C -ZEN en ^{13}C -T-2 in een 1 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ oplossing) toegevoegd en 725 μ L acetonitrile (ACN). Na vortex mixen (10 sec) en centrifugatie (8517 x g, 10 min, 4 °C) werd het supernatant drooggedampt (N_2 , 40 °C). Het residu werd heropgelost in 200 μ L water, gefilterd (0.22 μm PVDF-Millex filter) en geïnjecteerd op het LC-MS/MS toestel. Scheiding van de componenten vond plaats met een Hypersil Gold (50 x 2.1 mm i.d., 1.9 μm d.p.) met een prekolom (10 x 2.1 mm i.d., 5 μm d.p.) van hetzelfde type (ThermoFisher Scientific, Breda, Nederland). Volgende mobiele fasen werden gebruikt, 0.3% azijnzuur in water/methanol (98/2, v/v) met 10 mM ammoniumactetaat (A) en 0.3% azijnzuur in water/methanol (2/98, v/v) met 10 mM ammoniumactetaat (B). Er werd een gradiëntelutie toegepast: 0-2.0 min: 85% A, 15% B; 2.0-2.1 min: lineaire gradiënt naar 45% A, 55% B; 2.1-8.0 min: 45% A, 55% B; 8.0-8.1 min: lineaire gradiënt naar 100 % B; 8.1-10.0 min: 0% A, 100 % B; 11.0-11.1 min: lineaire gradiënt naar 85% A, 15% B; 11.1-15.0 min: 85% A, 15% B.

Detectie gebeurde met een Acquity[®] UPLC system gekoppeld aan een Xevo[®] TQ-S massa spectrometer opererend in de positieve (DON, T-2 en metabolieten) of negatieve (ZEN en metabolieten) ionisatie modus (Waters, Zellik, België). In figuur 19 is deze TQ-S MS weergegeven. Volgende MRM transitie werden gevolgd voor de kwantificatie en kwalificatie van de componenten, respectievelijk: DON: 297.1 > 249.1, 297.1 > 203.4; DOM-1: 281.1 > 215.1, 281.1 > 137.0; ^{13}C -DON: 312.0 > 245.2, 312.0 > 263.0; ZEN: 317.1 > 175.0, 317.1 > 131.0; α -ZOL: 319.0 > 275.0, 319.0 > 159.9; β -ZOL: 319.0 > 159.9, 319.0 > 275.0; ^{13}C -ZEN: 335.2 > 168.9, 335.2 > 185.0; T-2: 484.0 > 245.4, 484.0 > 305.4; HT-2: 447.2 > 285.1, 447.2 > 345.1 en ^{13}C -T-2: 508.2 > 198.0, 508.2 > 228.9. De kwantificatielimiet was 0.02, 0.06, 0.01, 0.01, 0.02, 0.01 en 0.01 $\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ voor DON, DOM-1, ZEN, α -ZOL, β -ZOL, T-2 en HT-2, respectievelijk. Bijlage 5 geeft een overzicht weer van de detectielimieten, de kwantificatielimieten en de MRM transitie per mycotoxine dat werd onderzocht m.b.v LC-MS/MS op het serum.

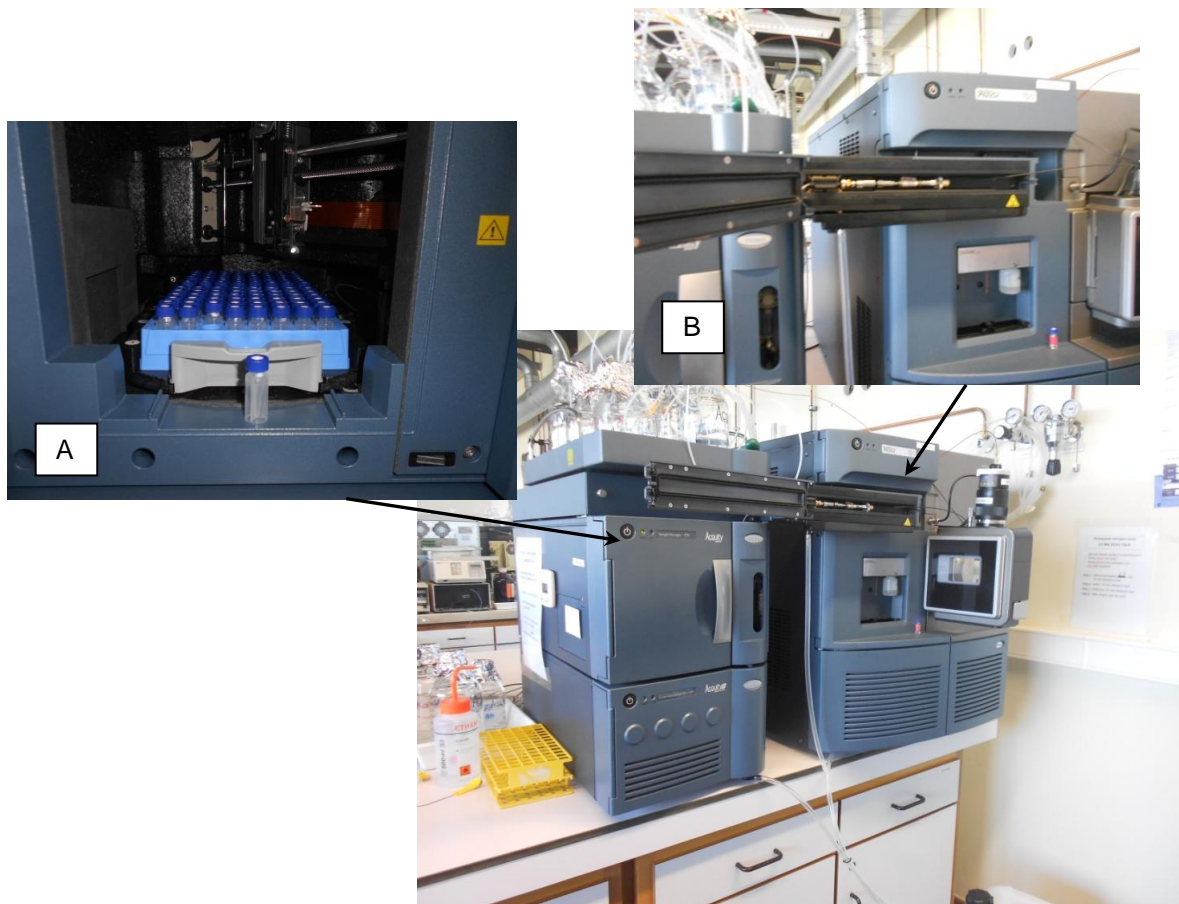


Fig 19. Detectie van mycotoxinen in het serum gebeurde met een Acquity® UPLC system gekoppeld aan een Xevo® TQ-S massa spectrometer (Waters, Zellik, België). A = Auto-sampler met de injectievials, B = UPLC systeem met zicht op de kolom.

2.4. Wateranalyse

De wateranalyse werd uitgevoerd door het DGZ waar de meeste analyses werden uitgevoerd onder ISO/IEC 17025 accreditatie. Chemische elementen werden voornamelijk via ionenchromatografie en spectrofotometrie bepaald.

2.5. Berekeningen en statistiek

Verschillen in mycotoxineconcentraties en managementgegevens tussen de probleem- en de controlebedrijven werden geëvalueerd en getoetst met IBM SPSS statistics 22 waarbij de waarden onder de kwantificatiegrens of de detectielimiet telkens werden weergegeven als de effectieve waarde van de grens van het desbetreffende mycotoxine vermenigvuldigd met $\frac{1}{2}$. Dit werd bij de voederanalyse niet toegepast omwille van de hoge positieve waarden. De significantiegrens werd gesteld op $p < 0,05$. Ook bij de berekening van de gemiddelde waarden en de standaarddeviatie per groep (probleembedrijven versus controlebedrijven) werden bij de voederanalyse geen rekening gehouden met de waarden onder de beslissinggrens, en werd het gemiddelde en de standaarddeviatie steeds berekend op basis van de positieve waarden. Bij de berekening van de gemiddelde waarden en de standaarddeviatie per groep bij de serumanalyse werd wel rekening gehouden met de waarden boven de detectielimiet en deze boven de kwantificatiegrens.

3. Resultaten

3.1. Gegevens omtrent het management en de productieresultaten

Aan de hand van de 20 volledig ingevulde vragenlijsten was het mogelijk om gegevens te vergelijken tussen enerzijds probleembedrijven en anderzijds controlebedrijven. Een significant verschil kon worden vastgesteld in het productiegetal tussen de probleembedrijven (+/- 26 biggen) en de controlebedrijven (+/- 29 biggen). Hieronder illustreren de grafieken dit significant verschil. Figuur 20 geeft een overzicht van het aantal bedrijven met een welbepaald productiegetal afhankelijk van het type bedrijf (controle- versus probleembedrijven). Figuur 21 toont de spreiding van deze productiegetallen aan binnen deze groepen.

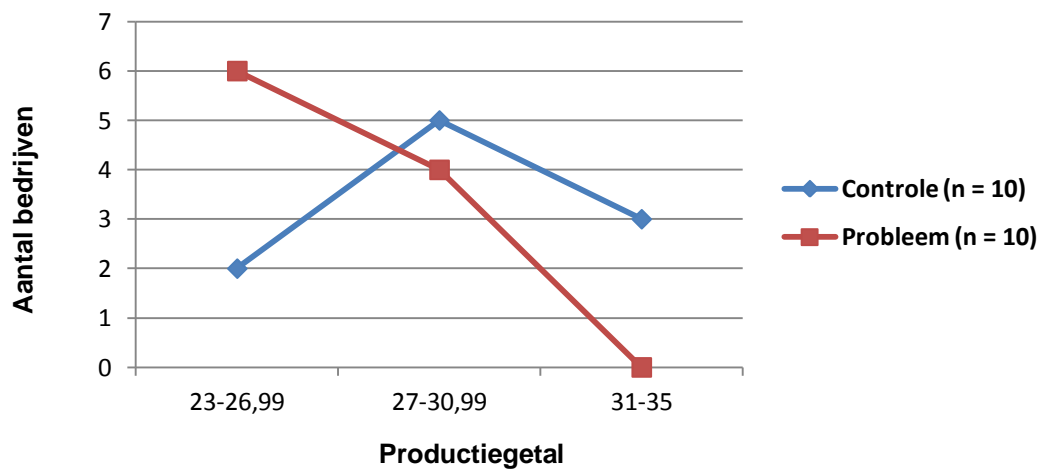


Fig. 20. Het aantal bedrijven met een bepaald productiegetal opgedeeld per type bedrijf (controle - versus probleembedrijven).

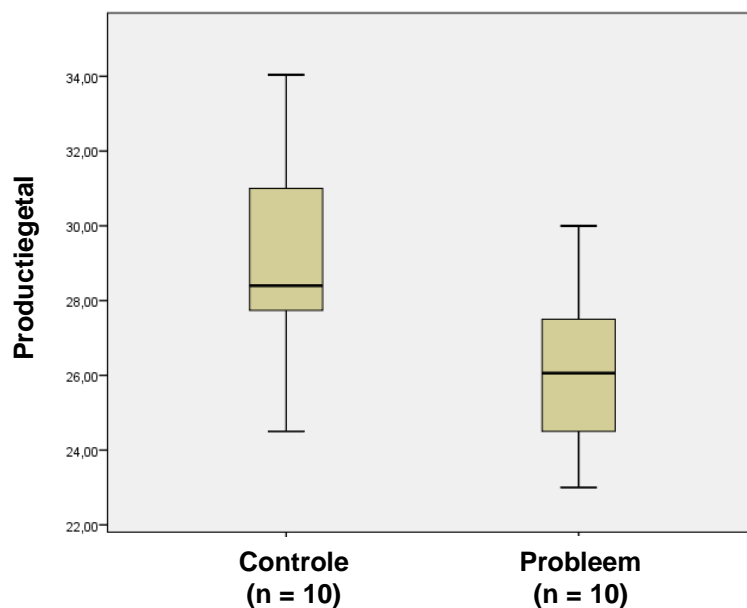


Fig. 21. Schematische weergave van de spreiding in productiegetallen van bedrijven behorende tot de probleem- of controlebedrijven.

Daarnaast zijn er nog een aantal zaken vastgesteld die niet significant verschillend zijn maar die wel relevant kunnen zijn. Zo is er een verschil in het aantal gespeende biggen per zeug met 11,17 voor de probleembedrijven en 12,35 in de controlebedrijven. Ook lijkt het dat probleembedrijven gemiddeld een big minder tellen in het aantal levend geboren biggen (13,04 t.o.v. 14,16). Dit wordt in figuur 22 geïllustreerd.

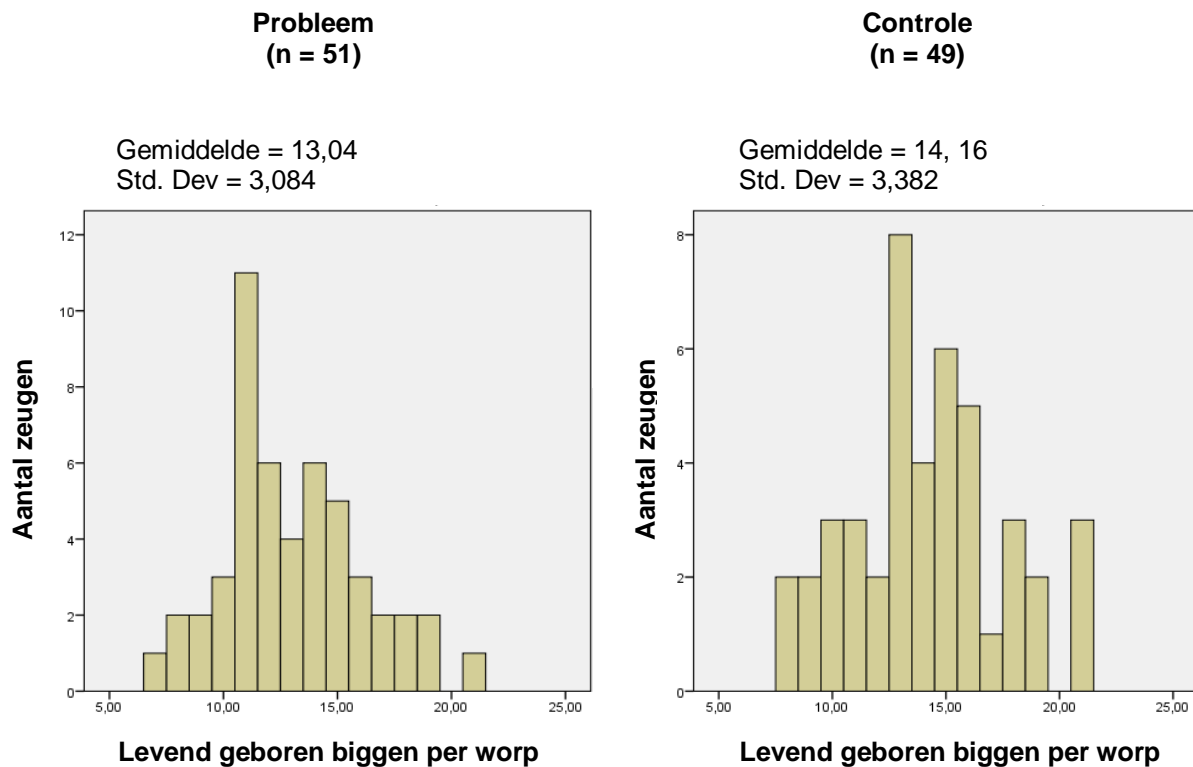


Fig. 22. Het aantal levend geboren biggen binnen de probleembedrijven (links) en de controlebedrijven (rechts).

Enkel met betrekking tot de probleembedrijven lijkt er bij een toenemende pariteit een hoger percentage van biggen aangetast te zijn met staartnecrose (figuur 23). De drachtduur zelf lijkt op zich geen invloed te hebben op het voorkomen van de staartnecrose. Al zou een kortere drachtduur resulteren in minder vitale biggen, en aldus kunnen leiden tot meer problemen maar dit is niet naar voor gekomen met de verzamelde gegevens. Ook het worpgetal heeft geen groot effect op het meer of minder optreden van staartnecrose binnen probleembedrijven (figuur 24).

Figuur 25 illustreert dat het vervangingspercentage bij de probleembedrijven hoger ligt. Zo is het gemiddelde vervangingspercentage bij de probleembedrijven 44 % en bij de controlebedrijven 36 %. Echter waren er 2 van de probleembedrijven net in overschakeling naar een ander zeugenras waardoor deze gegevens gecorrigeerd moeten worden. Indien deze 2 specifieke bedrijven met respectievelijke vervangingspercentage van 60 % en 50 % niet worden meegeteld dan wordt er een gemiddeld vervangingspercentage bij de probleembedrijven vastgesteld van 41,6 %.

