

Glyphosatnachweis in der Duodenalflüssigkeit bei Pferden mit Magenulzerasyndrom

G.F. Schusser¹, G. Köller¹, St. Recknagel¹, A. Lindner²

¹Medizinische Tierklinik, Veterinärmedizinische Fakultät, Universität Leipzig; ²Biocheck, Leipzig

Zusammenfassung

Das Herbizid Glyphosat inklusive Tensid wird gegen Unkräuter in der Landwirtschaft, in Haus-, Garten- und Parkanlagen, Strassenrändern sowie auf Bahndämmen eingesetzt. Das Versprühen dieses Herbizides ermöglicht das Verwehen und somit die Kontamination der Äcker, Wiesen und Weiden und folglich des Getreides, Heus, Strohs und der Haylage und führt somit zur oralen Aufnahme bei Pferden.

Um die Verbreitung der Glyphosatanwendung im Mitteldeutschen Raum und um einen möglichen Risikofaktor zur Auslösung des Magenulzerasyndromes zu eruieren, ist die Duodenalflüssigkeit bei Pferdepatienten auf Glyphosat getestet worden.

Überwiesene, unbehandelte Pferdepatienten (n=92) mit dem Vorbericht Kolik, Abmagerung, Durchfall, Anämie oder Leistungsdepression sind am Tag der Einweisung gastroduodenoskopiert worden. Die Graduierung der Schleimhautläsionen im Magen und Duodenum sind erfolgt und 40 ml Duodenalflüssigkeit abgesaugt und parallel 20 ml Blut gewonnen worden. Hämatologische und chemische Untersuchungen des Blutes sowie chemische Analysen der Duodenalflüssigkeit sind erfolgt. Glyphosat im Serum und in der Duodenalflüssigkeit ist mit einem direkten, kompetitiven ELISA und parallel mit einer Hochleistungsflüssigkeitschromatographie nachgewiesen worden.

Glyphosat ist bei allen untersuchten Pferden in der Duodenalflüssigkeit (median 12,2 ng/ml, 1. Quartil 4,0 ng/ml; 3. Quartil 19,3 ng/ml; min 0,6 ng/ml; max 192,9 ng/ml) und im Blut (1,79 ng/ml; 1,0 ng/ml; 2,8 ng/ml; 0,2 ng/ml; 3,7 ng/ml) nachgewiesen worden. Die Glyphosatkonzentration in der Duodenalflüssigkeit ist signifikant höher als im Blut (Mann Whitney U-Test, $p \leq 0,05$). Pferde mit kutanen (n=11/92) bzw. glandulären (n=9/92) Schleimhautläsionen des Magens mit Grad 4/4 haben signifikant höhere bzw. höhere Glyphosatkonzentrationen in der Duodenalflüssigkeit als jene mit Grad 0/4 (n=10 bzw. 9) (median: 19,8 ng/ml versus 8,4 ng/ml bzw. 19,2 ng/ml versus 11,1 ng/ml)

Die Aktivität der Gamma-Glutamyltransferase (GGT) in der Duodenalflüssigkeit ist in der Pferdegruppe mit niede-

Glyphosate detection in the duodenal fluid of horses with gastric ulcer syndrome

The hay producing plants, concentrate, straw and meadows could be contaminated by the aerosols of glyphosate based herbicide during spraying process of crops and pre-harvest desiccation treatment of cereals.

The aim of this study is to investigate the concentration of glyphosate in the duodenal fluid of horses with gastric ulcer syndrome.

The stomach and duodenum of referred untreated horse patients (n=92) with colic, weight loss, diarrhoea, anemia or performance intolerance were endoscopically examined right after the admission. Duodenal fluid (40 ml) was collected from the duodenal region where the papilla duodeni major is located. Hematology and clinical chemistry data were examined. The concentration of glyphosate in serum and duodenal fluid samples were analysed using a competitive ELISA and control analysis had also been done with HPLC. Statistical differences between groups were determined by the non-parametric Mann-Whitney-test using a significant level of $p \leq 0,05$.

Glyphosate was detected in all duodenal fluid (median 12,2 ng/ml; 1st quartile 4,0 ng/ml; 3rd quartile 19,3 ng/ml; min 0,6 ng/ml; max. 192,9 ng/ml) and blood samples (1,79 ng/ml; 1,0 ng/ml; 2,8 ng/ml; 0,2 ng/ml; 3,7 ng/ml) of all horses. Glyphosate concentrations of duodenal fluid samples are significantly higher than in blood samples (Mann Whitney U-test, $p \leq 0,05$). The concentration of glyphosate in the duodenal fluid was significantly higher in horses with squamous gastric disease (grade 4/4; n=11/92) compared to horses with normal squamous mucosa (grade 0/4, n=10/92) (median: 19,8 ng/ml versus 8,4 ng/ml). Horses with glandular gastric disease and a grade 4/4 (n=9/92) had higher concentrations of glyphosate in the duodenal fluid than horses with normal glandular mucosa (grade 0/4; n=9/92) (median: 19,2 versus 11,1). The Gamma-Glutamyltransferase (GGT) enzyme activity is significantly higher in the group of horses with lower concentration of glyphosate in the duodenal fluid ($\leq 12,2$ ng/ml) compared with the group

<https://doi.org/10.17236/sat00374>

Eingereicht: 07.02.2022
Angenommen: 11.09.2022

Glyphosatnachweis in der Duodenalflüssigkeit bei Pferden mit Magenulzerasyndrom

G.F. Schusser, G. Köller, St. Recknagel, A. Lindner

rer Glyphosatkonzentration ($\leq 12,2$ ng/ml) signifikant höher (median 279,5 U/L) als in der Pferdegruppe mit höherer Glyphosatkonzentration ($> 12,2$ ng/ml) (median 101,9 U/L). Die Glyphosatkonzentration ist während des Herbstes ($n=18$; median 14,3 ng/ml) am höchsten und am niedrigsten im Frühjahr ($n=34$; median 8,1 ng/ml). Signifikant höhere Glyphosatkonzentrationen in der Duodenalflüssigkeit sind bei Pferden, gehalten um die grossen Städte (17,8 ng/ml) im Vergleich zu den Pferden im ländlichen Raum (7,5 ng/ml), gemessen worden.

Schlüsselwörter: Duodenalflüssigkeit, Gammaglutamyltransferase, Glyphosat, Magenulzera, Pferd

with higher concentration of glyphosate ($> 12,2$ ng/ml) (median 279,5 versus 101,9 U/L). During autumn the horses had higher concentrations of glyphosate in duodenal fluid ($n=18$; median 14,3) compared with lower concentrations in spring time ($n=34$; median 8,1 ng/ml). Horses kept around big cities had significantly higher concentrations of glyphosate in the duodenal fluid in comparison to horses living in the countryside (medians 17,8 ng/ml versus 7,5 ng/ml).

Keywords: horse, gastric ulcer, duodenal fluid, glyphosate, gamma glutamyl transferase

Einleitung

Das Herbizid Glyphosat, ein N-(phosphonomethyl)glycin, inklusive des Netzmittels (= Tensid, Surfactant; z.B. Polyethoxylat-Tallow-Amin) ist in Deutschland in einer Menge von 3770 Tonnen gegen Unkräuter in der Landwirtschaft, in Haus- und Hobbygärten, Parkanlagen sowie zur Freihaltung von Unkräutern der Bahndämme und Strassenränder im Jahr 2020 eingesetzt worden.²⁹ In Österreich sind bis 2018 durchschnittlich 329 Tonnen pro Jahr in Verkehr gebracht worden.³⁰ In der Schweiz ist der Verkauf von 2008 bis 2020 von 342 auf 119 Tonnen um 65,09 % zurück gegangen.²⁷ Das Netzmittel (Tensid) setzt die Grenzflächenspannung zwischen Glyphosat und Pflanzenblattoberfläche herab, erhöht die Glyphosatlöslichkeit, schützt vor Abbau, verlängert die Halbwertszeit und unterstützt die Penetration der Zellmembran.²¹ Die Toxizität des jeweiligen Netzmittels alleine und des Herbizids mit Netzmittel inklusive Glyphosat ist höher als das Glyphosat alleine.¹ Das Versprühen des Glyphosates inklusive des Tensides auf Getreide, Reis, Sojabohnen und Zuckerrüben ermöglicht den Hautkontakt, die Inhalation und auch die orale Aufnahme über diese landwirtschaftlichen Erzeugnisse durch die Menschen und Haustiere. Glyphosat ist als mögliche kanzerogene Ursache beim Menschen beschrieben worden.^{3,14,34} Glyphosat, nachgewiesen im Brunnen-, Regen- und Seenwasser (67,3 und 28 bis 45 ng/ml), könnte als Ursache einer chronischen Nierenerkrankung beim Menschen in Sri Lanka, Mexico, Nicaragua, El Salvador, Argentinien und Indien sein.^{2,13} In einer weiteren Studie ist Glyphosat im Harn von 1,3–12,0 ng/ml bei 39 % der Farmer in den USA, in Frankreich von 9,5 ng/ml und in Sri Lanka von 73,5 ng/ml nach der Glyphosatanwendung auf dem Feld gefunden worden.²⁵ In der Schweiz und in Deutschland sind Glyphosatkonzentrationen im Harn des Menschen von 2,8 und 5,6 ng/ml gemessen worden.^{8,36} In einer retrospektiven Analyse über Umweltgifte im Bereich von Mailand, Italien, sind 13,8 % Todesfälle bei Hunden infolge der Aufnahme von Glyphosat festgestellt worden.^{5,9} Ziel dieser Arbeit ist der Nachweis des Herbizides Glyphosat in der Duodenalflüssigkeit

bei überwiesenen Pferdepatienten mit Indikation zur Gastroduodenoskopie und der zeitliche und regionale Nachweis der oralen Aufnahme dieses Herbizides im mitteldeutschen Raum.

