

Projectnr.: 801.71.819.01
Voeding biologische varkens

Projectleider: Dr. M.J. Groot

Rapport 2003. 018

september 2003

Mogelijke effecten van fyto-oestrogenen in ruwvoer voor zeugen

M.J. Groot

Business Unit: Safety & Health
Cluster: Food Contaminants

RIKILT - Instituut voor Voedselveiligheid
Bornsesteeg 45, 6708 PD Wageningen
Postbus 230, 6700 AE Wageningen
Telefoon 0317-475422
Telefax 0317-417717
Internet: www.rikilt.wur.nl

Copyright 2003, RIKILT – Instituut voor Voedselveiligheid.

Het is de opdrachtgever toegestaan dit rapport integraal openbaar te maken en ter inzage te geven aan derden. Zonder voorafgaande schriftelijke toestemming van RIKILT-Instituut voor Voedselveiligheid is het niet toegestaan:

- a) dit door RIKILT-Instituut voor Voedselveiligheid uitgebracht rapport gedeeltelijk te publiceren of op andere wijze gedeeltelijk openbaar te maken;*
- b) dit door RIKILT-Instituut voor Voedselveiligheid uitgebracht rapport, c.q. de naam van het rapport of RIKILT-Instituut voor Voedselveiligheid, geheel of gedeeltelijk te doen gebruiken ten behoeve van het instellen van claims, voor het voeren van gerechtelijke procedures, voor reclame of antireclame en ten behoeve van werving in meer algemene zin;*
- c) de naam van RIKILT-Instituut voor Voedselveiligheid te gebruiken in andere zin dan als auteur van dit rapport.*

VERZENDLIJST

INTERN:

directeur

auteur(s)

programmaleiders (4x)

marketing & communicatie (2x)

bibliotheek (3x)

Extern:

Animal Science Group Wageningen UR (Ir. C.M.C. Peet-Swering, Dr.ir. H.A.M. Spoolder)

Expertisecentrum LNV (Ir. L.J.A. Lekkerkerk)

INHOUD	blz. 1
SAMENVATTING	3
1 INLEIDING	5
2 METHODE	5
3 METABOLISME	7
4 EFFECTEN OP DE REPRODUCTIE	8
4.1 Fyto-oestrogenen	8
4.2 Zearalenon	8
4.3 Overige mycotoxinen	10
4.4 Echte Fyto-oestrogenen	10
4.5 Effecten van contaminanten	11
5 LANGE TERMIJN EFFECTEN	11
6 EFFECTEN VAN PROCESSING	12
7 NORMEN VOOR FYTO-OESTROGEN IN VOER	13
8 DISCUSSIE EN CONCLUSIES	13
LITERATUUR	14

SAMENVATTING

Dit rapport bespreekt de aanwezigheid van fyto-oestrogenen in ruwvoerders voor zeugen en de mogelijke effecten hiervan op reproductie. Met name klavers en luzerne kunnen aanzienlijke gehalten aan fyto-oestrogenen bevatten. Voor klavers zijn dat isoflavonen en coumestrol, voor luzerne voornamelijk coumestrol. Volgens de literatuur is het grootste probleem bij varkens echter te verwachten van het oestrogene mycotoxine Zearalenon (ZEN), wat gevormd wordt door *Fusarium Roseum*, een schimmel die voorkomt op graansoorten. In beruchte "Fusariumjaren" kan het ZEN gehalte oplopen tot 26.000 mcg/kg.

Effecten op de reproductie van varkens zijn uitgebreid beschreven voor ZEN, waarbij afhankelijk van de dosering, verstoring van de cyclus, verminderde conceptie, embryonale sterfte en het hyperoestrogene syndroom kunnen optreden. Kortdurende toediening van 1 mg/kg levend gewicht gedurende dag 7-10 van de dracht kan al embryonale sterfte veroorzaken. Bij een dosering van 3-4 ppm door het voer zijn effecten op de oestrus te zien, en bij nog hogere doseringen kan het zogenaamde oestrogene syndroom ontstaan met gezwollen rode tepels, zwelling van de vulva en oedeem van het perianale gebied. Dit soort verschijnselen kan optreden bij biggen van zeugen die rond de partus gecontamineerd voer hebben gekregen, maar ook bij prepuberale gelten waarbij dan ook nog vagina- en rectumprolaps kan optreden en de geslachtsorganen bij sectie vergroot bleken.

Voor klaver en luzerne is geen literatuur gevonden van klinische gevallen van verminderde vruchtbaarheid bij varkens, maar deze zijn wel beschreven wel bij schapen.

Lange termijn effecten kunnen optreden na blootstelling aan hoge gehalten fyto-oestrogenen waarbij klinische afwijkingen ontstaan, of bij chronische blootstelling aan lage gehalten. Voor varkens zijn alleen gegevens over ZEN gepubliceerd, wat bij zeugen tot langdurige verstoring van de vruchtbaarheid kan leiden, terwijl gelten tot de puberteit gevoed met gecontamineerd voer, daarna geen negatieve effecten op de reproductie lieten zien.

Effecten van processing zijn van belang voor de ontwikkeling van mycotoxinen in opgeslagen voer, waarbij het vochtgehalte en de temperatuur van grote invloed zijn. Bij klavers kunnen in de kuil isoflavonen omgezet worden in sterker oestrogene metabolieten, waarbij de pH en het melkzuurgehalte van invloed zijn.

Geconcludeerd wordt dat bij het voeren van veel ruwvoer, het ruwvoer onderzocht dient te worden op de aanwezigheid van iso-flavonen, coumestrol en Zearalenon. Moeilijkheid is dat er geen normen zijn voor veilige gehalten in veevoer. Mogelijke effecten op de vruchtbaarheid dienen dan ook gemonitord te worden en mogelijk gerelateerd aan gemeten gehalten. Bij gebleken effect kan dan een werkzaamheids drempel worden vastgesteld.