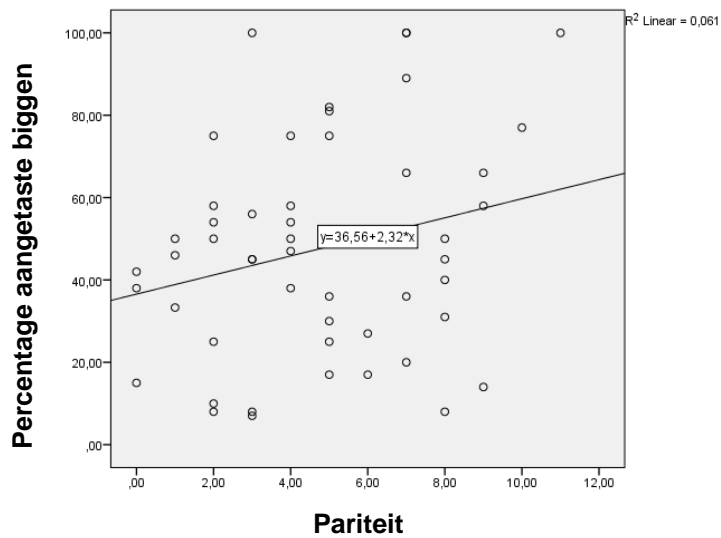


Fig 23. De correlatie tussen het percentage aangetaste biggen en de pariteit van de zeugen binnen de probleembedrijven (n= 10).

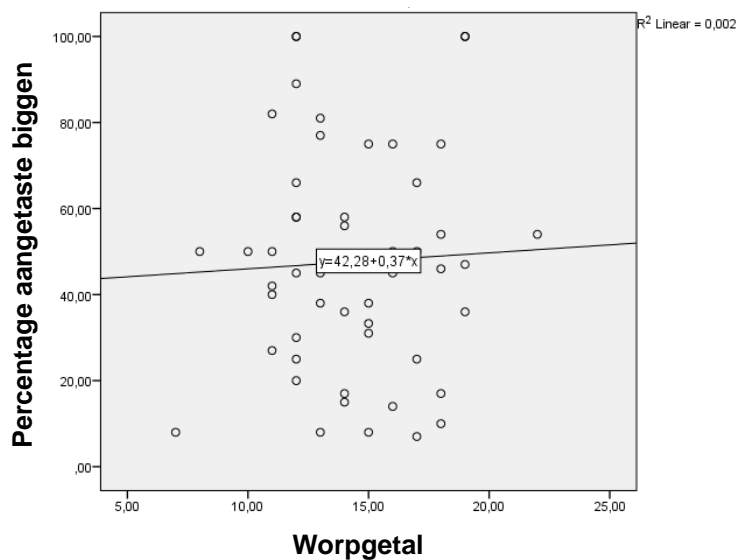


Fig. 24. Het verband tussen het percentage aangetaste biggen en de worpgrootte binnen de probleembedrijven (n=10).

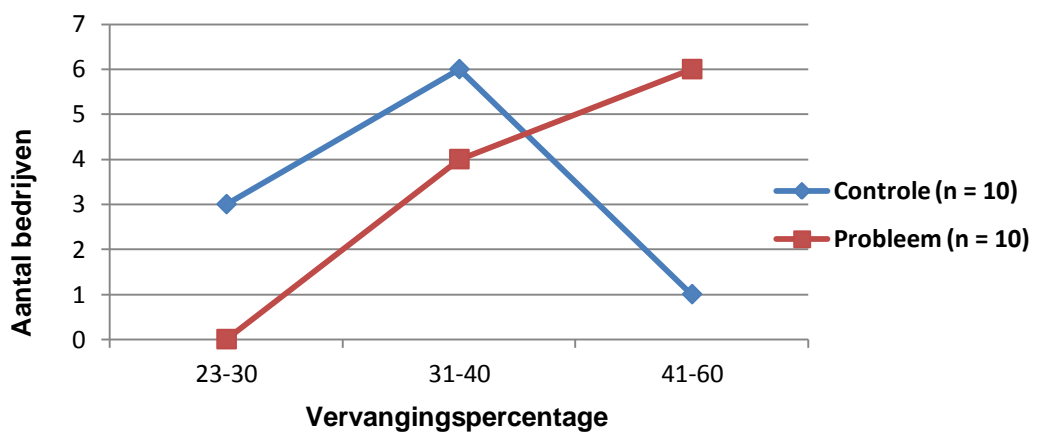


Fig. 25. De verspreiding van het aantal bedrijven met een bepaald vervangingspercentage opgedeeld per type bedrijf (controle- versus probleembedrijven).

3.2. Mycotoxinencontaminatie in het voeder

De voeders verzameld voor analyse in het kader van dit onderzoek waren deze die op het moment van de staalname werden gevoederd aan de zeugen. In tabel 15 zijn de gegevens omtrent deze voeders weergegeven.

Tabel 15

Gegevens omtrent de geanalyseerde voeders, waaronder het soort voeder, het hoofbestanddeel, het aantal dagen dat de zeugen hiermee werden gevoederd vooraleer ze bemonsterd werden en de aan- of afwezigheid van mycotoxinenbinders.

Bedrijf	Voeder op dit moment (staalname)			
	Soort	Hoofd- bestanddeel	Mycotoxinenbinders	# dagen
Probleem				
1	lacto	Tarwe	Afwezig	11
2	lacto	Maïs	Afwezig	10
3	lacto	Tarwe	Afwezig	8
4	lacto	Tarwe	Afwezig	7,5
5	lacto	Tarwe	Afwezig	1
6	lacto	Gerst – Tarwe	Afwezig	9
7	lacto	Tarwe	Afwezig	2
8	dracht	Tarwe	Afwezig	10
9	lacto	Tarwe	Afwezig	6
10	lacto	Maïs en tarwe	Afwezig	2
Controle				
11	lacto	Gerst - Tarwe	Afwezig	11 - 13
12	lacto	Tarwe	Afwezig	3 - 6
13	lacto	Tarwe	Afwezig	5
14	lacto	Tarwe	Afwezig	9
15	lacto	Tarwe	Afwezig	2 - 4
16	transitie	Maïs	Afwezig	7
17	lacto	Tarwe	Afwezig	1
18	lacto	Tarwe	Afwezig	6
19	worp	Tarwe	Afwezig	8
20	lacto	Tarwe	Afwezig	3

Uit de analyses bleek dat van de 23 onderzochte mycotoxinen slechts twaalf in minstens 1 van de voederstalen kon worden gedetecteerd. Tabel 16 geeft een overzicht van de mycotoxinenconcentraties die werden vastgesteld. DON kon in alle stalen gekwantificeerd worden, met een gemiddelde concentratie van $484 \pm 212,21 \mu\text{g.kg}^{-1}$ bij de probleembedrijven en $257,40 \pm 89,18 \mu\text{g.kg}^{-1}$ bij de controlebedrijven. Deze gemiddelde concentraties zijn significant verschillend.

Tabel 16

De resultaten van de voederanalyse voor de 12 mycotoxinen die werden gedetecteerd in minstens één voeder, namelijk DON, ZEN, T-2, NIV, 3-ADON, 15-ADON, AOH, STERIG, FB1, FB2 en ROQ-C. Deze resultaten zijn weergegeven in functie van het type bedrijf (problemebedrijf - controlebedrijf).

Type bedrijf	Voederanalyse: gedetecteerde mycotoxinen ($\mu\text{g.kg}^{-1}$)													
Probleem	DON	ZEN	T-2	HT-2 + T2	NIV	3-ADON	15-ADON	3-ADON + 15-ADON	AOH	STERIG	FB1	FB2	FB1 + FB2	ROQ-C
1	396								15					
2	283				39°									
3	392													
4	226								24°					
5	403													
6	363		23°	23										
7	653					37	112	149						
8	487	54												
9	753	214					111	111		8,3°				
10	884	199			42°	29	106	134		28	105°		105	
Gemiddelde	484	155,67	23	23	40,50	33	109,67	131,30	19,50	18,15	105		105	
Std Deviatie	212,21	88,36			2,12	5,66	3,21	19,14	6,36	13,93				
Controle														
11	104°								19°		110°	62°	172	
12	308	70									98°		98	2,7°
13	172°													
14	238													
15	247													
16	345													
17	408					18°	60	78						
18	309	147												32°
19	189°													
20	254													
Gemiddelde	257,40	108,50				18	60	78			104	62	135	17,35
Std Deviatie	89,18	54,45									8,49		52,33	20,72
Totaal														
Gemiddelde	370,70	136,80	23	23	40,50	28	97,25	118	19,33	18,15	104,33	62	125	17,35
Std Deviatie	196,50	72,89			2,12	9,54	24,97	30,91	4,51	13,93	6,03		40,85	20,72

Nota; het gemiddelde werd berekend op basis van de waarden boven de beslissingsgrens; lege vakjes = minder dan de beslissingsgrens, ° = de resultaten liggen buiten de vastgestelde range van de methode (buiten de kalibratiecurve).

Aanvullend illustreert figuur 26 dat per type bedrijf de gedetecteerde concentraties aan DON in het voeder normaal verdeeld zijn rond het gemiddelde.

Het tweede meest gedetecteerde mycotoxine, met name ZEN, werd in 3 probleembedrijven vastgesteld met een gemiddelde concentratie van $155,67 \pm 88,36 \mu\text{g.kg}^{-1}$ en in 2 controlebedrijven met een gemiddelde concentratie van $108,5 \pm 54,45 \mu\text{g.kg}^{-1}$. Voor T-2 werd enkel één positief staal van $23 \mu\text{g.kg}^{-1}$ vastgesteld bij een probleembedrijf. Daarnaast werden er voor 3- en 15- ADON meer waarden boven de kwantificatielimiet vastgesteld bij de probleembedrijven dan bij de controlebedrijven. Voor 3-ADON waren er bij de probleembedrijven 2 positieve stalen met een gemiddelde concentratie van $33 \pm 5,66 \mu\text{g.kg}^{-1}$ en van de controlebedrijven werd er slechts één positieve waarde van $18 \mu\text{g.kg}^{-1}$ vastgesteld. In 3 van de 10 voederstalen van de probleembedrijven werd ook 15-ADON vastgesteld met een gemiddelde concentratie van $109,67 \pm 3,21 \mu\text{g.kg}^{-1}$ terwijl slechts één voederstaal van de controlebedrijven positief testte met een waarde van $60 \mu\text{g.kg}^{-1}$. Ook nog andere mycotoxinen hadden waarden boven de kwantificatielimiet, maar deze zijn in het kader van deze masterproef en de problemen rond neonatale staartnecrose niet van toepassing.

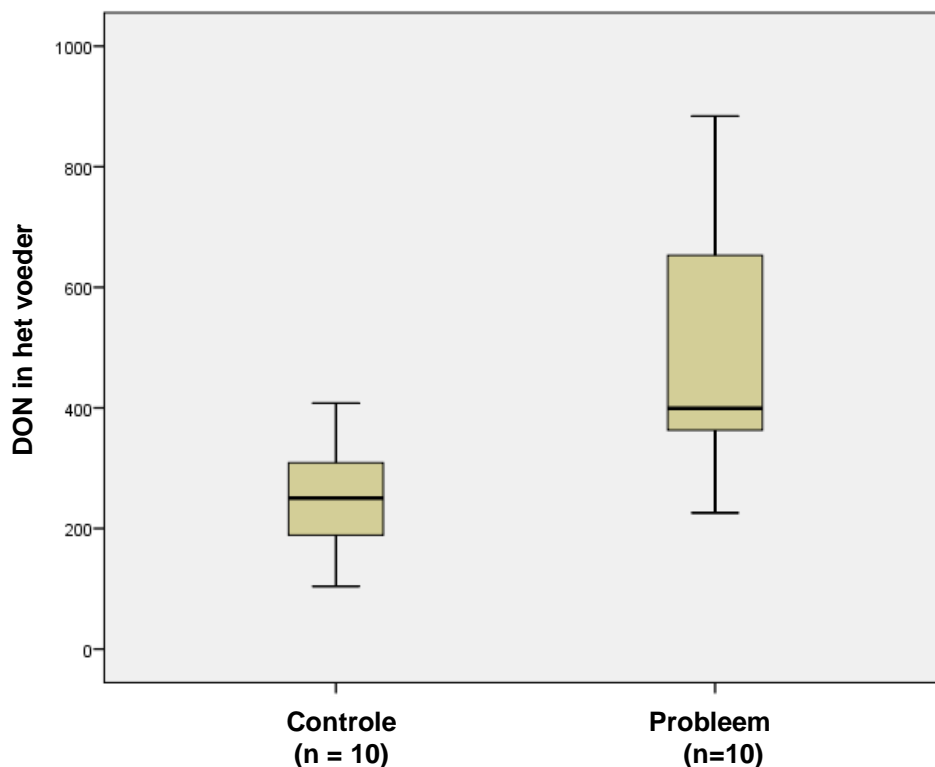


Fig. 26. Schematische weergave van de verdeling van de concentraties DON in het voeder t.o.v. de gemiddelde waarde per groep (probleembedrijven versus de controlebedrijven).

3.3. Mycotoxinen in het zeugenserum

In bijlage 5 is een volledig overzicht gegeven van de resultaten van de analyse van o.a. het zeugenserum. DON kon gedetecteerd worden in 89% van de stalen hiervan afkomstig. Van deze positieve stalen waren er 45 afkomstig van probleembedrijven en 44 van controlebedrijven. ZEN en de metabolieten α -ZOL en β -ZOL daarentegen konden slechts in een beperkt aantal stalen worden gekwantificeerd terwijl DOM-1, T-2 en HT-2 in geen enkel staal boven de LOQ kon worden waargenomen.

Wanneer de DON serumconcentraties tegen elkaar worden geplaatst in functie van het type bedrijf, dan kan een significant verschil vastgesteld worden. De gemiddelde concentraties in het serum van de zeugen bedraagt $0,967 \pm 0,692 \text{ ng.mL}^{-1}$ op de probleembedrijven terwijl deze op de controlebedrijven slechts $0,510 \pm 0,311 \text{ ng.mL}^{-1}$ bedraagt. In figuur 27 is duidelijk te zien dat er op de probleembedrijven een grotere spreiding binnen de groep zeugen is. Wanneer de concentraties aan DON in het serum worden uitgezet op het aantal stalen dan wordt er geen mooie normaalverdeling bekomen (figuur 28). Vermoedelijk wordt de eerste piek veroorzaakt door de vele waarden beneden de detectie- en kwantificatiegrens waarbij telkens de helft van de betreffende grenswaarde werd genomen voor de statistische berekeningen.

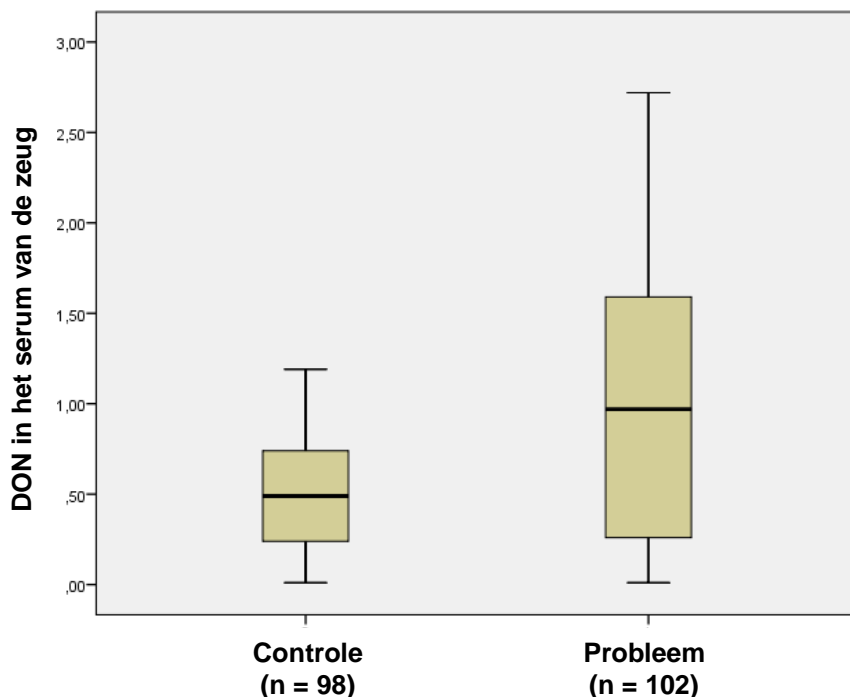


Fig. 27. Schematische weergave van de variatie aan serumconcentraties aan DON gedetecteerd bij zeugen per groep.

Tabel 17

De gedetecteerde concentraties aan DON, T-2 en ZEN in het voeder alsook de gedetecteerde concentraties aan DON, DOM-1, ZEN, α -ZOL, β -ZOL, T-2 en HT-2 in het zeugenserum weergegeven als gemiddelde per bedrijf.

