

Aus dem Institut
für Hygiene und Technologie der Lebensmittel tierischen Ursprungs
der Ludwig-Maximilians-Universität
Lehrstuhl: Univ.-Professor Dr. A. Stolle

Detektion von bovinem Nervengewebe
als Spezifiziertes Risikomaterial
in Fleischerzeugnissen
durch Etablierung eines speziesspezifischen ELISA
für die Routinediagnostik
unter Verwendung des Myelin Basic Protein

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung
der tiermedizinischen Doktorwürde
der Tierärztlichen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität München

von
Judith Nathalie Holtbecker
aus
Münster

München 2004

Gefördert durch das
Bayerische Staatsministerium
für Umwelt, Gesundheit und Verbraucherschutz
im Rahmen des Projektes LMU20
des Bayerischen Forschungsverbundes

Gedruckt mit Genehmigung der Tierärztlichen Fakultät der
Ludwig-Maximilians-Universität München

Dekan: Univ.-Prof. Dr. A. Stolle
1. Referent: Univ.-Prof. Dr. A. Stolle
2. Referent: Univ.-Prof. Dr. R. Hoffmann
1. Korreferent: Univ.-Prof. Dr. Dr.hc.mult. H.-G. Liebich
2. Korreferent: Prof. Dr. W. Rambeck
3. Korreferent: Univ.-Prof. Dr. O.-R. Kaaden

Tag der Promotion: 23. Juli 2004

1 Inhaltsverzeichnis

1	Inhaltsverzeichnis.....	1
2	Einleitung.....	4
3	Literatur.....	5
3.1	BSE.....	5
3.1.1	Geschichte und Epidemiologie.....	5
3.1.1.1	BSE in England.....	6
3.1.1.2	BSE in Deutschland.....	6
3.1.1.3	Zukünftige Entwicklung der Fallzahlen.....	7
3.1.2	Prionen als Krankheitserreger.....	8
3.1.3	Die Ausbreitung der pathogenen Prionen im Körper.....	9
3.1.4	Die klinische Erkrankung.....	10
3.1.5	Inkubationszeit.....	10
3.1.6	TSE bei anderen Nutztieren.....	10
3.1.7	Nachweis der BSE.....	12
3.1.8	Fleischhygienische Bedeutung von BSE.....	13
3.1.8.1	Von BSE betroffene Organe und Gewebe.....	13
3.1.8.2	Auswirkungen auf den Schlachtablauf.....	19
3.1.9	Auswirkung auf Fleischerzeugnisse.....	22
3.1.10	Nachweis von Nervengewebe in Fleischerzeugnissen.....	26
3.1.10.1	Testkits.....	28
3.1.10.2	Studien zum Nachweis von Nervengewebe in Fleisch- erzeugnissen.....	30
3.1.10.3	Speziesspezifischer Nachweis von Nervengewebe in Fleisch- erzeugnissen.....	34
3.1.11	Proteinsuche.....	38
3.1.12	Myelin Basic Protein.....	39
4	Eigene Untersuchungen.....	44
4.1	Material.....	44
4.1.1	Untersuchungsmaterial.....	44
4.1.2	Arbeitsmaterial.....	48
4.1.2.1	Antikörper.....	48

Inhaltsverzeichnis

4.1.2.2	Chemikalien und Lösungen.....	50
4.1.2.3	ELISA-Platten	51
4.1.2.4	Geräte	51
4.2	Methoden	52
4.2.1	Indirekter ELISA	52
4.2.2	Probenaufbereitung.....	52
4.2.3	Versuchsablauf	53
4.2.4	Protokoll der Versuche.....	55
4.2.5	Inkubationsbedingungen	56
5	Ergebnisse	57
5.1	Untersuchung der Reaktionsfähigkeit verschiedener Antikörper an reinem MBP	57
5.2	Untersuchung von Gehirn von Rind, Schwein und Huhn	60
5.3	Untersuchung von Brühwurst aus Schweinefleisch.....	63
5.3.1	Brät mit Rindergehirn... ..	63
5.3.2	Auf + 80°C erhitzte Brühwurst mit Rindergehirn.....	65
5.3.3	Auf + 115°C erhitzte Brühwurst mit Rindergehirn.....	67
5.4	Untersuchung von Brühwurst aus Rindfleisch.....	70
5.4.1	Brät mit Rindergehirn	70
5.4.2	Auf + 80°C erhitzte Brühwurst mit Rindergehirn.....	72
5.4.3	Auf + 115°C erhitzte Brühwurst mit Rindergehirn.....	74
5.4.4	Vergleich der HCl-Extraktion mit der PBS-Extraktion am Beispiel der auf + 115°C erhitzten Brühwurstproben mit Rindergehirn	76
5.5	Innereien von Rind und Schwein.....	83
5.5.1	Innereien des Schweins	83
5.5.2	Innereien des Rindes	85
5.6	Handelsübliche Leberwurst	88
5.7	Bestimmung der Nachweisgrenze.....	89
6	Diskussion.....	90
7	Schlussfolgerungen.....	95
8	Zusammenfassung.....	96
9	Summary	97
10	Tabellenverzeichnis	98
11	Abbildungsverzeichnis	99

Inhaltsverzeichnis

12	Abkürzungsverzeichnis	100
13	Literaturverzeichnis.....	102
14	Danksagung.....	115
15	Anhang	116

2 Einleitung

Im Jahr 1986 wurde in England erstmals die Bovine Spongiforme Enzephalopathie (BSE) histopathologisch bei einem Rind diagnostiziert. Bei dieser Erkrankung treten Veränderungen im Zentralen Nervensystem (ZNS), hauptsächlich im Gehirn der betroffenen Tiere auf. Derzeit wird davon ausgegangen, dass durch Aufnahme von infiziertem Material, insbesondere Gehirn, über die Nahrung eine Übertragung der Erkrankung auch auf den Menschen möglich ist. Nach dem Auftreten von BSE wurde aus diesem Grund die Verwendung von ZNS-Material in Fleischerzeugnissen verboten. Um die Nichtverwendung von ZNS zu überprüfen, wurden verschiedene Testsysteme entwickelt, von denen gegenwärtig zwei verfügbar sind.

Anhand dieser Tests kann nur festgestellt werden, ob ZNS verarbeitet wurde oder nicht. Eine Unterscheidung von Rinder- und Schweinegehirn ist ebenso wie eine Differenzierung zwischen Nervengewebe des Zentralen oder Peripheren Nervensystems nicht möglich. Auch über das Alter der Tiere bei der Schlachtung kann anhand des ZNS-Nachweises keine Aussage getroffen werden.

Da bei Schweinen bisher noch keine natürliche Prioneninfektion nachgewiesen wurde, stellt das Gehirn dieser Tierart ein geringeres Risiko dar, als zentrales Nervengewebe vom Rind. Deshalb ist die Suche nach einem speziesspezifischen Nachweisverfahren für bovines Nervengewebe von essentieller Bedeutung.

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, ein geeignetes Nachweissystem auf der Basis eines rinderspezifischen Proteins zu entwickeln, mit dessen Hilfe Nervengewebe in Fleischerzeugnissen detektiert werden kann.

Dieses Testsystem eröffnet der amtlichen Überwachung und dem Handel die Möglichkeit, den Verbraucher gezielt vor illegalem Zusatz von dem Risikomaterial Rindergehirn in Fleischerzeugnissen zu schützen.

3 Literatur

3.1 BSE

Die Bovine Spongiforme Enzephalopathie (BSE) ist eine Erkrankung der Rinder, die durch Eiweißkörper, sogenannte Prionen, ausgelöst wird. Im gesunden Organismus vorkommende Prionen werden bei dieser Erkrankung durch eine Konformationsänderung in infektiöse Prionproteinen umgewandelt, die bis zum Verfüterungsverbot von Tiermehl mit diesem in den Rinderbeständen verbreitet wurden und weitere Rinder infizierten.

3.1.1 Geschichte und Epidemiologie

BSE ist ein globales Problem, welches zuerst in England als Folge der Tiermehlverfütterung an Rinder auftrat (WILESMITH et al., 1988). Dort, ebenso wie in einigen anderen europäischen Mitgliedsstaaten, war bei der Tiermehlherstellung eine Umstellung vom sogenannten „Batch“-Verfahren auf ein kontinuierliches Verfahren mit reduzierten Temperaturen und einer verminderten Extraktion von Fett mit Lösungsmitteln erfolgt (CONRATHS et al., 2002a). Durch das geänderte Verfahren wurden die bis dahin unbekannt pathogenen Prionen nicht mehr inaktiviert, und es kam innerhalb der Rinderbestände zu einer Verbreitung durch das Tiermehl. Der Ursprung der pathogenen Prionen ist nach wie vor unklar. Verschiedene Theorien, die die Tiermehlverfütterung als Ursache für die Verbreitung sehen, besagen, dass es sich entweder um Scrapie-Prionen handelt oder um pathogenen Prionen des Rindes.

Die Scrapie-Prionen sind schon länger als Auslöser der Scrapie bzw. Traberkrankheit der kleinen Wiederkäuer bekannt und könnten sich entsprechend einer Hypothese an das Rind angepasst haben. Eine andere Hypothese besagt, dass sich ihre Virulenz gesteigert haben könnte. In beiden Fällen könnte so die Überwindung der Artenschanke möglich geworden sein (HÖRNLIMANN, 2001). Eine weitere Annahme ist, dass es sich von vornherein um BSE-Prionen gehandelt hat, die selten auftraten und aus diesem Grund nicht als Krankheit bekannt waren. SMITH

Literatur

(2003) erinnert in diesem Zusammenhang an die Creutzfeldt-Jakob Krankheit (CJD), an der nur ein bis zwei Menschen pro eine Million Menschen pro Jahr erkranken.

3.1.1.1 BSE in England

In England wurde der erste BSE-Fall 1986 entdeckt. Es wird aber vermutet, dass der Ursprung der Epidemie bereits in den siebziger Jahren lag (SMITH, 2003). Dem ersten Fall folgte eine große Anzahl weiterer Fälle. Der Höhepunkt der Epidemie konnte in den Jahren 1992 und 1993 vermerkt werden, einem Zeitpunkt der vier bis fünf Jahre nach dem Erlass des sogenannten „Feed-ban“ (Verfütterungsverbot) im Juli 1988 lag (DAHMS, 2003). Laut diesem Verfütterungsverbot durfte Tiermehl nicht mehr an Wiederkäuer verfüttert werden, an andere Tierarten aber weiterhin. Dies führte zu einem starken Rückgang der BSE-Fälle nach 1993, der die Theorie bestätigte, dass das Tiermehl Überträger der pathogenen Prionen ist. Die konsequente Umsetzung des Verbotes erfolgte jedoch erst 1996, nachdem Berichte über eine neue Variante der CJD veröffentlicht wurden. In diesem Jahr wurde das Tiermehlverfütterungsverbot für alle Nutztiere ausgesprochen. Es treten jedoch immer noch Fälle von Tieren auf, die nach 1996 geboren wurden, bei denen die Infektionsursache unklar ist und auch nicht generell mit einer möglichen maternalen Transmission erklärbar ist (SMITH, 2003).

3.1.1.2 BSE in Deutschland

Bis zur Entdeckung des ersten in Deutschland geborenen BSE-Rindes am 26.11.2000, galt Deutschland als BSE-frei. Die zuvor in den neunziger Jahren entdeckten sechs infizierten Tiere, waren nicht in Deutschland geboren, galten also auch nicht diesem Land zugehörig (MATTHEWS, 2003). Seither ist bei 294 Rindern (Stand 08.01.2004) das pathogene Prionprotein nachgewiesen worden, im Jahr 2003 traten 54 Fälle auf. Festgestellt wurden diese Infektionen durch die auf immunologischen und biochemischen Verfahren beruhenden Schnelltests, die histopathologisch bestätigt wurden.