1 INLEIDING

Fyto-oestrogenen zijn stoffen met een oestrogene werking die worden gevonden in planten (en schimmels). De meeste planten bevatten zulke stoffen. In veel planten worden geringe hoeveelheden oestron en oestradiol gevonden. De meeste fyto-oestrogenen hebben echter geen steroïde structuur, maar zijn fenolen met een chemische structuur die sterk lijkt op die van oestrogenen. Deze bio-actieve stoffen spelen een rol bij de stikstofbinding bij vlinderbloemigen, en hebben bij veel planten ook een insecticide of fungicide werking. Dit houdt in dat bij infectie met schimmels de planten meer fyto-oestrogenen kunnen gaan aanmaken. Fyto-oestrogenen kunnen binden aan de oestrogeenreceptor en zo hormonale effecten veroorzaken. Bij bepaalde niveaus kunnen fyto-oestrogenen de reproductie negatief beïnvloeden.

Er wordt onderscheid gemaakt tussen oestrogene stoffen die in planten zelf zitten, echte fyto-oestrogenen, en mycotoxines met oestrogene activiteit, afkomstig van schimmels die op planten groeien.

In dit literatuuronderzoek wordt een antwoord gegeven op de volgende vragen:

1. welke fyto-oestrogenen komen het meest voor in veel gebruikte ruwvoerders voor zeugen
2. wat is het gehalte aan fyto-oestrogenen in deze ruwvoerders
3. wat zijn de eventuele schadelijke effecten van fyto-oestrogenen op de reproductie van zeugen
4. bij welke niveaus treden deze problemen op
5. zijn er lange termijn effecten op de vruchtbaarheid
6. zijn er effecten van processing (b.v. inkuilen) op het gehalte of de activiteit van fyto-oestrogenen

In hoofdstuk 2 worden de bronnen en mogelijke gehalten van fyto-oestrogenen in enkele veel gebruikte ruwvoerders besproken, in hoofdstuk 3 het metabolisme van fyto-oestrogenen, in hoofdstuk 4 de effecten van fyto-oestrogenen op reproductie en de niveaus waarop deze effecten optreden, in hoofdstuk 5 de lange termijn effecten en in hoofdstuk 6 de effecten van processing. In hoofdstuk 7 wordt kort ingegaan op normstelling en in hoofdstuk 8 worden de resultaten bediscussieerd en conclusies geformuleerd.

2 BRONNEN VAN FYTO-OESTROGENEN IN VEEL GEBRUIKTE RUWVOEDERS

De belangrijkste fyto-oestrogenen zijn de isoflavonen, lignanen en coumestanen, het belangrijkste oestrogene mycotoxine is Zearalenon uit de schimmel *Fusarium Roseum* (tabel 1).

Tabel 1 Klassificering van fyto-oestrogenen

Plant inhoudstoffen: Chemische groep	Naam	Voorkomen
Coumestanen	Coumestrol	Luzerne-spruiten, spruiten van sojabonen, bonen (<i>Phaseolus aureus</i> Roxb.) klaver
Flavonoiden	Chalconen – isoliquiritigenin - Phloretin Flavonen - apigenin Flavonolen - Kaempferol Flavanonen- naringenin Isoflavonen- daidzein - genistein - biochanin A - Formononetin - Pratensein - Equol - O-desmethylangolensin	Vlinderbloemigen, soja, erwten, bonen, rode klaver en hop
Lignan	Enterolacton Enterodiol Matairesinol (MAT) Seco-isolariciresinol (SECO)	Lijnzaad, Fruit, groente, granen, vlinderbloemigen en hout
Resorcylic acid lactones	Mycotoxine: Zearalenon	<i>Fusarium roseum</i> , schimmel die voorkomt op graansoorten

Vrij naar (Mazur and Adlercreutz, 1998)

De meest gebruikte ruwvoerders voor dragende zeugen zijn: gras, klaver, kuilvoer, grashooi, snijmais, bietenperspulp, luzerne, maiskolvenschroot, GPSgraan en graanstro (Van Krimpen 2003, persoonlijke mededeling).

Mogelijke bronnen van fyto-oestrogenen en mycotoxinen in de geselecteerde ruwvoerders zijn:

- klaver (o.a. coumestrol, en de flavonoiden: trifoliol, formononetin, genestein, biochanin A en daidzein)
- luzerne (coumestrol en flavonoiden)
- snijmais (zearalenon)
- maiskolvenschroot (zearalenon)
- GPS graan (zearalenon)
- Graan stro (zearalenon)
- Gras (zearelenon)

In mindere mate:

- Bietenpulp (zearalenon)

Fyto-oestrogenen

De gehalten aan fyto-oestrogenen in planten zijn afhankelijk van het ras, de tijd van het jaar, het maaistadium van het gewas, of het vers of gedroogd is en eventuele schimmelinfecties in het gewas.

Zo bevat luzerne van nature weinig fyto-oestrogenen (onder andere coumestrol, formononetin en biochanin A), maar na infectie met schimmels neemt de coumestrol productie sterk toe. Het kan dan 25-65 mg/kg coumestrol in de droge stof bevatten (Saloniemi et al., 1995).

In tabel 2 zijn de fyto-oestrogeenconcentraties (mg/kg) en de oestradiol equivalenten (mg/kg) in de diverse ruwvoeders weergegeven. Oestradiol equivalenten geven de oestrogene activiteit van het gewas in vergelijking met het natuurlijke oestrogeen oestradiol17beta weer, waarbij een oestradiolequivalent van 1 betekent dat 100 gram product het zelfde effect heeft als 1 mg oestradiol17beta.