Type Bedrijf	Voederanalyse ($\mu\text{g.kg}^{-1}$)			Serumanalyse: Gemiddelde waarden van de zeugen per bedrijf (ng.mL^{-1})						
	DON	ZEN	T-2	DON	DOM-1	ZEN	α -ZOL	β -ZOL	T-2	HT-2
Probleem										
1	396			0,957	0,088	0,048	0,05	0,05	0,05	0,05
2	283			0,278	0,086	0,005	0,05	0,05	0,05	0,05
3	392			0,066	0,044	0,005	0,05	0,05	0,05	0,05
4	226			0,542	0,1	0,005	0,05	0,01	0,05	0,05
5	403			1,5	0,1	0,005	0,05	0,01	0,05	0,05
6	363		23	0,344	0,1	0,005	0,005	0,01	0,05	0,05
7	653			1,112	0,1	0,005	0,005	0,01	0,05	0,005
8	487	54		0,892	0,1	0,005	0,005	0,01	0,05	0,005
9	753	214		1,902	0,086	0,023	0,005	0,01	0,005	0,005
10	884	199		2,096	0,086	0,005	0,05	0,03	0,005	0,005
Gemiddelde	484	155,670	23	0,967	0,089	0,011	0,032	0,024	0,041	0,032
Std deviatie	212,21	88,36		0,6924	0,0172	0,0142	0,0232	0,0190	0,0190	0,0232
Controle										
11	104			0,072	0,1	0,005	0,005	0,01	0,05	0,005
12	308	70		0,926	0,086	0,507	0,005	0,01	0,005	0,005
13	172			0,48	0,1	0,238	0,005	0,01	0,005	0,005
14	238			0,805	0,0825	0,045	0,005	0,0125	0,00625	0,00625
15	247			0,096	0,1	0,005	0,05	0,01	0,005	0,005
16	345			0,36	0,1	0,005	0,12	0,01	0,005	0,005
17	408			0,418	0,1	0,005	0,05	0,042	0,005	0,005
18	309	147		0,974	0,1	0,005	0,05	0,066	0,005	0,005
19	189			0,482	0,1	0,005	0,05	0,048	0,005	0,005
20	254			0,488	0,1	0,005	0,05	0,02	0,005	0,005
Gemiddelde	257,4	108,5		0,510	0,097	0,083	0,039	0,024	0,010	0,005
Std deviatie	89,18	54,45		0,3112	0,0067	0,1659	0,0362	0,0205	0,0142	0,00039
Totaal										
Gemiddelde	370,7	136,8	23	0,740	0,093	0,047	0,036	0,024	0,025	0,019
Std Deviatie	196,50	72,89		0,5730	0,0133	0,1203	0,0298	0,0192	0,0229	0,0211

Nota; de berekeningen bij de concentraties in het voeder werden uitgevoerd op basis van de positieve resultaten. De berekeningen omtrent de concentraties in het serum daarentegen werden uitgevoerd rekening houdend met de waarden onder de detectiegrens / kwantificatielimit. In de berekeningen werden volgende gegevens ingebracht: minder dan de detectielimiet ($< \text{LOD}$) = $\text{LOD}/2$ (LOD voor DON = $0,02 \text{ ng.mL}^{-1}$, DOM-1 = $0,06 \text{ ng.mL}^{-1}$, ZEN = $0,01 \text{ ng.mL}^{-1}$, α -ZOL = $0,01 \text{ ng.mL}^{-1}$, β -ZOL = $0,02 \text{ ng.mL}^{-1}$, T-2 = $0,01 \text{ ng.mL}^{-1}$ en HT-2 = $0,01 \text{ ng.mL}^{-1}$), minder dan de kwantificatielimit (lege vakjes) = $\text{LOQ}/2$ (LOQ voor DOM-1 = $0,2 \text{ ng.mL}^{-1}$, LOQ voor alle andere analyten = $0,1 \text{ ng.mL}^{-1}$); ° = de resultaten liggen buiten de vastgestelde range van de methode (buiten de kalibratiecurve). Voor de absolute waarden van de concentratie in de serumstalen wordt verwezen naar bijlage 6.

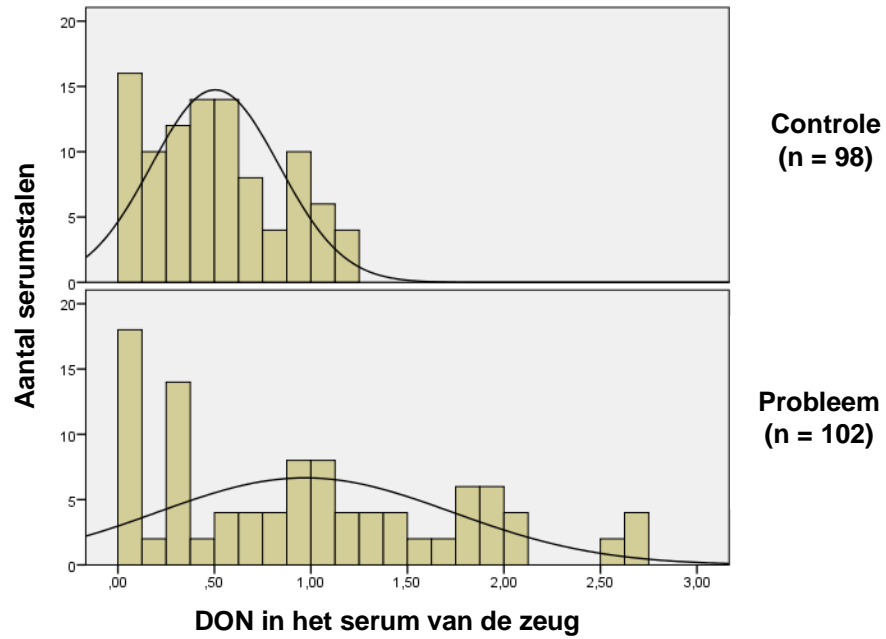


Fig. 28. Schematische weergave van het aantal serumstalen met een bepaalde serumconcentratie aan DON gedetecteerd bij zeugen per groep (controle- versus probleembedrijf).

Daarnaast is er ook een positieve correlatie vastgesteld tussen het gehalte aan DON in het voeder en de concentraties aan DON in het serum van de zeug met correlatie-coëfficiënt 0.703. Deze wordt schematisch weergegeven in figuur 29.

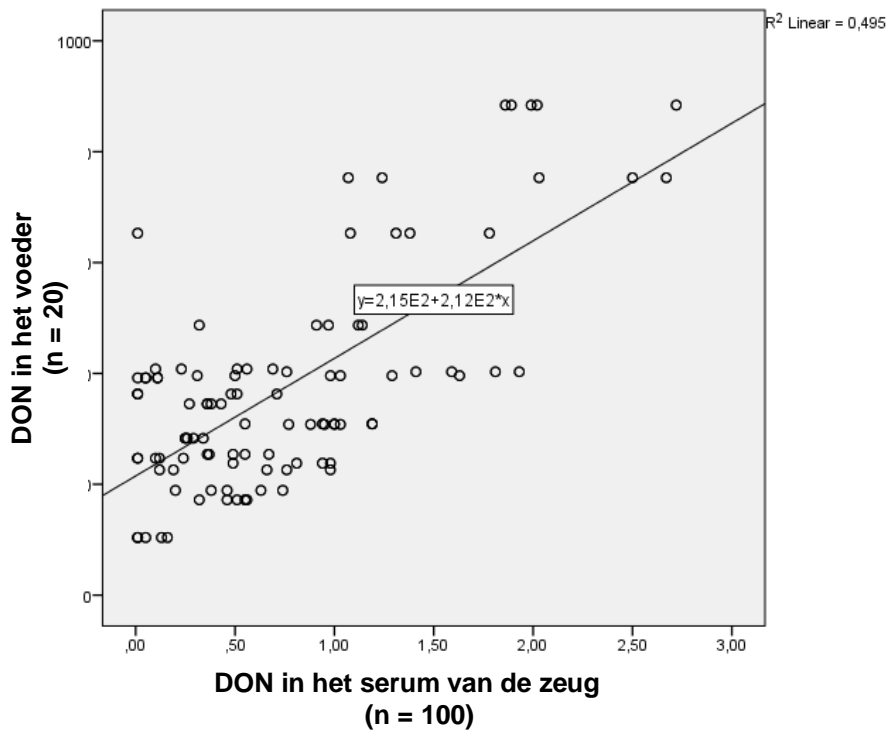


Fig. 29. Schematische weergave van de positieve correlatie tussen het gehalte aan DON in het voeder en de concentraties aan DON in het serum van de zeug.

3.4. Mycotoxinen in het biggenserum

In tabel 18 is een overzicht weergegeven van de resultaten van de voederanalyse en de serumanalyse van de biggen op bedrijfsniveau en per groep (probleembedrijven versus controlebedrijven). Om enkel relevante gegevens te vergelijken werden enkel de mycotoxinen in het voeder weergegeven die ook in het serum werden onderzocht, met name DON, ZEN en T-2. Een volledig overzicht van de resultaten van o.a. het biggenserum is weergegeven in bijlage 5. DON is het enige mycotoxine dat ook in het biggenserum in voldoende stalen en in voldoende bedrijven gekwantificeerd kon worden om verdere statistische berekeningen op uit te voeren. Figuur 30 toont aan dat de concentraties aan DON in het biggenserum over alle bedrijven niet normaal verdeeld zijn, evenmin als de verdelingen van de DON-concentraties in het biggenserum binnen de controle- en probleembedrijven (figuur 31). Ook bij de verschillende transformaties werd de verdeling van deze variabele niet normaal. Dit kan verklaard worden door de vele waarden onder de detectie- en kwantificatiegrens, waarvoor telkens de helft van de betreffende waarde werd genomen bij de statistische berekeningen. De gemiddelde DON-concentratie per big in het serum bedraagt $0,033 \pm 0,040 \text{ ng.mL}^{-1}$. Bij de probleembedrijven is de gemiddelde concentratie DON in het biggenserum $0,049 \pm 0,051 \text{ ng.mL}^{-1}$ en bij de controlebedrijven ligt dit gemiddelde op $0,017 \pm 0,015 \text{ ng.mL}^{-1}$. Er is dus duidelijk een verschil tussen beide groepen, waarbij zowel de gemiddelde concentratie aan DON als de standaardafwijking bij de probleembedrijven hoger ligt dan bij de controlebedrijven, maar een significant verschil kon niet aangetoond worden op basis van deze gegevens.

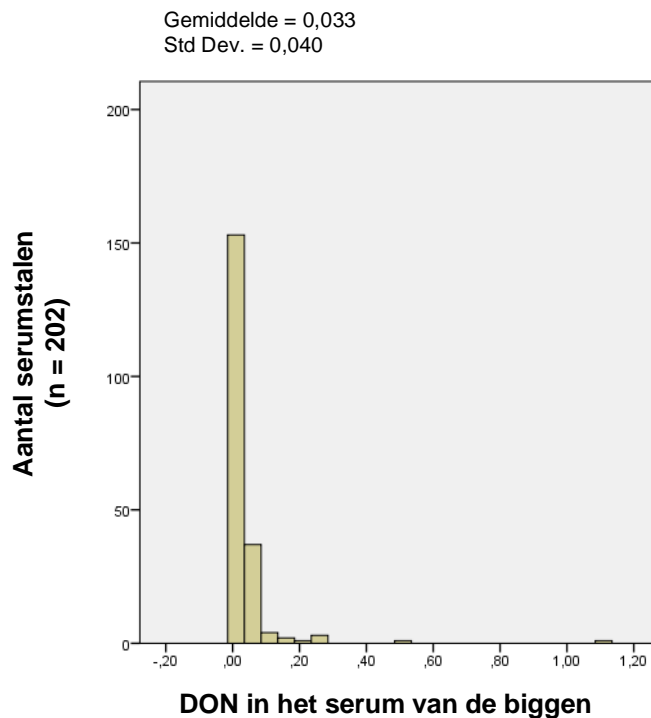


Fig. 30. De verdeling van de concentraties aan DON in het biggenserum over alle bedrijven.

Tabel 18

De gedetecteerde concentraties aan DON, T-2 en ZEN in het voeder alsook de gedetecteerde concentraties aan DON, DOM-1, ZEN, α -ZOL, β -ZOL, T-2 en HT-2 in het biggenserum weergegeven als gemiddelde per bedrijf.

Type Bedrijf	Voederanalyse ($\mu\text{g.kg}^{-1}$)			Serumanalyse: Gemiddelde waarden van de biggen per bedrijf (ng.mL^{-1})						
	DON	ZEN	T-2	DON	DOM-1	ZEN	α -ZOL	β -ZOL	T-2	HT-2
1	396			0,051	0,042	0,050	0,05	0,072	0,05	0,05
2	283			0,026	0,051	0,005	0,05	0,067	0,05	0,05
3	392			0,094	0,058	0,005	0,05	0,092	0,05	0,05
4	226			0,01	0,117	0,005	0,05	0,014	0,05	0,05
5	403			0,085	0,119	0,005	0,041	0,018	0,05	0,05
6	363		23	0,01	0,114	0,005	0,005	0,018	0,05	0,05
7	653			0,014	0,1	0,005	0,005	0,01	0,05	0,005
8	487	54		0,018	0,1	0,005	0,005	0,01	0,05	0,005
9	753	214		0,165	0,093	0,162	0,005	0,01	0,005	0,005
10	884	199		0,018	0,086	0,028	0,05	0,05	0,005	0,005
Gemiddelde	484	155,67	23	0,0491	0,0880	0,0275	0,0311	0,0361	0,0410	0,0320
Std Deviatie	212,21	88,36		0,0511	0,0282	0,0496	0,0226	0,0312	0,0190	0,0232
Controle										
11	104			0,01	0,1	0,005	0,005	0,01	0,05	0,005
12	308	70		0,01	0,1	0,1325	0,005	0,01	0,005	0,005
13	172			0,058	0,093	0,005	0,0095	0,01	0,005	0,005
14	238			0,01	0,11625	0,1543	0,00625	0,0125	0,00625	0,00625
15	247			0,01	0,093	0,0395	0,05	0,01	0,005	0,005
16	345			0,01	0,1	0,005	0,05	0,01	0,005	0,005
17	408			0,014	0,1	0,0095	0,05	0,014	0,005	0,005
18	309	147		0,022	0,093	0,0185	0,05	0,014	0,005	0,005
19	189			0,018	0,1	0,005	0,05	0,013	0,005	0,005
20	254			0,01	0,1	0,005	0,05	0,01	0,005	0,005
Gemiddelde	257,4	108,5		0,0172	0,0995	0,0379	0,0326	0,0114	0,0096	0,0051
Std Deviatie	89,18	54,45		0,0149	0,0067	0,0569	0,0225	0,0018	0,0142	0,000395
Totaal										
Gemiddelde	370,7	136,8	23	0,0332	0,0938	0,0327	0,0318	0,0237	0,0253	0,0186
Std Deviatie	196,50	72,89		0,0401	0,0208	0,0522	0,0220	0,0250	0,0229	0,02111

Nota; de berekeningen bij de concentraties in het voeder werden uitgevoerd op basis van de positieve resultaten. De berekeningen omtrent de concentraties in het serum daarentegen werden uitgevoerd rekening houdend met de waarden onder de detectiegrens / kwantificatielimit. In de berekeningen werden volgende gegevens ingebracht: minder dan de detectielimit ($< \text{LOD}$) = $\text{LOD}/2$ (LOD voor DON = $0,02 \text{ ng.mL}^{-1}$, DOM-1 = $0,06 \text{ ng.mL}^{-1}$, ZEN = $0,01 \text{ ng.mL}^{-1}$, α -ZOL = $0,01 \text{ ng.mL}^{-1}$, β -ZOL = $0,02 \text{ ng.mL}^{-1}$, T-2 = $0,01 \text{ ng.mL}^{-1}$ en HT-2 = $0,01 \text{ ng.mL}^{-1}$), minder dan de kwantificatielimit (lege vakjes) = $\text{LOQ}/2$ (LOQ voor DOM-1 = $0,2 \text{ ng.mL}^{-1}$, LOQ voor alle andere analyten = $0,1 \text{ ng.mL}^{-1}$); ° = de resultaten liggen buiten de vastgestelde range van de methode (buiten de kalibratiecurve). Voor de absolute waarden van de concentratie in de serumstalen wordt verwezen naar bijlage 6.

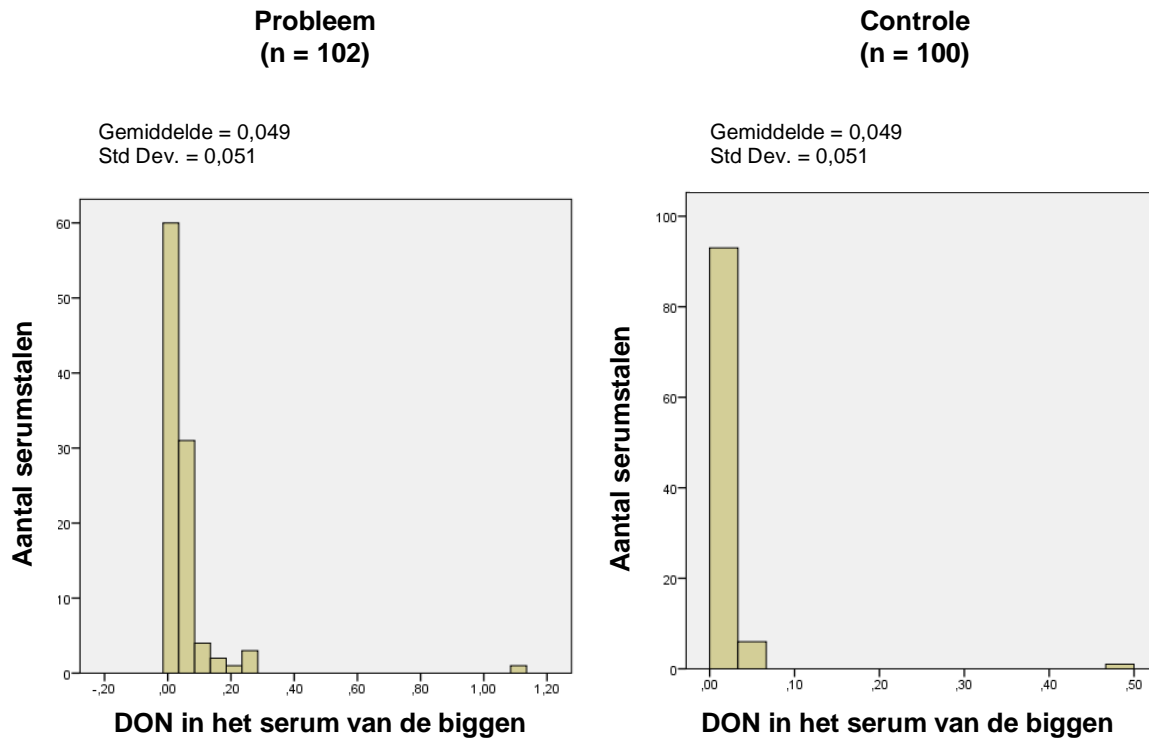


Fig. 31. De verdeling van de concentraties aan DON in het biggenserum bij de probleembedrijven (links) en de controlebedrijven (rechts).