Material und Methodik

Tiere

In den Jahren 2016 und 2017 sind 92 Pferde (30 Stuten, 44 Wallache, 18 Hengste; Alter 11 Jahre (Median) (1. Quartil 8; 3. Quartil 15; min. 1, max. 23) der Rassen Warmblut ($n=73$), Englisches Vollblut ($n=2$), Vollblutaraber ($n=5$), Traber ($n=1$), Kaltblut ($n=1$), Friese ($n=6$) und Deutsches Reitpony ($n=4$) mit dem Vorbericht Kolik ($n=54$), Abmagerung ($n=21$), Durchfall ($n=3$), Anämie ($n=3$), Plattenepithelkarzinom der Haut ($n=1$), Harnabsatzstörung ($n=1$) oder Leistungsdepression ($n=9$) zur Gastroduodenoskopie überwiesen worden. 76 Pferde sind im Freizeitsport und 16 Pferde im Dressur- oder Springsport der Klassen A, L oder M eingesetzt worden.

Gastroduodenoskopie

Die Gastroduodenoskopie ist gleich nach der Ankunft in der Medizinischen Tierklinik, Veterinärmedizinische Fakultät, Universität Leipzig, durchgeführt worden, wobei eine vierstündige Nahrungskarenz im Heimatstall vorher eingehalten worden ist. Die Transportzeit kommt noch hinzu. Pferde mit gefülltem Magen sind von der Untersuchung ausgeschlossen worden, wobei nur die vorberichtlich bekannten zwei Pferde mit Magenentleerungsstörung und ein Pferd mit chronischer, primärer Magenverstopfung in die gastroscopische Untersuchung einbezogen worden sind. Der Standort des kranken Pferdes und die Kraftfutter-, Heu-, Haylage- und Strohherkunft sind erhoben worden. Als Einschlusskriterium dieser Untersuchung hat gegolten, dass kein Pferd Medikamente insbesondere keine steroidalen oder nicht steroidalen Antiphlogistika bis vierzehn Tage vor Aufnahme erhalten hat. Die indizierte gastroduodenoskopische Untersuchung ist unter Sedierung mit Detomidin (Cepesedan RP ad us.

vet., CP-Pharma, 31303 Burgdorf, Deutschland, 0,02 mg / kg i.v.) und Butorphanol (Butomidol ad us. vet., Vetoquinol, 85737 Ismaning, Deutschland, 0,01 mg / kg i.v.) vorgenommen worden. Die Charakterisierung der ulzerativen und erosiven Läsionen in der grossen und kleinen Kurvatur der kutanen Schleimhaut des Magens (Equine Squamous Gastric disease=ESGD) sind aufgrund des Consensus Statement «Equine Gastric Ulcer Syndrome (EGUS) in Adult Horses» des European College of Equine Internal Medicine graduiert worden.³² Die Graduierung der glandulären Schleimhaut (Equine Glandular Gastric Disease=EGGD) des Fundus und insbesondere des Antrums und Pylorus ist aufgrund der Publikation von Banse und Andrews⁴ vorgenommen worden: Grad 0=normal, Grad 1=lokale Hyperämie, Grad 2=fokale, flache, fibrinöse Läsionen im Fundus oder Antrum, Grad 3=flache, hämorrhagisch fibrinöse Läsionen im Antrum, Grad 4=erhabene, hämorrhagisch fibrinöse Läsionen im Pylorus. Polypen im Antrum, Pylorus oder Duodenum und Schleimhautveränderungen im Duodenum mit Biopatientnahmen sind gesondert beschrieben worden.^{11,26,35} Die Entnahme der Duodenalflüssigkeit ist durch den Arbeitskanal des Gastroskopes im Bereich der Papillae majoris et minoris duodeni erfolgt. Nur bei den zwei Pferden mit Magenentleerungsstörung und bei dem Pferd mit chronischer, primärer Magenverstopfung ist flüssiger Mageninhalt gewonnen worden. Die Magen- bzw. Duodenalflüssigkeitsmenge hat 20 bis 40 ml pro Pferdepatient umfasst und diese Proben sind gepaart mit dazugehörigen Serumproben (20 ml) bis zur Analyse bei minus 20 °C gelagert worden.

Labormedizinischen Untersuchungen

Die labormedizinischen Untersuchungen der Serum- und Duodenalflüssigkeitsproben sind nach den beschriebenen Laboruntersuchungsmethoden durchgeführt worden.¹⁵ Die Aktivität der Glutathion-S-Transferase (GST) ist analog dem GST-Assay-Kit (Merck-Sigma-Aldrich, Darmstadt, Deutschland) bestimmt worden. Hierzu sind 4 µl Probe zu 196 µl einer Substratlösung, bestehend aus 9,8 ml PBS-Puffer, 0,1 ml 200 mM L-Glutathion (reduzierte Form) und 0,1 ml 100 mM 1-Chloro-2,4-dinitrobenzen (CDNB), gegeben und die Extinktion bei 340 nm für 6 Minuten gemessen worden. Der Anstieg der resultierenden Kurve hat der GST-Aktivität und die Aktivität von 1 U hat dem Stoffumsatz von 1 µmol/l CDNB pro min entsprochen.

Der Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA) (Abraxis, Warminster, PA, USA) zum Glyphosatnachweis ist ein direkter, kompetitiver ELISA, in dem Glyphosatmoleküle durch polyklonale Antikörper erfasst worden sind. Die zu untersuchenden Proben von Serum und Duodenalflüssigkeit sind derivatisiert und auf beschichtete Mikrotiterplatten pipettiert worden. Mittels eines zweiten Antikörpers, Konjugat, Substrat und Stopplösung sind die Antikörperkomplexe auf der Mikrotiterplatte gebunden, eine Farb-

reaktion erzeugt und diese mittels eines ELISA-Reader-Gerätes gemessen worden. Die Intensität der Farbreaktion ist proportional zur Glyphosatkonzentration der Probe. Die Validierung des ELISA zur Glyphosatkonzentrationsbestimmung in der Serumprobe ist mit Hilfe der Gas-Chromatographie-Massen-Spektrometrie (GC-MS) im Medizinischen Labor in Bremen (Haferwende 12, D-28357 Bremen) erfolgt und mit einer Korrelation von 0,95 und einer Messunsicherheit von kleiner als 10 % ausgewertet worden. Der ELISA hat eine Testuntergrenze von 0,075 ng/ml und eine Testobergrenze von 4,0 ng/ml ausgewiesen. Proben, welche eine höhere Glyphosatkonzentration als 4 ng/ml enthalten haben, sind stärker verdünnt, wiederholt gemessen und die Konzentration durch Multiplikation mit dem Verdünnungsfaktor berechnet worden. Die Wiederfindung von genau bemessenen Glyphosattmengen in Serum- und Duodenalflüssigkeitsproben hat im ELISA 91 bzw. 65 % betragen.

Die Glyphosatkonzentrationen der Serum- und Duodenalflüssigkeitsproben, gemessen mit ELISA, sind parallel mit einer Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (HPLC) mittels Fluoreszenzdetektion bei 260 und 320 nm Wellenlänge kontrolliert worden. Die Probenaufbereitung zur Eliminierung von Matrixbestandteilen hat die Proteinfällung mit Acetonitril und Festphasenextraktion mit Chromabondsäulen (Machery-Nagel GmbH & Co. KG, Valencienner Str. 11, 52355 Düren, Deutschland) umfasst. Die Derivatisierung ist nach Schüssler und Mikler (Bayrisches Landesamt für Wasserwirtschaft, Lazarettstr. 67, 80636 München, Deutschland) und Le Fur et al.¹⁸ erfolgt. Die HPLC-Systemparameter sind nach der Messmethode von Küsters und Gerhartz¹⁶ definiert worden. Vergleichsuntersuchungen mit Referenzmaterial, ausgeführt in Ringuntersuchungen in externen Untersuchungslaboratorien und internen Kontrollen, haben eine Korrelation zwischen ELISA und HPLC mit Serumproben von 0,95 und eine Nachweisgrenze bei 2 ng/ml sowie eine Messunsicherheit von 6 % ergeben. Die Wiederfindung mit der HPLC in Abhängigkeit der verwendeten Matrix Serum und Duodenalflüssigkeit liegt bei 94 bzw. 66 bis 99 %.

Statistik

Die statistische Analyse der einzelnen Blutparameter inklusive Glyphosatkonzentration im Serum und in der Duodenalflüssigkeit umfasst den Medianwert inklusive erstes und drittes Quartil sowie den Minimal- und Maximalwert. Zwischen den Tests ist der Rangkorrelationskoeffizienten nach Spearman berechnet worden. Die statistische Unterscheidung bei $p \leq 0,05$ zwischen den einzelnen Analysengruppen ist mit Hilfe des nichtparametrischen Mann-Whitney-Tests durchgeführt worden.