Tabel 2. Gehalten aan fyto-oestrogenen (in mg/kg) en oestradiolequivalenten (in mg/kg)

Bron	Gehalte fyto-oestrogenen					Oestradiol-equivalenten
	Daidzein	Genistein	Biochanin A	Formononetin	coumestrol	
Rode klaver	0-300	400-1.400	3.200-14.600	4.800-10.500	-	± 42.6
Witte klaver	100-600					± 2.6
Onderaardse klaver	Tot 50.000					± 100
Luzerne	spoor	Spoor	Spoor	Spoor	25.3-63.0	± 1.9

Vrij naar Lintelo, 1997.

Uit tabel 2 blijkt dat m.n. rode klaver en onderaardse klaver een sterke oestrogene werking heeft.

Mycotoxinen

Fusarium Roseum behoort tot de veldschimmels, dat wil zeggen ze groeien en produceren mycotoxinen op de gewassen op het veld. Belangrijke risicofactoren voor de vorming van mycotoxinen door veldschimmels zijn: weersomstandigheden, bodembewerking, vruchtwisseling, rassenkeuze en oogststadium (Kloet et al., 2002). ZEN en DON zijn twee belangrijke mycotoxinen die geproduceerd worden door *Fusarium Roseum*.

Zearalenon (ZEN) komt vaak voor in tarwe, mais en maissilage. In de zogenaamde "Fusariumjaren" kan het ZEN gehalte wel oplopen tot 26.000 mcg/kg. ZEN besmetting beperkt zich niet tot granen, maar kan ook voorkomen bij andere voeders zoals gras en bietenpulp. Deoxynivalenol (DON), kan in "Fusariumjaren" voorkomen tot 34.000 mcg/kg in tarwe, gerst en mais. Ook maissilage, corn cob mix en hooi kunnen zijn besmet met DON (Veldman, 2003).

Een recent overzicht van gehalten aan mycotoxinen in veevoedergrondstoffen staat in een rapport van Veldman (2003), waarbij opvalt dat vrijwel alle voedergrondstoffen kunnen zijn besmet.

3 METABOLISME VAN FYTO-OESTROGENEN

De opname van fyto-oestrogenen uit de voeding is afhankelijk van de concentratie in het voer en de biologische beschikbaarheid van fyto-oestrogenen. De activiteit van fyto-oestrogenen is afhankelijk van de opname door het maagdarmkanaal, de oestrogeniciteit (activiteit vergeleken met oestradiol17beta) en de fysiologische halfwaardetijd.

Bij monogastrische dieren zoals varkens worden lignanen en isoflavonen opgenomen als glycosiden (dwz gebonden aan suikers), waarbij die suikergroep in de darm door de darmflora worden afgesplitst, zodat er oestrogene werkzame stoffen ontstaan (Lintelo, 1997).

De halfwaarde tijd van het endogene oestradiol 17β is ongeveer 20-30 minuten, fyto-oestrogenen (bv daidzin, formonotenin en equol) kunnen halfwaarde tijden hebben van langer dan 8 uur. Daarbij treedt ook een enterohepatische kringloop op, waarbij stoffen die door de lever met de gal zijn uitgescheiden naar de darm, verder in de darm weer worden opgenomen. Hierdoor kan accumulatie optreden zodat de halfwaarde tijd nog weer langer wordt. Dit houdt in dat lage gehalten toch relatief veel effect kunnen hebben omdat ze langer in het lichaam blijven circuleren.

4 EFFECTEN OP DE REPRODUCTIE

4.1 Fyto-oestrogenen

Het werkingsmechanisme van fyto-oestrogenen is niet helemaal bekend en verschilt per stof, per diersoort en per weefsel en de effecten kunnen zowel oestrogene als anti-oestrogene zijn. De effecten van fyto-oestrogenen kunnen worden onderverdeeld in directe en indirecte effecten. Directe effecten op het geslachtsapparaat komen door competitieve binding van fyto-oestrogenen aan de oestrogene receptor (ER). Indirecte werking ontstaat door veranderde hormoongehalten waardoor via biofeedback op het hypothalamo-hypofysaire systeem de uitscheiding van gonadotrofinen wordt beïnvloed. Daarnaast kunnen fyto-oestrogenen invloed hebben op de hoeveelheid ER, op de gehalten aan sex hormone binding globulin (SHBG) en op de activiteit van diverse enzymsystemen zoals tyrosine kinase en het aromatase enzym, waarmee oestrogenen worden gesynthetiseerd uit androgene precursors. Op deze manier beïnvloeden fyto-oestrogenen het metabolisme van oestradiol 17β en zo de hormonale status (Rosselli et al., 2000).

Voor varkens kunnen de effecten variëren van meer terugkomers, schijnzwangerschap, embryonale sterfte, kleinere worpen, meer doodgeboorten tot fysieke veranderingen aan het geslachtsapparaat zoals zwelling en roodheid van de vulva, vergrote uiers en tepels, en rectum- en vaginaprolaps.

4.2 Zearalenon

Er is uitgebreid geschreven over effecten van fyto-oestrogenen op de fertiliteit van varkens, waarbij opvalt dat de meeste publicaties betrekking hebben op intoxicatie met het oestrogene mycotoxine Zearalenon (ZEN) uit de schimmel *Fusarium roseum*, welke voorkomt op graansoorten. Hieronder is kort een aantal beschreven effecten bij verschillende diergroepen (fysiologische status) en doseringen weergegeven.