Op basis van de resultaten van de voederanalyse en de analyse van het biggenserum (tabel 18) kon tussen de DON-concentratie in het voeder en het DON aanwezig in het serum van de biggen een positieve correlatie aangetoond worden waarbij de correlatiecoëfficiënt 0,33 bedraagt. Deze is echter te laag om als relevant te beschouwen. Ook tussen de mycotoxingehalten in het biggenserum en in het zeugenserum werd een correlatiecoëfficiënt van 0,181 vastgesteld, maar ook deze is te laag om als relevant te beschouwen. Aanvullend wordt in tabel 19 een overzicht gegeven van de analyseresultaten van het serum van de biggen en het serum van de zeugen.

3.5. Wateranalyse

Van de 20 stalen onderzocht door het DGZ was er slechts 1 staal dat volledig aan de normen voldeed. Alle andere waterstalen waren afwijkend in minstens 1 parameter. In tabel 20 zijn de uitslagen van de wateranalyse weergegeven. De meest vastgestelde afwijkende parameters zijn de sulfietreducerende *Clostridia* en de intestinale Enterokokken. Uit deze en de andere parameters werden geen significante verschillen vastgesteld met betrekking tot de probleembedrijven.

Tabel 19

De gemiddelde gedetecteerde concentraties aan DON, DOM-1, ZEN, α -ZOL, β -ZOL, T-2 en HT-2 in het serum van de zeugen en de biggen per groep (probleembedrijven versus controlebedrijven).

Type Bedrijf	Serumanalyse							Serumanalyse						
	Gemiddelde waarden van de zeugen per bedrijf (ng.mL ⁻¹)							Gemiddelde waarden van de biggen per bedrijf (ng.mL ⁻¹)						
Probleem	DON	DOM-1	ZEN	α -ZOL	β -ZOL	T-2	HT-2	DON	DOM-1	ZEN	α -ZOL	β -ZOL	T-2	HT-2
1	0,957	0,088	0,048	0,05	0,05	0,05	0,05	0,051	0,042	0,050	0,05	0,072	0,05	0,05
2	0,278	0,086	0,005	0,05	0,05	0,05	0,05	0,026	0,051	0,005	0,05	0,067	0,05	0,05
3	0,066	0,044	0,005	0,05	0,05	0,05	0,05	0,094	0,058	0,005	0,05	0,092	0,05	0,05
4	0,542	0,1	0,005	0,05	0,01	0,05	0,05	0,01	0,117	0,005	0,05	0,014	0,05	0,05
5	1,5	0,1	0,005	0,05	0,01	0,05	0,05	0,085	0,119	0,005	0,041	0,018	0,05	0,05
6	0,344	0,1	0,005	0,005	0,01	0,05	0,05	0,01	0,114	0,005	0,005	0,018	0,05	0,05
7	1,112	0,1	0,005	0,005	0,01	0,05	0,005	0,014	0,1	0,005	0,005	0,01	0,05	0,005
8	0,892	0,1	0,005	0,005	0,01	0,05	0,005	0,018	0,1	0,005	0,005	0,01	0,05	0,005
9	1,902	0,086	0,023	0,005	0,01	0,005	0,005	0,165	0,093	0,162	0,005	0,01	0,005	0,005
10	2,096	0,086	0,005	0,05	0,03	0,005	0,005	0,018	0,086	0,028	0,05	0,05	0,005	0,005
Gemiddelde	0,9670	0,0890	0,0110	0,0320	0,0240	0,0410	0,0320	0,0491	0,088	0,0275	0,0311	0,0361	0,0410	0,0320
Std Deviatie	0,6924	0,0172	0,0142	0,0232	0,0190	0,0190	0,0232	0,0511	0,0282	0,0496	0,0226	0,0312	0,0190	0,0232
Controle														
11	0,072	0,1	0,005	0,005	0,01	0,05	0,005	0,01	0,1	0,005	0,005	0,01	0,05	0,005
12	0,926	0,086	0,507	0,005	0,01	0,005	0,005	0,01	0,1	0,1325	0,005	0,01	0,005	0,005
13	0,48	0,1	0,238	0,005	0,01	0,005	0,005	0,058	0,093	0,005	0,0095	0,01	0,005	0,005
14	0,805	0,0825	0,045	0,005	0,0125	0,00625	0,00625	0,01	0,11625	0,1543	0,00625	0,0125	0,00625	0,00625
15	0,096	0,1	0,005	0,05	0,01	0,005	0,005	0,01	0,093	0,0395	0,05	0,01	0,005	0,005
16	0,36	0,1	0,005	0,12	0,01	0,005	0,005	0,01	0,1	0,005	0,05	0,01	0,005	0,005
17	0,418	0,1	0,005	0,05	0,042	0,005	0,005	0,014	0,1	0,0095	0,05	0,014	0,005	0,005
18	0,974	0,1	0,005	0,05	0,066	0,005	0,005	0,022	0,093	0,0185	0,05	0,014	0,005	0,005
19	0,482	0,1	0,005	0,05	0,048	0,005	0,005	0,018	0,1	0,005	0,05	0,013	0,005	0,005
20	0,488	0,1	0,005	0,05	0,02	0,005	0,005	0,01	0,1	0,005	0,05	0,01	0,005	0,005
Gemiddelde	0,5101	0,0970	0,0830	0,0390	0,0240	0,0100	0,005	0,0172	0,0995	0,0379	0,0326	0,0114	0,0096	0,0051
Std Deviatie	0,3112	0,0067	0,1659	0,0362	0,0205	0,0142	0,00039	0,0149	0,0067	0,0569	0,0225	0,0018	0,0142	0,000395
Totaal														
Gemiddelde	0,7395	0,0929	0,0468	0,0355	0,0239	0,0253	0,0186	0,0332	0,0938	0,0327	0,0318	0,0237	0,0253	0,0186
Std Deviatie	0,5730	0,0133	0,1203	0,0298	0,0192	0,0229	0,0211	0,0401	0,0208	0,0522	0,0220	0,0250	0,0229	0,02111

Nota; de berekeningen bij de concentraties in het voeder werden uitgevoerd op basis van de positieve resultaten. De berekeningen omtrent de concentraties in het serum daarentegen werden uitgevoerd rekening houdend met de waarden onder de detectiegrens / kwantificatielimit. In de berekeningen werden volgende gegevens ingebracht: minder dan de detectielimiet (< LOD) = LOD/2 (LOD voor DON = 0,02 ng.mL⁻¹, DOM-1 = 0,06 ng.mL⁻¹, ZEN = 0,01 ng.mL⁻¹, α -ZOL = 0,01 ng.mL⁻¹, β -ZOL = 0,02 ng.mL⁻¹, T-2 = 0,01 ng.mL⁻¹ en HT-2 = 0,01 ng.mL⁻¹), minder dan de kwantificatielimit (lege vakjes) = LOQ/2 (LOQ voor DOM-1 = 0,2 ng.mL⁻¹, LOQ voor alle andere analyten = 0,1 ng.mL⁻¹); ° = de resultaten liggen buiten de vastgestelde range van de methode (buiten de kalibratiecurve). Voor de absolute waarden van de concentratie in de serumstalen wordt verwezen naar bijlage 6.

Tabel 20

De gegevens omtrent de watervoorziening in de kraamstal en de resultaten van de wateranalyse. Hierin zijn de afwijkende zaken weergegeven waaronder de te hoge waarden in sulfietreducerende Clostridia, intestinale Enterokokken, totaal aëroob kiemgetal bij een omgevingstemperatuur van 22°C, ammoniumgehalte en totale hardheid. Ook afwijkingen in fysische eigenschappen, geur en kleur zijn weergegeven.

Watervoorziening in de kraamstal				Afwijkend in de wateranalyse							
N°	Soort water	Desinfectie	Zuren	Sulfiet-reducerende Clostridia	Intestinale Enterokokken	Totaal Aëroob kiemgetal 22°C	NH ₃	Totale hardheid	Fysisch	Geur	Kleur
Probleem											
1	Putwater (100m)	CD	/		+						
2	Oppervlaktewater	CS	/	+				+		Licht	geel
3	Leidingwater Regenwater	/	/		+					Licht	
4	Putwater (140 m) Regenwater	CD	Ja	+	+						
5	Putwater (50 m)	/	/	+	+			+			
6	Putwater (158 m)	CD	/	+							
7	Putwater (140 m)	/	/		+						
8	Putwater (25 m)	/	/	+					Zwart bezinksel		
9	Putwater (136 m)	/		+	+	+					
10	Putwater (136 m)	CD	/								

Watervoorziening in de kraamstal
Afwijkend in de wateranalyse

N°	Soort water	Desinfectie	Zuren	Sulfiet-reducerende <i>Clostridia</i>	Intestinale Enterokokken	Totaal Aëroob kiemgetal 22°C	NH ₃	Totale hardheid	Fysisch	Geur	Kleur
Controle											
11	Leidingwater	CD	/	+	+						
12	Putwater (3 m) Regenwater Oppervlaktewater	/	/	+	+						Bruin
13	Putwater (9m) Regenwater Oppervlaktewater	/	/	+	+			+			
14	Putwater (4m) Regenwater Oppervlaktewater	/	ja	+			+			sterk	
15	Putwater (6m) Regenwater Oppervlaktewater	/	/	+	+			+			
16	Putwater (80 m)	/	/	+	+						
17	Putwater (2,5 m) Regenwater Oppervlaktewater	/	/		+			+			
18	Oppervlaktewater	NaOCl	/	+	+						
19	Regenwater Oppervlaktewater	H ₂ O ₂	ja	+	+					Licht	Geel
20	Regenwater Oppervlaktewater	CD	/	+	+						

Nota; lege vakjes = binnen de normwaarde, + = boven de normwaarde, CD = Chloordioxide (99,9%), CS = Chloorstabilisator, H₂O₂ = waterstofperoxide, NaOCl = natriumhypochloriet, NH₃ = ammonium. Normwaarden voor Sulfietreducerende Clostridia = < 1 kve/20mL, Intestinale enterokokken = < 1 kve/100 mL, Totaal aëroob kiemgetal 22°C = < 100 000 kve.mL⁻¹, Ammonium = ≤ 2,0 mg.L⁻¹, Totale hardheid = ≤ 20°D, Fysisch = helder, Geur = geurloos, Kleur = kleurloos (naar www.dgz.be/publicatie/normen-wateronderzoek).

4. Bespreking

Dit onderzoek heeft aangetoond dat DON één van de factoren is die een belangrijke rol speelt in de pathogenese van neonatale staartnecrose. Zo werd in dit onderzoek een significant verschil aangetoond tussen de concentraties DON in het voeder van probleembedrijven en het voeder van controlebedrijven. Ook al bevinden alle concentraties in het voeder zich beneden de richtlijn van de Europese Unie met name $0,9 \text{ mg.kg}^{-1}$, toch zouden deze lage concentraties aanleiding kunnen geven tot nadelige effecten. Als mogelijke verklaring kan het zijn dat de analysetechniek niet alle relevante metabolieten heeft kunnen waarnemen. Zo kunnen gemaskeerde vormen in het voeder aanwezig zijn die niet worden gedetecteerd maar in het lichaam wel toxiciteit kunnen veroorzaken. Daarnaast kunnen ook synergetische en additieve werkingen tussen mycotoxinen of metabolieten een grote rol spelen. De vaststelling van bepaalde lage concentraties DON in het voeder van probleembedrijven is aansluitend een indicatie dat niet alleen mycotoxinen in hun zuivere vorm dit effect geven. Het optreden van co-exposure, de aanwezigheid van metabolieten en structuuranalogen, alsook andere factoren waaronder deze die omgeving en gastheer beïnvloeden spelen wellicht allemaal een rol. Verder onderzoek is nodig om na te gaan hoe deze factoren inwerken op elkaar en leiden tot ongunstige symptomen zoals staartnecrose. Bij de staalname van het voeder werd telkens voeder genomen dat op het moment van de staalname aan de zeugen werd gegeven. Het is gekend dat DON geen accumulerende eigenschappen bezit wat ook in dit onderzoek werd vastgesteld. Er is namelijk een correlatie vastgesteld tussen de concentraties DON in het voeder en de concentraties DON in het serum terwijl de inname van dit voeder varieerde binnen de 20 bedrijven van minimum 1 tot maximum 13 dagen. Sommige van de mycotoxinen waarbij geen verband kon worden vastgesteld zouden mogelijks wel kunnen accumuleren in weefsels waardoor er voor deze mycotoxinen geen correlatie kon worden gevonden. Om hierover meer te weten moet zowel het voeder tijdens de dracht als het voeder in de kraamstal worden onderzocht.

Tussen de serumconcentraties van de zeugen van de probleem- en controlebedrijven werd er een significant verschil vastgesteld omtrent de DON concentraties. Ook was er een positieve correlatie tussen het gehalte DON in het voeder en de concentratie in het serum van de zeug. Hieruit kan besloten worden dat serum als dierlijke matrix een goede diagnostische tool is om DON-blootstelling bij zeugen vast te stellen. Bijkomend onderzoek zou het mogelijk maken om een referentiewaarde in het bloed vast te leggen waardoor men in de toekomst een mycotoxicosis aan DON makkelijker kan diagnosticeren. Het feit dat er geen significante correlatie is vastgesteld tussen de concentraties DON in het serum van de zeugen en in het serum van de biggen kan verklaard worden door de detectiegrens die mogelijks nog te hoog is. Voor de andere mycotoxinen zoals ZEN en T-2 werd geen positieve correlatie gevonden tussen de concentratie in het voeder en de concentratie in het serum. Een verklaring hiervoor zou kunnen zijn dat in deze studie het serum enkel werd onderzocht op fase I metabolieten. Fase II metabolieten waaronder de geconjugeerde vormen worden hiermee dus niet gedetecteerd en misschien zijn het wel deze moleculen die voor een groot deel verantwoordelijk zijn voor de toxiciteit eens ze zich in het lichaam bevinden. Daarom is het, zonder analyse van deze fase II metabolieten, onduidelijk of serum een geschikte parameter is om andere mycotoxineblootstelling dan DON te onderzoeken. Wat ZEN betreft hebben Goyarts

et al. (2007) in hun studie geconcludeerd dat serum geen goede parameter is om een blootstelling vast te stellen. Er wordt best geopteerd om de concentraties te bepalen in gal met behulp van HPLC met fluorescentie techniek of met LC-MS/MS. Helaas kan met deze methode geen screening of monitoring worden uitgevoerd in de praktijk omdat deze methode enkel postmortem kan plaatsvinden. Daarnaast zou urine ook als dierlijke matrix kunnen aangewend worden. Dit wordt in de humane geneeskunde reeds als routine diagnostisch middel gebruikt om blootstelling aan mycotoxinen vast te stellen in het kader van de voedselveiligheid. Ook hierin worden fase II metabolieten opgespoord. Het nadeel is echter dat bij varkens alleen urine kan worden bekomen na spontane urinelozing of met behulp van een katheter, wat het praktisch minder toepasbaar maakt. Graag werd in dit onderzoek de urine getest op mycotoxinen, maar binnen het tijds kader van deze masterproef was dit helaas niet mogelijk. Meer onderzoek is dus nodig om duidelijkheid te geven over de geschiktheid van serum en urine als dierlijke matrix in de diagnostiek voor mycotoxicosis. De vele waarden onder de detectielimiet of de kwantificatielimiet van de onderzochte mycotoxinen zijn nogmaals een indicatie dat de concentraties aan mycotoxinen dermate laag zijn en dat de detectiegrens in het serum via LC-MS/MS nog te hoog ligt om significante correlaties te kunnen waarnemen.