Die Zustimmung der Eigentümerin des jeweiligen Pferdes zur Veröffentlichung der Daten ist bei Aufnahme gemacht worden.

Glyphosatnachweis in der Duodenalflüssigkeit bei Pferden mit Magenulzerasyndrom

G.F. Schusser, G. Köller, St. Recknagel, A. Lindner

Glyphosatnachweis in der Duodenalflüssigkeit bei Pferden mit Magenulzerasymptom

G.F. Schusser, G. Köller, St. Recknagel, A. Lindner

Resultate

Klinische Untersuchungsbefunde

Die objektiv klinischen Befunde der 92 Pferdepatienten sind: innere Körpertemperatur 37,9°C (1.Quartil 37,7; 3.Quartil 38,1; min. 37,0; max. 39,5), Atemfrequenz 17/min (15; 20; 8; 34), Herzfrequenz 44/min (40; 56; 24; 80). Glyphosat im Serum und in der Duodenalflüssigkeit ist bei jedem Pferdepatient nachgewiesen worden (Tabelle 1, 3). Die Diagnosen der 54 Pferde mit Kolik sind: EGUS (40/54), Obstipation der linken ventralen Kolonlängslage (2/54), Obstipation des gesamten Blinddarmes (2/54), Dickdarmverlagerung (2/54), Gastroduodenojejunitis (2/54), multisystemische eosinophile epitheliotrope Krankheit (1/54), Gastroösophageale Refluxkrankheit (GERD) infolge Magenentleerungsstörung (2/54), chronische primäre Magenverstopfung (1/54), Peritonitis (Kolonulcus aufgrund lymphoplasmazelluläre Enterocolitis, kalte Druse mit Abszedierung

intraabdominaler Lymphknoten) (2/54). Diagnosen der 21 Pferde mit Abmagerung: EGUS (13/21), rekurrende Verlagerung der linken Kolonlängslage über das Milz-Nieren-Band (1/21), Peritonitis (1/21), Hepathopathie (2/21), lymphoplasmazelluläre Enterocolitis (2/21), Grass sickness (1/21), Narkolepsie (1/21). Diagnosen der 3 Pferde mit Durchfall: akute Typhlocolitis (2/3), lymphoplasmazelluläre Enterocolitis (1/3). Diagnosen der 3 Pferde mit Anämie: B-Zell-Lymphom (1/3), Hämoabdomen aufgrund eines Magenulkusdurchbruches (1/3), Anämie mit ungeklärter Genese jedoch nicht infolge infektiöser Anämie (1/3). Ein Pferd mit Harnabsatzstörung infolge fibrinöser Zystitis und ein Pferd mit Plattenepithelkarzinom im Anusbereich sowie 9 Pferde mit Leistungsdepression (EGUS mit Grad 2–4/4 in der kutanen und/oder glandulären Magenschleimhaut) sind ebenfalls gastroskopiert worden. Die beiden Pferde mit einer diagnostizierten GERD haben eine Magenentleerungsstörung als Ursache aufgewiesen, wobei

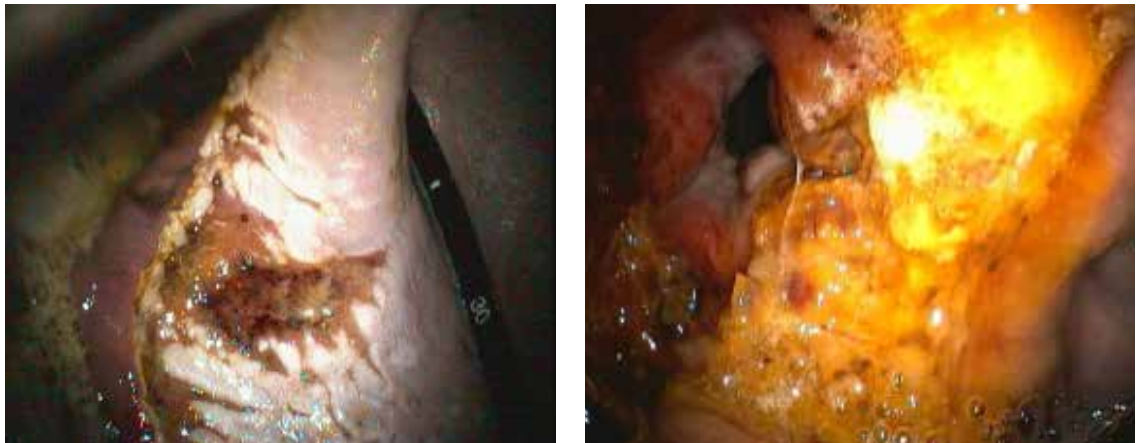


Abbildung 1: Warmblutstute, 16 Jahre alt, mit Leistungsdepression als Folge eines grossen, tiefgehenden Ulkus in der kleinen Kurvatur des Margo plicatus der kutanen Schleimhaut mit ESGD-Grad 4/4 (Bild links) und erhabene, hämorrhagisch fibrinöse Läsionen im Antrum und Pylorus mit EGGD-Grad 4/4 (Bild rechts) sowie der höchsten Glyphosatkonzentration in der Duodenalflüssigkeit von 192,9 ng/ml.

Tabelle 1: Die Glyphosatkonzentrationen in der Duodenalflüssigkeit sind bei Pferdepatienten mit ESGD 4/4 (= Equine Squamous Gastric Disease: grosser tiefgehender Ulkus) signifikant (*) und bei jenen Pferdepatienten mit EGGD Grad 4/4 (Equine Glandular Gastric Disease: erhabene, hämorrhagisch fibrinöse Läsionen im Pylorus) wesentlich höher als bei den Pferdepatienten mit physiologischer kutaner (Grad 0/4) oder physiologischer Drüsenschleimhaut (Grad 0/4) des Magens. Werte der Glyphosatkonzentrationen in Median, 1. Quartil; 3. Quartil, Minimal-, Maximalwert. Mann-Whitney-Test (*) p≤0,05.

| | ESGD 0/4 | ESGD 1/4 | ESGD 2/4 | ESGD 3/4 | ESGD 4/4 |
|--|---|--|--|---|---|
| Glyphosat in der Duodenalflüssigkeit ng/ml | 8,4* (2,45; 15,18) min 0,6; max 22,9 n = 10 | 12,1 (7,4; 20,6) min 1,1; max 53,2 n = 19 | 8,5 (2,87; 15,1) min 1,15; max 23,3 n = 25 | 11,5 (5,75; 17,75) min 2,1; max 33,1 n = 27 | 19,8* (12,05; 30,1) min 3,0; max 192,9 n = 11 |
| | EGGD 0/4 | EGGD 1/4 | EGGD 2/4 | EGGD 3/4 | EGGD 4/4 |
| Glyphosat in der Duodenalflüssigkeit ng/ml | 11,1 (5,3; 19,45) min 3,0; max 29,3 n = 9 | 11,9 (7,65; 20,6) min 0,6; max 33,1 n = 30 | 14,1 (6; 17,9) min 1,8; max 26,7 n = 21 | 15,6 (7,1; 21,3) min 3,1; max 29,0 n = 23 | 19,2 (9,2; 30,9) min 6,0; max 192,9 n = 9 |

nach dreitägiger Nahrungskarenz der Magen stets rektal fühlbar, endoskopisch Mageninhalt über den Margo plicatus stets nachweisbar und die hyperechoische Magenwand bis zum 15. Interkostalraum links feststellbar gewesen ist.

Gastroduodenoskopie Befunde und Glyphosatkonzentrationen

Eine unauffällige kutane Schleimhaut haben 10/92 und 9/92 Pferdepatienten haben eine unauffällige Drüsen-schleimhaut im Magen aufgewiesen. Allerdings hat kein Pferdepatient in dieser Studie sowohl eine normale kutane als auch eine physiologische, glanduläre Magenschleimhaut gezeigt. Die Pferdepatienten mit dem höchsten Grad der Läsionen in der kutanen Schleimhaut (ESGD, Grad 4/4) haben signifikant höhere Glyphosatkonzentrationen in der Duodenalflüssigkeit im Vergleich zu jenen Pferdepatienten mit physiologischer, kutaner Magenschleimhaut (Grad 0/4) (Abbildung 1, Tabelle 1). Die Glyphosatkonzentrationen in der Duodenalflüssigkeit der Pferdepatienten mit erhabenen, hämorrhagisch fibrinöseitigen Läsionen im Antrum und Pylorus (EGGD, 4/4) (Abbildung 2) sind wesentlich höher als bei jenen Pferdepatienten mit physiologischer, glandulärer Schleimhaut (Grad 0/4) (Tabelle 1). Drei Pferde mit EGGD Grad 3/4 und Polypen vom Typ II³⁵ im Pylorus und ein Pferd mit EGGD Grad 2/4 und erhabenen Brunner'schen Drüsen²⁶ haben eine Glyphosatkonzentration in der Duodenalflüssigkeit von 1,8; 3,1; 21 bzw. 5,5 ng/ml aufgewiesen. Drei bzw. vier Pferde mit EGGD Grad 3/4 bzw. 4/4 haben eine Glyphosatkonzentration in der Duodenalflüssigkeit von 22,9 bis 45,7 ng/ml aufgewiesen, wobei eine wellenförmige, verdickte duodenale Schleimhaut mit Lumeneinengung festgestellt und in den Schleimhautbiopaten eine mittelgradige lymphoplasmazelluläre Infiltration in der Lamina propria mucosae der Dünndarmschleimhaut gefunden worden ist.