- Gehalten van 25 of meer ppm pure zearalenon door het voer bij drachtige zeugen leidt tot vruchtbaarheidsstoringen (Chang et al., 1979). Deze uiten zich als: onvruchtbaarheid, constante oestrus, schijnzwangerschap, verminderde vruchtbaarheid, verkleinde worpgrootte, kleinere biggen, misvormingen, juveniel hyperoestrogenisme, en waarschijnlijk foetale resorptie. Macroscopische en histologische veranderingen in het geslachtsapparaat worden waargenomen, zoals squameuze metaplasie (veranderde differentiatie van het epitheel) in baarmoeder, baarmoederhoornen, cervix, vagina en uier.

- Zearalenon in doseringen van 3.61 ppm en 4.33 ppm door voer, vanaf puberteit tot dekken, had effect op de oestrus bij gelten (Etienne ,1982). ZEN induceerde schijn-dracht bij 45 % van de zeugen, geen oestrus binnen 50 dagen na het bereiken van de puberteit en persistente corpora lutea. De baarmoederhoortjes waren oedemateus. Reproductiekenmerken 80 dagen na dekken waren normaal, maar als ook tijdens de dracht ZEN werd gevoerd dan was het gewicht van de baarmoeder en de foetussen significant lager en de heterogeniteit tussen de foetussen groter.
- Praktijkvergiftiging is beschreven in Argentinië (Lopez et al., 1988), waar zeugen en prepuberale gelten oestrogene effecten vertoonden: vergroot uier, gezwollen vulva, en sterk vergrote inwendige geslachtsorganen. Het graan bevatte 56 ppm ZEN, verder een aantal andere toxinen zoals Deoxynivalenol 4.9 ppm.
- Effecten van ZEN (1mg/ kg lichaamsgewicht) op dag 7-10 na dekking waren te zien in embryo's van dag 13, die degeneratie vertoonden (Long et al., 1992; Diekman et al., 1989). Dit betekent dat in een gevoelige periode van de dracht kortdurende blootstelling al negatieve effecten kan hebben.
- Verdere proeven met ZEN tijdens de vroege dracht toonde aan dat toediening van dag 2-15 na het dekken in doseringen van 0, 5, 15, 30, 60 of 90 ppm vanaf 30 ppm effect had op de foetale ontwikkeling. Vanaf 60 ppm was er geen foetale ontwikkeling of was er sprake van totale resorptie (Long, et al. 1984)
- Eerdere experimenten met drachtige zeugen welke met mycotoxinen vervuild voer (10 % cultuur van *fusarium roseum*) kregen van dag 7-17 na oestrus gaven ook resorptie van vruchten aan. Hoewel 6 van de 10 zeugen op dag 40 volgens een echo drachtig bleek heeft geen van de zeugen geworpen. Bovendien kwamen de zeugen de eerste 20 weken niet in oestrus wat aangeeft dat mycotoxinen niet alleen kunnen leiden tot embryo-resorptie, maar ook de normale cyclus gedurende lange tijd kunnen verstoren (Long et al., 1983).
- In een onderzoek van Young et al. (1990) kregen lacterende zeugen dagelijks 0, 5 of 10 ppm ZEN gevoerd. Hieruit bleek dat het interval tussen spenen en oestrus toenam met de dosering ZEN.
- Ook lage concentraties ZEN (3, 6, of 9 ppm) in het dieet van zeugen vanaf het moment van oestrus gaven effecten op de vruchtbaarheid, zo trad schijnzwangerschap op bij 88 % van de 6-9 ppm groep (Young et al., 1986).
- Andere experimenten met beschimmeld voer bij drachtige en lacterende zeugen gaven een verminderde vruchtbaarheid te zien, met minder biggen per worp, minder complete drachten en oestrogene effecten bij de biggen, zoals zwelling en roodheid van het uitwendige geslachtsapparaat, (Young et al., 1982).
- ZEN mycotoxicosis is een meerdere malen beschreven ziektebeeld bij biggen van zeugen gevoerd met gecontamineerd graan (Dacasto et al., 1995). Het klinisch beeld bestaat uit oedemateuze zwelling en roodheid van de vulva, soms met roodheid en necrose van de staart, sommige dieren hadden aangeboren afwijkingen aan het geslachtsapparaat.
- ZEN mycotoxicose is ook beschreven bij varkens gevoerd met ZEN gecontamineerde mais en (sorghum) graan, waarin tot 8 mg/kg ZEN aanwezig was. De prepuberale zeugen vertoonden zwelling en roodheid van de vulva, vergrote uiers en vergrote tepels. In sommige gevallen trad rectum- en vaginaprolaps op

waardoor dieren stierven. Bij sectie waren de ovaria en baarmoeder vergroot (Blaney et al., 1984).

- Ook kan er sprake zijn van een perinataal oestrogeen syndroom bij varkens blootgesteld aan mycotoxinen rond de partus (door F2 fusariotoxicosis). Hierbij treden een verminderd aantal bevruchtingen bij zeugen en gelten op, een toename aan terugkomers, verkleinde worpgrootte en een toename van het aantal doodgeboorten. Zowel de levende als de doodgeboren biggen vertoonden zwelling van vulva en tepels en oedeem van het perianale gebied, de onderzijde van de buik rond de navel, vaak met ontsteking en vervolgens necrose van de tepels. Ook het aantal biggen met splayleg en trillers was toegenomen (Vanyi et al., 1994).
- Ook is bekend dat ZEN de vroege dracht bij varkens onderbreekt zonder dat de ultra-uterine hoeveelheid oestradiol17bèta (E2) of progesteron en de embryo-migratie of de E2 synthese in de blastocyst wordt verstoord. Alleen de serum progesterongehalten worden verlaagd (Green et al., 1991).