Hoewel er geen significante verschillen zijn vastgesteld tussen de DON concentraties in het biggenserum tussen de probleembedrijven enerzijds en de controlebedrijven anderzijds, maar deze wel zichtbaar aanwezig waren, is er toch een mogelijkheid dat de zeug DON kan overdragen naar de biggen. Deze overdracht zou transplacentair kunnen gebeuren omdat sommige biggen al beginnende staartnecrose vertonen slechts 1 uur na de geboorte, maar ook is het mogelijk dat DON via de melk wordt overgedragen omdat andere biggen pas na een paar dagen symptomen vertonen. Het is echter niet uitgesloten dat blootstelling ook mogelijk is via stof of inhalatie van mycotoxinen die zich in het zeugenvoeder bevinden. Graag werd in dit onderzoek de melk verder onderzocht met LC-MS/MS om na te gaan welke gehalten aan mycotoxinen erin aanwezig waren, en of er wel effectief een overdracht via de melk plaatsvindt. Helaas was dit binnen het tijdsbestek van deze masterproef niet meer mogelijk. Ook hier zou meer onderzoek een antwoord op kunnen geven.

Naast alle verbanden omtrent de concentraties van mycotoxinen waren er ook interessante bevindingen uit de vragenlijsten die de varkenshouders hebben beantwoord. Het feit dat het productiegetal significant lager lag bij de probleembedrijven is een indicatie dat de mogelijke oorzaken van neonatale staartnecrose een nadelig effect kunnen hebben op de productieresultaten. Echter worden de productieresultaten door tal van factoren beïnvloed waaronder het zeugenras en de manier van bedrijfsvoering. Verschillen die niet significant konden worden bevestigd, maar wel konden worden waargenomen, zoals het lager aantal levend geboren biggen en het kleiner aantal gespeende biggen per zeug bij de probleembedrijven, bevestigen het vermoeden van een ongunstige invloed. Om dit fenomeen en de mogelijke oorzaken en effecten beter te begrijpen is meer onderzoek nodig.

Met deze studie is duidelijk geworden dat DON een belangrijk mycotoxine is dat verband houdt met neonatale staartnecrose en dat serum voor de blootstelling van DON een goede matrix is voor diagnostiek.

Referentielijst

1. Aguilera-Luiz M.M., Plaza-Bolanos P., Romero-Gonzalez R., Martinez Vidal J.L. en Garrido Frenich A. (2011). Comparison of the efficiency of different extraction methods for the simultaneous determination of mycotoxins and pesticides in milk samples by ultra high-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Anal. Bioanal. Chem.* **399**:2863–2875.
2. Ahn J., Kim D., Kim H. en Jahng K.-Y. (2010). Quantitative determination of mycotoxins in urine by LCMS/MS. *Food Additives & Contaminants: Part A*, **27**:12: 1674-1682.
3. Bauer J., Heinritzi K., Gareis M., Gedek B. (1987). Changes in the genital tract of female swine after feeding with practice-relevant amounts of zearalenone. *Tierärztliche Praxis* **15**: 33-36.
4. Broekaert N., Devreese M., De Baere S., De Backer P. en Croubels S. (2015). Modified Fusarium mycotoxins unmasked: From occurrence in cereals to animal and human excretion. *Food Chem. Toxicol.* **80**:17-31.
5. Biehl M.L., Prelusky D.B., Koritz G.D., Hartin K.E., Buch W.B. en Trenholm H.L. (1993). Biliary excretion and enterohepatic cycling of Zearalenone in immature pigs. *Toxicology and Applied Pharmacology* **121**: 152-159.
6. Chang K., Kurtz H.J., Mirocha C.J. (1979). Effects of the mycotoxin zearalenone on swine reproduction. *American Journal of Veterinary Research* **40**: 1260-1267.
7. Creppy E.E., Chiarappa P., Baudrimont I., Borrachi P., Moukha S. en Carrutu M.R. (2004). Synergetic effects of fumonisin B1 and ochratoxin A: are in vitro cytotoxicity data predictive of in vivo acute toxicity? *Toxicology* **201**: 115-123.
8. Commission recommendation 2006/576/EC of 17 August 2006 on the presence of deoxynivalenol, zearalenone, ochratoxin A, T-2, and HT-2 and fumonisins in products intended for animal feeding.
9. Council for Agricultural Science and Technology - CAST (2003). Mycotoxins - Risk in plant, animal and human systems. Task Force Report **139**, Ames, Iowa, USA.
10. Dacasto M., Rolando P., Nachtmann C., Ceppan L. en Nebbia C. (1995). Zearalenone mycotoxicosis in piglets suckling sows fed contaminated grain. *Veterinary Human Toxicology* **37**: 359-361.
11. Devreese M., De Backer P. en Croubels S. (2013). Overview of the most important mycotoxins for the pig and poultry husbandry. *Vlaams Diergeneeskundig Tijdschrift* **82**: 171-180.
12. Devreese M., De baere S., De Backer P. en Croubels S. (2012). Quantitative determination of several toxicological important mycotoxins in pig plasma using multi-mycotoxin and analyte-specific high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometric methods. *Journal of Chromatography A*. **12547**: 74-80.
13. Diekman M.A. en Green M.L. (1992). Mycotoxins and reproduction in domestic livestock. *Journal of Animal Science* **70**: 1615-1627.
14. Directive 2002/32/EC of the European Parliament and of the council of 7 May 2002 on undesirable substances in animal feed.
15. D'Mello J.P.F., Placinta C.M. en Macdonald A.M.C. (1999). Fusarium mycotoxins: a review of global implications for animal health, welfare and productivity. *Animal feed science and technology* **80**: 183-205.
16. D'Mello J.P.F. (2000). Antinutritional factors and mycotoxins. In J.P.F. D'Mello, ed. *Farm animal metabolism and nutrition*. Wallingford, UK, CAB International. p. 383-403.
17. Döll S., Dänicke S., Ueberschär K.H., Valenta H., Schnurrbusch U., Ganter M., Klobasa F., Flachowsky G. (2003). Effects of graded levels of Fusarium toxin contaminated maize in diets for female weaned piglets. *Arch. Anim. Nutr. Archiv. Tieremähr* **57**(5): 311-334.
18. Döll S., Dänicke S. en Valenta H. (2008). Residues of deoxynivalenol (DON) in pig tissue after feeding mash or pellet diets containing low concentrations. *Molecular nutrition & food research* **52**: 727-734.
19. Driessen B. en Van Thielen J.(2012) Technische Kengetallen in de zeugenhouderij. *Varkensbedrijf* april 2012: 27-29.
20. Eriksen G.S. en Pettersson H. (2004). Toxicological evaluation of Trichothecenes in animal feed. *Animal Feed Science and Technology* **114**: 205-239.
21. Etienne M. en Jemmali M.(1982). Effects of zearalenone (F2) on oestrus activity and reproduction in gilt. *Journal of Animal Science* **55**: 1–10

22. European Food Safety Authority (EFSA). (2004). Opinion on the scientific panel on contaminants in the food chain on a request from the commission related tot deoxynivalenol as undesirable substance in animal feed. *EFSA Journal* **73**: 1-35.
23. Fink-Gremmels J. (1999). Mycotoxins: their implications for human and animal health. *The veterinary Quarterly* **21**: 115-120.
24. Friend D.W., Thompson B.K., Trenholm H.L., Boermans H.J., Hartin K.E., Panich P.L. (1992). Toxicity of T-2 toxin and its interaction with deoxynivalenol when fed to young pigs. *Can. J. Anim. Sci.* **72**: 703-711.
25. Gajęcki M., Gajęcka M., Jakimiuk E., Zielonka L.en Obremski K. (2010) Zearalenone - undesirable substance. In: Rai Mahendra, Varma Ajit, (eds) *Mycotoxins in food, feed and bioweapons*. Springer-Verlag Berlin Heidelberg 131-144.
26. Goyarts T. , Dänicke S. , Valenta H. en Ueberschär K.H. (2007). Carry-over of Fusarium toxins (deoxynivalenol and zearalenone) from naturally contaminated wheat tot pigs. *Food Additives and Contaminants* **24** (4): 369-380.
27. Greenman D.L., Mehta R.G., Wittliff J.L. (1979). Nuclear interaction of Fusarium mycotoxins with estradiol binding sites in the mouse uterus. *Journal of Toxicology and Environmental Heath.* **5**: 593-598.
28. Harvey R.B., Kubena L.F., HuffW.E., Corrier D.E., Rottinghaus G.E., Phillips T.D. (1990). Effects of treatment of growing swine with aflatoxin and T-2 toxin. *Am. J. Vet. Res.* **51**: 1688-1693.
29. Harvey R.B., Kubena L.F., Elissalde M.H., Rottinghaus G.E., Corrier D.E. (1994). Administration of ochratoxin A and T-2 toxin to growing swine. *Am. J. Vet. Res.* **55** (1757-1761).
30. Harvey R.B., Edrington T.S., Kubena L.F., Elissalde M.H. en Rottinghaus G.E. (1995). Influence of aflatoxine and fumonisine B1 containing culture material on growing barrows. *American Journal of Veterinary Research* **56**: 1668-1672.
31. Heidler D. (2004) Dealing with mycotoxins in swine feed. *Revista da Sociedade Cientifica de Suinicultura.* 14-20.
32. Hochsteiner W., Kahlbacher H. en Schuh M. (2001). Die wichtigsten Mykotoxikosen bei Nutztieren in Österreich. *Wiener Tierärztliche Monatschrift* **88**: 342-346.
33. Hollinger K. en Ekperigin H.E. (1999). Mycotoxicosis in food producing animals. *Veterinary clinics of North America; Food Animal Practice.* **15** (1); 133-165.
34. Huff W.E., Kubena L.F., Harvey R.B. en Doerr J.A. (1988). Mycotoxin interactions in poultry and swine. *Journal of Animal Science* **66**: 2351-2355.
35. International Agency for Research on Cancer - IARC. (1993). Evaluation of carcinogenic risks of chemical to humans. Some naturally-occurring substances: Food items and constituents. Heterocyclic aromatic amines and mycotoxins. *IARC monographs* **56**: 359-362.
36. JECFA (1998). Safety evaluation of certain food additives and contaminants. *WHO Food Additives Series.* **40**: 897-913.
37. JECFA (2000). Joint FAO/WHO expert committee on food additives, 53rd report. Safety evaluation of certain food additives. *WHO Food Additives Series* 44.
38. Jenkinson P. en Parry D.W. (1994). Splash dispersal of conidia of *Fusarium colmorum* and *Fusarium avenaceum*. *Mycology Research.* **98**: 506-510.
39. Kan C.A., Rump R., Van Erp A., Bolder N.M. en Mulder R.W.A.W. (1985). The determination of aflatoxins in poultry feed, eggs and meat and its application to mouldy feeds. *Proceedings 9th International Symposium of the World Association of Veterinary Food Hygienists, Budapest,* 361.
40. Katzenellebogen B.S., Katzenellebogen J.A. en Mordecai D. (1979). Zearalenone: characterization of the estrogenic potencies and receptor interactions of a series of fungal beta-resorcylic acid lactones. *Endocrinology* **105**,1: 33-40.
41. Kloet D.G., van Raamsdonk L.W.M., de Waal E.J., Traag W.A., Kuiper H.A. en Schat B. (2002). *Mycotoxinen in de dierlijke productieketen. Rikilt Rapport 2002.018. Rijks Kwaliteitsinstituut voor land- en tuinbouwproducten, Wageningen.*
42. Kolsova A., Stroka J. (2011). *World Mycotoxin J.* **4**: 225-256.
43. Krska R., Schubert-Ullrich P., Molinelli A., Sulyok M., Macdonald S. en Crews C. (2008). Mycotoxin analysis: An update. *Food addit. Contam.* **25**: 152-163.
44. Kuiper-Goodman T. , Scott P.M., Watanabe H. (1987). Risk assessment of mycotoxin Zearalenone. *Regul. Toxicol. Pharmacol.* **7**: 253-306
45. Kuiper G.G.J.M., Lemmen J.G., Carlsson B., Corton J.C., Safe S.H., van der Saag P.T., van der Burg P., Gustafsson J.A. (1998). Interaction of estrogenic chemicals and phytoestrogens with estrogen receptor beta. *Endocrinology* **139**: 4252-4262.

46. Liu B.H., Yu F.Y., Chan M.H. en Yang Y.L. (2002). The effects of mycotoxins, fumonisin B1 and aflatoxin B1 on primary swine alveolar macrophages. *Toxicology and Applied Pharmacology* 180: 197-204.
47. Long, G. G. en Diekman M. A. (1986). Characterization of effects of zearalenone in swine during early pregnancy. *American Journal of Veterinaire Research* 47:184.
48. Maes D.G.D., Janssens G.P.J., Delputte P., Lammentyn A. en de Kruif A. (2004). Back fat measurements in sows from three commercial pig herds. Relationship with reproductive efficiency and correlation with visual ody condition scores. *Livestock Production Science* 91: 57-67.
49. Malekinejad H., Maas-Bakker R., Fink-Gremmels J. (2006). Species differences in the hepatic biotransformation of zearalenone. *Veterinary Journal* 172, 96-102.
50. Maaroufi K., Chekir L., Creppy E.E., Ellouz F., Bacha H. (1996). Zearalenone induces modifications of haematological and biochemical parameters in rats. *Toxicon* 34: 535-540.
51. Marczuk J., Obremski K., Lutnicki K., Gajęcka M., Gajęcki M. (2012). Zearalenone and deoxylevalenol mycotoxicosis in dairy cattle herds. *Polish Journal of Veterinary Sciences*. 15(2): 365-372.
52. Minervini F. en Dell'Aquila M.E. (2008). Zearalenone and reproductive function in farm animals. *International Journal of Molecular Science* 9: 2570-2584.
53. Mishra H.en Chitragada D. (2003). A review on biological control and metabolism of aflatoxin. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* 43: 245-264.
54. Mol H.G.J., Plaza- Bolanos P., Zomer P., de Rijk T.C., Stolker A.A.M. en Mulder P.P.J. (2008). Toward a Generic Extraction Method For Simultaneous Determination of Pesticides, Mycotoxins, Plant Toxins and Veterinary Drugs in Feed and Food Matrixes. *Anal. Chem.* 80: 9450-9459.
55. Monbaliu S., Van Poucke C., Detavernier C., Dumoulin F., Van De Velde M., Schoeters E., Van Dyck S., Averkieva O., Van Peteghem C. en De Saeger S. (2010). Occurrence of mycotoxins in feed as analyzed by a multi-mycotoxin LC-MS/MS method. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 58: 66-71.
56. Mul M.F., Binnendijk G.P. en Kan C.A. (2006). Probleeminventarisatie mycotoxinen in de varkenshouderij: Rapport 02. Wageningen UR Aniomal Science Group, Lelystad.
57. Musser R.E., Goodband R.D., Tokach M.D., Owen K.Q., Nelssen J.L., Blum S.A., Dritz S.S. en Civis C.A. (1999). Effects of L-carnitine fed during gestation and lactation on sow and litter performance. *Journal of Animal Science* 77: 3289-3295.
58. Osweiler G. (1992). Mycotoxins. In Leman A.D, Straw A.E., Mengeling W.L. et al.: *Diseases of Swine*, 7th edition. Ames, Iowa State University Press. p 735.
59. Osweiler G.D. (2006). Occurrence of mycotoxins in grains and feeds. In: Straw B., Zimmerman J., D'Allaire S.en Taylor D.: *Diseases of Swine*. 9th ed. Blackwell Publishing, Ames, Iowa. 915-929.
60. Packet S., Vanlimbergen T., Maes D. (2014). Casuïstiek in het kader van de Masterproef.
61. Palyusik M., Harrach B., Horvath G., Mirocha C.J. (1990). Experimental fusariotoxicosis of swine produced by zearalenone and T-2 toxins. *J. Environ. Pathol. Toxicol. Oncol.* 10: 52-55.
62. Pestka J.J. (2007). Deoxynivalenol: Toxicity, mechanism and animal health risks. *Animal Feed Science and Technology* 137: 283-298.
63. Pinton P. (2009). The food contaminant deoxynivalenol, decreases intestinal barrier permeability and reduces claudin expression: *Toxicology and Applied Pharmacology* 237: 41-48.
64. Pinton P., Tsybulskyy D., Luciola J., Laffitte J., Callu P., Lyazhri F., Grosjean F., Bracarense A.P., Kolf-Clauw M.en Oswald I.P. (2012). Toxicity of deoxynivalenol and its acetylated derivates on the intestine: differential effects on morphology, barrier function, tight junction proteins, and mitogen-activated protein kinases. *Toxicological Sciences* 130: 180-190.
65. Preferent K.I. (2014) Internetsite: http://www.preferentki.com/images/beeradvies/kengetal_groot.jpg (geconsulteerd op 27/01/2015).
66. Rafai P., Tuboly S. (1982). Effect of T-2 toxin on adrenocortical function and immune response in growing pigs. *Zentralbl. Veterinarmed. B* 29, 558-565.
67. Rafai P., Tuboly S., Tury E. (1989). Effect of T-2 fusariotoxin on adrenocortical function and some immunological parameters in growing pigs. *Magy. Allatorv. Lapja* 44, 299-303.
68. Rafai P., Bata A., Vanyi A., Papp Z., Brydl E., Jakab L., Tuboly S., Tury E. (1995). Effect of various levels of T-2 toxin on the clinical status, performance and metabolism of growing pigs. *Vet. Rec.* 136: 485-489.
69. Rankin M. en Grau C. (2002). Agronomic Considerations for Molds and Mycotoxins in Corn Silage. *Focus on Forage* 4: 1-4.