Labormedizinische Befunde

Die Labormedizinischen Daten sind in Tabelle 2 und 3 aufgelistet. Zwei Pferde mit Abmagerung infolge Hepatopathie haben Aktivitäten der Enzyme Gamma-Glutamyltransferase (GGT) und Glutamatdehydrogenase (GLDH) von 173,5 und 126,2 U/L bzw. 45,2 und 12,7 U/L sowie eine Gesamtbilirubin- von 96,4 µmol/L und 86,7 µmol/L und eine direkte Bilirubinkonzentration von 8,9 µmol/L und 11,9 µmol/L im Serum aufgewiesen. Das letztere Pferd hat einen Ultraschallbefund des Leberparenchyms mit Hyperechogenität, Gallengänge mit Schallschatten, in den Leberbiopaten eine subakute bis chronische Hepatitis und im Antrum und Pylorus einen EGGD-Grad von 4/4 gezeigt (Abbildung 2). Die Konzentrationen des Glyphosats in der Duodenalflüssigkeit sind bei 20 und 45,7 ng/ml gemessen worden.

Die Aktivitäten der GGT und der alkalischen Phosphatase (ALP), gemessen in der Duodenalflüssigkeit, sind im Vergleich zu den entsprechenden Aktivitäten im Serum signifikant höher insbesondere die der GGT. Dagegen die Akti-

vitäten der Aspartat-Aminotransferase (ASAT) und der GLDH sowie die Totalproteinkonzentration sind signifikant niedriger in der Duodenalflüssigkeit als im Serum. Die Konzentration des Gesamtbilirubins und des direkten Bilirubins sind signifikant um ein Vielfaches höher in der Duodenalflüssigkeit als im Serum. Die Enzymaktivitäten der ALP, ASAT und GST sind bei der Gruppe der Pferde mit niedriger oder gleicher Glyphosatkonzentration als der eruierte Medianwert von 12,2 ng/ml in der Duodenalflüssigkeit höher im Vergleich zu jenen Pferden mit höherer Glyphosatkonzentration als der Medianwert aller Pferde von 12,2 ng/ml. Nur die Enzymaktivität der GGT in der Duodenalflüssigkeit von den Pferden mit niedriger oder gleicher Glyphosatkonzentration als der Medianwert von 12,2 ng/ml aller Pferde ist signifikant höher als in jener Pferdegruppe mit höherer Glyphosatkonzentration (>12,2 ng/ml) (Tabelle 3). Die höchste, gemessene Glyphosatkonzentration von 192,9 ng/ml eines Pferdepatienten mit Leistungsdepression und mit ESGD Grad 4/4 sowie EGGD Grad 4/4 (Abbildung 1, Tabelle 1) ist kombiniert mit einer GGT von 11,6 U/L in der Duodenalflüssigkeit. Eine gemessene GGT-Enzym-Aktivität von 3666 U/L wird begleitet mit 7,6

Glyphosatnachweis in der Duodenalflüssigkeit bei Pferden mit Magenulzerasyndrom

G.F. Schusser, G. Köller, St. Recknagel, A. Lindner



Abbildung 2: Warmblutwallach, 15 Jahre alt, mit Abmagerung infolge subakuter bis chronischer Hepatitis und mehrerer erhabener, hämorrhagisch fibrinöseitiger Läsionen im Antrum und Pylorus mit EGGD-Grad 4/4 und einer Glyphosatkonzentration in der Duodenalflüssigkeit von 45,7 ng/ml.

Tabelle 2: Hämatologische und blutchemische Ergebnisse der 92 Pferdepatienten mit EGUS und Nachweis von Glyphosat in der Duodenalflüssigkeit. Referenzbereiche aus Köller et al. 2014.

| | Befund (Median, 1. u. 3. Quartil) | Referenzbereich ¹⁵ aller Rassen, Alter 1 bis 26 Jahre |
|------------------------------|--------------------------------------|--|
| Erythrozyten (T/L) n = 89/92 | 7,4 (6,5; 8,6) | 5,1 – 10,2 |
| Leukozyten (G/L) n = 90/92 | 6,7 (5,4; 8,7) | 4,4 – 13,0 |
| Thrombozyten (G/L) n = 90/92 | 142 (134; 192) | 98 – 344 |
| Harnstoff (mmol/L) n = 90/92 | 4,9 (3,8; 5,6) | 2,49 – 8,95 |
| Kreatinin (µmol/L) n = 90/92 | 106 (94,5; 119,3) | 51,0 – 156,4 |

Glyphosatnachweis in der Duodenalflüssigkeit bei Pferden mit Magenulzerasyndrom

G.F. Schusser, G. Köller, St. Recknagel, A. Lindner

ng/ml Glyphosat in der Duodenalflüssigkeit eines weiteren Pferdepatienten mit Abmagerung und mit ESGD Grad 3/4 und EGGD Grad 1/4 als Diagnose. Die Glyphosatkonzentration ist in der Duodenalflüssigkeit signifikant höher als im Serum (Tabelle 3).

Die jahreszeitliche Verteilung der Glyphosatkonzentrationen in der Duodenalflüssigkeit der Pferdepatienten hat einen Höchstwert im Herbst und einen Tiefstwert im Frühling (Tabelle 4).

Die Aufnahme des kontaminierten Futters und/oder der Stroheinstreu durch die Pferde ist im Herkunftsstall/Herkunftsort erfolgt. Diese Orte liegen in ganz Mitteldeutschland (Sachsen, Sachsen-Anhalt, Thüringen) aber auch in Nordbayern, Brandenburg, Niedersachsen, Baden-Würt-

temberg und Saarland. Die signifikant höchsten Glyphosatkonzentrationen sind im Umkreis grosser Städte (17,8; 10,6; 20,9; min 1,1; max 192,9 ng/ml) und die niedrigsten im ländlichen Raum und in Dörfern (7,5; 3,0; 13,0; min 0,6; max 29,0 ng/ml) gemessen worden (Abbildung 3).

Diskussion

Das Glyphosat mit Tensid (Roundup Classic: Glyphosat plus Polyethoxylat-Tallow-Amin) befindet sich an der Oberfläche und innerhalb der Zellen der Getreidekörner, des Strohs, Heus oder Haylage und kann so durch das Pferd oral aufgenommen werden. Neuerdings werden auch die Wasserpflanzen in Wasserwegen mit Glyphosat bekämpft. So gelangt das Glyphosat noch mehr in Boden und Grundwasser, so dass auch über das Trinkwasser Pferde Glyphosat aufnehmen können.³³ Während des Sprühvorganges und durch Lufttransport, ausgelöst durch den Wind, kann Glyphosat und das Tensid auch eingeatmet und durch das Weiden auch oral aufgenommen werden. Somit kann eine Exposition der Pferde gegenüber diesem Pflanzenschutzmittel über kontaminierte Futtermittel, das Trinkwasser oder auch über die Luft erfolgen.

Zwei Pferde sind in einer Pestizidanalyse des Vergiftungskontrollzentrums Mailand beschrieben, wobei keine klinischen Symptome aufgezeichnet worden sind.⁵ Da die Gastroduodenoskopie in der Medizinischen Tierklinik sofort nach Aufnahme und somit nach der letzten Futteraufnahme im Herkunftsbetrieb durchgeführt worden ist, stammt das nachgewiesene Glyphosat vom Wasser, Futter und/oder von der Stroheinstreu des Herkunftsbetriebes. Die gemessene Glyphosatkonzentration in der Duodenalflüssigkeit könnte geringer sein als die aktuelle Aufnahme, weil die Resorption und der Weitertransport im Dünndarm kontinuierlich und die Ausscheidung des Glyphosats über den Kot und Harn erfolgt. Da die physiologische Halbwertszeit der Magenentleerung für strukturiertes Futter beim Pferd bei $t_{1/2}$ 49±30 min²³ liegt und die mittlere Magenentleerungs- und Dünndarmtransitzeit bei gefütterten Ponies⁶ bei drei Stunden gemessen worden ist, ist die Rückdatierbarkeit eines Glyphosats nachweises in der Duodenalflüssigkeit eines Pferdes innerhalb der 3 Stunden nach Aufnahme des glyphosatkontaminierten Futters und/oder der Stroheinstreu möglich. Eine längere, verzögerte, vollständige Magenentleerung bis 12 Stunden könnte durch Stress, geringe Futtermenge, fehlende Einstreu oder Transport hervorgerufen werden. Wird die Halbwertszeit des Glyphosats, gemessen im Urin des Menschen von 5,47–14,53 bzw. 9 Stunden^{7, 36} herangezogen, so kann die Rückdatierbarkeit der Glyphosataufnahme beim Pferd auch länger sein. In der vorliegenden Studie sind die Pferde mind. 4 Stunden nach der letzten Futteraufnahme untersucht und die entsprechenden Proben entnommen worden. Glyphosat ist in der Duodenalflüssigkeit als auch im Serum nachgewiesen worden, weil die Magen-