Nahezu 80 % der BSE-positiv getesteten Rinder wurden in den Jahren 1995 und 1996 geboren, wobei das älteste positive Tier aus dem Jahr 1987 stammt. Diese

Literatur

Zahl lässt vermuten, dass bereits zu einem früheren Zeitpunkt - Mitte bis Ende der Achtziger - ein BSE-Geschehen stattgefunden hat. Die Häufung von Fällen in Nord- und Süddeutschland folgt im Wesentlichen der Verteilung der Rinderpopulationen, die schwerpunktmäßig in diesen Gebieten verteilt sind (GÖBEL et al., 2003).

BSE wurde sehr wahrscheinlich durch infizierte lebende Rinder aus England und durch agenshaltiges Fleisch- und Knochenmehl aus England und anderen Ländern eingeführt (SMITH, 2003). Daraufhin wurde in Deutschland im Juni 1994 ein Verfütterungsverbot proteinhaltiger Erzeugnisse aus Säugetiergewebe an Wiederkäuer erlassen (N.N., 1994), wobei aber bis 1996 weiterhin ein Infektionsrisiko durch Verschleppung beim Mischfutterherstellungsprozess bestand. Ein Infektionsrisiko war außerdem durch die illegale Verfütterung von Mischfuttermitteln mit proteinhaltigen Erzeugnissen aus Säugetiergewebe gegeben (CONRATHS et al., 2002a). Vom Verfütterungsverbot wurden tierische Fette bis zum Dezember 2000 nicht erfasst (N.N., 2000), da diese Fette aus Schlachtkörperteilen lebensmitteltauglicher Gewebe gewonnen wurden und deshalb mit Ausschmelztemperaturen von weniger als + 80°C hergestellt wurden. Diese Fette durften bei Wiederkäuern bis Ende 2000 eingesetzt werden und wurden vorwiegend zur Herstellung von Milchaustauschern verwendet (CONRATHS et al., 2002a).

3.1.1.3 Zukünftige Entwicklung der Fallzahlen

Um Voraussagen über die Entwicklung der BSE Epidemie in Deutschland zu machen, wurden verschiedene Berechnungen durchgeführt. Sie haben aber vorerst nur eine begrenzte Aussagekraft, da die Epidemie noch nicht lange genug bekannt ist, es zu geringe Fallzahlen gibt und manche Daten nicht gesammelt wurden, da diese Daten erst unter dem Gesichtspunkt der BSE interessant wurden. CONRATHS et al. (2002b) haben versucht, anhand mathematischer Modelle die zukünftige Entwicklung der Fallzahlen zu prognostizieren. Während ein Modell dabei von einem nichtlinearen, unterproportionalen Verlauf ausgeht, rechnet ein weiteres Modell mit einem linearen, proportionalen Verlauf. Die Kurven beider Verläufe sind in den ersten Monaten der BSE-Epidemie identisch. Erst frühestens 24 Monaten nach der Entdeckung des ersten BSE-Falles kann hierbei festgestellt werden, welches Modell zutrifft. Zum Zeitpunkt der Modellanwendung konnte daher noch keine Aussage getroffen werden, welches Modell den Fallzahlen endgültig entspricht. Aus den

Literatur

Modellen waren aber schon zum damaligen Zeitpunkt Hinweise ersichtlich, die zeigen, dass „sich Deutschland zurzeit eher im fallenden Teil der epidemischen Kurve für das aktuelle BSE-Geschehen befinden könnte“ (CONRATHS et al., 2002a). In England sind zwei Modelle für BSE entwickelt worden, die DAHMS (2003) auf ihre Anwendbarkeit für Deutschland untersuchte. Bei dem Modell des Central Veterinary Laboratory werden für ein bis zwei Jahre im Voraus die zu erwartenden BSE-Fallzahlen prognostiziert, um die entstehenden Kosten abschätzen zu können. Beim zweiten Modell, das an der Universität von Oxford erstellt wurde, handelt es sich um ein „Backcalculation“-Modell. Neben der Beschreibung der populationsbezogenen Infektions- und Übertragungsdynamiken der BSE soll auch eine Rückrechnung der Zahlen der infizierten Tiere stattfinden, die in der Vergangenheit klinisch unauffällig in die Lebensmittelkette gelangt sind. Da bei beiden Modellen Datenmaterial notwendig ist, das nicht verfügbar ist und zusätzlich die Datenmenge in Deutschland kleiner ist als in England, wird aber von einer Modellschätzung abgeraten (DAHMS, 2003).

Eine neue Prognose der EU-Kommission geht trotz der in 2003 niedrigeren Zahl an BSE-Fällen gegenüber 2002 und 2001 von einem erneuten Anstieg der positiven BSE-Nachweise im Jahr 2004 aus. Dies wird damit begründet, dass in der zweiten Hälfte des Jahres 2003 die BSE-Zahlen in Deutschland zunahmen, dass der Anteil der BSE-Fälle im Jahr 2003 EU-weit in Deutschland am höchsten gewesen sei und dass Risikomaterial erst seit Ende 2000 entfernt würde (N.N., 2004).

3.1.2 Prionen als Krankheitserreger

BSE wird durch das pathogene Prionprotein (PrP^{Sc}) ausgelöst. Hierbei handelt es sich um ein Agens, das keine Nukleinsäure enthält, keine Immunantwort hervorruft und über eine hohe Tenazität gegenüber den meisten Desinfektionsmitteln und Hitze verfügt. Bei gesunden Tieren gibt es auf den Zelloberflächen zelluläre Prionproteine (PrP^{C}), vor allem auf den Zellen im Gehirn, gefolgt von den Zellen der Lunge, der Skelettmuskulatur, des Herzens, des Uterus, des Thymus und der Zunge (MOUDJOU et al., 2001). Die genaue Funktion des zellulären PrP^{C} ist noch nicht geklärt. Bisherige Untersuchungen haben gezeigt, dass das PrP^{C} an Prozessen der Signaltransduktion beteiligt ist (SPIELHAUPTER et al., 2001), in Verbindung mit Kupfer als Antioxidans wirkt (BROWN, 2001) und dessen Transport in die Zellen erleichtert (KRAMER et al., 2001). Während das PrP^{C} einen hohen Gehalt an α -Helices aufweist,

Literatur

sind im PrP^{Sc} vor allem β -Faltblätter vorhanden (PAN et al., 1993). Es handelt sich also beim PrP^{Sc} um ein anomal gefaltetes Prionprotein, das außerdem gegenüber einer Behandlung mit Proteinase K unempfindlich ist, während PrP^C durch eine solche Behandlung abgebaut wird. Dieser Umstand wird für den Nachweis von PrP^{Sc} mit den sogenannten Schnelltests an geschlachteten und gefallenen Tieren genutzt. Wenn ein Rind mit Prionen infiziert wurde, dann kam es zur Vermehrung der PrP^{Sc}, indem die pathogenen PrP^{Sc} die bereits vorhandenen zellulären PrP^C in neue pathogene PrP^{Sc} umwandeln (GASSET et al., 1992; KOCISKO et al., 1994; NGUYEN et al., 1995). Nach ihrer Umwandlung in die pathogene Form lagern sich die Prionen aneinander und formen erst Fibrillen, die sich wiederum als Plaques ablagern.

3.1.3 Die Ausbreitung der pathogenen Prionen im Körper

Prionenkrankheiten bei Mensch und Tier können spontan, familiär und infektiös auftreten (RIESNER, 2001). Da der Weg der Prionen im Körper nach der oralen Infektion durch Tiermehl noch weitgehend ungeklärt ist, versucht man die Ausbreitung mit Hilfe immunhistochemischer Methoden und im Tierversuch zu verfolgen. Dazu werden Untersuchungen am Rind durchgeführt und darüber hinaus Forschungsergebnisse von Prionenkrankheiten anderer Spezies auf BSE übertragen. FRIES et al. (2003) geben einen Überblick über diese Forschungsergebnisse, welche darauf schließen lassen, dass die Prionen nach oraler Aufnahme einerseits den Darm über das lymphatische Gewebe verlassen und sich von dort aus nerval über das Ganglion coeliacum und das Ganglion mesentericum craniale zu den Spinalganglien, dem Rückenmark und zum Gehirn hin ausbreiten und sich andererseits über den Nervus vagus direkt ins Gehirn bewegen. TERRY et al. (2003) haben das Ileum von experimentell und natürlich infizierten Rindern verschiedener Altersgruppen auf PrP^{Sc} untersucht. Sie konnten zeigen, dass das lymphoretikuläre System des Ileums weniger von pathogenen Prionen betroffen ist, als es bei Schafen mit Scrapie der Fall ist.

3.1.4 Die klinische Erkrankung

Bei der Bovinen Spongiformen Enzephalopathie (BSE) handelt es sich um eine Erkrankung, die zu Störungen des Verhaltens, der Bewegung und der Sensibilität führt. Der Verlauf ist progressiv schleichend und trotz erhaltener Fresslust kommt es zu sinkender Milchleistung und Abmagerung. An Verhaltensstörungen fallen Ängstlichkeit und Nervosität auf, die sich beispielsweise bei unvorhergesehenen Ereignissen, wie beispielsweise einem lauten Geräusch, zeigen. Das Rind zuckt zurück, bei andauerndem Ereignis leckt es sich Nase und Flotzmaul und knirscht mit den Zähnen. Eine gesteigerte Aggressivität manifestiert sich in Form von Abwehrbewegungen gegenüber dem Melkzeug und Ausschlagen beim Aufschütteln des Strohes. Störungen in der Motilität verstärken sich im Laufe der Zeit und können sich zuerst in einer Ataxie, später in einem steiferen Gang und in Gleichgewichtsstörungen, im Endstadium durch Festliegen äußern. Die krankhaft veränderte Sensibilität macht sich durch eine Überempfindlichkeit gegenüber Berührungen, vor allem im Kopf- und Halsbereich, sowie gegenüber Lärm und Licht bemerkbar (BRAUN et al., 2001).

3.1.5 Inkubationszeit

Die Symptome der BSE treten nach einer Infektion im ersten Lebensjahr meistens in einem Alter von ungefähr fünf Jahren, also nach einer Inkubationszeit von ca. 4,5 Jahren auf. Abweichungen von diesem Erkrankungsalter können, wie der Fall des jüngsten betroffenen Rindes mit einem Alter von 20 Monaten deutlich macht, auftreten (HÖRNLIMANN, 2001).

3.1.6 TSE bei anderen Nutztieren

TSE-Erkrankungen kommen außer beim Rind auch bei Schaf, Ziege, nordamerikanischen Cerviden, Nerzen und Katzen vor und sind auch bei Zootieren und Straußen aufgetreten.

Bei **Schaf** und **Ziege** handelt es sich um die Traberkrankheit bzw. Scrapie, die in fast allen Ländern auftritt, in denen Schafe gezüchtet werden. Eine Infektion mit Scrapie

Literatur

kann horizontal, zum Beispiel über kontaminierte Weiden oder vertikal während bzw. unmittelbar nach der Geburt erfolgen. Des Weiteren wird davon ausgegangen, dass bei Scrapie eine genetische Komponente von Bedeutung ist.

Cerviden in Nordamerika können von der Chronic Wasting Disease (CWD) bzw. von der Chronisch Zehrenden Krankheit der Hirschartigen betroffen sein, wobei diese TSE-Erkrankung sowohl in Gatterhaltung als auch bei freilebenden Hirschartigen auftritt. Wie die Infektion abläuft ist noch unklar, es wird aber eine Ansteckung über Kot und Speichel vermutet (WILLIAMS et al., 2002).

Über **Schweine** liegen keine Berichte einer natürlichen Prionenerkrankung vor. Im Rahmen einer Studie von WELLS et al. (2003) wurden Schweine zum einen parenteral, zum anderen oral infiziert. Letzteres wurde mittels getrocknetem Hirnhomogenat BSE-erkrankter Kühe durchgeführt. Bei der parenteralen Verabreichung wurde den Schweinen eine Suspension aus Hirnhomogenat von BSE-Kühen sowohl intracranial, als auch intravenös und intraperitoneal verabreicht. Bei diesen Tieren kam es sowohl zu einer BSE-Infektion, als auch teilweise zu einer BSE-Erkrankung, wodurch eine Empfänglichkeit bestätigt ist. Bei den Schweinen, die das Hirnhomogenat ausschließlich oral verabreicht bekamen, trat weder eine Infektion noch eine Erkrankung auf.