Samengevat zijn de effecten van ZEN op de vruchtbaarheid bij varkens uitgebreid onderzocht, zowel experimenteel als bij toevallige vergiftigingen in de praktijk. Blootstelling tijdens de gevoeligste periode van de dracht (dag 7 tot 10 na dekking) kan van invloed zijn op de embryonale ontwikkeling en dus op de worpgrootte. Verder zijn de effecten van ZEN in het voer onder te verdelen in effecten voor de dracht (mindere vruchtbaarheid, meer terugkomers), effecten tijdens de dracht (embryoresorptie, opbrekers) en effecten op de worpgrootte (kleinere worpen, doodgeboren biggen, afwijkende biggen).

Daarnaast zijn er bij zeugen en biggen klinische afwijkingen aan het geslachtsapparaat zoals gezwollen en rode vulva, rectum- of vagina prolaps, gezwollen uier en rode gezwollen tepels.

4.3 Overige mycotoxinen

Andere, niet oestrogene mycotoxinen, die indirect van invloed zijn op de fertiliteit van varkens zijn deoxynivalenol (DON), ochratoxine, ergot alkaloiden en aflatoxinen. DON wordt afhankelijk van de omgevingsinvloeden ook gevormd door *Fusarium Roseum*, maar heeft geen oestrogene werking. DON veroorzaakt verminderde voeropname, voerweigering en soms braken. Door verminderde groei wordt ook indirect de reproductie geremd. Ergot alkaloiden uit moederkoren (*Claviceps purpurea*), een schimmel van tarwe, kunnen vruchtbaarheidsproblemen geven en de melkgift remmen. Verder zijn er aflatoxines uit *Aspergillus flavus* en *Aspergillus parasiticus* die de reproductie indirect remmen door verminderde voeropname en aantasting van lever en nierfunctie, verminderde bloedstolling en verlaagde weerstand tegen infecties door een verminderde immuniteit. Ochratoxine wordt gevormd door schimmelsoorten *Penicillium*, *Claviceps*, *Aspergillus* en *Fusarium* en is toxisch voor de nieren (Diekman et al., 1992).

4.4 Echte fyto-oestrogenen

Plant fyto-oestrogenen die kunnen leiden tot vruchtbaarheidsproblemen zijn afkomstig van onderaardse klaver (*trifolium subterraneum* (zeldzaam in NL), rode klaver (*trifolium pratense*) en witte klaver (*trifolium repens*). De onderaardse klaver (*trifolium subterraneum*) heeft het hoogste isoflavone gehalte (tot 3 % van het drooggewicht).

Negatieve effecten op de reproductie van onderaardse klaver zijn vooral bekend bij schapen in Australië, waar deze klaver de oorzaak is van de zogenaamde "Clover Disease". Gecastreerde

rammen vertoonden lactatie, squameuze metaplasie (epitheliale veranderingen) van de bulbo-urethraalklier en stenose van de urethra. Bij intacte oöien werd onvruchtbaarheid, verstoord eitransport, vervroegde regressie van het corpus luteum, cysteuze hyperplasie van de endometriumklieren, abortus en uterusprolaps waargenomen. Verantwoordelijke isoflavonen zijn de glycosides van genistein, biochanin A, daidzein en zijn 4 methylether formononetin en pratensein.

Coumestrol is verantwoordelijk voor de oestrogene activiteit van alfalfa (luzerne). Coumestrol en genistein verdringen 17- β -oestradiol van de cytoplasmatische receptor in de uterus en induceren eiwitsynthese (Lindner, 1976).

In de enige publicatie over effecten van tarwe met luzernehooi (46 %) op de reproductie bij zeugen (Holzgraefe et al., 1986), werd tarwe met luzernehooi vergeleken met tarwe + sojabonenmeel en met tarwe + sojameel + lasalocid, hierbij werd geen verschil in reproductiekenmerken waargenomen tussen de verschillende voedingsgroepen. Opgemerkt moet worden dat soja ook fyto-oestrogenen bevat, zodat dit geen goede vergelijking was.

Bij schapen grazend op luzerne zijn wel histopathologische afwijkingen in het geslachtsapparaat waargenomen (Cantero et al., 1996), met name in de cervix en uterus waar bij 43 % van de 56 dieren epitheliale veranderingen vertoonden.

Hop bevat 8-prenylnaringenin, een van de krachtigste fyto-oestrogenen (Milligan et al, 2002).

Bierbostel is een tussenproduct uit het brouwproces waarbij nog geen hop is toegevoegd. Fyto-oestrogenen afkomstig uit hop zijn er dan ook niet in te verwachten en er is geen literatuur gevonden waarin effecten van fyto-oestrogenen uit bierbostel beschreven zijn.

4.5 Effecten van contaminanten algemeen

In het algemeen zijn er verschillende voedingscontaminanten of toxines die embryo-overleving en foetale ontwikkeling beïnvloeden (McEvoy et al., 2001). Oestrogene planten remmen de ovariële activiteit, verminderen de conceptie en verhogen de embryonale mortaliteit. Rode klaver bevat het isoflavon formononetin, wat in kuil of hooi wordt omgezet tot equol, wat oestrogeen werkt. Vooral bij varkens zijn mycotoxines uit *Fusarium roseum* (zearalenone en deoxynivalenol) op dag 7-10 na dekking schadelijk voor de embryonale ontwikkeling. McEvoy geeft grenswaarden voor negatieve effecten op het embryo van 2 ppm voor deoxynivalenon en 30 ppm voor ZEN, waarbij hogere doseringen de maternale oestradiol concentraties verlagen door veranderde gonadotrofine secretie (biofeedback). Echter bij veel lagere doseringen zijn effecten gemeld (zie 4.2) Gehaltes van 5-10 ppm ZEN) voor de dekking bij de zeug verstoren de luteale functie zodat het interoestrus interval groter wordt. Prepuberale blootstelling aan ZEN verlaagt de fertiliteit bij zeugen echter niet.