Tabelle 4: Jahreszeitliche Verteilung der Glyphosatkonzentrationen (ng/ml) in der Duodenalflüssigkeit bei 92 Pferdepatienten mit EGUS. Der Höchstwert im Herbst und der Tiefstwert im Frühling unterscheiden sich nicht signifikant. Medianwert (1., 3. Quartil), Mann-Whitney-Test, $p > 0,05$.

| Winter (22.12. – 21.3.) | Frühling (22.3. – 21.6.) | Sommer (22.6. – 21.9.) | Herbst (22.9. – 21.12) |
|----------------------------|-----------------------------|----------------------------|---------------------------|
| 11,1 (4; 17,5) n = 27 | 8,1 (3,3; 19,6) n = 34 | 11,1 (7,8; 15,6) n = 13 | 14,3 (12,4; 20) n = 18 |



Abbildung 3: Regionale Standorte in den Bundesländern Baden-Württemberg (BWB), Bayern, Brandenburg, Niedersachsen, Saarland, Sachsen, Sachsen-Anhalt und Thüringen jener 92 Pferdepatienten, bei denen am Tag der Aufnahme in der Medizinischen Tierklinik eine Gastroduodenoskopie und eine Entnahme der Duodenalflüssigkeit durchgeführt und bei denen Glyphosat in der Duodenalflüssigkeit nachgewiesen worden ist. Pferde, gehalten um grosse Städte (roter Kreisring), haben signifikant höhere Glyphosatkonzentrationen (Median 17,8; 1. Quartil 10,6; 3. Quartil 20,9; min 1,1; max 192,9 ng/ml) in der Duodenalflüssigkeit aufgewiesen, verglichen mit jenen Pferdepatienten, die im ländlichen Raum (schwarze Kreisfläche) (7,5; 3,0; 13,0; 0,6; 29,0 ng/ml) lokalisiert gewesen sind. Mann-Whitney-Test, $p \leq 0,05$.

leerung während des Transportes verzögert worden ist, daher konnte Glyphosat in der Duodenalflüssigkeit stets nachgewiesen werden. Jedoch ist die Halbwertszeit des Glyphosats beim Pferd noch nicht eruiert worden.

Die Wasserlöslichkeit des Glyphosats, verstärkt durch das Tensid, ermöglicht die Resorption im Dünndarm, den Abbau zum Glyphosatmetaboliten Aminomethylphosphonsäure (AMPA) in der Leber und die Ausscheidung über Harn und Kot. Somit besteht die Nachweismöglichkeit des Glyphosats im Blut, Harn und in der Duodenalflüssigkeit.^{12,33,36}

Die akute Vergiftung beim Menschen infolge oraler Aufnahme des Glyphosats in Form von Roundup® verursacht Hypersalivation, gerötet ödematösen Pharynx-Larynx-Bereich mit Schluckstörungen, Magen-Darm-Ulzera mit Erbrechen, Bauchschmerzen und Erosionen, Nekrosen sowie Blutungen im Magen-Darm-Trakt. Weitere Symptome sind Schweratmigkeit, Koma und/oder Herzrhythmusstörungen, Leberschädigung und akutes Nierenversagen. Die Glyphosatkonzentrationen im Blut und Harn sind bei milden Intoxikationen bei 0,6–150 mg/L bzw. 228–5752 mg/L und bei tödlichem Verlauf bei 321–7480 mg/L bzw. 998–22300 mg/L gemessen worden.^{17,37} Die per orale Verabrei-

Glyphosatsnachweis in der Duodenalflüssigkeit bei Pferden mit Magenulzerasyndrom

G.F. Schusser, G. Köller, St. Recknagel, A. Lindner

Tabelle 3: Die Medianwerte der Glyphosatkonzentration, Enzymaktivitäten von GGT und ALP sowie der Stoffwechselprodukte direktes und Gesamtbilirubin in der Duodenalflüssigkeit sind signifikant (**) höher bzw. die Medianwerte der Enzymaktivitäten von ASAT und GLDH sowie des Totalproteins signifikant niedriger im Vergleich zu den Medianwerten im Serum aller 92 Pferdepatienten. Die Medianwerte der beiden Gruppen mit Glyphosatkonzentrationen in der Duodenalflüssigkeit von >12,2 ng/ml und ≤12,2 ng/ml unterscheiden sich signifikant (*). Der Medianwert der Aktivität der GGT der Gruppe mit gleicher oder niedriger Glyphosatkonzentration in der Duodenalflüssigkeit (≤12,2 ng/ml) ist signifikant (*) höher als der Medianwert der Gruppe mit >12,2 ng/ml. Die Medianwerte der ALP, ASAT und Glutathion-S-Transferase sind in der Gruppe der Glyphosatkonzentration ≤12,2 ng/ml höher als in der Gruppe der Glyphosatkonzentration >12,2 ng/ml. Medianwerte, 1., 3. Quartil, Minimal- und Maximalwerte, Mann-Whitney-Test, p<0,05.

| | Duodenalflüssigkeit n = 92 | Duodenalflüssigkeit | | Serum n = 92 | Referenzbereich im Serum |
|----------------------------------|---|---|---|--|-----------------------------|
| | | bei 45/92 Pferden mit Glyphosat >12,2 ng/ml | bei 47/92 Pferden mit Glyphosat ≤12,2 ng/ml | | |
| Glyphosat ng/ml | 12,2** (4,0; 19,3); min 0,6 max 192,9 | 19,6* (15,7; 2) min 13,0 max 192,9 | 4,8* (2,9; 7,7) min 0,6 max 12,2 | 1,7** (1,0; 2,8) min 0,2 max 3,7 | 0,0 |
| GGT U/L | 151,4** (64,0; 571,3) min 5,3 max 3666 | 101,9* (37,5; 243,6) min 5,3 max 802,2 | 279,5* (92,9; 1158,1) min 7,0 max 3666 | 22,3** (15,4; 32,1) min 3,6 max 173,5 | 6,3 – 44,8 |
| ALP U/L | 455** (293,5; 747,3) min 25 max 5555 | 416 (258; 768) min 44 max 1956 | 474 (321,5; 687) min 25 max 5555 | 192,2** (145; 252,5) min 75 max 446 | 89,3 – 350,8 |
| ASAT U/L | 1,7** (1,3; 2,5) min 0,2 max 27,3 | 1,9 (1,3; 2,5) min 0,2 max 21,5 | 2,0 (1,3; 2,5) min 0,6 max 27,3 | 341,5** (283; 538,8) min 140 max 1532 | 213,2 – 739,4 |
| GLDH U/L | 0,6** (0,3; 1,6) min 0,1 max 44,3 | 0,6 (0,2; 1,6) min 0,1 max 44,3 | 0,6 (0,3; 1,6) min 0,1 max 11,2 | 4,5** (2,3; 13,7) min 1,0 max 244 | 1,3 – 11,4 |
| Glutathion-S- Transferase U/L | 83,4 (56,5; 122,3) min 9,7 max 206,7 | 78,1 (56,3; 115,4) min 31,2 max 159,1 | 83,5 (66,2; 127,2) min 9,7 max 206,7 | – | – |
| Gesamtbilirubin | 140,1** (91,5; 235,6) min 19,6 max 591,7 | 140,1 (84,1; 224) min 19,6 max 541,5 | 141,6 (102,6; 236,5) min 22,5 max 591,7 | 57,6** (40,9;75,8) min 10,2 max 120,2 | 6,3 – 46,9 |
| direktes Bilirubin µmol/L | 138** (99,9; 222,3) min 6,7 max 596 | 139,6 (86; 261,3) min 21,9 max 596 | 137,6 (110,4; 217,9) min 6,7 max 526,3 | 9,4** (8,9; 11,5) min 5,8 max 17,6 | 1,7 – 11,5 |
| Totalprotein g/L | 0,07** (0,04; 0,12) min 0,01 max 0,56 | 0,08 (0,05; 0,12) min 0,02 max 0,35 | 0,07 (0,04; 0,11) min 0,01 max 0,56 | 69,6** (58,9; 73,7) min 36,9 max 82,5 | 57,8 – 81,4 |

Glyphosatnachweis
in der Duodenalflüssigkeit
bei Pferden mit
Magenuzerasynndrom

G.F. Schusser, G. Köller,
St. Recknagel, A. Lindner

chung von Roundup®, in der Zusammensetzung von Glyphosaten (p.o. 2 g/kg KM) und dem Tensid Polyoxyethylenamin (POEA) (p.o. 1 g/kg KM), hat Durchfall, Lungenblutung und Lungenepitheldestruktion bei Ratten hervorgerufen.¹ Die direkte Auslösung der Apoptose und Nekrose in einer Zebrafischleberzelllinie hat eine Glyphosat- oder Roundupkonzentration von 0,65 und 3,25 ng/ml binnen 24 Stunden hervorgerufen.¹⁹ Da sowohl der Wirkstoff Glyphosat als auch das Tensid im Herbizid Roundup® GT nekrotische und apoptotische Wirkung auf Zellen haben, ist eine LC50 in humanen Zelllinien für das Herbizid Roundup® GT bei 63 ppm nach 24 Stunden gemessen worden.²¹ Roundup® in einer Konzentration von 0,3% verursacht in einer Brustkrebszelllinie einen 70%igen Zelltod innerhalb von drei Stunden, eine Erhöhung der Sauerstoffradikale und Zerstörung der DNS-Reparatur.³¹ Diese Studien zeigen, dass die Toxizität von zusammengesetzten Rezepturen höher sein können als die aktiven Einzelsubstanzen alleine.