Auch bei **Hühnern**, die ebenfalls mit Tiermehl gefüttert wurden, gibt es keine Hinweise für ein TSE-Risiko. Dazu wurde 1990 eine Studie begonnen, in der eine Gruppe Eintagsküken parenteral den Erreger verabreicht bekam und eine andere Gruppe den Erreger oral aufnahm. Bei keinem der Tiere konnten histopathologische Veränderungen an Gehirn oder Rückenmark nachgewiesen werden. Bei mehreren Tieren aus beiden Gruppen trat nach 22 bis 60 Monaten ein klinisches Syndrom auf, welches als „motor disturbance“ bezeichnet wurde. Dieses Syndrom war bisher nicht bekannt und deshalb wurde Nervengewebe der betroffenen Hühner an Eintagsküken und Mäusen verabreicht, die aber ebenfalls keine histopathologischen Veränderungen entwickelten (MATTHEWS et al., 2003).

Die TSE-Forschung bei **Fischen** steht noch am Anfang. Bisher konnte das natürliche Prionprotein des Kugelfisches (SUZUKI et al., 2002) und des Atlantischen Lachses (OIDTMANN et al., 2003) isoliert und identifiziert werden. Eine TSE beim Fisch ist nicht bekannt, kann aber aufgrund des noch geringen Wissens nicht ausgeschlossen werden (N.N., 2003a).

3.1.7 Nachweis der BSE

BSE kann zurzeit nur postmortal an ZNS-Gewebe nachgewiesen werden. Dabei dient ein histopathologischer Nachweis als Referenzverfahren, welcher aber eine längere Durchführungszeit beansprucht. Aus diesem Grund wurden sogenannte Schnelltests entwickelt, die alle nach demselben Prinzip arbeiten, indem sie das PrP^{Sc} nachweisen. Dafür wird ein Verdau mit Proteinase K durchgeführt, bei dem zelluläres PrP^C abgebaut wird. Übrig bleiben nur die proteinaseresistenten PrP^{Sc}, die mit verschiedenen Testsystemen detektiert werden können. **Tabelle 1** gibt einen Überblick über diese Testkits. Dabei handelt es sich zum einen um den **Prionics-Check Western Test** der Firma Prionics. Als Probenmaterial dient hier neben der sogenannten Obexregion, bei der es sich um das Kerngebiet des Nervus vagus handelt, auch Rückenmarksgewebe. Bei diesem Test wird ein Western Blot durchgeführt (HÖRNLIMANN et al., 2001a). Zusätzlich zu diesem Western Blot wurde am 20.6.2003 der **Prionics-Check LIA-Test** derselben Firma in Europa zugelassen, bei dem es sich um einen Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA) handelt. Beim **Enfer-Test** der Firma Enfer Technology Limited wird Rückenmarksgewebe als Untersuchungsmaterial verwendet. Bei dem hier verwendeten Testsystem handelt es sich um einen ELISA, dessen Ergebnisse mit Chemilumineszenz dargestellt werden. Der **Bio-Rad Platelia-Test** der Firma Bio-Rad benötigt die Obexregion für den Nachweis der PrP^{Sc} mittels Sandwich-ELISA (MALCHOW, 2003). Zusätzlich ist seit dem 20.06.2003 ein weiterer Test in Europa zugelassen worden, bei dem es sich um den **InPro CDI-5-Test** handelt, bei dem im Gegensatz zu den vorher genannten Testsystemen die Konformation von Prionproteinen in einem Immunoassay detektiert wird (N.N., 2003).

Tabelle 1: In Europa zugelassene Schnelltests

Test	Hersteller	Testprinzip
Prionics-Check Western-Test	Prionics	Western-Blotting-Verfahren zum Nachweis des proteaseresistenten Fragments PrP ^{Res}
Prionics-Check LIA-Test	Prionics	ELISA
Enfer-Test	Enfer Technology Limited	Chemilumineszenz-ELISA-Test
Bio-Rad TeSeE-Test, ehemals Bio-Rad Platelia-Test	Bio-Rad	Sandwich-ELISA
InPro CDI-5-Test	InPro	Automatisierter konformationabhängiger Immunoassay mit Abgleich der Reaktivität eines Detektionantikörpers gegenüber den proteaseempfindlichen und proteaseresistenten PrP ^{Sc} -Formen und den PrP ^C

3.1.8 Fleischhygienische Bedeutung von BSE

3.1.8.1 Von BSE betroffene Organe und Gewebe:

Mit den zunehmenden Erkenntnissen über die Krankheit BSE und deren Verbreitung bei Rindern in Europa, erhärtete sich die Vermutung, dass BSE durch die orale Aufnahme von infektiösen Prionen zur neuen Variante der CJD beim Menschen

Literatur

führen kann (HILDEBRANDT et al., 2001). Aus diesem Grund wurde die Verordnung (EG) 999/2001 erlassen, durch die verhindert werden soll, dass infektiöses Material in die Nahrungskette gelangt. Bestimmte Organe und Tierkörperenteile werden hier entsprechend dem Kenntnisstand über die Verteilung der Prionen im Körper als Spezifiziertes Risikomaterial (SRM) eingeteilt und müssen unschädlich beseitigt werden. In der folgenden **Tabelle 2** sind die derzeit als SRM beim Rind geltenden Gewebe aufgeführt.

Tabelle 2: Spezifiziertes Risikomaterial (SRM) bei Rindern laut VO (EG) 1139/2003 vom 27.06.2003

SRM	Schädel ohne Unterkiefer aber einschließlich Hirn und Augen,
	Wirbelsäule ohne Schwanzwirbel, Querfortsätze der Lenden- und Brustwirbel sowie Kreuzbeinflügel, aber einschließlich der Spinalganglien und des Rückenmarkes von über 12 Monate alten Rindern
	Tonsillen
	Darm von Duodenum bis Rektum und Mesenterium von Rindern aller Altersklassen.

Ergänzend wurde in der VO (EG) 1326/2001 die Verwendung von **Knochen** von Wiederkäuern für die Herstellung von Separatorenfleisch verboten, womit eine potentielle Gefährdung durch an den Knochen anhaftendes Nervengewebe ausgeschaltet werden sollte. Dies gilt insbesondere für die Wirbelsäule wegen der hier befindlichen Spinalganglien und des Rückenmarks, außerdem für den Schädel wegen der Kopfganglien und des Gehirns. An den langen Röhrenknochen stellen einerseits die Nerven und andererseits das Knochenmark einen Gefahrenpunkt dar, da, wie eine Scrapie-Studie zeigte, im Knochenmark Infektiosität nachgewiesen werden konnte. Allerdings wurde bisher bei BSE noch keine Infektiosität in Knochen nachgewiesen (RUFFING et al. 2001).

Eine Ausnahme bildet in Deutschland die Herstellung von **Speisegelatine**, welche aus Wiederkäuerknochen mit Ausnahme von Schädel und Wirbelsäule hergestellt werden darf. Dies wird in der Speisegelatine-VO vom 13.12.2002 geregelt und ist darin begründet, dass in Deutschland 90 % der Gelatine aus Schweineschwarten hergestellt wird (N.N., 2002a). Außerdem wird durch die üblichen

Literatur

Herstellungsverfahren eventuelle Infektiosität in einem Ausmaß zerstört, dass die Gefahr gegen Null geht (N.N., 2002d). Ein weiteres Ausgangsmaterial für die Gelatineproduktion sind Wiederkäuerhäute, die ebenfalls laut Speisegelatineverordnung zugelassen sind, da sie als sicher gelten, solange eine Kontamination vermieden wird (N.N., 2003c), die im Bereich des Bolzenschußloches auftreten kann.

Bei **Kopffleisch** besteht das Risiko einer Kontamination mit Nervengewebe aus dem Bolzenschußloch und aus dem Foramen magnum. Da bisher die Bedingungen, unter denen dieses Fleisch gewonnen werden konnte, unklar waren, sind Auflagen für eine Gewinnung dieses Fleisches nun mit der Verordnung (EG) 1139/2003 definiert worden. Zum Beispiel müssen die genannten Öffnungen mit einem Verschluss versiegelt werden und eine mögliche Kontamination des Fleisches mit Nervengewebe soll anhand von Laboruntersuchungen im Rahmen stichprobenartiger Kontrollen ausgeschlossen werden. Diese neuen Bedingungen gelten nicht für die Gewinnung von Backenfleisch, wenn die Köpfe nicht vom Förderband oder Haken entfernt werden.

Mit dieser Regelung wird ein Kompromiss zwischen dem wirtschaftlichen Verlangen das Kopf- und Backenfleisch zu nutzen und dem Bedürfnis des Verbrauchers nach sicherem Fleisch versucht. Es bleibt zu klären, ob durch die Verschlüsse eine Kontamination des Kopffleisches verhindert werden kann, da durch den Schnitt beim Kopfabsetzen und beim Enthäuten des Kopfes eine Verbreitung von ZNS-Material auf dem umliegenden Fleisch denkbar ist. Aufschluss über die Wirksamkeit der Verschlüsse werden letztendlich die stichprobenartigen Kontrollen geben.

Um einschätzen zu können, inwieweit ZNS-Material im Verlauf der Schlachtung auf den enthäuteten Rinderschädel gelangt, haben MOJE et al. (2001) die Umgebung des Bolzenschußloches, die Muskulatur neben dem Hinterhauptbeinloch und die äußere Kaumuskulatur mit dem sogenannten RIDASCREEN Risk Material Test untersucht. Es gelang ihnen an allen drei Lokalisationen das Glial fibrillary acidic protein (GFAP) nachzuweisen. GFAP ist ein Protein aus den Gliazellen und eignet sich daher zum Nachweis von Nervengewebe. MOJE et al. (2001) untersuchten 100 Tierkörper und wiesen in 95 % der Fälle in der Umgebung des Schussloches, in 72 % der Fälle auf der Muskulatur neben dem Hinterhauptbeinloches und bei 26 % der Köpfe auf der

Literatur

äußeren Kaumuskulatur GFAP nach. Neben einer Kontamination durch ZNS-Material besteht auch durch das Ganglion cervicale craniale an der Schädelbasis, welches im Gegensatz zu den anderen Kopfganglien leicht erreichbar ist und beim Entbeinen mit in die Fleischfraktion gelangen kann, ein Risiko. Zwar wurden hier noch keine PrP^{Sc} nachgewiesen, aber vorbeugend sollte es besser am Schädel verbleibend entsorgt werden (FRIES et al., 2003). Da das Risiko einer Kontamination des Kopfes unvermeidlich ist, empfiehlt das Bundesinstitut für Risikobewertung, den Kopf nicht mehr für die Fleischgewinnung einzusetzen, sondern ihn unschädlich zu beseitigen (N.N., 2001b).