5 LANGE TERMIJN EFFECTEN

Bij de lange termijn effecten dient onderscheid gemaakt te worden tussen effecten na korte blootstelling aan hoge gehalten fyto-oestrogenen, waarbij klinische verschijnselen zijn opgetreden, en effecten van chronische blootstelling aan lage gehalten.

Lange termijn effecten van fyto-oestrogenen zijn beschreven bij schapen die hadden geleden aan "Clover Disease", waarbij na verweiding van een perceel met veel fyto-oestrogene klaver naar een

schone weide, 5 maanden later toch veel minder tweelingen geboren werden. Ook wordt in het algemeen een verminderde vruchtbaarheid gezien, met minder dieren in oestrus, meer terugkomers, meer abortus, meer cysteuze endometriumhyperplasie en meer problemen postpartum. Ook algehele onvruchtbaarheid kan optreden na "Clover Disease" door verandering van het cervixepitheel waardoor er geen sperma meer kan worden vastgehouden en het dier ondanks een normale oestrus toch niet opneemt. Ook kan irreversibele masculinisatie van vrouwelijke dieren optreden met een afwijkend sexueel gedrag, vergroting van de clitoris en vergroeiing van de schaamlippen (Adams NR, 1995).

Ook andere diersoorten zoals knaagdieren en vrouwen, blootgesteld aan oestrogenen in een kritische periode van de sexuele differentiatie in het embryonale of neonatale leven, kunnen op volwassen leeftijd afwijkingen aan het geslachtsapparaat en een gestoorde fertiliteit vertonen.

Het standaardvoer voor laboratoriumratten bevatte voldoende fyto-oestrogenen uit de verwerkte soja om de lange termijn effecten op de vruchtbaarheid te veroorzaken (Sharma et al., 1992).

Lage gehalten aan fyto-oestrogenen in het voer kunnen bij herkauwers tijdelijk verminderde fertiliteit veroorzaken, zonder klinische verschijnselen. Hier kan het aantal ovulaties afnemen, waardoor er minder tweelingen worden geboren, dit soort subklinische infertiliteit is een groot probleem bij schapen in Australië (Adams NR, 1995).

Bij varkens is weinig onderzoek verricht naar lange termijn effecten van fyto-oestrogenen. Gelten die voor de puberteit gevoerd zijn met ZEN gecontamineerd voer hebben na overzetting op schoon voer, geen problemen met de reproductie. Terwijl bij zeugen die tijdens de dracht gevoerd werden met ZEN gecontamineerd voer de vruchtbaarheid gedurende langere tijd verstoord was (Long et al., 1983). Verwacht wordt dat langdurige blootstelling aan lage doseringen de vruchtbaarheid negatief beïnvloedt, mede omdat bij lage blootstellingsdosis ophoping van ZEN in het vetweefsel kan optreden (Veldman, 2003).

6 EFFECTEN VAN PROCESSING

Opslag van onvoldoende gedroogd graan, of inadequate opslagcondities kunnen leiden tot verhoging van het vochtgehalte in het graan tot 22-23 %, waardoor *Fusarium Roseum* op grote schaal zowel DON als ZEN kan gaan vormen (Diekman et al, 1992).

Wat betreft de onderaardse klaver blijkt dat de fyto-oestrogenen alleen aanwezig zijn in vers product, ze verdwijnen wanneer de plant afsterft. Alleen in hooi dat snel gedroogd is kunnen aanzienlijke hoeveelheden iso-flavonen voorkomen (Lintelo, 1997).

Bij rode klaver is het gehalte vooral hoog in de lente als de plant bloeit en voor luzerne geldt hetzelfde. In het algemeen bevatten gedroogde producten minder fyto-oestrogenen dan verse producten.

Kallela (1980) heeft onderzoek gedaan naar oestrogene effecten van kuilvoer bestaand uit 50 % grassen en 50 % rode klaver. Uit zijn onderzoek bleek dat de hoeveelheid melkzuur significante invloed had op het oestrogene effect. Waarbij meer melkzuur ook een sterkere oestrogene effect veroorzaakte. De pH en de hoeveelheid melkzuur hadden ook significant effect op de hoeveelheid gemeten isoflavonen, waarbij bij PH 5 de hoogste waarden werden gemeten. Ook verschillende inkuilmethoden zoals met of zonder melasse, en de "green-solution method" (30% melkzuur, 55% formaline en 15% beschermoplossing: hiervan 6-7 kg/ton voer) hadden invloed op de hoeveelheid fyto-oestrogenen. In ander onderzoek (Kallela, 1975) keek hij naar het effect van inkuilen op het oestrogene effect van rode klaver. Hierbij bleek dat ingekuilde klaver (green solution method), sterker oestrogene was dan verse klaver, dit terwijl het gehalte aan isoflavonen niet verhoogd

was. Dit is waarschijnlijk het gevolg van omzetting van isoflavonen in sterker werkzame oestrogenen. Rode klaver bevat het isoflavon formononetin, wat in kuil of hooi wordt omgezet tot equol, wat oestrogeen werkt.

7 NORMEN VOOR FYTO-OESTROGENEN IN VOER

Op dit moment zijn er geen normen van het Productschap Diervoeder voor ZEN en fyto-oestrogenen in ruwvoer (PVE, 2003). Wat betreft de mycotoxinen is er wel een norm voor DON (5 mg/kg) in varkensvoer en voor moederkoren (*claviceps*) (1000mg/kg).

Alleen Duitsland heeft normen voor ZEN in varkensvoer, zie tabel 3 (v Raamsdonk, 2001).