Eine zweijährige Verabreichung des Glyphosats in einer Dosierung von 0,05 ng/ml über Trinkwasser und Futter hat bei Ratten Mammaadenokarzinome, nekrotische Areale in der Leber und schwere chronisch fortschreitende Nephropathien ausgelöst.²⁸ Die niederen, nachgewiesenen Glyphosatkonzentrationen in der Duodenalflüssigkeit der Pferde sind gleich wie durch Lopes¹⁹ in der Gewebekultur und im Rattenversuch durch Séralini²⁸ verwendeten Glyphosatsdosierungen. Da über das gesamte Jahr bei den Pferden in der Duodenalflüssigkeit Glyphosat nachgewiesen worden ist, könnte eine kontinuierliche Aufnahme von glyphosat- und tensidhaltigem(r) Futter und/oder Stroheinstreu vorgekommen sein. Die apoptotische Wirkung des Glyphosates inklusive des Tensides im Herbizidprodukt könnte die Regeneration der kutanen und Drüsen Schleimhautzellen hemmen oder reduzieren. Jedoch die nekrotische Wirkung auf Zellen könnte die ulzerativen und/oder hämorrhagisch fibrinöseitigen Läsionen in der kutanen und Drüsen Schleimhaut der Antrum- und Pylorusregion hervorrufen und EGUS auslösen.^{10,17,22,37} Auch die lymphoplasmazelluläre Infiltration in der Lamina propria mucosae der Pars cranialis duodeni bei sieben Pferdepatienten könnte durch Glyphosat plus Tensid induziert worden sein. Denn dieses Herbizid setzt die antioxidative Kapazität der Darmschleimhaut herab, aktiviert die mukosaassoziierten T-Zellen und setzt somit proinflammatorischen TNF- α und Interferon- γ frei und ruft dadurch eine Imbalance der intestinalen Mikrobiota hervor, so dass eine chronische Entzündung der Darmschleimhaut entstehen kann.²⁰

Die Zytotoxizität, Apoptose und Nekrose, ausgelöst durch Glyphosat und das Tensid des oral aufgenommenen Herbizids, könnte die physiologische Zellaktivität der Duodenal-, Gallengang- und Pankreasepithelzellen reduziert oder inhibiert haben und somit ist die Enzymaktivität der GGT in der Duodenalflüssigkeit der Pferdepatienten mit höherer Glyphosatkonzentration (>12,2 ng/ml) signifikant geringer

vorhanden (Tabelle 3).^{10,22} Die GGT kommt hauptsächlich in der Zellmembran der Epithelzellen des Duodenum, Pankreasganges und der extrahepatischen Gallengänge vor. Die GGT katalysiert den Transport von Aminosäuren, Peptiden und intrazellulär an Glutathion gebundene, Fremdstoffe durch die Zellmembran (zelluläre Entgiftung). Das Enzym GST könnte auch den Glyphosatmetaboliten AMPA an Glutathion im Zuge des Phase-II-Metabolismus binden. Somit kann das Enzym GGT die gebildeten Glutathionkonjugate leichter ausscheiden. Auch die GGT und ALP, als zytoplasmatische Enzyme in den Duodenalepithelzellen, sind bei niedriger Konzentration von Glyphosat in der Duodenalflüssigkeit mit höherer Aktivität gemessen worden.

Die Enzyme ASAT und GLDH sind vermehrt in den Herz- und Skelettmuskelzellen bzw. in den Leberzellen aktiv und sind der direkten Einwirkung des Glyphosats und Tensids nicht ausgesetzt, so dass der Einfluss des Glyphosats und Tensids auf diese Enzymaktivitäten in der Duodenalflüssigkeit unbedeutend ist.

Die Reduzierung des zellulären Stoffwechsels, die Zytotoxizität, die nekrotischen und apoptotischen Effekte des Glyphosats inklusive des Tensids im Herbizidprodukt könnten EGUS verursachen. Denn das Tensid (Netzmittel) im glyphosathaltigen Herbizid inhibiert die lebensnotwendige intrazelluläre Adenylatkinase und diese Inhibition bewirkt die Degradierung der Zellmembran, was zum Zelltod (Nekrose) führt. Dies wird durch eine weit geringere Konzentration des Herbizids hervorgerufen als für die Landwirtschaft empfohlene Dosierung.^{10,22} Die jahreszeitliche Verteilung des Glyphosatnachweises in der Duodenalflüssigkeit bei allen Pferdepatienten mit EGUS gibt einen Hinweis auf die Kontamination des Futters und/oder der Stroheinstreu, das bzw. die während des gesamten Jahres in Mitteldeutschland verabreicht bzw. verwendet worden sind. Der Höchstwert der Glyphosatkonzentration in der Duodenalflüssigkeit im Herbst könnte auf das kürzlich geerntete Futter und/oder Stroh zurückzuführen sein.

Der Nachweis des Glyphosates in allen Pferdepatienten unterschiedlicher Herkunft weist darauf hin, dass das Glyphosat als Bestandteil eines Herbizids überall eingesetzt wird. Die höheren Glyphosatkonzentrationen bei den Pferdepatienten, gehalten in Stadtnähe, geben einen Hinweis, dass in Stadtnähe mehr glyphosathaltende Herbizide bei Gehwegen, Haus-, Park- und Gleisanlagen sowie bei Bahndämmen eingesetzt und so durch Wind die umliegenden Felder, Weiden und das Grundwasser kontaminiert werden. Da bei vielen Pferdestandorten in Stadtnähe das Futter und die Stroheinstreu zugekauft werden, kann das/die glyphosatkontaminierte Futter/Stroheinstreu auch von anderen Produktionsstandorten oder von Importen stammen. Da die Erythrozyten-, Leukozyten- und Thrombozytenzahl bei 89, 90, bzw. 92/92 Pferdepatienten nicht verändert sind, sind die pathologischen Veränderungen, hervorgerufen

durch glyphosathaltige Formulierungen, dort zu suchen, wo diese Substanzen längere Zeit in direktem Kontakt mit der Schleimhaut stehen, wie im Magen und Dünndarm. Nur die längerdauernde Glyphosataufnahme, wie beim Menschen und der Ratte beschrieben, manifestiert die pathologischen Veränderungen als non-Hodgkin Lymphom, chronische Nierenkrankheit bzw. Mammadenokarzinom, Lebernekrosen und chronische hochgradige Nephropathien.^{17,28, 34}

Die kontinuierlichen Untersuchungen während einer längeren Periode hätten einen besseren Zusammenhang zwischen Glyphosatkonzentration und den pathologischen Veränderungen im Magen und Dünndarm beim Pferdepatienten ergeben. Ein weiterer wichtiger toxischer Faktor fehlt, nämlich der Nachweis des Tensids des glyphosathaltigen Herbizids in der Duodenalflüssigkeit. Denn dieses ist toxischer für Epithelzellen und Organe. Auch die Untersuchung der Bioakkumulation des Glyphosats inklusive des Tensids in Organen ist erforderlich bei chronischen Krankheiten – auch beim Pferd.²⁴ Die periodische Untersuchung des Futters auf der Weide und im Stall sowie der Einstreu auf Glyphosat und das Tensid im Herbizid ermöglicht die Erfassung der genauen oralen Aufnahmemenge dieser Substanzen. Diese weiteren Untersuchungen sind erforderlich, um diese ursächlichen Zusammenhänge zum EGUS beim Sport- und Freizeitpferd zu erforschen.

Schlussfolgerung

Der Nachweis des Glyphosats in der Duodenalflüssigkeit ist bei jedem Pferdepatienten unterschiedlicher Regionen in Mitteleuropa erfolgt. Also sind das Futter und/oder die Stroheinstreu mit diesem Herbizid kontaminiert gewesen, und zwar über das gesamte untersuchte Jahr. Alle Pferdepatienten haben Magenläsionen im Sinne des Equine Gastric Ulcer Syndroms aufgewiesen, so dass der Risikofaktor Glyphosat plus Tensid eingeschlossen werden könnte, wenn andere wissenschaftlich bewiesenen Risikofaktoren, wie mindere Qualität des Futters, der Stroheinstreu, kein Weideaufenthalt, schlechte Haltungsbedingungen, geringer Rohfaseranteil, erhöhter Kraftfutteranteil, geringere Fütterungshäufigkeit als dreimal pro Tag, geringere Tränkemöglichkeiten, chronische Krankheiten, langer Transport, Stress (z. B. Training von 6 und mehr Tage pro Woche, erhöhte Trainingsintensität, Teilnahme an internationalen Turnieren, Überbesatz im Stall, Auslauf oder auf der Weide), Verabreichung von Steroiden oder nicht nichtsteroidalen Medikamenten ausgeschlossen worden sind.

Erklärung zum Interessenskonflikt

Die Autoren erklären, dass weder zu den Firmen der Medizingeräte noch zu Medikamentenherstellern ein Interessenskonflikt besteht.