Weitere Organe, die infektiöse PrP^{Sc} enthalten können, sind **Herz, Lunge und Blut**. Durch mit dem Blutfluss abgeschwemmtes Hirnmaterial, welches durch den Bolzenschuss gelöst werden kann, ist eine Kontamination möglich, wobei die Größe des Risikos von der Art des verwendeten Schussapparates abhängt (N.N., 2002c). GARLAND et al. (1996) haben Rinderlungen von Tieren, die mit einem pneumatischen Betäubungsgerät mit Luftinjektion nach Hantover, wie es vor allem in England und in den USA verwendet wurde, untersucht und fanden in den Pulmonararterien makroskopisch sichtbare ZNS-Emboli bei 2,5-5 % der Rinder. Es folgte eine Studie von ANIL et al. (2001) in der das Blut der Jugularvenen von Schafen gesammelt und untersucht wurde. Sie waren mit Schussapparaten betäubt worden, die entweder mit Patronen oder mit Luftinjektion betrieben wurden oder sie wurden einer Elektrobetäubung unterzogen. Zusätzlich wurde bei einigen Schafen das Blut aus der Aorta untersucht. Der Nachweis von ZNS erfolgte mit Hilfe von S-100 β und Syntaxin 1-B, zwei ZNS-Proteine, die normalerweise nicht im Blut vorkommen. Während bei den beiden Betäubungsverfahren mit Schussapparaten bei jeweils zwei von 15 Schafen die ZNS-Proteine im venösen Blut detektiert werden konnten, konnten weder im arteriellen Blut noch im Blut der elektrobetäubten Tiere die ZNS-Proteine nachgewiesen werden. Auch HORLACHER et al. (2002a) haben sich mit dieser Thematik beschäftigt und Emboli aus arteriellen Lungengefäßen von Rindern gesammelt, die mit einem Bolzenschussgerät nach Schermer betäubt wurden. Es handelt sich hierbei um einen Apparat, der mit einem durch eine Treibladung angetriebenen Schlagbolzen arbeitet und der üblicherweise in Deutschland verwendet wird. Die Emboli wurden immunchemisch und immunhistochemisch auf Neuronenspezifische Enolase (NSE) und GFAP untersucht und nur bei wenigen

Literatur

Emboli konnte NSE und GFAP nachgewiesen werden. In einer Folgestudie von LÜCKER et al. (2002) wurden ebenfalls Rinderlungen auf NSE untersucht, wobei bei 726 Rindern nur 48 Emboli auftraten, von denen nur zwei Lungenemboli positiv bei der Untersuchung auf NSE reagierten. Bei dieser Studie wurden auch Emboli im rechten Herzen untersucht, die aber alle keine Reaktivität zeigten. Im Gegensatz dazu konnten MOJE et al. (2001) bei 2 % der von ihnen untersuchten Rinderherzen GFAP nachweisen.

Zusammenfassend kann festgestellt werden, dass bei einer Schlachtung mit einem Bolzenschussapparat, wie sie in Deutschland üblich ist, die Abschwemmung von Hirnmaterial in den Körper in geringem Maße möglich ist. Zu diesem Thema vertritt das Bundesinstitut für Risikobewertung die Ansicht, „dass aus Gründen des vorbeugenden Verbraucherschutzes bei Tieren, die mit dem penetrierenden Bolzenschuss betäubt wurden, der gesamte Kopf sowie Blut, Herz und Lunge zu SRM erklärt werden sollten, da zumindest in den Gefäßabschnitten zwischen Hirn, rechter Herzkammer und Lunge mit dem Vorkommen von ZNS-Fragmenten gerechnet werden muss“ (N.N., 2001b). SCHÜTT-ABRAHAM (2002) empfiehlt, auf alternative Betäubungsverfahren wie die Elektrobetäubung auszuweichen, wenn die genannten Organe trotzdem verwendet werden sollen.

Eine Frage, die den Verbraucher seit dem Auftreten von BSE beschäftigt ist, ob man sich durch den Verzehr von **Rindfleisch** mit der Krankheit infizieren kann. Nach dem gegenwärtigen Stand der Forschung konnten in Rindfleisch bisher keine Infektionstiter nachgewiesen werden. Weder in der Muskulatur von Rindern in der Inkubation, noch in der Muskulatur von Rindern, die an BSE erkrankt waren. Deshalb gilt Rindfleisch zum jetzigen Zeitpunkt als sicher. Die Forschung in diesem Bereich wird jedoch kontinuierlich vorangetrieben. Beispielsweise wird in England seit 1996 ein Langzeitversuch mit Kälbern durchgeführt, bei dem den Tieren homogenisiertes Muskelgewebe von an BSE erkrankten Kühen ins Gehirn appliziert wurde (HÖRNLIMANN et al., 2001b). In anderen Studien wurde bei kleinen Versuchstieren die Skelettmuskulatur auf Scrapie-Prionen hin untersucht. BOSQUE et al. (2002) haben Mäusen zwei verschiedene Stämme von PrP^{Sc} in Form von Hirnhomogenat von Mäusen oder Hamstern intramuskulär (i.m.) und intraperitoneal (i.p.) appliziert und konnten anschließend in der Muskulatur der infizierten Mäuse PrP^{Sc} im Western Blot-Verfahren nachweisen. Dabei zeigte sich, dass Prionen in verschiedenen Muskeln in

Literatur

unterschiedlichem Ausmaß vorkamen. Zu ähnlichen Ergebnissen kamen THOMZIG et al. (2003) in ihrer Studie, bei der Hamster oral mit Scrapie mittels Hamsterhirnhomogenat infiziert wurden. Auch sie konnten zeigen, dass verschiedene Muskeln der infizierten Tiere unterschiedlich stark PrP^{Sc} ausgeprägt hatten. Zum Beispiel waren in der Zunge mehr PrP^{Sc} als in der Skelettmuskulatur zu finden, wobei aber zusätzliche Schwankungen zwischen den verschiedenen Individuen bestanden. Die Ergebnisse dieser Studien können zwar nicht unmittelbar auf Rinder und BSE übertragen werden, sie stellen aber Modelle dar, die verdeutlichen, dass weiter Forschungsbedarf besteht.

Nach derzeitigem Wissensstand birgt reines **Fettgewebe** kein Risiko in Bezug auf BSE. Ein Problem besteht allerdings darin, dass einerseits im Fettgewebe oft Nerven, wie zum Beispiel im Fett des Mesenteriums, eingelagert sind und andererseits früher Fett auch von Schädeln inklusive Gehirn, Wirbelsäulen und dem Rückenmark gewonnen wurde und dadurch das Fett mit pathogenen Prionen kontaminiert werden konnte. Durch die Zuordnung der oben aufgezählten Organe zum SRM sind diese aus der Fettproduktion ausgeschlossen worden. Rinderfett wird unter den Voraussetzungen, dass das Ausgangsmaterial aus BSE-freien Ländern stammt und die Herstellung entweder mit gespanntem Dampf bei + 133°C für 20 Minuten oder mit 1M NaOH bei + 20°C für eine Stunde erfolgt als sicher angesehen (RUFFING et al., 2001; HÖRNLIMANN et al., 2001b; N.N., 1997). Entsprechend wird in den „Leitsätzen für Fleisch und Fleischerzeugnisse“ der Deutschen Lebensmittelbuchkommission Kessel- und Knochenfett nicht für die Verwendung in Fleischerzeugnissen erlaubt (N.N., 2001a). Zugelassen ist laut der Verordnung 999/2001 ausgelassenes Fett vom Rind nur aus tauglichem angelagertem Fettgewebe. Für Speisefette und Speiseöle dürfen entsprechend der zugehörigen Leitsätze nur Nierenfettgewebe und Zerlegefett verwendet werden.

Obwohl in **Rindermilz** bisher noch keine BSE-Infektiosität nachgewiesen wurde (N.N. 2002f), ist Milz, insbesondere Rindermilz entsprechend der Leitsätze für Fleisch und Fleischerzeugnisse für die Verwendung in Fleischerzeugnissen ausgeschlossen, da bei Schafen mit Scrapie die Milz Infektiosität aufweist.

3.1.8.2 Auswirkungen auf den Schlachtablauf

Das Auftreten von BSE führte zu zahlreichen Änderungen im Schlachtablauf, die dazu dienen, eine Verbreitung von möglicherweise vorhandenen PrP^{Sc} zu verhindern und eine Kontaminationsgefahr so gering wie möglich zu halten. So ist seit dem 01.01.2001 die Verwendung eines Rückenmarkszerstörers, der vorher zur Ausschaltung von Spinalreflexen unmittelbar nach der Bolzenschußbetäubung eingesetzt wurde, verboten, da durch seinen Einsatz pathogene Prionen verteilt werden können. Außerdem drückte er Rückenmark aus dem Wirbelkanal heraus und konnte damit umliegendes Fleisch kontaminieren.

Des Weiteren werden Rinder ab einem Alter von 24 Monaten in Kohorten von ungefähr 40 Tieren geschlachtet. Nach jeder Kohorte werden der Schlagbolzen des Bolzenschußapparates, das Messer zum Absetzen des Kopfes, die Sägeblätter oder Sägebänder der Rückenspaltsäge, die Geräte oder Geräteteile zum Entfernen des Rückenmarks und alle sonstigen Geräte oder Geräteteile und Schutzkleidung, wie Schutzhandschuhe, die mit infektiösem Material verunreinigt sein können, gegen entsprechend gereinigte und desinfizierte Gegenstände ausgetauscht (N.N., 2002b). Bei den genannten Gerätschaften handelt es sich um diejenigen, die in erster Linie mit Nervengewebe in Kontakt kommen. Die Einteilung in Kohorten erfolgt aus wirtschaftlichen Gründen. So muss nach Feststellung eines positiven Schnelltests nur eine begrenzte Zahl von Schlachtkörpern, die mit möglicherweise kontaminierten Geräten in Kontakt gekommen sein könnten, unschädlich beseitigt werden.

Obwohl diese Regelung theoretisch einleuchtend ist, bestehen praktisch Mängel, die zum Beispiel die Schutzkleidung betreffen. Nach jeder Kohorte werden zwar die Handschuhe gewechselt, aber beispielsweise die Schürze, die nicht immer eine Einmalschürze ist, und die Stiefel werden nur mit Wasser abgespült, wobei es sich um kein wirksames Mittel zur Inaktivierung von pathogenen Prionen handelt. Als weiteres Beispiel kann die Position angeführt werden, an der das Rückenmark abgesaugt wird und an der es zu einer weitflächigen Kontamination der Umgebung mit ZNS-Gewebe kommt. Durch diese beiden Beispiele soll gezeigt werden, dass der Wechsel der Gerätschaften und Ausrüstungsgegenstände zur Reduktion einer möglichen Verbreitung von Prionen führt, jedoch strenggenommen trotzdem eine Kontamination von Kohorten, die auf eine mit einem BSE-Fall betroffene Kohorte folgen, eintreten kann.

Literatur

Das Absetzen des Kopfes ist ein Arbeitsschritt, der mehrere Risiken birgt, da die benutzten Messer Prionen sowohl auf denselben Tierkörper, als auch auf nachfolgende Tierkörper übertragen könnten. Üblicherweise werden die Rinderköpfe nach der Abtrennung vom Schlachtkörper mit Trinkwasser abgespült. Ein Problem bildet hierbei in das Schuss- und in das Hinterhauptsloch eindringendes Wasser, welches durch Wegspritzen und Aerosolbildung ebenfalls zu einer Verbreitung von möglicherweise vorhandenen PrP^{Sc} führen kann (BANDICK, 2003). Entsprechend empfiehlt das Bundesinstitut für Risikobewertung, diese Kopfwäsche nicht durchzuführen, wenn die Zunge gewonnen werden soll (N.N., 2001b). Nachfolgend werden die Köpfe in das Organförderband eingehängt, wobei das Problem der Kontamination von Leber, Herz und Lunge durch direkten Kontakt auftreten kann und zum anderen durch die gesetzlich vorgegebenen Untersuchungsschnitte der Fleischkontrolleure.