70. Riley R.T. (1998). Mechanistic interactions of mycotoxins: Theoretical considerations. In: Mycotoxins in agriculture and food safety. Editors Sinhaad K.K. en Bhatnagar D. Marcel Dekkers, Inc New York. Basel, Hong Kong, 227-253.
71. Rodrigues I. en Schuh M. (2013). Mycotoxins in Swine Production.
72. Rotter B.A., Prelusky D.B. en Preska J.J. (1996). Toxicology of deoxynivalenol (vomitoxin). *Journal of Toxicology and Environmental Health* **48**: 1-34.
73. Seeling K., Lebzien P., Danicke S., Spilke J., Sudekum K.H. en Flachowsky G. (2006). Effects of level of feed intake and Fusarium toxin-contaminated wheat on rumen fermentation as well as blood and milk parameters in cows. *J. Anim. Physiol. Anim. Nutr.* **90**: 103-115.
74. Smiley R.W., Collins H.P. en Rasmussen P.E. (1996). Diseases of wheat in long-term agronomic experiments at Pendelton, Oregon. *Plant Disease* **80**: 813-820.
75. Speijers G.J.A. en Speijers M.H.M. (2004). Combined toxic effects of mycotoxins. *Toxicology Letters* **153**: 91-98.
76. Stoev S.D., Goundasheva D., Mirtcheva T. en Mantle P.G. (2000). Susceptibility to secondary bacterial infections in growing pigs as an early response in ochratoxicosis. *Experimental and Toxicological Pathology* **52**: 287-296.
77. Streit E., Schatzmayr G., Tassis P., Tzika E., Marin D., Taranu I., Tabuc C., Nicolau A., Aprodu I., Puel O. en Oswald I.P. (2012). Current situation of mycotoxine contamination and co-occurrence in animal feed-focus on Europe. *Toxins* **4**: 788-809.
78. Topigs. (2013). Voeradvies Topigs20 zeugen. Internetreferentie: <http://www.varkens.nl/sites/default/files/pdf/Voeradvies-TOPIGS20-NL.pdf> (geconsulteerd op 6/04/2015)
79. Trenholm H.L, Thompson B.K., Hartin K.E., Geenhalgh R., McAllister A.J. (1985). Ingestion of vomitoxin (deoxynivalenol) – contaminated wheat bij nonlactating cows. *J. Dairy Sci.* **68**: 1000-1005.
80. Ueno Y. (1977). Mode of Action of Trichothecenes. *Annales de la Nutrition et de l'Alimentation* **31**: 885-900.
81. Ueno Y. (1985). The Toxicology of Mycotoxins. *Critical Reviews in Toxicology* **14**: 99-132.
82. Van Limbergen T. (2014). ProHealth WP1. Draft Version.
83. Vanyi A., Glavits R., Gajdacs E., Sandor G., Kovacs F. (1991). Changes induced in newborn piglets by the trichothecene toxin T-2. *Acta Vet. Hung.* **39**: 29-37.
84. Vanyi A., Bata A., Glavits R. en Kovacs F. (1994). Perinatal oestrogen syndrome in swine. *Acta Veterinaria Hungarica* **42** (4): 433-446.
85. Veldman B. (2003a). Deskstudie naar de aanwezigheid en detectie van mycotoxinen in diervoedergrondstoffen. Rapport van De Schothorst. Stichting Instituut voor de Veevoeding. V&K-03-04.
86. Veldman B. (2003 b). Mycotoxinen: de belasting van éénmagige landbouwhuisdieren en de overdracht naar het dierlijk product. Een deskstudie. Rapport van De Schothorst. Stichting Instituut voor de Veevoeding. V&K-03-06.
87. Veršilovskis A., Geys J., Huybrechts B., Goossens E., De Saeger S. en Callebaut A. (2012) Simultaneous determination of masked forms of deoxynivalenol and Zearalenone after oral dosing in rats by LC-MS/MS. *World Mycotoxin Journal*. Vol 5 (3): 303-318.
88. Weaver G.A., Kurtz H.J., Bates F.Y., Chi M.S., Mirocha C.J., Behrens J.C., Robison T.S. (1978) Acute and chronic toxicity of T-2 mycotoxin in swine. *Vet. Rec.* **103**: 531-535.
89. Wyatt R.D. (2005). Mycotoxin interactions. In *The Mycotoxin Blue Book*. Edited by Diaz .D.E. Nottingham University Press, UK, 269-279.
90. Young L.G., McGirr L., Valli V.E., Lumsden J.H., Lun A. (1983). Vomitoxin in corn fed to young pigs. *Journal of Animal Science* **57**: 655-664.
91. Young L. G. en King. G. J. (1986). Low concentrations of zearalenone in diets of mature gilts. *Journal of Animal Science* **63**:1191.
92. Young L.G., Ping H. en King G.J. (1990). Effects of feeding zearalenone to sows on rebreeding and pregenancy. *Journal of Animal Science*. **68**: 15-20.
93. Zielonka L., Wisniewska M., Gajecka M., Obremski K. en Gajecki M. (2009). Influence of low doses of deoxynivalenol on histopathology of selected organs of pigs. *Polish Journal Veterinary Science* **1**: 89-95.
94. Zinedine A., Soriano J.M., Molto J.C. en Manes J. (2007). Review on the toxicity, occurrence, metabolism, detoxification, regulations and intake of Zearalenone: an oestrogenic mycotoxin. *Food Chemistry and Toxicology* **45**: 1-18.

Bijlagen

Bijlage 1: Nieuwsbrief DGZ

Oproep: zeugenbedrijven gezocht voor nieuw Veepeilerproject rond neonatale staartnecrose

21 augustus 2014

Neonatale staartnecrose komt frequent voor op zeugenbedrijven. Om inzicht te krijgen in deze problematiek, start Veepeiler Varken binnenkort met staalnames op 20 zeugenbedrijven (10 bedrijven met klinische symptomen en 10 controlebedrijven) die hieraan wensen mee te werken.

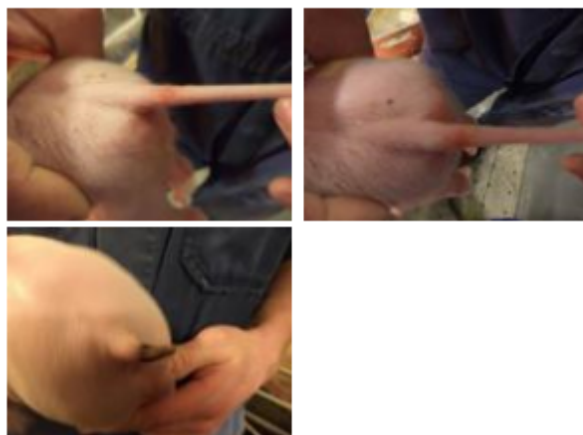


Recent werden er op een aantal bedrijven biggen aangetroffen met neonatale staartnecrose. Om een beter inzicht te krijgen in deze problematiek - praktijkgericht onderzoek is immers een belangrijke activiteit van Veepeiler Varken (*) - zijn de faculteit Diergeneeskunde en DGZ op zoek naar 20 zeugenbedrijven (10 bedrijven met klinische symptomen en 10 controlebedrijven) die hun medewerking willen verlenen aan dit project.


Op elk van de 20 bedrijven zal er een bedrijfsbezoek plaatsvinden, waarbij we - naast het invullen van een korte checklist - ook een aantal stalen zullen nemen voor verder onderzoek.

Alle onderzoeken en staalnames die we binnen dit project uitvoeren, zijn uiteraard kosteloos voor de varkenshouder. De resultaten ervan zullen worden meegedeeld aan de betreffende varkenshouders en bedrijfsdierenartsen.

Concreet zijn we op zoek naar bedrijven met de volgende of gelijkaardige klinische symptomen bij biggen jonger dan 1 week (zie foto's):



Het letsel begint met een (circulaire) roodverkleuring, vanaf ongeveer de 2de levensdag, op ongeveer 1 cm distaal van de staartbasis (zie foto 1 en 2). Na verloop van tijd (einde kraamstal/begin batterij) wordt het letsel circulair necrotisch en breekt het caudale eind af, zoals te zien is op de derde foto. De 2 letsels worden soms ook vergezeld van necrose ter hoogte van de hakken en een opzetting van de vulva.

Indien u interesse hebt om aan dit Veepeilerproject deel te nemen of hierover meer informatie wenst, neem dan contact op met drs. Tommy Van Limbergen (e-mail: Tommy.VanLimbergen@UGent.be .

Bijlage 2: Vragenlijst voor de varkenshouder.

Onderzoek naar de rol van mycotoxinen in het ontstaan van staartnecrose bij biggen.

Beste varkenshouder,

Bedankt om mee te werken aan dit onderzoek! Dit veepeilerproject loopt in samenwerking met de faculteit Diergeneeskunde en DGZ-Vlaanderen. Via een bedrijfsbezoek zullen er een aantal vragen gesteld worden met betrekking staartnecrose bij pasgeboren biggen en mogelijke risicofactoren. Er zullen ook een aantal stalen genomen worden voor verder onderzoek.

Het is de bedoeling om de rol van mycotoxinen in het ontstaan van staartnecrose bij biggen na te gaan. Mycotoxinen zijn stoffen aangemaakt door schimmels die zich voornamelijk ontwikkelen bij vochtige en warme omstandigheden. Daarom komen ze onder andere voor in maïs- en graanvoeders die onder niet optimale omstandigheden bewaard worden. Zo kunnen varkens deze giftstoffen opnemen via het voeder (zoals brijvoer, mengvoer, bijproducten en granen), maar ook via besmet water. De effecten zijn vooral afhankelijk van de hoeveelheid die wordt opgenomen, als ook van het type mycotoxine. Er bestaan vele verschillende soorten mycotoxines, maar bij varkens zijn vooral deoxynivalenol (DON) en zearalenone (ZEN) belangrijk. DON veroorzaakt bij varkens vooral voedselweigering en braken met onvermijdelijke gevolgen voor de groei. Opname van ZEN heeft vooral bij gelten effecten die van hormonale aard zijn, waardoor de vruchtbaarheidscyclus en de dracht verstoord kunnen worden. Naast de effecten op de zeug, kunnen ook biggen leiden onder een vergiftiging met mycotoxines. Dit komt tot uiting als sufheid, zwakte, het voorkomen van spreidzit, necrotische staartjes en necrotische vulva's. In dit onderzoek wordt vooral ingegaan op de staartnecrose bij biggen, wat recent een probleem vormt op bepaalde bedrijven. Deze staartnecrose is een aandoening die kort na de geboorte kan optreden bij aanvankelijk gezond geboren biggen. Maar reeds na 2 dagen kunnen symptomen gezien worden waarbij het staartje geleidelijk aan afsterft. Om meer inzicht te krijgen in het ontstaan van dit ziektebeeld en om er achter te komen in welke mate mycotoxinen hierin bijdragen is uw medewerking van grote waarde. De resultaten van dit onderzoek zullen u meegedeeld worden via uw bedrijfsdierenarts.

Voor meer informatie kan u contact opnemen met uw bedrijfsdierenarts of met de Eenheid Varkensgezondheidszorg van de faculteit Diergeneeskunde (Universiteit Gent) via tommy.vanlimbergen@UGent.be.

Met vriendelijke groeten,

Van Neste Karen (Laatstejaarsstudente optie varkens, pluimvee en konijn)

Drs. Van Limbergen Tommy

Drs. Annelies Michiels

Prof. dr. Dominiek Maes

Algemene bedrijfsgegevens:

Bedrijfsgrootte aantal zeugen : meest gebruikte ras aantal gespeende biggen per jaar per zeug :																																																																						
Bedrijfsstructuur:	<input type="checkbox"/> gesloten (eigen aanfok gelten) <input type="checkbox"/> open (aankoop van gelten)																																																																						
Groepsgewijs management: Wekensysteem (WS)	<input type="checkbox"/> <table border="1"> <thead> <tr> <th colspan="10">Werkplanning (D : Dekken, W : Werpen, S: Spenen)</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>1WS</td><td>SDW</td><td>SDW</td><td>SDW</td><td>SDW</td><td>SDW</td><td>SDW</td><td>SDW</td><td>SDW</td><td>SDW</td> </tr> <tr> <td>2WS</td><td>DW</td><td>S</td><td>DW</td><td>S</td><td>DW</td><td>S</td><td>DW</td><td>S</td><td>S</td> </tr> <tr> <td>3WS</td><td>S</td><td>D</td><td>W</td><td>S</td><td>D</td><td>W</td><td>S</td><td>D</td><td>D</td> </tr> <tr> <td>4WS</td><td>DW</td><td>/</td><td>/</td><td>S</td><td>DW</td><td>/</td><td>/</td><td>S</td><td>S</td> </tr> <tr> <td>5WS</td><td>S</td><td>D</td><td>W</td><td>/</td><td>/</td><td>S</td><td>D</td><td>W</td><td>W</td> </tr> <tr> <td>7WS</td><td>D</td><td>/</td><td>W</td><td>/</td><td>/</td><td>/</td><td>S</td><td>D</td><td>D</td> </tr> </tbody> </table> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/>	Werkplanning (D : Dekken, W : Werpen, S: Spenen)										1WS	SDW	SDW	SDW	SDW	SDW	SDW	SDW	SDW	SDW	2WS	DW	S	DW	S	DW	S	DW	S	S	3WS	S	D	W	S	D	W	S	D	D	4WS	DW	/	/	S	DW	/	/	S	S	5WS	S	D	W	/	/	S	D	W	W	7WS	D	/	W	/	/	/	S	D	D
Werkplanning (D : Dekken, W : Werpen, S: Spenen)																																																																							
1WS	SDW	SDW	SDW	SDW	SDW	SDW	SDW	SDW	SDW																																																														
2WS	DW	S	DW	S	DW	S	DW	S	S																																																														
3WS	S	D	W	S	D	W	S	D	D																																																														
4WS	DW	/	/	S	DW	/	/	S	S																																																														
5WS	S	D	W	/	/	S	D	W	W																																																														
7WS	D	/	W	/	/	/	S	D	D																																																														
Is er een sanitaire transitieperiode tussen de groepen in de kraamstal?	<input type="checkbox"/> ja, deze duurt dagen <input type="checkbox"/> nee																																																																						
Hoeveel jaren ervaring heeft de persoon in leiding?																																																																						
Hoeveel personen werken er op het bedrijf?																																																																						
Voor welke ziekten heeft uw bedrijf een vrij statut?	<input type="checkbox"/> PRRS <input type="checkbox"/> APP <input type="checkbox"/> Mycoplasma																																																																						
Komen er nog andere ziekteproblemen voor ?	In de kraamstal: In de dekstal: In de drachtstal: In de quarantaine:																																																																						

Vaccinatieschema (Gelieve het vaccin en tijdstip in de periode te noteren)

	Gelten	Zeugen	Beren	Biggen
AR				
Coli				
Mycoplasma				
Parvo				
PCV2				
PRRS				
Rota				
Vlekziekte				
Griep				
Glässer				
Clostridium				

De kraamstal (bouwjaar:)

Aantal compartimenten:
Aantal boxen per compartiment:
Algemene productieresultaten	worpindex (aantal worpen / zeug/ jaar): productiegetal (aantal biggen / zeug/ jaar): vervangingspercentage:

Watervoorziening van de zeugen

Oorsprong van het water	<input type="checkbox"/> stadswater / leidingwater <input type="checkbox"/> putwater / grondwater (diepte van de put:) <input type="checkbox"/> oppervlaktewater / drainagewater / regenwater <input type="checkbox"/> ontsmet met
Watervoorziening	<input type="checkbox"/> reiniging en desinfectie met Laatste gebeurd op:
Medicijnen in het drinkwater	meest gebruikte geneesmiddel: gemiddelde duur van toedienen: laatst gebruikte geneesmiddel: duur van het toedienen: laatste toegediend op: (datum)
Desinfectie van het water	<input type="checkbox"/> tussen elke productiecycclus <input type="checkbox"/> gedurende de productiecycclus
Nippels	<input type="checkbox"/> telkens grondig gereinigd bij het verhokken <input type="checkbox"/> soms grondig gereinigd e bij het verhokken
Is het mogelijk het dagelijks waterverbruik in de kraamstal te kwantificeren? Zo ja, wat is dan het verbruik? Hoeveel zeugen zitten er in de kraamstal?	<input type="checkbox"/> ja <input type="checkbox"/> nee liter per dag in de kraamstal zeugen

Voeder van de zeugen

Hoe worden de zeugen gevoederd?	<input type="checkbox"/> ad libitum (zeugen kunnen altijd eten) <input type="checkbox"/> gevoederd op tijdstippen, keer per dag
Werd het voeder eerder onderzocht voor mycotoxines? Zoja, wat was de uitslag?	<input type="checkbox"/> ja (indien mogelijk, graag een kopie van deze analyse <u>meegeven</u>) <input type="checkbox"/> nee

Welk voeder wordt gegeven aan de zeug (Graag het etiket doormailen)

	Tijdens de dracht - Voor de partus				Op dit moment: (2 dagen na de partus)
	Begin van de dracht	Groeps-huisvesting	4 weken tot 1 week voor de partus	In de kraamafdeling	
Naam van het voeder					
Manier van voederen (Manueel – automatisch)					
Hoeveelheid voeder per dag					
Additieven: Mycotoxinebinder sporenelementen en metalen*, vitaminen, andere	<input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/>
Eigen bijmengingen (Welke producten? Hoe bewaard?)					