Danksagung

Dieses Forschungsprojekt ist gefördert worden (Sächsische Aufbaubank, SAB-Verbundprojekt, FKZ 100269479).

Glyphosatnachweis
in der Duodenalflüssigkeit
bei Pferden mit
Magenulzerasyndrom

G.F. Schusser, G. Köller,
St. Recknagel, A. Lindner

Détection de glyphosate dans le liquide duodénal de chevaux atteints du syndrome d'ulcère gastrique

L'herbicide glyphosate, y compris le surfactant, est utilisé contre les mauvaises herbes dans l'agriculture, les maisons, les jardins et les parcs, les bords de route ainsi que sur les remblais des voies ferrées. La pulvérisation de cet herbicide engendre sa dispersion et donc la contamination des champs, des prairies et des pâturages et, par conséquent, des céréales, du foin, de la paille et du haylage, entraînant ainsi une ingestion orale chez les chevaux.

Afin de déterminer l'étendue de l'utilisation du glyphosate dans la région du centre de l'Allemagne et d'identifier un éventuel facteur de risque pour le déclenchement du syndrome de l'ulcère gastrique, le liquide duodénal a été testé par rapport au glyphosate chez des patients équins.

Rilevamento di glifosato nel liquido duodenale dei cavalli con sindrome da ulcera gastrica

L'erbicide glifosato, compreso il tensioattivo, viene utilizzato contro le erbe infestanti in agricoltura, nelle aree domestiche, nei giardini e nei parchi, ai bordi delle strade e nelle massicciate ferroviarie. Lo spargimento di questo erbicide permette la sua propagazione e quindi la contaminazione di campi, prati e pascoli e, di conseguenza, di cereali, fieno, paglia e foraggio, con conseguente ingestione orale da parte dei cavalli.

Per determinare la distribuzione del glifosato nella regione della Germania centrale e identificare un possibile fattore di rischio per l'insorgenza della sindrome dell'ulcera gastrica, il liquido duodenale cavalli è stato analizzato in rapporto al glifosato.

Glyphosatnachweis
in der Duodenalflüssigkeit
bei Pferden mit
Magenzulzerasymptom

G.F. Schusser, G. Köller,
St. Recknagel, A. Lindner

Les chevaux référés et non traités (n=92) présentant des antécédents de colique, d'amaigrissement, de diarrhée, d'anémie ou de baisse de performance ont été soumis à une gastroduodénoscopie le jour de leur admission. La graduation des lésions des muqueuses de l'estomac et du duodénum a été effectuée, 40 ml de liquide duodénal ont été aspirés et 20 ml de sang ont été prélevés en parallèle. Des analyses hématologiques et chimiques du sang ainsi que des analyses chimiques du liquide duodénal ont été effectuées. Le glyphosate a été détecté dans le sérum et le liquide duodénal à l'aide d'un test ELISA direct et compétitif et, parallèlement, d'une chromatographie liquide haute performance.

Le glyphosate a été détecté dans le liquide duodénal (médiane 12,2 ng/ml, 1^{er} quartile 4,0 ng/ml ; 3^e quartile 19,3 ng/ml ; min 0,6 ng/ml ; max 192,9 ng/ml) et dans le sang (1,79 ng/ml ; 1,0 ng/ml ; 2,8 ng/ml ; 0,2 ng/ml ; 3,7 ng/ml) de tous les chevaux étudiés. La concentration de glyphosate dans le liquide duodénal est significativement plus élevée que dans le sang (test U de Mann Whitney, p<0,05). Les chevaux présentant des lésions cutanées (n=11/92) ou glandulaires (n=9/92) de la muqueuse gastrique de grade 4/4 présentaient des concentrations de glyphosate dans le liquide duodénal significativement plus élevées ou plus élevées que ceux de grade 0/4 (n=10 et 9 respectivement) (médiane : 19,8 ng/ml versus 8,4 ng/ml ou 19,2 ng/ml versus 11,1 ng/ml).

L'activité de la gamma-glutamyltransférase (GGT) dans le liquide duodénal était significativement plus élevée (médiane de 279,5 U/L) dans le groupe de chevaux présentant une faible concentration de glyphosate ($\leq 12,2$ ng/ml) que dans le groupe de chevaux présentant une concentration plus élevée de glyphosate ($>12,2$ ng/ml) (médiane de 101,9 U/L). La concentration de glyphosate était plus élevée pendant l'automne (n=18 ; médiane 14,3 ng/ml) et plus faible au printemps (n=34 ; médiane 8,1 ng/ml). Des concentrations significativement plus élevées de glyphosate dans le liquide duodénal ont été mesurées chez les chevaux détenus autour des grandes villes (17,8 ng/ml) par rapport aux chevaux vivant dans les zones rurales (7,5 ng/ml).

Mots clés: liquide duodénal, gammaglutamyltransférase, glyphosate, ulcères gastriques, cheval

I pazienti equini non trattati (n=92) che presentavano un'anamnesi di coliche, cachessia, diarrea, anemia o depressione delle prestazioni sono stati sottoposti il giorno del ricovero a una gastroduodenoscopia. È stata effettuata la graduazione delle lesioni della mucosa gastrica e duodenale e sono stati aspirati 40 ml di liquido duodenale e 20 ml di sangue in parallelo. In seguito sono stati eseguiti esami ematologici e chimici del sangue e analisi chimiche del liquido duodenale. Il glifosato nel siero e nel liquido duodenale è stato rilevato con un ELISA competitivo diretto e in parallelo con una cromatografia liquida ad alte prestazioni.

Il glifosato è stato rilevato nel liquido duodenale (mediana 12,2 ng/ml, 1° quartile 4,0 ng/ml; 3° quartile 19,3 ng/ml; min 0,6 ng/ml; max 192,9 ng/ml) e nel sangue (1,79 ng/ml; 1,0 ng/ml; 2,8 ng/ml; 0,2 ng/ml; 3,7 ng/ml) di tutti i cavalli esaminati. La concentrazione di glifosato nel liquido duodenale è significativamente più alta rispetto al sangue (test U di Mann Whitney, p<0,05). I cavalli con lesioni cutanee (n=11/92) o ghiandolari (n=9/92) della mucosa gastrica di grado 4/4 presentano concentrazioni di glifosato nel liquido duodenale significativamente più alte o superiori rispetto a quelli con grado 0/4 (n=10 e 9, rispettivamente) (mediana: 19,8 ng/ml contro 8,4 ng/ml e 19,2 ng/ml contro 11,1 ng/ml, rispettivamente).

L'attività della gamma-glutamyltransferasi (GGT) nel liquido duodenale è significativamente più alta (mediana 279,5 U/L) nel gruppo di cavalli con una concentrazione di glifosato inferiore ($\leq 12,2$ ng/ml) rispetto al gruppo di cavalli con una concentrazione di glifosato superiore ($>12,2$ ng/ml) (mediana 101,9 U/L). La concentrazione di glifosato è massima in autunno (n=18; mediana 14,3 ng/ml) e minima in primavera (n=34; mediana 8,1 ng/ml). Sono state misurate concentrazioni significativamente più elevate di glifosato nel liquido duodenale nei cavalli allevati nelle grandi città (17,8 ng/ml) rispetto a quelli allevati nelle aree rurali (7,5 ng/ml).

Parole chiave: Rilevamento di glifosato nel liquido duodenale dei cavalli con sindrome da ulcera gastrica