Im Zuge der BSE-Bekämpfung wurden zusätzliche Positionen in den Schlachtablauf integriert. Es handelt sich hierbei zum einen um die Probennahme von Obexmaterial für die Schnelltests und zum anderen um die Entfernung des Rückenmarkes entweder durch Absaugen vor der medianen Spaltung oder durch Ausfräsen nach der Zerteilung. Das Absaugen vor der Zerteilung des Schlachtkörpers wurde erprobt, um eine Verteilung von Nervengewebe auf der Muskulatur während des Sägevorganges, wie sie in mehreren Studien nachgewiesen wurde, zu verhindern. Dabei ist der Erfolg dieses Verfahrens von der Enthäutung abhängig, die erst nach dem Absaugen durchgeführt werden sollte, damit es nicht zu Verengungen im Wirbelkanal durch verschobene Wirbel kommt. Zwar wird durch das Absaugen vor der Zerteilung die Menge an Nervengewebe reduziert und führt damit zu einer Verbesserung der Situation, jedoch stellt dieses Verfahren keine sichere Methode dar, um die Verteilung von Nervengewebe auszuschließen (LÜCKER et al., 2002a; SCHWÄGELE et al., 2002). Deshalb wurden alternative Methoden entwickelt, die eine mediane Längsspaltung des Schlachttierkörpers umgehen sollen. Bei diesen Methoden handelt es sich einmal um die Keilmethode, bei der die Wirbelsäule nach Lösung der Rücken- und Nackenmuskulatur von den Dornfortsätzen keilförmig links und rechts der Wirbelkörper in Höhe des dorsalen Endes der Rippen herausgehackt wird, und um die Sattelmethode, bei der die Rückenmuskulatur beidseits der Dornfortsätze ausgelöst wird und der Schlachttierkörper nicht in zwei Teile getrennt wird. Die weitere Methode ist die Lateralmethode, bei der eine Trennung paramedian

Literatur

der Wirbelsäule durchgeführt wird, was dazu führt, dass die Wirbelsäule an einer Tierkörperhälfte verbleibt (TROEGER et al., 2002). Es zeigte sich schnell, dass diese Verfahren gut in handwerklichen kleineren Betrieben angewendet werden können, aber nicht für große Schlachthöfe geeignet sind. Eine weitere Alternative, die sich möglicherweise für größere Schlachthöfe eignen könnte, wäre die Entfernung der Wirbelsäule mit einem doppelten Sägeblatt als Ganzes (BGVV, 2001).

Am Ende der Schlachtung werden bei Verschmutzungen auf dem Schlachtkörper die betroffenen Stellen weggeschnitten, was als trimmen bezeichnet wird. Manchmal kommt es zu Verschmutzungen auf den halbierten Wirbelknochen, wodurch beim Trimmvorgang pathogene Prionen aus dem Wirbelkanal verteilt werden können. Ebenso, wenn die Schlachthälften mit Wasser abgebraust werden.

Nach der Schlachtung, Kühlung und Fleischreifung werden die Schlachttierkörper zerlegt, wobei es zu einem Anschnitt von Spinalganglien und somit wiederum zu einer Verbreitung von Prionen kommen kann. Mit diesem Problem hat sich die Deutsche Landwirtschafts-Gesellschaft e.V. (DLG) beschäftigt und die übliche Schnittführung mit der Lage der Spinalganglien verglichen. Sie kam zu dem Schluss, dass durch kleine Modifikationen der Schnitte dieses Risiko umgangen werden kann (N.N., 2002g).

Es ist ersichtlich, dass die Krankheit BSE weitreichende Risiken im Verlauf des Schlachtprozesses birgt und da aufgrund der langen Inkubationszeit Rinder geschlachtet werden, bevor eine mögliche Erkrankung Symptome zeigt, sollten, solange es BSE-Fälle in Deutschland gibt, im Schlachtprozess die Sicherheitsanforderungen so hoch wie möglich gesteckt werden. Mögliche Lösungsansätze stellen hierbei die Implementierung der Elektrobetäubung und die räumliche Trennung der abgetrennten Köpfe von den Organen und den Schlachthälften dar.

3.1.9 Auswirkung auf Fleischerzeugnisse

Fleischerzeugnisse sind entsprechend den Leitsätzen für Fleisch und Fleischerzeugnisse Erzeugnisse, die ausschließlich oder überwiegend aus Fleisch bestehen. In manchen sogenannten „speziellen Fleischerzeugnissen“ wurde traditionell Gehirn von Rind und Schwein eingearbeitet, wobei für den Verbraucher anhand der Verkehrsbezeichnung einiger Produkte zu ersehen war, dass sie Gehirn enthielten. Darüber hinaus war es rechtskonform, bis zu 5 % Innereien und somit auch Gehirn in andere Fleischerzeugnisse, vor allem in streichfähige Fleischerzeugnisse, einzumischen, was aus technologischen Gründen praktiziert wurde, wobei dies nicht für den Konsumenten erkennbar war. Neben einer positiven Beeinflussung der Konsistenz sorgte es durch seinen hohen Fettanteil auch für einen guten Geschmack.

Da Gehirn von BSE-Kühen den wichtigsten Überträger der pathogenen Prionen darstellt, gilt Rindergehirn als Spezifiziertes Risikomaterial (SRM) und muss entsorgt werden. Seit 2001 wird in den Leitsätzen Hirn als Tierkörperpartie aufgeführt, das nicht in Fleischerzeugnissen verarbeitet werden darf (LS.-Nr. 1.61), wobei nicht zwischen Tierarten differenziert wird. Dies führte dazu, dass weder Rinder- noch Schweinehirn verwendet werden darf. Bei den Leitsätzen handelt es sich zwar nicht um eine rechtsverbindliche Vorgabe, sie fixieren aber die allgemeine Verkehrsauffassung, die von den Herstellern umgesetzt wird.

Entsprechend diesem freiwilligen Verzicht, Gehirn in Fleischerzeugnissen einzuarbeiten, sind auch die **speziellen Fleischerzeugnisse**, die Hirn enthalten, seit 2001 aus den Leitsätzen gestrichen worden. Es handelt sich dabei um:

Bregenwurst LS.-Nr. 2.212.2

Hirnwurst LS.-Nr. 2.222.6

Hannoversche Bregenwurst LS.-Nr. 2.2313.6.

Gehirn - früher auch Bregen oder Brägen genannt - wurde neben seiner Verwendung in Fleischerzeugnissen auch als Spezialität gebraten, gratiniert (N.N., 1980) oder in Form von Suppe (KRAMER, 1983) verzehrt. Bei den genannten drei Zubereitungsmöglichkeiten wurden laut Rezept Kalbsgehirne verwendet, während in einem weiteren Rezept für eine selbstgemachte „Hausmacher Bregenwurst“ 15 %

Literatur

Schweinegehirn zugefügt wurden (SCHMIDT, 1996). Eine noch vielseitigere Verwendung hatte Gehirn zu Beginn des 20. Jahrhunderts, wie von OSTERTAG (1932) ohne Festlegung der Tierart dokumentiert wurde. Damals wurde Gehirn aufgrund eines niedrigen Kohlehydrat-, aber hohen Fett- und Eiweißgehaltes zur Ernährung bei Diabetes mellitus empfohlen und Hirnextrakt zur Blutstillung genutzt. Außerdem wird erwähnt, dass in Thüringen Gehirnwürste mit Gehirn und Ei hergestellt wurden, einer anderen Rezeptur, als die Hirnwurst, die in den Leitsätzen aufgeführt war. An dieser Stelle gibt es auch einen Hinweis darauf, dass Gehirn auch in **Leberwürsten** verarbeitet wurde. So wurden beispielsweise in Württemberg Hirnleberwürste hergestellt (OSTERTAG, 1932). Da in späteren gefundenen Quellen die Bezeichnung „Hirn“ nicht mehr in den Verkehrsbezeichnungen von Leberwürsten aufgeführt wird, handelt es sich dort um eine versteckte Beimengung. Laut BENTHLIN (1940) durfte eine Delikatessleberwurst höchstens 10 %, eine Leberwurst „1.Qualität“ höchstens 5 % und eine Leberwurst „2.Qualität“ kein Bregen enthalten. Auch hier fand keine Festlegung auf Rinder- oder Schweinegehirn statt. In einer späteren Quelle von 1974 (N.N., 1974) wird erwähnt, dass Hirn zu einfachen Leberwürsten zugefügt werden kann. Gegenwärtig werden Leberwürste entsprechend ihrem Lebergehalt in die Kategorien Spitzenqualität, mittlere Qualität und einfache Qualität eingeteilt, wobei eine Leberwurst der Spitzenqualität abgesehen von Leber keine anderen Innereien enthalten darf. In Leberwürsten von mittlerer oder einfacher Qualität können auch „andere Innereien“ mit verarbeitet sein, die in den Erläuterungen zu den einzelnen Verkehrsbezeichnungen in den Leitsätzen nicht näher bezeichnet werden. Entsprechend der Leitsatznummer 1.5 bedeutet dies, dass bis zur Leitsatzänderung 2001 auch Hirn eingesetzt werden konnte. Ebenso wie beim Verbot von Hirn wurde auch bei der Nennung von Hirn für spezielle Fleischerzeugnisse bis 2001 keine Tierart angegeben, jedoch werden wahrscheinlich aus praktischen Gründen vor allem Schweinegehirne verwendet worden sein, da diese leichter zugänglich sind als die Gehirne adulter Rinder.

Ob und in welchem Ausmaß ZNS zu **handelsüblichen Fleischerzeugnissen** zugefügt wurde, wurde von LÜCKER et al. (1999a) und HORLACHER et al. (2001) untersucht. Dabei konnte noch 1999 in 9,4 % der untersuchten Leberwürste und in 14,5 % der untersuchten Kochmettwürste ZNS nachgewiesen werden. Hingegen wurde laut HORLACHER et al. (2001) in keiner der untersuchten Kochwürste in den

Literatur

Jahren 2000 und 2001 zentralnervöses Gewebe gefunden. Daraus schließen sie, dass auf die bewusste Verwendung von Gehirn bei der Herstellung verzichtet wird. Weitere Fleischerzeugnisse, denen Rindergehirn zugesetzt wurde, sind **Hamburger**, die als Ursache für die englischen vCJD-Fälle gesehen werden, da bis 1989 ein Rindergehirnhomogenisat zur besseren Bindung zu brüh- und kochwurstartigen Erzeugnissen und zu Hamburgern zugegeben wurde (VERDRAGER, 1996; DEALLER et al., 1990).

Literatur

Von Bedeutung für dieses Thema ist auch das Kapitel „Spezielle Fleischteilstücke und spezielle Fleischgerichte“ der Leitsätze unter welches das inzwischen verbotene **T-Bone-Steak** fällt, welches aus einer Scheibe der inneren und äußeren Lendenmuskulatur des Rindes besteht und immer auch anhaftende Wirbelsäule enthält. Dazu zeigt die folgende **Abbildung 1** der Deutschen Landwirtschafts-Gesellschaft e. V. anschaulich die Topographie der Ganglien, die zwischen dieser Muskulatur und der Wirbelsäule liegen und beim Zuschneiden von T-Bone-Steaks automatisch an den Verbraucher gelangen würden.