Tabel 3. normen voor ZEN in veevoer (oriënteringswaarde bij 12 % vochtigheid)

Land	Diergroep	Norm (mcg/kg)
Duitsland	Voer voor vrouwelijke, jonge varkens	50
Duitsland	Voer voor fokberen en zeugen	250

Er komen binnenkort Europese normen voor ZEN, DON en Ochratoxine. Normen voor plantaardige fyto-oestrogenen zijn er niet en worden ook niet verwacht.

8 DISCUSSIE EN CONCLUSIES

Fyto-oestrogenen komen op grote schaal voor in plantaardige producten, de oestrogene activiteit is echter gering vergeleken met het natuurlijk oestrogeen oestradiol17beta, meestal factor 1000 of meer lager. De oestrogene activiteit is afhankelijk van de biobeschikbaarheid, de binding aan de oestrogeenreceptor en de halfwaarde tijd.

In het algemeen varieert het gehalte fyto-oestrogenen van het gewas, afhankelijk van het ras, het groeistadium, of het vers of gedroogd is en de aanwezigheid van eventuele schimmelinfectie. Gedroogd gewas bevat in de regel minder fyto-oestrogenen dan vers (Lintelo, 1997).

Met name bij schapen zijn negatieve effecten op de vruchtbaarheid beschreven door het grazen op klaverrijke weiden. Door zeugen meer ruwvoer te geven is het echter mogelijk dat ook zeugen worden blootgesteld aan hogere gehalten aan fyto-oestrogenen, waardoor de fertiliteit negatief beïnvloed kan worden. Volgens de literatuur vormt vooral het mycotoxine zearalenon uit met fusarium geïnfecteerde granen een risico, verder kunnen ook klaver en luzerne aanzienlijke gehalten fyto-oestrogenen bevatten.

Prepuberale gelten zijn het meest gevoelig voor ZEN, bij een gehalte van 1.8 ppm door het voer werden al effecten waargenomen (Rainey et al., 1990). De grotere gevoeligheid van varkens voor ZEN in vergelijking met andere diersoorten wordt veroorzaakt door het feit dat varkens ZEN kunnen omzetten in α -zearalenol, wat ook sterk aan de oestrogeenreceptor kan binden en zelfs een sterkere oestrogene activiteit heeft dan ZEN (Riley, 1998). Lange termijn effecten in de vorm van permanente onvruchtbaarheid zijn bij varkens niet beschreven, hoewel blootstelling aan gehalten van 1 mg/kg levend gewicht op dag 7-10 na dekken al kan leiden tot degeneratie van embryo's. Verder leidde blootstelling aan ZEN gecontamineerd voer tijdens de dracht tot embryoresorptie en duurde het 20 weken voordat de dieren weer oestrus vertoonden (Long et al., 1983). Bij contaminatie met mycotoxine ZEN moet men bedacht zijn op het tegelijk voorkomen van DON wat door dezelfde schimmel gevormd wordt.

Over effecten van andere fyto-oestrogenen op de vruchtbaarheid bij varkens is geen literatuur gevonden. Voor lucerne wordt zelfs beweerd dat lage gehalten van 10-20 % in het voer voor drachtige zeugen de worpgrootte, de overleving en het speengewicht van de biggen positief beïnvloedt (Holzgraefe et al., 1986). In principe remmen oestrogene planten de ovariële activiteit, verminderen de conceptie en verhogen de embryosterfte.

Effecten van verwerking zijn beschreven voor klaver, waarbij inkuielen leidt tot omzetting van formomonetin in equol wat sterker oestrogeen werkzaam is. Daarnaast zijn de pH en de hoeveelheid melkzuur van belang voor de oestrogeniciteit (Kalella, 1980). Wat betreft ZEN kunnen slechte opslagomstandigheden leiden tot verhoging van het vochtgehalte, waardoor extra mycotoxine productie plaats vindt (Diekman et al., 1992).

Om ruwvoerders veilig te kunnen voeren dient men bedacht te zijn op mogelijke effecten van fyto-oestrogenen uit het gewas zelf of door oestrogene mycotoxinen. Fyto-oestrogenen kunnen van belang zijn bij klavers en luzerne, het mycotoxine ZEN komt voornamelijk voor op granen, maar kan in alle voeders voorkomen. Alle ruwvoeder dient dus te worden onderzocht op zearalenon, luzerne en klaver ook op coumestrol en isoflavonen. Het ontbreken van normen bemoeilijkt de interpretatie van de verkregen data, bij gebrek aan beter kan voor ZEN de Duitse norm gebruikt worden. Voor de overige fyto-oestrogenen is het raadzaam te gehalten bij te houden en mogelijke effecten op de vruchtbaarheid te monitoren. Bij gebleken effecten zou dan een werkzaamheids drempel kunnen worden vastgesteld.

LITERATUUR

Adams NR. Detection of the effects of phyto-oestrogens on sheep and cattle. *J Animal Sci* 1995; 73, 1509-15.

Blaney BJ, RC Bloomfield, CJ Moore. Zearalenone intoxication of pigs. *Aust Vet J* 1984; 61, 24-27.

Cantero A, JL Sancha, JM Flores, A Rodriguez and T Gonzalez. Histopathological changes in the reproductive organs of Macheo ewes grazing on Lucerne. *J Vet Med A*, 1996, 43, 325-30.

Chang K, HJ Kutz, CJ Mirocha. Effects of the mycotoxin zearalenone on swine reproduction. *Am J Vet Res* 1979; 40, 1260-67.

Dacasto M, P Rolando, C Nachtmann, L Ceppa, C. Nebbia. Zearalenone mycotoxicosis in piglets suckling sows fed contaminated grain. *Vet Hum Toxicol* 1995; 37, 359-61.

Diekman MA and ML Green. Mycotoxins and reproduction in domestic livestock. *J anim Sci.* 1992; 70, 1615-1627.