Literaturnachweis

- ¹ Adam A., Marzuki A., Abdul Rahman H., Abdul Aziz M.: The oral and intratracheal toxicities of roundup and its components to rats. *Vet Hum Toxicol* 1997, 39: 147–51.
- ² Alonso L.L., Demetrio P.M., Etchegoyen M.A., Marino D.J.: Glyphosate and atrazine in rainfall and soils in agroproductive areas of the pampas region in Argentina. *Science of The Total Environment* 2018, 645: 89–96.
- ³ Andreotti G., Koutros St., Hofmann J.N., Sandler D.P., Lubin J.H., Lynch Ch.F., Lerro C.C., De Roos A.J., Parks C.G., Alavanja M.C., Silverman D.T., Beane Freeman L. E.: Glyphosate use and cancer incidence in the Agricultural Health Study. *Journal of the National Cancer Institute* 2018, 110: 509–516.
- ⁴ Banse H.E., Andrews F.M.: Equine glandular gastric disease: prevalence, impact and management strategies. *Veterinary Medicine: Research and Reports* 2019, 10: 69–76.
- ⁵ Caloni F., Cortinovic C., Rivolta M., Davanzo F.: Suspected poisoning of domestic animals by pesticides. *Science of the Total Environment* 2016, 539: 331–336.
- ⁶ Clark E. S.: Intestinal motility. In: White II, N.A. (ed), *The Equine Acute Abdomen*. Lea & Febiger, Philadelphia, USA, 1990: 36–48.
- ⁷ Connolly A., Jones K., Basinas I., Galea K.S., Kenny L., McGowan P., Coggins M.A.: Exploring the half-life of glyphosate in human urine samples. *International Journal of Hygiene and Environmental Health* 2019, 222: 205–210.
- ⁸ Conrad A., Schröter-Kermani Ch., Hoppe H.W., Rüter M., Pieper S., Kolossa-Gehring M.: Glyphosate in German adults – Time trend (2001 to 2015) of human exposure to widely used herbicide. *International Journal of Hygiene and Environmental Health* 2017, 220: 8–16.
- ⁹ Cortinovic C., Davanzo F., Rivolta M., Caloni F.: Glyphosate-surfactant herbicide poisoning in domestic animals: an epidemiological survey. *Veterinary Record* 2015, 176: 413–414.
- ¹⁰ Defarge N., Takács E., Lozano V.L., Mesnage R., Spiroux de Vendômois J., Séralini G.E., Székács A.: Co-Formulants in glyphosate-based herbicides disrupt aromatase activity in human cells below toxic levels. *International Journal of Environmental Research and Public Health* 2016, 13, 264: 1–17.
- ¹¹ Ehlers K., Uhlig A., Recknagel St., Snyder A., Breuer J., Arnold C., Graness N., Schusser G.F.: Schleimhautläsionen im Bereich des Pylorus – Retrospektive Studie an 315 Pferdepatienten (2004–2013). *Pferdeheilkunde* 2016, 32: 96–102.
- ¹² Gerlach H., Gerlach A., Schrödl W., Schottdorf B., Haufe S., Helm H., Shehata A., Krüger M.: Oral application of charcoal and humic acids to dairy cows influences *Clostridium botulinum* blood serum antibody level and glyphosate excretion in urine. *Journal of Clinical Toxicology* 2014, 4: 186–194.
- ¹³ Gunatilake S., Sene St., Orlando L.: Glyphosate's synergistic toxicity in combination with other factors as a cause of chronic kidney disease of unknown origin. *International Journal of Environmental Research and Public Health* 2019, 16: 2734–2760.
- ¹⁴ IARC Monographs, volume 112: some organophosphate insecticides and herbicides: tetrachlorvinphos, parathion, malathion, diazinon and glyphosate. International Agency for Research on Cancer working group, monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans, Lyon 3–10 March, 2015.
- ¹⁵ Köller G., Gieseler T., Schusser G.F.: Hämatologische und blutchemische Referenzbereiche bei Pferden unterschiedlicher Rasse und Altersgruppen basierend auf neuesten labordiagnostischen Methoden. *Pferdeheilkunde* 2014, 30: 381–393.
- ¹⁶ Küsters M., Gerhartz M.: Enrichment and low-level determination of glyphosate, aminomethylphosphonic acid and glufosinate in drinking water after cleanup by cation exchange resin. *Journal of Separation Science* 2010, 33: 1139–1146.
- ¹⁷ Langrand J., Blanc-Brisset I., Boucaud-Maitrec D., Puskarczyk E., Nissee P., Garnier R., Pulce C.: Increased severity associated with tallowamine in acute glyphosate poisoning. *Clinical Toxicology* 2020, 58: 201–203.
- ¹⁸ Le Fur E., Charrêteur C., Dufau C., Péron J.J.: Determination of glyphosate herbicide and aminomethylphosphonic acid in natural waters by liquid chromatography using pre-column fluorogenic-labeling. Part I: Direct determination at the 0,1 µg/l level using FMOC. *Analisis* 2000, 28: 813–818.
- ¹⁹ Lopes F.M., Sandrini J.Z., Souza M.M.: Toxicity induced by glyphosate and glyphosate-based herbicides in the zebrafish hepatocyte cell line (ZF-L). *Ecotoxicol Environ Saf.* 2018, 162:201–207.
- ²⁰ Marino M., Mele E., Viggiano A., Nori St.L., Meccariello R., Santoro A.: Pleiotropic outcomes of glyphosate exposure: from organ damage to effects on inflammation, cancer, reproduction and development. *International Journal of Molecular Sciences* 2021, 22: 1–26.
- ²¹ Mesnage R., Defarge N., Spiroux de Vendômois J., Séralini G.E.: Major pesticides are more toxic to human cells than their declared active principles. *BioMed Research International* 2014, Article ID 179691: 1–8.
- ²² Mesnage R., Benbrook Ch., Antoniou M.N.: Insight into the confusion over surfactant co-formulants in glyphosate-based herbicides. *Food and Chemical Toxicology* 2019, 128: 137–145.
- ²³ Neuwirth L.: Scintigraphy. In: Colahan P.T., Merritt A., Moore J.N., Mahew I.G. (eds), *Equine Medicine and Surgery*, 5. Aufl., Mosby, St. Luis, USA, 1999: 582.
- ²⁴ Panzacchi S., Mandrioli D., Manservigi F., Bua L., Falcioni L., Spinaci M., Galeati G., Dinelli G., Miglio R., Mantovani A., Lorenzetti S., Hu J., Chen J., Perry M.J., Landrigan P.J., Belpoggi F.: The Ramazzini institute 13-week study on glyphosate-based herbicides at human equivalent dose in Sprague Dawley rats: study design and first in-life endpoints evaluation. *Environmental Health* 2018, 17: 52–65.
- ²⁵ Perry M.J., Mandrioli D., Belpoggi F., Manservigi F., Panzacchi S., Irwin C.: Historical evidence of glyphosate exposure from a US agricultural cohort. *Environmental Health* 2019, 18: 42–46.
- ²⁶ Scheidemann W., Schubert S., Kretschmer I., Recknagel St., Snyder A., Schusser G.F.: Gastric and Duodenal Polyps in Horses. *Colic Research Symposium*, Edinburgh, 2021.

Glyphosatnachweis in der Duodenalflüssigkeit bei Pferden mit Magenulzerasyndrom

G.F. Schusser, G. Köller, St. Recknagel, A. Lindner

Glyphosatnachweis
in der Duodenalflüssigkeit
bei Pferden mit
Magenzulzeras Syndrom

G.F. Schusser, G. Köller,
St. Recknagel, A. Lindner

- ²⁷ Schweizerische Eidgenossenschaft, Bundesamt für Landwirtschaft: Verkaufsmengen je Pflanzenschutzmittel-Wirkstoff, Stand 23.11.2021. <https://www.blw.admin.ch/blw/de/home/nachhaltige-produktion/pflanzenschutz/verkaufsmengen-der-pflanzenschutzmittel-wirkstoffe.html>
- ²⁸ Séralini G.E., Clair E., Mesnage R., Gress S., Defarge N., Malatesta M., Hennequin D., de Vendômois J.S.: Republished study: long-term toxicity of a Roundup herbicide and a Roundup-tolerant genetically modified maize. *Environmental Sciences Europe* 2014, 26:14.
- ²⁹ Statista: Absatzmengen des Wirkstoffes Glyphosat in Deutschland in den Jahren 1987 bis 2020. <https://de.statista.com/statistik/daten/studie/588345/umfrage/absatz-von-glyphosat-in-deutschland/>.
- ³⁰ Steinkellner S. Nationale Marktstudie zum Glyphosatausstieg. Forschungsprojekt 101347, Universität für Bodenkultur, Wien 2019.
- ³¹ Stur E., Aristizabal-Pachon A.F., Chagas Peronni K., Agostini L.P., Waigel S., Chariker J., Miller D.M., Thomas S.D., Rezzoug F., Detogni R.S., Silva dos Reis R., Silva Junior W.A., Louro I.D.: Glyphosate-based herbicides at low doses affect canonical pathways in estrogen positive and negative breast cancer cell lines. *PLOS ONE* 2019: 1–13. doi.org/10.1371/journal.pone.0219610.
- ³² Sykes B.W., Hewetson M., Hepburn R.J., Luthersson N., Tamzali Y.: European College of Equine Internal Medicine Consensus Statement-Equine Gastric Ulcer Syndrome in Adult Horses. *Journal Veterinary Internal Medicine* 2015 29: 1288–1299.
- ³³ Van Bruggen A.H.C., He M.M., Shin K., Mai V., Jeong K.C., Finckh M.R., Morris J.G.: Environmental and health effects of the herbicide glyphosate. *Science of the Total Environment* 2018, 616–617: 255–268.
- ³⁴ Vandenberg L.N., Blumberg B., Antoniou M. N., Benbrook Ch. M., Carroll L., Colborn T., Everett L.G., Hansen M., Landrigan P.J., Lanphear B.P., Mesnage R., vom Saal F.S., Welshons W.V., Peterson Myers J.: Is it time to reassess current safety standards for glyphosate-based herbicides? *Journal of Epidemiology and Community Health*, 71: 613–618.
- ³⁵ Yamada T., Ichikawa H.: X-ray diagnosis of elevated lesions of the stomach. *Radiology* 1974, 110: 79.
- ³⁶ Zoller O., Rhyn P., Zarn J. A., Dudler V.: Urine glyphosate level as a quantitative biomarker of oral exposure. *International Journal of Hygiene and Environmental Health* 2020, 228: 113526. doi.org/10.1016/j.ijheh.2020.113526.
- ³⁷ Zouaoui K.S., Dulaurent J.M., Gaulier C., Moesch G., Lachatre G.: Determination of glyphosate and AMPA in blood and urine from humans: About 13 cases of acute intoxication. *Forensic Science International* 2013, 226: e20–e25.

Korrespondenzadresse

Gerald Fritz Schusser
Medizinische Tierklinik, Veterinärmedizinische Fakultät,
Universität Leipzig
An den Tierkliniken 11
CDE-04103 Leipzig
Telefon: +49 34299 77850
E-Mail: schusser@vetmed.uni-leipzig.de