* sporenelementen: ijzer, zink, koper, molybdeen, boor, mangaan en magnesium

* metalen niet behorende tot sporenelementen: aluminium, chroom, nikkel, lood

Hoelang worden de dieren al gevoederd met het voeder dat ze nu in de kraamstal krijgen (en waar dus een staal is van genomen?)

.....

Is het voederschema recent gewijzigd?	<input type="checkbox"/> ja <input type="checkbox"/> nee
Zoja, waarom werd dit gewijzigd?

Opmerkingen:

.....

Extra voeder bij de biggen (voor de staalname):

extra melk:(Graag het etiket meegeven indien poeder wordt gebruikt)

bijgevoederd met (Graag het etiket meegeven)
 hoeveelheid dat wordt bijgevoederd per big:

Medicatie bij de biggen tot 2 dagen oud:

.....

Stalinrichting:

Vloer	<input type="checkbox"/> volledige rooster <input type="checkbox"/> deels rooster – deels volle vloer <input type="checkbox"/> plastic <input type="checkbox"/> beton
Stalklimaat Temperatuur in de kraamstallen Ventilatie °C <input type="checkbox"/> natuurlijke ventilatie (onder invloed van wind en temperatuur) <input type="checkbox"/> klepventilatie <input type="checkbox"/> ventielventilatie <input type="checkbox"/> Deurventilatie <input type="checkbox"/> kanaalventilatie <input type="checkbox"/> plafondventilatie <input type="checkbox"/> combiventilatie (vals plafond, ventilator) <input type="checkbox"/> frisse neuzen systeem (verse lucht naar kop van de zeug) <input type="checkbox"/> centrale afzuiging

Mycotoxinen - staartnecrose

Herkent u deze symptomen bij een aantal van uw zeugen? Zijn er nog andere afwijkingen bij deze zeugen?	<input type="checkbox"/> vruchtbaarheidsproblemen <input type="checkbox"/> weerstandsproblemen <input type="checkbox"/> kleinere tomen <input type="checkbox"/> meer terugkomers <input type="checkbox"/> vulva zwelling
Herkent u deze symptomen bij een aantal van de biggen in de kraamstal? Zijn er nog andere afwijkingen bij deze biggen?	<input type="checkbox"/> slappe, zwakke, suffe indruk <input type="checkbox"/> spreidzit <input type="checkbox"/> necrotische vulva (zwart, ondoorbloed) <input type="checkbox"/> necrotische staartjes
Hebt u deze symptomen eerder gezien op uw bedrijf? Welke symptomen kwamen toen voor? Wanneer was dit?	<input type="checkbox"/> ja <input type="checkbox"/> nee zeug: <input type="checkbox"/> vruchtbaarheidsproblemen <input type="checkbox"/> weerstandsproblemen <input type="checkbox"/> kleinere tomen <input type="checkbox"/> meer terugkomers <input type="checkbox"/> vulva zwelling biggen: <input type="checkbox"/> slappe, zwakke, suffe indruk <input type="checkbox"/> spreidzit <input type="checkbox"/> necrotische vulva (zwart, ondoorbloed) <input type="checkbox"/> necrotische staartjes

Bijlage 3: Invulfiche van bemonsterde zeugen en biggen

Bedrijf:
 datum:/...../.....

STAALNAME BIJ DE ZEUG:

Identificatienummer:

Algemeen:

Aantal zeugen in het compartiment: }
 Aantal zeugen met probleembiggen: } % zeugen met aangetaste worpen:

Algemeen		Deze worp: (...../...../.....)	
Ras:	Ras beer
Pariteit / aantal worpen:	Drachtig na	<input type="checkbox"/> 1 ^e dekking <input type="checkbox"/> 2 ^e dekking
Gemiddelde zoogduur:	Drachtduur
Drachtig na voornamelijk	<input type="checkbox"/> 1 ^e dekking <input type="checkbox"/> 2 ^e dekking	Partusinductie	<input type="checkbox"/> ja <input type="checkbox"/> nee
Drachtduur (gemiddeld)	Zoja, wanneer? welke producten?
Wanneer in de kraamstal? (aantal dagen voor de partus)	Worpgrootte: % aangetaste biggen*:
Conditie score: 1-5 spekdikte	Levend geboren:
		Dodgeboren: mummies:
		Uitval: aantal oorzaak
		Toomuniformiteit 1: niet uniform 4: perfect uniform

* Biggen met staartnecrose

Bedrijf met staartnecrose bij biggen:

Afwijkingen bij de bemonsterde zeug:
Heeft zij eerder deze symptomen vertoont?	<input type="checkbox"/> ja <input type="checkbox"/> nee
Zoja, wanneer was dit?
Totaal aantal aangetaste zeugen:
Afwijkingen bij de zeugen:

Voorgeschiedenis:

Zijn er bij vorige worpen problemen geweest met staartnecrose?

.....
.....

Zijn er bij vorige worpen andere problemen geconstateerd bij de pasgeboren biggen?

.....
.....

Waren er opvallende afwijkende kengetallen in vorige worpen (lager levend geboren, verhoogde uitval, ...)?

.....
.....

Opmerkingen bij staalname

Bloed

.....
.....

Melk (biest)

.....
.....

Urine

.....
.....

STAALNAME BIJ 5 BIGGEN VAN ZEUG met identificatienummer

BIG 1:		BIG 2:.....	
Geslacht:	<input type="checkbox"/> ♂ <input type="checkbox"/> ♀	Geslacht:	<input type="checkbox"/> ♂ <input type="checkbox"/> ♀
Gewicht: gram	Gewicht: gram
Staartnecrose:	<input type="checkbox"/> Aanwezig <input type="checkbox"/> Afwezig	Staartnecrose:	<input type="checkbox"/> Aanwezig <input type="checkbox"/> Afwezig
Andere afwijkingen:	<input type="checkbox"/> Necrose hakken <input type="checkbox"/> Rode vulva <input type="checkbox"/> Gezwollen vulva <input type="checkbox"/> Splayleg <input type="checkbox"/>	Andere afwijkingen:	<input type="checkbox"/> Necrose hakken <input type="checkbox"/> Rode vulva <input type="checkbox"/> Gezwollen vulva <input type="checkbox"/> Splayleg <input type="checkbox"/>

BIG 3: :.....		BIG 4: :.....	
Geslacht:	<input type="checkbox"/> ♂ <input type="checkbox"/> ♀	Geslacht:	<input type="checkbox"/> ♂ <input type="checkbox"/> ♀
Gewicht: gram	Gewicht: gram
Staartnecrose:	<input type="checkbox"/> Aanwezig <input type="checkbox"/> Afwezig	Staartnecrose:	<input type="checkbox"/> Aanwezig <input type="checkbox"/> Afwezig
Andere afwijkingen:	<input type="checkbox"/> Necrose hakken <input type="checkbox"/> Rode vulva <input type="checkbox"/> Gezwollen vulva <input type="checkbox"/> Splayleg <input type="checkbox"/>	Andere afwijkingen:	<input type="checkbox"/> Necrose hakken <input type="checkbox"/> Rode vulva <input type="checkbox"/> Gezwollen vulva <input type="checkbox"/> Splayleg <input type="checkbox"/>

BIG 5: :.....	
Geslacht:	<input type="checkbox"/> ♂ <input type="checkbox"/> ♀
Gewicht: gram
Staartnecrose:	<input type="checkbox"/> Aanwezig <input type="checkbox"/> Afwezig
Andere afwijkingen:	<input type="checkbox"/> Necrose hakken <input type="checkbox"/> Rode vulva <input type="checkbox"/> Gezwollen vulva <input type="checkbox"/> Splayleg <input type="checkbox"/>

Bedrijf met staartnecrose bij biggen

Afwijkingen bij de bemonsterde biggen:
Aantal aangetaste biggen binnen de worp:
Afwijkingen bij de biggen:
Totaal aantal aangetaste biggen:

Voor het opstellen van de vragenlijsten werden volgende artikels gebruikt: Driessen en Van Thielen (2012); Mul et al. (2006); Van Limbergen (2014).

Bijlage 4: Overzicht van de detectielimieten, kwantificatielimieten en MRM transities van de onderzochte mycotoxinen bij de analyse op het voeder m.b.v. LC-MS/MS.

Mycotoxine	LOD ($\mu\text{g.kg}^{-1}$)	LOQ ($\mu\text{g.kg}^{-1}$)	MRM transities
Aflatoxine B1	3,20	6,41	313 > 285.1*, 313 > 241.2
Aflatoxine B2	2,79	5,59	315 > 287.2*, 315 > 259.2
Aflatoxine G1	3,53	7,07	329 > 343.0*, 329 > 311.2
Aflatoxine G2	4,37	8,74	331 > 313.1 *, 331 > 245.2
Ochratoxine A	6,30	12,60	403.9 > 239.0* , 403.9 > 358.2
Deoxynivalenol	110,87	221,74	297.1 > 249.2*, 297.1 > 231.2
Zearalenone	32,65	65,31	319.1 > 187.2*, 319.1 > 203.0
Fumonisine B1	58,24	116,47	722.1 > 352.4*, 722.1 > 704.4
Fumonisine B2	44,57	89,15	706.1 > 336.5*, 706.1 > 688.5
Fumonisine B3	42,40	84,81	706.1 > 336.5*, 706.1 > 688.5
T-2 toxine	17,16	34,31	489.1 > 245.1*, 489.1 > 327.0
HT-2 toxine	16,89	33,79	447.1 > 345.3*, 447.1 > 285.1
Nivalenol	66,26	132,53	313.1 > 125.0*, 313.1 > 205.0
3-acetyldeoxynivalenol	8,96	17,91	339.0 > 231.2*, 339.0 > 203.2
15-acetyldeoxynivalenol	5,62	11,24	339.0 > 137.1*, 339.0 > 321.2
Diacetoxyscirpenol	1,22	2,45	384.2 > 307.1*, 384.2 > 247
Fusarenon-X	30,34	60,68	355.0 > 174.9*, 355 > 137.0
Neosolaniol	15,72	31,45	400.0 > 305.3*, 400.0 > 185.0
Alternariol	21,92	43,84	258.9 > 185.1*, 258.9 > 213.1
Alternariol Methylether	32,48	64,96	272.9 > 258.2*, 272.9 > 199.3
Roquefortine-C	1,98	3,97	390 > 193.2*, 390 > 322.2
Sterigmatocystine	8,69	17,38	325 > 310.2*, 325 > 281.1

Nota; LOD = detectielimieten, LOQ = kwantificatielimieten, MRM = Multiple Reaction Monitoring, *= kwantificatie ion.

Bijlage 5: Overzicht van de detectielimieten, kwantificatielimieten en MRM transities van de onderzochte mycotoxinen bij de analyse op het serum m.b.v. LC-MS/MS.

Mycotoxine	LOD (ng.mL⁻¹)	LOQ (ng.mL⁻¹)	MRM transities
Deoxynivalenol	0.02	0,1	297.1 > 249.1, 297.1 > 203.4
DOM-1	0.06	0,2	281.1 > 215.1, 281.1 > 137.0
¹³ C-DON			312.0 > 245.2, 312.0 > 263.0
Zearalenone	0.01	0,1	317.1 > 175.0, 317.1 > 131.0
α-ZOL	0.01	0,1	319.0 > 275.0, 319.0 > 159.9
β-ZOL	0.02	0,1	319.0 > 159.9, 319.0 > 275.0
¹³ C-ZEN			335.2 > 168.9, 335.2 > 185.0
T-2 toxine	0.01	0,1	484.0 > 245.4, 484.0 > 305.4
¹³ C-T-2			508.2 > 198.0, 508.2 > 228.9
HT-2 toxine	0.01	0,1	447.2 > 285.1, 447.2 > 345.1

Nota; LOD = detectielimieten, LOQ = kwantificatielimieten, MRM = Multiple Reaction Monitoring.

Bijlage 6: Resultaten van de mycotoxinenanalyse op het zeugen- en biggenserum

Bedrijf/zeug/big	Serumconcentratie zeug (ng.mL ⁻¹)							Serumconcentratie big (ng.mL ⁻¹)						
	DON	DOM-1	ZEN	α-ZOL	β-ZOL	T-2	HT-2	DON	DOM-1	ZEN	α-ZOL	β-ZOL	T-2	HT-2
1 / 1 / 1	0,5	< LOQ		< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ			< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ
1 / 1 / 2	0,5	< LOQ		< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ	0,17	< LOQ		< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ
1 / 2 / 1	1,03	< LOQ		< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ		0,55	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ
1 / 2 / 2	1,03	< LOQ		< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ			< LOQ	0,14	< LOQ	< LOQ
1 / 3 / 1	0,98	< LOQ		< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ				< LOQ	0,11	< LOQ	< LOQ
1 / 3 / 2	0,98	< LOQ		< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ				< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ
1 / 4 / 1	0,31			< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ				< LOQ		< LOQ	< LOQ
1 / 4 / 2	0,31			< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ			< LOQ	0,1	< LOQ	< LOQ
1 / 5 / 1	1,63	< LOQ	0,26	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ			< LOQ	0,1	< LOQ	< LOQ
1 / 5 / 2	1,63	< LOQ	0,26	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ			< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ
1 / 6 / 1	1,29	< LOQ		< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ	0,1	< LOQ		< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ
1 / 6 / 2	1,29	< LOQ		< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ				< LOQ	0,11	< LOQ	< LOQ
2 / 1 / 1	0,29	< LOQ		< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ			< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ
2 / 1 / 2	0,29	< LOQ		< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ				< LOQ	0,1	< LOQ	< LOQ
2 / 2 / 1	0,25	< LOQ		< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ				< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ
2 / 2 / 2	0,25	< LOQ		< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ		< LOQ		< LOQ		< LOQ	< LOQ
2 / 3 / 1	0,26	< LOQ		< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ		< LOQ		< LOQ	0,11	< LOQ	< LOQ
2 / 3 / 2	0,26	< LOQ		< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ				< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ
2 / 4 / 1	0,34	< LOQ		< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ		< LOQ	0,1	< LOQ	< LOQ
2 / 4 / 2	0,34	< LOQ		< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ			< LOQ	0,1	< LOQ	< LOQ
2 / 5 / 1	0,25			< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ				< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ
2 / 5 / 2	0,25			< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ			< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ

Bedrijf/zeug/big	Serumconcentratie zeug (ng.mL ⁻¹)						Serumconcentratie big (ng.mL ⁻¹)							
	DON	DOM-1	ZEN	α-ZOL	β-ZOL	T-2	HT-2	DON	DOM-1	ZEN	α-ZOL	β-ZOL	T-2	HT-2
3 / 1 / 1	< LOQ			< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ				< LOQ	0,11	< LOQ	< LOQ
3 / 1 / 2	< LOQ			< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ		< LOQ	0,16	< LOQ	< LOQ
3 / 2 / 1				< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ			< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ
3 / 2 / 2				< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ		< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ
3 / 3 / 1	< LOQ			< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ	0,11			< LOQ	0,11	< LOQ	< LOQ
3 / 3 / 2	< LOQ			< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ			< LOQ	0,15	< LOQ	< LOQ
3 / 4 / 1	0,11			< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ		< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ
3 / 4 / 2	0,11			< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ			< LOQ	0,12	< LOQ	< LOQ
3 / 5 / 1	0,11	< LOQ		< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ	0,25			< LOQ	0,11	< LOQ	< LOQ
3 / 5 / 2	0,11	< LOQ		< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ	0,27	< LOQ		< LOQ		< LOQ	< LOQ
4 / 1 / 1	0,98	< LOQ		< LOQ		< LOQ	< LOQ		< LOQ		< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ
4 / 1 / 2	0,98	< LOQ		< LOQ		< LOQ	< LOQ		< LOQ		< LOQ		< LOQ	< LOQ
4 / 2 / 1	0,19	< LOQ		< LOQ		< LOQ	< LOQ		< LOQ		< LOQ		< LOQ	< LOQ
4 / 2 / 2	0,19	< LOQ		< LOQ		< LOQ	< LOQ		< LOQ		< LOQ		< LOQ	< LOQ
4 / 3 / 1	0,66	< LOQ		< LOQ		< LOQ	< LOQ		< LOQ		< LOQ		< LOQ	< LOQ
4 / 3 / 2	0,66	< LOQ		< LOQ		< LOQ	< LOQ		< LOQ		< LOQ		< LOQ	< LOQ
4 / 4 / 1	0,12	< LOQ		< LOQ		< LOQ	< LOQ		< LOQ		< LOQ		< LOQ	< LOQ
4 / 4 / 2	0,12	< LOQ		< LOQ		< LOQ	< LOQ		< LOQ		< LOQ		< LOQ	< LOQ
4 / 5 / 1	0,76	< LOQ		< LOQ		< LOQ	< LOQ		< LOQ		< LOQ		< LOQ	< LOQ
4 / 5 / 2	0,76	< LOQ		< LOQ		< LOQ	< LOQ		0,27		< LOQ		< LOQ	< LOQ
5 / 1 / 1	0,76	< LOQ		< LOQ		< LOQ	< LOQ	0,2	< LOQ		< LOQ		< LOQ	< LOQ
5 / 1 / 2	0,76	< LOQ		< LOQ		< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ		< LOQ		< LOQ	< LOQ
5 / 2 / 1	1,93	< LOQ		< LOQ		< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ		< LOQ		< LOQ	< LOQ
5 / 2 / 2	1,93	< LOQ		< LOQ		< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ		< LOQ		< LOQ	< LOQ
5 / 3 / 1	1,59	< LOQ		< LOQ		< LOQ	< LOQ		< LOQ		< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ
5 / 3 / 2	1,59	< LOQ		< LOQ		< LOQ	< LOQ		0,29		< LOQ		< LOQ	< LOQ
5 / 4 / 1	1,81	< LOQ		< LOQ		< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ		< LOQ		< LOQ	< LOQ
5 / 4 / 2	1,81	< LOQ		< LOQ		< LOQ	< LOQ		< LOQ		< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ
5 / 5 / 1	1,41	< LOQ		< LOQ		< LOQ	< LOQ	0,15	< LOQ		< LOQ		< LOQ	< LOQ
5 / 5 / 2	1,41	< LOQ		< LOQ		< LOQ	< LOQ	0,27	< LOQ		< LOQ		< LOQ	< LOQ