Diekman MA, GG Long. Blastocyst development on days 10 or 14 after consumption of zearalenone by sows on day 7 to 10 after breeding. *Am J Vet Res* 1989; 50, 1224-27.

Etienne M, M Jemmali. Effects of zearalenone (F2) on oestrous activity and reproduction in gilts. *J Anim Sci* 1982; 55, 1-10.

Green ML, DK Stouffer, AB Scheidt, GG Long, MA Diekman. Evaluation of the use of progesterone to counteract zearalenone toxicosis during early pregnancy in gilts. *Am J Vet Res* 1991; 52, 1871-74.

Holzgraefe DP, AH Jensen, GC Fahey Jr, RR Grummer. Effects of dietary alfalfa-orchardgrass hay and lasalocid on sow reproductive performance. *J Anim Sci* 1986; 62, 1145-53.

Kalella K. The effect of storage on the estrogenic effect of red clover silage. *Nord Vet Med* 1975; 27, 562-9.

Kalella K. The estrogenic effect of silage fodder. *Nord Vet Med* 1980; 32, 480-6.

Kloet DG, LWD van Raamsdonk, EJ de Waal, WA traag, HA Kuiper en B Schat. Mycotoxinen in de dierlijke productieketen. Rapport 2002.018 RIKILT-Instituut of Food Safety, Wageningen 2002.

Lintelo, G.J. te. De invloed van phyto-oestrogenen op de fertiliteit van mens en dier. Scriptie diergeneeskunde, april 1997.

Long GG, MA Diekman. Characterization of effects of zearalenone in swine during early pregnancy. *Am J. Vet Res* 1986; 47, 184-87.

Long GG, MA Diekman. Effect of purified zearalenone on early gestation in gilts. *J Anim Sci* 1984; 59, 1662-70.

Long GG, MA Diekman, JF Tuite, GM Shannon, RF Vesonder. Effects of *Fusarium roseum* (*Gibberella zeae*) on pregnancy and the estrous cycle in gilts fed moldy corn on days 7-17 post-estrus. *Vet Res Commun* 1983; 6, 199-204.

Long GG, J Turek, MA Diekman, AB Scheidt. Effects of zearalenone on days 7 to 10 post-mating on blastocyst development and endometrial morphology in sows. *Vet Pathol* 1992; 29, 60-67.

Lopez TA, ER Odriozola, GD Milano, JC Sobredo, LH Donadio, JA Rocco. Hyperestrogenism in swine due to natural poisoning with zearalenon. *Rev Argent Microbiol* 1988; 3, 119-123.

Mazur W, H Adlercreutz. Natural and anthropogenic environmental oestrogens: the scientific basis for risk assessment. *Pure & Appl Chem* 1998; 70, 1759-76.

McEvoy TG, JJ Robinson, AJ Ashworth, JA Rooke and KD Sinclair. Feed and forage toxicants affecting embryo survival and fetal development. *Theriogenology* 2001; 55, 113-129.

Milligan S, J. Kalita, V. Pocock, A. Heyerck, L. DeCooman, H. Rong and D. De Keukeleire. Oestrogenic activity of the hop phyto-oestrogen 8-prenylnaringenin. *Reproduction* 2002; 123, 235-242.

Productschap Diervoeder: Productnomen GMP-regeling diervoedersector, GMP11-4-2003.

Raamsdonk LWD van. Mycotoxine gehaltenes in grondstoffen voor diervoeders. Rapport 2001.020 RIKILT-Instituut of Food Safety, Wageningen 2001.

Rainey MR, RC Tubbs, LW Bennet and NM Cox. Prepubertal exposure to dietary zearalenone alters hypothalamo-hypophysial function but does not impair postpubertal reproductive function of gilts. *J Anim Sci* 1990; 68, 2015-22.

Riley RT. Mechanistic interactions of mycotoxins: Theoretical considerations. In: *Mycotoxins in agriculture and food safety*. Eds Sinhaad KK and D Bhatnagar. Marcel Dekker, Inc New York, Basel, Hong Kong, 1998, 227-53.

Rosselli M, K Reinhart, B Imthurn, PJ Keller and RK Dubey. Cellular and biochemical mechanisms by which environmental oestrogens influence reproductive function. *Human Reproduction Update* 2000; 6, 332-350.

Saloniemi H, K Wahala, P Nykanen-Kurki, K Kalella, I Saastamoinen. Phyto-oestrogen content and oestrogenic effect of legume fodder. *Proc Soc Exp Biol Med* 1995; 208, 13-7.

Sharma OMP, H Adlercreutz, JD Strandberg, BR. Zirkin, DS Coffee and LL Ewing. Soy of dietary source plays a preventive role against pathogenesis of prostatitis in rats. *J Steroid Biochem Mol Biol* 1992; 43, 557-64.

Young LG, GJ King. Low concentrations of zearalenone in diets of mature gilts. *J Anim Sci* 1986; 63, 1191-96.

Young LG, GJ King, L McGirr, JC Sutton. Moldy corn in diets of gestating and lactating swine. *J Anim Sci* 1982; 54, 976-82.

Young LG, H Ping, GJ King. Effects of feeding zearalenone to sows on rebreeding and pregnancy. *J Anim Sci* 1990; 68, 15-20.

Vanyi A, A Bata, R Glavits, F Kovacs. Perinatal oestrogen syndrome in swine. *Acta Vet Hung* 1994; 42, 433-46.

Veldman, B. Deskstudie naar de aanwezigheid en detectie van mycotoxinen in diervoedergrondstoffen. De Schothorst, Lelystad 2003.

Veldman, Bert. Mycotoxinen: de belasting van eenmagige landbouwhuisdieren en de overdracht naar het dierlijke product. Een deskstudie. De Schothorst, Lelystad 2003.