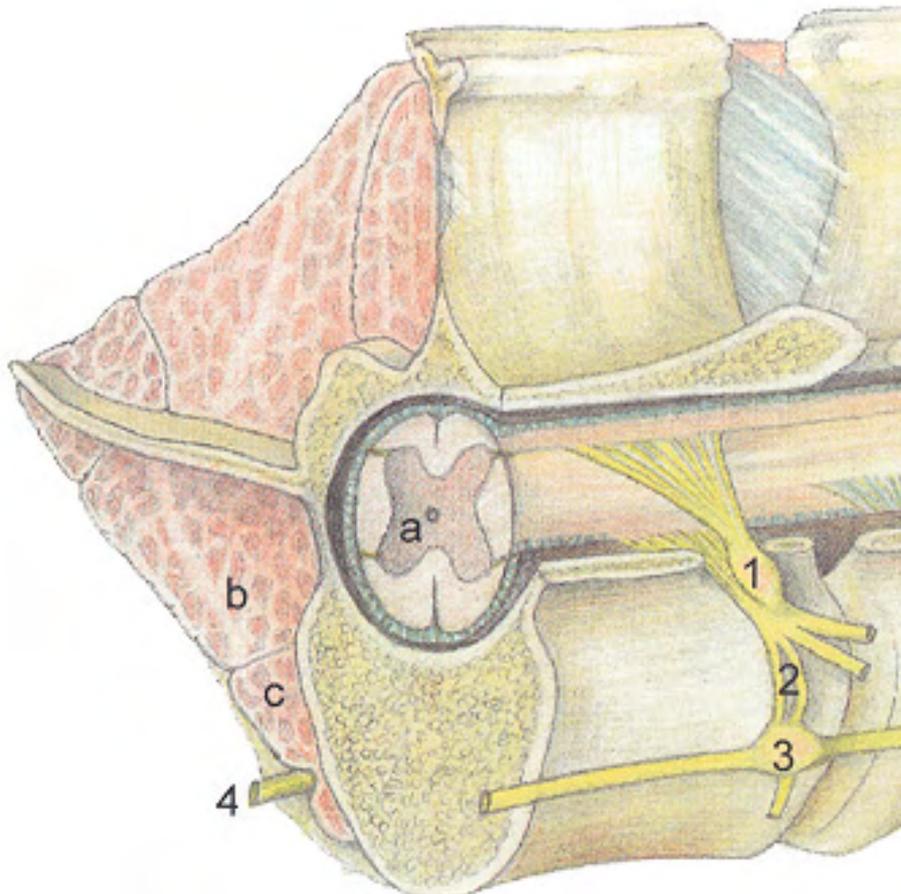


Abbildung 1: Topographie des Lendenbereichs (N.N., 2002g)

- 1** Ganglion spinale
- 2** Rami communicantes albi et grisei
- 3** Ganglion trunci sympathici
- 4** Truncus sympathicus
- a** Rückenmark
- b** Musculus psoas major (Großer Lendenmuskel)
- c** Musculus psoas minor (Kleiner Lendenmuskel)

Literatur

HILDEBRANDT et al. (2001) berichten von **Lebensmitteln**, die nicht näher bezeichnet werden, denen Fettfraktionen aus Rindergehirn zugesetzt wurden. Möglich wurde dies, indem manche Betriebe Rinderschädel aufkauften, das ZNS herauslösten und an Fettschmelzen abgaben. In diesem Zusammenhang fügen HILDEBRANDT et al. (2001) hinzu, dass bei lebensmitteltauglichen Schlachtresten und Knochen nach § 6.2 des Tierkörperbeseitigungsgesetzes auch eine Untersterilisation durchgeführt werden konnte.

3.1.10 Nachweis von Nervengewebe in Fleischerzeugnissen

Wie aus dem vorigen Kapitel ersichtlich ist, war es bis vor wenigen Jahren üblich, zentrales Nervengewebe von Rind oder Schwein für die Herstellung von Fleischerzeugnissen einzusetzen. Um nach dem Auftreten von BSE den Verbraucher vor bovinem Nervengewebe zu schützen, welches nun Spezifiziertes Risikomaterial darstellt, wurden umfangreiche Forschungsarbeiten durchgeführt. Daraus resultierten drei Testkits mit denen der Nachweis von Nervengewebe in Fleischerzeugnissen gelang. Im Rahmen der verschiedenen Forschungstätigkeiten wurde auch versucht, Fragestellungen bezüglich einer Bestimmung der Tierart anhand von Nervengewebe in Fleischerzeugnissen, einer Differenzierung von zentralem und peripherem Nervengewebe und eine Zuordnung zu Altersgruppen zu lösen.

Fleischerzeugnisse stellen als Probenmaterial eine besondere Herausforderung dar, da manche im Produktionsvorgang in der Regel auf + 75°C oder auch bis zu + 100°C erhitzt werden, stark zerkleinert und einigen auch technologische Hilfsstoffe zugesetzt werden. Dabei handelt es sich beispielsweise um Nitritpökelsalz, Ascorbinsäure und Kutterhilfsmittel auf Phosphatbasis. Für einen Nachweis von Nervengewebe auf der Basis von Proteinen bedeutet dies, dass durch diese Herstellungsschritte ein Nachweis erschwert werden kann bzw. ein Marker zerstört wird und dadurch nicht mehr detektierbar ist.

Für den Nachweis von Nervengewebe in Fleischerzeugnissen sind zwei Proteine von Bedeutung. Das **saure Gliafaserprotein** (GFAP) kommt in Astrozyten vor, woraus zunächst geschlossen wurde, dass es sich um ein ZNS-spezifisches Protein handelt. Inzwischen konnte aber auch Kreuzreaktivität im peripheren Nervensystem nachgewiesen werden, wenn auch in geringerem Ausmaß als im ZNS. Weiterhin ist

Literatur

der Gehalt an GFAP im Rückenmark um den Faktor 4 bis 5 höher als im Gehirn (KELLEY et al., 2000; SCHMIDT et al., 1999). Eine Temperatur von + 80°C, wie sie in der Herstellung von Fleischerzeugnissen sehr häufig ist, beeinflusst den Nachweis von GFAP nicht negativ, auch wenn das Erzeugnis 60 Minuten dieser Temperatur ausgesetzt wird. Darüber, in welchem Ausmaß höhere Temperaturen den Nachweis beeinträchtigen, gibt es unterschiedliche Angaben. Während SCHMIDT et al. (2001) nach einer Behandlung mit + 115°C für 100 Minuten kein GFAP mehr nachweisen konnten, war es NAGEL et al. (2002) möglich einen Zusatz von 0,5 % Gehirn in Vollkonserven mit einer Erhitzung auf mehr als + 100°C, aber maximal + 121°C, für mindestens 50 Minuten zu detektieren. Allerdings wurde dabei festgestellt, dass nach dieser Behandlung gegenüber einer Erhitzung auf + 80 bis + 100°C 70 % weniger GFAP nachweisbar war.

Weiterhin konnte am GFAP gezeigt werden, dass die Zugabe von Gewürzen den ZNS-Nachweis behindert (SCHMIDT et al., 2001).

Die **neuronenspezifische Enolase** (NSE) ist in Zellen des Nervensystems und in neuroendokrinen Zellen vorhanden (TAPIA et al., 1980; SCHMECHEL et al., 1978). Sie ist somit nicht ZNS-spezifisch, kommt im peripheren Nervensystem aber in 20-200fach geringerer Konzentration vor als im ZNS (N.N., 2001c). Der Nachweis der NSE in Fleischerzeugnissen ist temperaturabhängig, vor allem bei höheren Temperaturen ist kein Nachweis mehr möglich. LÜCKER et al. (2000) konnten nach einer Erhitzung auf + 100°C für 120 Minuten keine NSE-Immunoreaktivität mehr nachweisen, ebenso wie NAGEL et al. (2002), die ihre Untersuchungen an Vollkonserven mit einer Kerntemperatur von mehr als + 100°C, aber maximal + 121°C für mindestens 50 Minuten durchführten.

Die Studien an GFAP und NSE führten zur Entwicklung der folgenden drei Testkits:

3.1.10.1 Testkits

Der **RIDASCREEN® Risk Material 10/5** der Firma R-Biopharm weist GFAP semiquantitativ in und auf rohen Fleisch- und Wurstwaren sowie auf kontaminierten Oberflächen nach. Es handelt sich hierbei um einen **Sandwich-Enzymimmunoassay**, dessen Nachweisgrenze bei 0,1 % ZNS-Gewebe liegt. Der Testkit kann für die Untersuchung auf Nervengewebe von Rind, Kalb, Schaf, Ziege, Pferd, Geflügel und Schwein verwendet werden, eine Differenzierung findet nicht statt (N.N., 2002e).

Der **RIDASCREEN® Risk Material** ist im Gegensatz zum erstgenannten Testkit für die Anwendung bei Fleisch und Fleischerzeugnissen geeignet und ermöglicht einen Nachweis in prozessierten und erhitzten Fleischerzeugnissen. Dieser Test beruht auf einem semiquantitativen **Sandwich-Enzymimmunoassay** mit einer Nachweisgrenze von 0,2 % ZNS-Gewebe. Wie beim obigen Testkit erfolgt keine Differenzierung der Spezies (N.N., 2001d).

Der **ScheBo® Brainostic™ Test** basiert auf dem semiquantitativen Nachweis von NSE in Fleischerzeugnissen, die laut Gebrauchsanweisung auch erhitzt sein können und verwendet als Testprinzip das **Western Blot** Verfahren. Die Nachweisgrenze liegt bei 0,25 % ZNS-Gewebe, und es findet keine Unterscheidung nach Tierarten statt.

Dieser Testkit ist nicht mehr erhältlich (N.N., 2001c).

Falschpositive Befunde:

HORLACHER et al. (2001) untersuchten 220 Feldproben auf GFAP und NSE im Western Blot Verfahren. Es kam bei 37 Proben zu positiven NSE-Befunden, die nicht mit GFAP bestätigt werden konnten. Bei 46 der 220 Proben handelte es sich um Putenfleischprodukte, bei denen der Anteil der falschpositiven Ergebnisse bei 50 % lag. Auch bei den Schweinefleischprodukten, die mit 104 Proben vertreten waren, traten 13,5 % falschpositive Ergebnisse auf.

Ebenso stellten BERG et. al. (2002) in ihren Untersuchungen, die ebenfalls mit dem Western Blot Verfahren durchgeführt wurden, falschpositive NSE-Ergebnisse bei rohem Geflügelfleisch fest.

Literatur

Diese falschpositiven NSE-Ergebnisse wurden in einer weiteren Studie von HORLACHER et al. (2002b) bestätigt, wobei unter Verwendung des RIDASCREEN® Risk Material Tests und des Western Blot Verfahrens diesmal 40 % falschpositive Ergebnisse bei Erzeugnissen aus Geflügelfleisch und 25 % bei Produkten aus Schweinefleisch auftraten.

Vergleich des RIDASCREEN® Risk Material 10/5 Tests mit dem ScheBo® Brainostic™ Tests:

HAJMEER et al. (2003) untersuchten in einer Studie rohe homogenisierte Fleischproben, denen verschiedene Gehalte an Rückenmark zugegeben worden waren, mit dem RIDASCREEN® Risk Material 10/5 Test und mit dem ScheBo® Brainostic™ Test mit dem Ziel die Stärken und Schwächen beider Testkits zu ermitteln. Der **ScheBo® Brainostic™ Test** erbrachte wiederholt zuverlässig gleich bleibende Resultate und die vom Hersteller angegebene Nachweisgrenze konnte bestätigt werden. Allerdings ist die Durchführung dieses Testes sehr zeitaufwendig, da allein der Test, ohne Probenvorbereitung, 11 Stunden in Anspruch nimmt. Abgesehen davon ist dieses Testkit teurer, als der **RIDASCREEN® Risk Material 10/5 Test**, der gut geeignet ist, um eine qualitative Aussage über einen möglichen ZNS-Zusatz zu treffen. Allerdings kann eine semiquantitative Bestimmung nicht sicher erfolgen, da der Gehalt an GFAP im Rückenmark 4- bis 5-mal höher ist, als im Gehirn. Da im Testkit die GFAP-Konzentration der Positivkontrollen auf einer Kombination der Gehalte von Rückenmark und Gehirn basieren, kommt es bei alleiniger Verwendung von nur Gehirn oder nur Rückenmark in den Proben zu einer Abweichung der Extinktionen gegenüber den Positivkontrollen. Genauso wie beim vorigen Testkit konnte die Nachweisgrenze des RIDASCREEN® Risk Material 10/5 Tests bestätigt werden, die mit 0,1% ZNS-Gehalt weit unter der des ScheBo® Brainostic™ Tests liegt. Der RIDASCREEN® Risk Material 10/5 Tests ist demzufolge weitaus sensitiver und es wird darüber hinaus deutlich weniger Zeit für seine Durchführung benötigt, da 30 Proben in ca. zwei Stunden analysiert werden können.

3.1.10.2 Studien zum Nachweis von Nervengewebe in Fleischerzeugnissen

Einen Überblick über die verwendeten Marker und die auf sie angewandten Analyseverfahren findet sich in **Tabelle 3**.