Bedrijf/zeug/big	Serumconcentratie zeug (ng.mL ⁻¹)							Serumconcentratie big (ng.mL ⁻¹)						
	DON	DOM-1	ZEN	α-ZOL	β-ZOL	T-2	HT-2	DON	DOM-1	ZEN	α-ZOL	β-ZOL	T-2	HT-2
6 / 1 / 1	0,51	< LOQ				< LOQ	< LOQ					< LOQ	< LOQ	< LOQ
6 / 1 / 2	0,51	< LOQ				< LOQ	< LOQ					< LOQ	< LOQ	< LOQ
6 / 2 / 1	0,71	< LOQ				< LOQ	< LOQ						< LOQ	< LOQ
6 / 2 / 2	0,71	< LOQ				< LOQ	< LOQ						< LOQ	< LOQ
6 / 3 / 1		< LOQ				< LOQ	< LOQ		0,24				< LOQ	< LOQ
6 / 3 / 2		< LOQ				< LOQ	< LOQ						< LOQ	< LOQ
6 / 4 / 1	0,48	< LOQ				< LOQ	< LOQ						< LOQ	< LOQ
6 / 4 / 2	0,48	< LOQ				< LOQ	< LOQ						< LOQ	< LOQ
6 / 5 / 1		< LOQ				< LOQ	< LOQ						< LOQ	< LOQ
6 / 5 / 2		< LOQ				< LOQ	< LOQ						< LOQ	< LOQ
7 / 1 / 1	1,31	< LOQ				< LOQ		< LOQ	< LOQ				< LOQ	
7 / 1 / 2	1,31	< LOQ				< LOQ			< LOQ				< LOQ	
7 / 2 / 1	1,78	< LOQ				< LOQ			< LOQ				< LOQ	
7 / 2 / 2	1,78	< LOQ				< LOQ			< LOQ				< LOQ	
7 / 3 / 1	1,38	< LOQ				< LOQ			< LOQ				< LOQ	
7 / 3 / 2	1,38	< LOQ				< LOQ			< LOQ				< LOQ	
7 / 4 / 1		< LOQ				< LOQ			< LOQ				< LOQ	
7 / 4 / 2		< LOQ				< LOQ			< LOQ				< LOQ	
7 / 5 / 1	1,08	< LOQ				< LOQ			< LOQ				< LOQ	
7 / 5 / 2	1,08	< LOQ				< LOQ			< LOQ				< LOQ	
8 / 1 / 1	0,97	< LOQ				< LOQ		< LOQ	< LOQ				< LOQ	
8 / 1 / 2	0,97	< LOQ				< LOQ		< LOQ	< LOQ				< LOQ	
8 / 2 / 1	1,12	< LOQ				< LOQ			< LOQ				< LOQ	
8 / 2 / 2	1,12	< LOQ				< LOQ			< LOQ				< LOQ	
8 / 3 / 1	0,32	< LOQ				< LOQ			< LOQ				< LOQ	
8 / 3 / 2	0,32	< LOQ				< LOQ			< LOQ				< LOQ	
8 / 4 / 1	1,14	< LOQ				< LOQ			< LOQ				< LOQ	
8 / 4 / 2	1,14	< LOQ				< LOQ			< LOQ				< LOQ	
8 / 5 / 1	0,91	< LOQ				< LOQ			< LOQ				< LOQ	
8 / 5 / 2	0,91	< LOQ				< LOQ			< LOQ				< LOQ	

Bedrijf/zeug/big	Serumconcentratie zeug (ng.mL ⁻¹)							Serumconcentratie big (ng.mL ⁻¹)						
	DON	DOM-1	ZEN	α-ZOL	β-ZOL	T-2	HT-2	DON	DOM-1	ZEN	α-ZOL	β-ZOL	T-2	HT-2
9 / 1 / 1	2,67	< LOQ						0,1						
9 / 1 / 2	2,67	< LOQ						0,13	< LOQ					
9 / 2 / 1	2,03								< LOQ	0,76				
9 / 2 / 2	2,03							< LOQ	< LOQ					
9 / 3 / 1	2,5	< LOQ	< LOQ					< LOQ	< LOQ	0,12				
9 / 3 / 2	2,5	< LOQ	< LOQ					1,11	< LOQ	0,22				
9 / 4 / 1	1,24	< LOQ	< LOQ					< LOQ	< LOQ	0,49				
9 / 4 / 2	1,24	< LOQ	< LOQ					< LOQ	< LOQ					
9 / 5 / 1	1,07	< LOQ						< LOQ	< LOQ					
9 / 5 / 2	1,07	< LOQ						< LOQ	< LOQ					
10 / 1 / 1	1,86	< LOQ		< LOQ					< LOQ		< LOQ			
10 / 1 / 2	1,86	< LOQ		< LOQ					< LOQ	< LOQ	< LOQ			
10 / 2 / 1	1,99			< LOQ					< LOQ		< LOQ			
10 / 2 / 2	1,99			< LOQ				< LOQ	< LOQ		< LOQ			
10 / 3 / 1	2,02	< LOQ		< LOQ	0,02				< LOQ	0,1	< LOQ			
10 / 3 / 2	2,02	< LOQ		< LOQ	0,02				< LOQ	< LOQ	< LOQ		0,06	
10 / 4 / 1	2,72	< LOQ		< LOQ	0,02			< LOQ	< LOQ		< LOQ			
10 / 4 / 2	2,72	< LOQ		< LOQ	0,02				< LOQ		< LOQ		0,36	
10 / 5 / 1	1,89	< LOQ		< LOQ						< LOQ	< LOQ			
10 / 5 / 2	1,89	< LOQ		< LOQ							< LOQ			

Bedrijf/zeug/big	Serumconcentratie zeug (ng.mL ⁻¹)							Serumconcentratie big (ng.mL ⁻¹)						
	DON	DOM-1	ZEN	α-ZOL	β-ZOL	T-2	HT-2	DON	DOM-1	ZEN	α-ZOL	β-ZOL	T-2	HT-2
11 / 1 / 1	< LOQ	< LOQ				< LOQ		< LOQ					< LOQ	
11 / 1 / 2	< LOQ	< LOQ				< LOQ		< LOQ					< LOQ	
11 / 2 / 1		< LOQ				< LOQ		< LOQ					< LOQ	
11 / 2 / 2		< LOQ				< LOQ		< LOQ					< LOQ	
11 / 3 / 1	0,16	< LOQ				< LOQ		< LOQ					< LOQ	
11 / 3 / 2	0,16	< LOQ				< LOQ		< LOQ					< LOQ	
11 / 4 / 1		< LOQ				< LOQ		< LOQ					< LOQ	
11 / 4 / 2		< LOQ				< LOQ		< LOQ					< LOQ	
11 / 5 / 1	0,13	< LOQ				< LOQ		< LOQ					< LOQ	
11 / 5 / 2	0,13	< LOQ				< LOQ		< LOQ					< LOQ	
12 / 1 / 1	0,77	< LOQ	0,65					< LOQ	0,76					
12 / 1 / 2	0,77	< LOQ	0,65					< LOQ	< LOQ					
12 / 2 / 1	0,95	< LOQ						< LOQ						
12 / 2 / 2	0,95	< LOQ						< LOQ						
12 / 3 / 1	1,03	< LOQ						< LOQ						
12 / 3 / 2	1,03	< LOQ						< LOQ						
12 / 4 / 1	0,88	< LOQ						< LOQ						
12 / 4 / 2	0,88	< LOQ						< LOQ						
12 / 5 / 1	1		1,87					< LOQ	0,48					
12 / 5 / 2	1		1,87					< LOQ						
13 / 1 / 1	0,55	< LOQ												
13 / 1 / 2	0,55	< LOQ						< LOQ						
13 / 2 / 1	0,56	< LOQ						< LOQ						
13 / 2 / 2	0,56	< LOQ					0,49	< LOQ		< LOQ				
13 / 3 / 1	0,32	< LOQ						< LOQ						
13 / 3 / 2	0,32	< LOQ						< LOQ						
13 / 4 / 1	0,51	< LOQ	1,17					< LOQ						
13 / 4 / 2	0,51	< LOQ	1,17					< LOQ						
13 / 5 / 1	0,46	< LOQ						< LOQ						
13 / 5 / 2	0,46	< LOQ						< LOQ						

Bedrijf/zeug/big	Serumconcentratie zeug (ng.mL ⁻¹)							Serumconcentratie big (ng.mL ⁻¹)							
	DON	DOM-1	ZEN	α-ZOL	β-ZOL	T-2	HT-2	DON	DOM-1	ZEN	α-ZOL	β-ZOL	T-2	HT-2	
14 / 1 / 1	staal ontbreekt														
14 / 1 / 2	staal ontbreekt							< LOQ		0,2					
14 / 2 / 1	0,98							< LOQ							
14 / 2 / 2	0,98							< LOQ							
14 / 3 / 1	0,81	< LOQ						< LOQ		0,81					
14 / 3 / 2	0,81	< LOQ						< LOQ							
14 / 4 / 1	0,49	< LOQ	< LOQ					< LOQ		0,19					
14 / 4 / 2	0,49	< LOQ	< LOQ					< LOQ							
14 / 5 / 1	0,94	< LOQ	0,12					< LOQ							
14 / 5 / 2	0,94	< LOQ	0,12					< LOQ							
15 / 1 / 1	0,12	< LOQ					< LOQ	< LOQ							
15 / 1 / 2	0,12	< LOQ					< LOQ	< LOQ							
15 / 2 / 1		< LOQ					< LOQ	< LOQ							
15 / 2 / 2		< LOQ					< LOQ	< LOQ							
15 / 3 / 1	0,1	< LOQ					< LOQ	< LOQ							
15 / 3 / 2	0,1	< LOQ					< LOQ	0,13	< LOQ						
15 / 4 / 1		< LOQ					< LOQ	< LOQ	< LOQ						
15 / 4 / 2		< LOQ					< LOQ	< LOQ							
15 / 5 / 1	0,24	< LOQ					< LOQ	0,18	< LOQ						
15 / 5 / 2	0,24	< LOQ					< LOQ	< LOQ							
16 / 1 / 1	0,36	< LOQ					< LOQ	< LOQ							
16 / 1 / 2	0,36	< LOQ					< LOQ	< LOQ							
16 / 2 / 1	0,36	< LOQ					< LOQ	< LOQ							
16 / 2 / 2	0,36	< LOQ					< LOQ	< LOQ							
16 / 3 / 1	0,38	< LOQ					< LOQ	< LOQ							
16 / 3 / 2	0,38	< LOQ					< LOQ	< LOQ							
16 / 4 / 1	0,43	< LOQ					< LOQ	< LOQ							
16 / 4 / 2	0,43	< LOQ					< LOQ	< LOQ							
16 / 5 / 1	0,27	< LOQ					0,4	< LOQ							
16 / 5 / 2	0,27	< LOQ					0,4	< LOQ							

Bedrijf/zeug/big	Serumconcentratie zeug (ng.mL ⁻¹)							Serumconcentratie big (ng.mL ⁻¹)						
	DON	DOM-1	ZEN	α-ZOL	β-ZOL	T-2	HT-2	DON	DOM-1	ZEN	α-ZOL	β-ZOL	T-2	HT-2
17 / 1 / 1	0,51	< LOQ		< LOQ	0,07			< LOQ	< LOQ		< LOQ			
17 / 1 / 2	0,51	< LOQ		< LOQ	0,07				< LOQ		< LOQ			
17 / 2 / 1	0,69	< LOQ		< LOQ	0,05				< LOQ		< LOQ			
17 / 2 / 2	0,69	< LOQ		< LOQ	0,05			< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ			
17 / 3 / 1	0,1	< LOQ		< LOQ					< LOQ		< LOQ			
17 / 3 / 2	0,1	< LOQ		< LOQ					< LOQ		< LOQ			
17 / 4 / 1	0,23	< LOQ		< LOQ	0,03				< LOQ		< LOQ	0,05		
17 / 4 / 2	0,23	< LOQ		< LOQ	0,03				< LOQ		< LOQ			
17 / 5 / 1	0,56	< LOQ		< LOQ	0,05				< LOQ		< LOQ			
17 / 5 / 2	0,56	< LOQ		< LOQ	0,05				< LOQ		< LOQ			
18 / 1 / 1	1	< LOQ		< LOQ	0,09				< LOQ		< LOQ			
18 / 1 / 2	1	< LOQ		< LOQ	0,09				< LOQ		< LOQ			
18 / 2 / 1	1,19	< LOQ		< LOQ	0,06			< LOQ	< LOQ		< LOQ	0,05		
18 / 2 / 2	1,19	< LOQ		< LOQ	0,06				< LOQ		< LOQ			
18 / 3 / 1	1,19	< LOQ		< LOQ					< LOQ		< LOQ			
18 / 3 / 2	1,19	< LOQ		< LOQ				< LOQ	< LOQ		< LOQ			
18 / 4 / 1	0,94	< LOQ		< LOQ	0,1			< LOQ			< LOQ			
18 / 4 / 2	0,94	< LOQ		< LOQ	0,1				< LOQ		< LOQ			
18 / 5 / 1	0,55	< LOQ		< LOQ	0,07				< LOQ	0,14	< LOQ			
18 / 5 / 2	0,55	< LOQ		< LOQ	0,07				< LOQ		< LOQ			
19 / 1 / 1	0,74	< LOQ		< LOQ	0,06				< LOQ		< LOQ			
19 / 1 / 2	0,74	< LOQ		< LOQ	0,06				< LOQ		< LOQ	0,04		
19 / 2 / 1	0,38	< LOQ		< LOQ	0,04				< LOQ		< LOQ			
19 / 2 / 2	0,38	< LOQ		< LOQ	0,04				< LOQ		< LOQ			
19 / 3 / 1	0,63	< LOQ		< LOQ	0,06				< LOQ		< LOQ			
19 / 3 / 2	0,63	< LOQ		< LOQ	0,06				< LOQ		< LOQ			
19 / 4 / 1	0,46	< LOQ		< LOQ	0,04				< LOQ		< LOQ			
19 / 4 / 2	0,46	< LOQ		< LOQ	0,04				< LOQ		< LOQ			
19 / 5 / 1	0,2	< LOQ		< LOQ	0,04			< LOQ	< LOQ		< LOQ			
19 / 5 / 2	0,2	< LOQ		< LOQ	0,04			< LOQ	< LOQ		< LOQ			

Bedrijf/zeug/big	Serumconcentratie zeug (ng.mL ⁻¹)							Serumconcentratie big (ng.mL ⁻¹)						
	DON	DOM-1	ZEN	α-ZOL	β-ZOL	T-2	HT-2	DON	DOM-1	ZEN	α-ZOL	β-ZOL	T-2	HT-2
20 / 1 / 1	0,49	< LOQ		< LOQ	0,04			< LOQ			< LOQ			
20 / 1 / 2	0,49	< LOQ		< LOQ	0,04			< LOQ			< LOQ			
20 / 2 / 1	0,55	< LOQ		< LOQ				< LOQ			< LOQ			
20 / 2 / 2	0,55	< LOQ		< LOQ				< LOQ			< LOQ			
20 / 3 / 1	0,37	< LOQ		< LOQ	0,03			< LOQ			< LOQ			
20 / 3 / 2	0,37	< LOQ		< LOQ	0,03			< LOQ			< LOQ			
20 / 4 / 1	0,67	< LOQ		< LOQ				< LOQ			< LOQ			
20 / 4 / 2	0,67	< LOQ		< LOQ				< LOQ			< LOQ			
20 / 5 / 1	0,36	< LOQ		< LOQ				< LOQ			< LOQ			
20 / 5 / 2	0,36	< LOQ		< LOQ				< LOQ			< LOQ			

Nota; gele vakjes = gedetecteerde concentraties, lege vakjes = minder dan de detectielimiet = LOD/2 (LOD voor DON = 0,02 ng.mL⁻¹, DOM-1 = 0,06 ng.mL⁻¹, ZEN = 0,01 ng.mL⁻¹, α-ZOL = 0,01 ng.mL⁻¹, β-ZOL = 0,02 ng.mL⁻¹, T-2 = 0,01 ng.mL⁻¹ en HT-2 = 0,01 ng.mL⁻¹), < LOQ = minder dan de kwantificatielimiet = LOQ/2 (=0,1 ng.mL⁻¹ voor alle analyten behalve DOM-1 = 0,2 ng.mL⁻¹); ° = de resultaten liggen buiten de vastgestelde range van de methode (buiten de kalibratiecurve).