In ersten Untersuchungen zum Nachweis von ZNS-Gewebe in Fleischerzeugnissen wurde **Cholesterol**, welches in hoher Konzentration im ZNS vorkommt, als Marker verwendet und mit Hilfe eines **enzymatischen Verfahrens** entsprechend der Amtlichen Sammlung von Untersuchungsverfahren nach § 35 LMBG zur Bestimmung des Cholesteringehaltes in Eiern und Eiprodukten nachgewiesen. Dieses Verfahren beruht auf der Oxidation der 3- β -Hydroxigruppe des Cholesterols zum Δ^4 -Cholesten-3-on durch die Cholesterin-Oxidase. Allerdings tritt Cholesterol im Körper ubiquitär auf, und besonders die Zugabe von Eigelb und Leber, die ebenfalls hohe Gehalte an Cholesterol aufweisen, führt dazu, dass bei einem hohen Wert nicht ausschließlich auf einen Zusatz von Nervengewebe zu Fleischerzeugnissen geschlossen werden kann. (LÜCKER et al., 1997 und 2001). NITSCH et al. (2001) schließen aus eigenen Untersuchungen, dass in Fleischerzeugnissen Rückenmarksgehalte ab 1 % und Hirngewebsgehalte erst ab 5 % sicher nachweisbar sind, und dass für geringere Gehalte eine zehnmalige Wiederholung der Tests und eine statistische Auswertung erfolgen muss.

Schon früh konnte LINKE (1959) einen **histologischen Nachweis** von 5 % Gehirn in Brühwürsten mit der Calleja-Färbung, einem für die Wursthistologie gängigen Verfahren, erbringen, wobei aber nur eine beschränkte Differenzierung einzelner Bestandteile möglich war. Es wurde hervorgehoben, dass eine Verarbeitung von ZNS-Gewebe in Brühwurst im histologischen Schnittbild möglich ist, da Gewebskomponenten sich durch Farbe, polymorphen Kerngehalt, Pia-Überreste und Gefäßscheiden von übrigen Bestandteilen abheben.

Diese Beobachtungen konnten von WENISCH et al. (2000) nicht bestätigt werden, wobei sie neben der Färbung nach Calleja auch neurohistologische Routinefärbungen, wie zum Beispiel die Nissl-Färbung, anwandten.

Eine Ursache für die unterschiedlichen Ergebnissen von LINKE und WENISCH könnte möglicherweise in einer Weiterentwicklung der Herstellungstechnologie von

Literatur

Fleischerzeugnissen liegen, die eventuell zu einem höheren Grad an Homogenität des Brätes geführt hat.

Weiterhin untersuchten WENISCH et al. (2000) die Nachweismöglichkeit von Nervengewebe mit monoklonalen Antikörpern gegen **GFAP** und **NSE** mittels **Immunhistochemie**. Es zeigte sich, dass mit Hilfe des Markers NSE Nervengewebe in Brühwurst detektiert werden kann und dass darüber hinaus die Färbesignale mit der Menge an zugesetztem ZNS korrelieren. Dies bedeutet, dass eine ungefähre Mengenabschätzung des zugegebenen Nervengewebes erfolgen kann. Im Gegensatz zum NSE traten in den entsprechenden Untersuchungen auf GFAP hin falschpositive Ergebnisse auf, die GFAP als für dieses Verfahren nicht geeignet erscheinen ließen.

Der Begriff **Integriertes Nachweisverfahren** (INV) fasst die Nachweisverfahren mit den beiden Markern Cholesterin und NSE zusammen, die an der Tierärztlichen Fakultät in Gießen entwickelt wurden. Die Untersuchung auf Cholesterin mittels enzymatischem Verfahren soll als Screening-Methode dienen, der eine immunhistochemische Untersuchung oder eine Analyse mit dem Western Blot Verfahren zum Nachweis von NSE folgt (Lücker et al., 1999b).

KELLEY et al. (2000) untersuchten Separatorenfleisch mit **histologischen** und **immunhistochemischen Verfahren** auf das Vorhandensein von Rückenmark. Unter Anwendung der Hämatoxylin-Eosin Färbung konnte nur in Proben, die den Weichseparator noch nicht durchlaufen hatten Rückenmark detektiert werden, wohingegen in Proben, die nach dem Weichseparator gewonnen wurden, der Zerkleinerungsgrad zu hoch war, um histologisch Rückenmark nachweisen zu können. Daraufhin wurden diese Proben einem immunhistochemischen Verfahren unterzogen, in welchem **GFAP**, **Neurofilament**, welches wie GFAP zu den Intermediärfilamenten von Nervenzellen zählt, und **Synaptophysin**, welches in präsynaptischen Vesikeln in der grauen Substanz des ZNS, aber nicht im peripheren Nervensystem auftritt, nachgewiesen werden sollten. Aufgrund der Ergebnisse konnten KELLEY et al. (2000) zeigen, dass in manuell gewonnenem Knochenputz nur periphere Nerven auftraten, während im maschinell produzierten Separatorenfleisch Rückenmark nachweisbar war.

Literatur

Ebenfalls **immunhistochemische** Untersuchungen wurden von TERSTEEG et al. (2002) an Rinder- und Schweinegehirn, an Brät und an Brühwürsten durchgeführt, denen ZNS zugesetzt und die einer Erhitzung für 60 Minuten auf eine Kerntemperatur von + 70°C und + 115°C unterzogen worden waren. Verwendet wurden Antikörper gegen **Neurofilament**, **NSE**, **GFAP** und **Myelin Basic Protein (MBP)**. Neurofilament konnte im Gehirn beider Tierarten bei allen Temperaturen und im Brät detektiert werden, wohingegen in auf + 70°C erhitzter Brühwurst nur höhere ZNS-Gehalte und in auf + 115°C Brühwurst überhaupt kein ZNS mehr nachgewiesen wurde. NSE erbrachte nur bei den rohen Proben eine Reaktion. Der Antikörper gegen GFAP erbrachte bei den rohen und erhitzten ZNS-Proben beider Tierarten und bei den Brätproben positive Reaktionen. In Brühwurstproben trat keine Reaktion auf.

Von allen untersuchten Markern erwies sich MBP als am Geeignetsten für den Nachweis in Fleischerzeugnissen, da bei allen Proben, abgesehen von den Kontrollproben, positive Reaktionen auftraten. Eine Differenzierung nach Tierarten war in diesem Versuchsansatz nicht möglich, da ein polyclonaler Antikörper Verwendung fand.

Eine weitere Studie von AUPPERLE et al. (2002) beschäftigt sich ebenfalls mit dem Nachweis der Marker **NSE**, **GFAP**, **Neurofilament**, **MBP** und zusätzlich **Peripherin**, einem Intermediärfilament der peripheren Nerven und enteralen Ganglien. Wie in der vorigen Untersuchung wurde **immunhistochemisch** gearbeitet und darüber hinaus für die Marker Neurofilament, MBP und Peripherin ein **Western Blot** Verfahren durchgeführt, wobei als Probenmaterial neben Brät und Brühwurst, die für 20 Minuten auf + 80°C oder + 120°C erhitzt wurden, auch natives formalinfixiertes Gehirn und Nerven dienten. Im Western Blot Verfahren konnte bei keinem der drei Marker eine Reaktion erzielt werden.

Im immunhistologischen Verfahren konnte am formalinfixierten Nervengewebe gezeigt werden, dass Peripherin in peripheren Nerven zu einer Reaktion führte, aber nicht im ZNS und auch in den Wurstproben trat keine Reaktion auf.

GFAP war sowohl im ZNS, als auch im PNS nachweisbar, aber wiederum nicht in den Brühwurstproben. NSE war im ZNS und PNS zu detektieren, jedoch in Wurstproben konnte in Proben mit ZNS-Zusatz nur eine Hintergrundreaktion ermittelt

Literatur

werden, die auch in Kontrollproben ohne ZNS-Beimengung auftrat. Neurofilament konnte im ZNS, im PNS und in den Brühwurstproben dargestellt werden. MBP war im ZNS deutlich und im PNS schwach nachweisbar, wobei zusätzlich festzustellen war, dass der Antikörper zwar mit Wiederkäuernervengewebe reagiert, aber nicht mit porcinem Nervengewebe. In Wurstproben sowohl mit als auch ohne Zugabe von Nervengewebe trat nur eine positive Reaktion der „amorphen Grundmasse“ auf. Zusammenfassend kann festgestellt werden, dass sich in dieser Untersuchung Neurofilament als geeignet für den Nachweis in Fleischerzeugnissen herausgestellt hat. AUPPERLE et al. (2002) kommen damit zu einem anderen Ergebnis als TERSTEEG et al. (2002), bei denen sich MBP als geeignet erwiesen hat. Unterschiedliche Ergebnisse in den verschiedenen Studien sind darauf zurückzuführen, dass die Probenherstellung differiert, dass die verwendeten Untersuchungsverfahren nicht immer ganz identisch sind und dass für dieselben Marker unterschiedliche Antikörper verwendet werden.

Eine Möglichkeit für eine spezifische Detektion von ZNS-Gewebe, im Gegensatz zu peripherem Nervengewebe, ist durch das Proteolipid **Lipophilin** gegeben. Lipophilin kommt im Myelin vor, ist hochgradig spezifisch für Gehirn und Rückenmark und ist stark konserviert, deshalb weist es geringe Speziesunterschiede auf. Es ist nicht wasserlöslich, weshalb das Extraktionsverfahren etwas aufwendiger ist. Im gewählten Untersuchungsverfahren **Western Blot** konnte das Protein bisher an Fleischerzeugnissen, die bis zu einer Temperatur von + 95°C für 180 Minuten erhitzt worden waren mit einer Nachweisgrenze von 0,03 % ZNS-Gewebe nachgewiesen werden (SANDMEIER et al., 2003).

In einer anderen Studie zeigten LÜCKER et al. (2002b), dass der Bio-Rad Platelia-Test, der für die Untersuchung von Obexmaterial etabliert wurde, auch auf Fleischerzeugnisse angewendet werden kann und dass er geeignet ist, um in Brühwurst, die mit BSE-positivem Rindergehirn versetzt worden ist, **PrP^{Sc}** nachzuweisen. Dabei besteht eine Korrelation zwischen der Menge an zugegebenem infiziertem Gehirn und der mit dem Testkit nachgewiesenen Immunoreaktivität. Im Rahmen dieser Studie wurde auch ein immunhistochemischer Nachweis von PrP^{Sc} in Brühwurst versucht, der sich jedoch als nicht geeignet erwies.

3.1.10.3 Speziesspezifischer Nachweis von Nervengewebe in Fleisch-erzeugnissen

Nachdem im Jahr 2000 noch keine Ergebnisse über einen tierartspezifischen Nachweis von Nervengewebe vorlagen, wurden mittlerweile verschiedene Ansätze zur Problemlösung veröffentlicht.

Ein Lösungsansatz wurde von NIEDERER et al. (2001) und LÜCKER et al. (2002c) vorgelegt und basiert auf dem Nachweis von **Fettsäuremethylestern (FAME)** mit der **Gaschromatographie-Massenspektroskopie (GC-MS)**. Dieses Verfahren bietet Möglichkeiten in Bezug auf einen ZNS-Nachweis in Fleischerzeugnissen, zusätzlich eine Bestimmung der Tierart dessen ZNS-Material zugesetzt wurde und darüber hinaus eine Zuordnung des ZNS-Materials zu Altersgruppen. Ausgangspunkt ist das Mengenverhältnis, in dem verschiedene Fettsäuren wie die Docosahexaensäure, die Lignocerinsäure, die cis-/trans-Nervonsäure und die Cerebronsäure, die Membranbestandteile von Nervenzellen sind, zueinander auftreten. Nach einer Extraktion der Gesamtlipide aus Probenmaterial folgt eine Aufreinigung der genannten Fettsäuren durch eine Festphasenextraktion, an die sich eine Umesterung der Fettsäuren zu den Fettsäuremethylestern (FAME) anschließt. Die FAME schließlich können per GC-MS aufgetrennt, identifiziert und quantifiziert werden.

Die Docosahexaensäure tritt außer im ZNS auch in Fischölen und Algen auf. Trans-Nervonsäure ist Bestandteil von pflanzlichen Sphingolipiden und ist abgesehen davon zusammen mit der Cerebronsäure spezifisch für Nervengewebe, wobei letztere in größerer Menge vorhanden ist als die trans-Nervonsäure. Die FAME der cis-Nervonsäure und Lignocerinsäure treten in ZNS-freiem Material in merklichen Mengen auf, weshalb sie nicht allein als ZNS-Marker verwendet werden können.

Nachdem in den Untersuchungen von NIEDERER et al. (2001) und LÜCKER et al. (2002c) die Gehalte dieser Fettsäuren als FAME in den Gehirnen von Rind, Kalb, Schwein, Schaf und Pute bestimmt worden waren, konnte festgestellt werden, dass das Verhältnis von cis- zu trans-Nervonsäure in Gehirnen für die verschiedenen Spezies spezifisch ist. In daraufhin untersuchten Standardbrühwürsten konnte anhand dessen die **Tierart** des zugesetzten ZNS-Gewebes bestimmt werden. Für die Differenzierung zwischen Kalb und Schaf oder Schwein und Pute wurde zusätzlich der Gehalt an Lignocerinsäure benötigt.

Literatur

Bezüglich einer **Altersbestimmung** stellte sich ebenfalls das Verhältnis der cis- zur trans-Nervonsäure als geeignet heraus, da dieses mit zunehmendem Alter bei allen Tierarten zunimmt. Teilweise werden auch hier zusätzliche FAME-Gehalte benötigt. Obwohl diese Untersuchungen in Standardproben zu den genannten Resultaten führten, wird bezweifelt, dass dieselbe Zuverlässigkeit bei Feldproben erzielt werden kann, da:

- FAME im ZNS heterogen verteilt sind,
- FAME teilweise nicht ZNS-spezifisch sind,
- Gemische von ZNS verschiedener Tierarten und Altersgruppen verarbeitet sein können.

Die **Nachweisgrenze** für ZNS adulter Rinder ermittelt anhand der Cerebronsäure betrug 0,2 % (LÜCKER et al., 2002c).

Zum Zweck eines speziesspezifischen Nachweises führten SEYBOLDT et al. (2003) eine Reverse Transkription-Polymerase Kettenreaktion (**RT-PCR**) mit anschließender Untersuchung des Restriktionsfragmentlängenpolymorphismus (RFLP) des **GFAP** durch. Dabei war ein Nachweis von boviner GFAP-m-RNA bei einem ZNS-Zusatz von 0,5 % in erhitzten Fleischerzeugnissen nach 35 Tagen Lagerdauer noch möglich. Es zeigte sich weiterhin, dass in unbehandelter Muskulatur m-RNA von GFAP nachweisbar ist, was vermutlich auf peripheres Nervengewebe zurückzuführen ist, dass jedoch in hitzebehandelten Fleischerzeugnissen diese m-RNA nicht mehr detektierbar ist. Als mögliche Ursache hierfür wird das Auftreten der m-RNA von GFAP in zwei verschiedenen Isoformen, die eine im ZNS und die andere im PNS, gesehen.

SCHÖNENBRÜCHER et al. (2003a) wiesen bovine **GFAP-m-RNA** mittels **RT-PCR** bis zu einer Nachweisgrenze von 0,01% in Fleischerzeugnissen nach. In einem zweiten Versuch wurde porcine GFAP-m-RNA mit einem **Sybr®- Green-Real Time-PCR-Verfahren** in prozessierten Lebensmitteln detektiert (SCHÖNENBRÜCHER et al., 2003b)

LANGE et al. (2002) konnten in ihren Untersuchungen belegen, dass die **m-RNA** von **GFAP** im Gehirn verschiedener Tierarten wie Rind, kleiner Wiederkäuer, Schwein

Literatur

und Huhn vorkommt und spezifisch für Nervengewebe ist. Im Gegensatz dazu konnte die ebenfalls nervengewebespezifische m-RNA von **MBP** nur in Gehirnen von Wiederkäuern, aber nicht vom Schwein detektiert werden.

HERDE et al. (2003) untersuchten bovines, ovines und porcines Rückenmark und Fleischerzeugnisse mit 0 %, 8 % und 20 % Zusatz von Rindergehirn. Angewendete Verfahren waren **Immunhistochemie** und **Western Blot** mittels monoklonaler Antikörper gegen **GFAP**, **MBP** und **Oligodendrocyte Specific Protein (OSP)**. Die verwendeten Antikörper gegen GFAP und MBP reagierten mit den entsprechenden bovinen Proteinen, aber nicht mit denen vom Schwein. Der Nachweis von OSP gelang nicht.

SCHNEIDER et al. (2003) etablieren zurzeit einen **Sandwich-ELISA** zum Nachweis von GFAP mittels eines Antikörpers, der spezifisch bovines **GFAP** detektiert. Bisher wurden die Vorversuche veröffentlicht.

Tabelle 3: Für die verschiedenen Marker durchgeführte Verfahren

Marker	Verfahren									
	GC-MS	enzymatisches Verfahren	Immunhistochemie	Western Blot	ELISA	PCR	Histologie	Bio-Rad Platelia		
Cerebronsäure	X									
Cholesterol		X								
Docosahexaensäure	X									
Lignocerinsäure	X									
Lipophilin				X						
GFAP			X	X	X	X				
MBP			X	X		X				
Nervonsäure	X									
Neurofilament			X	X						
NSE			X	X						
OSP			X	X						
Peripherin			X	X						
PrP ^{Sc}			X						X	
Synaptophysin			X							

3.1.11 Proteinsuche

Zunächst wurde auf der Proteinebene nach einem Marker gesucht, von dessen Eigenschaften das spätere Untersuchungsverfahren abhängig ist.

Ein Marker, der für die Fragestellung dieser Studie geeignet ist, sollte folgendermaßen charakterisiert sein:

- spezifisch für Nervengewebe, eventuell sogar spezifisch für ZNS gegenüber dem PNS
- Aminosäuresequenz oder Nucleotidsequenz sowohl beim Rind, als auch beim Schwein bekannt
- Sequenzunterschiede zwischen den Markern von Rind und Schwein, die eine Differenzierung der Spezies ermöglichen
- unempfindlich gegenüber Hitze, Chemikalien und mechanische Denaturierung.

Mit Hilfe der Datenbanken des National Center for Biotechnology Information (NCBI), Bethesda, USA, die durch das Programm „Entrez“ zugänglich sind, wurden zwei Listen erstellt, die gehirnspezifische Proteine auflisten sollten. Es zeigte sich schnell, dass die aufgeführten Proteine zwar im Nervengewebe auftreten, aber häufig nicht spezifisch dafür sind. Neben dem Nervengewebe sind sie auch in anderen Geweben vorhanden, was teilweise schon am Entrez-Eintrag ersichtlich war, sich jedoch häufig erst in einer anschließenden Literaturrecherche herausstellte.

Im Anhang in **Tabelle 6** sind die Proteine aufgelistet, die bis zum Auffinden eines geeigneten Markers auf ihre Verwendbarkeit hin recherchiert wurden und sich als nicht nutzbar für die Zielsetzung dieser Studie erwiesen. Nicht in allen Fällen kann dieses Urteil als endgültig gelten, da viele Proteine noch nicht vollständig erforscht sind und zum Beispiel die Sequenz beim Rind bekannt ist, aber nicht beim Schwein. Dies ist zusammen mit der Tatsache, dass viele aufgeführte Proteine nicht spezifisch für Nervengewebe sind, die wichtigste Ursache, dass die Proteine nicht für diese Studie herangezogen werden konnten.

Im Verlauf der Recherche wurde auch **Alpha-Internexin** untersucht, bei dem es sich um ein zu den Intermediärfilamenten gehörendes Protein handelt, welche Zellen

Literatur

stabilisieren. Alpha-Internexin ist beschränkt auf Neuronen und von daher interessant für diese Studie. KAPLAN et al. (1990) gelang es einen monoklonalen Antikörper gegen dieses Protein herzustellen, der nicht mit den nah verwandten Neurofilamenten kreuzreagiert und darüber hinaus nur eine geringe Reaktivität am Ischiasnerv zeigt, woraus geschlossen werden kann, dass Alpha-Internexin im peripheren Nervensystem in geringerem Ausmaß auftritt, als im ZNS. Weiterhin lassen die unterschiedlichen Molekulargewichte bei Rind (70 kDa) und Schwein (62 kDa) auf Sequenzunterschiede schließen, die für eine Differenzierung genutzt werden könnten (KAPLAN et al., 1990; TANAKA et al., 1993). Da aber bisher nur ein Teil der porcinen Sequenz untersucht und publiziert wurde und die Sequenz vom bovinen Protein unbekannt ist, wurde ein anderes Protein gewählt, welches im Folgenden vorgestellt wird.

3.1.12 Myelin Basic Protein

Das **Myelin Basic Protein (MBP)** beziehungsweise basisches Myelinprotein enthält einen hohen Anteil (24 %) basischer Aminosäuren und ist im Myelin vom Zentralen Nervensystem und vom peripheren Nervensystem enthalten, wo es ein Bestandteil der Membranen ist. MBP ist wahrscheinlich mitverantwortlich für die Stabilisierung von kompaktiertem Myelin, indem es mit seinen positiven Ladungen gegenüberliegende zytoplasmatische Myelinmembranen verbindet (KURSULA, 2001). Das MBP ist ein wichtiger Teil des **Myelins** und liegt dort dementsprechend auch in großer Zahl vor. Im ZNS werden 30-40 % vom Gesamtproteingehalt des Myelins vom MBP gestellt (LEES et al., 1984). DEIBLER et al. (1972) haben MBP aus Meerschweinchen-ZNS extrahiert und konnten 183,2 mg MBP pro 100 g Gehirn und 556,1 mg MBP pro 100 g Rückenmark gewinnen, woraus folgt, dass das Rückenmark mehr MBP enthält als das Gehirn. Demgegenüber ist der Gehalt dieses Proteins im PNS niedriger als im ZNS, denn dort stellt das MBP nur einen Anteil von 5-15 % an den Myelinproteinen (KURSULA, 2001).

Ein wichtiger Grund für die Verwendung von MBP für einen Nachweis in Fleischerzeugnissen liegt in seiner **Hitzestabilität**, die von mehreren Forschern beobachtet wurde. Sie stellten fest, dass die Antigenität des Proteins nach Erhitzung auf 100°C für eine Stunde noch erhalten ist (EYLAR et al., 1970; GROOME, 1980). Auch gegenüber Harnstoff (EYLAR et al., 1970) und Mercaptoethanol (GROOME, 1980)

Literatur

Nachweis von bovinem Nervengewebe genutzt wird. Deshalb wird dieses Epitop hier separat abgebildet:

131 133 135
Rind: Gly-Gly-Arg-Ala- **Ser** –Asp- Tyr –Lys- **Ser** –Ala-His

132 134 136
Schwein: Gly-Gly-Arg-Ala- **Pro** –Asp- Tyr –Lys- **Pro** –Ala-His

Die beiden Sequenzen unterscheiden sich nur an zwei Positionen, wobei das bovine MBP an Position 131 und 135 je ein Serin trägt und das porcine Protein an den entsprechenden Positionen je ein Prolin, eine aromatische Aminosäure.

Mehrere Forscher haben festgestellt, dass **monoklonale Antikörper**, die für dieses Epitop hergestellt werden, streng speziesspezifisch sind, was bedeutet, dass humane und bovine Antikörper beide sowohl das humane, als auch das bovine MBP, aber nicht das porcine MBP erkennen. HRUBY et al. (1984) haben einen monoklonalen Antikörper hergestellt, der mit der Sequenz 131-140 vom humanen und bovinen Protein reagiert, aber nicht mit der porcinen Sequenz. MENDZ et al. (1985) haben sich ebenfalls mit diesem Epitop beschäftigt und die Struktur dieser Region anhand von Circular dichroismus und magnetischer Kernresonanzspektroskopie (NMR) untersucht. Dabei haben sie die Interaktion zwischen einem humanen monoklonalen Antikörper und bovinem und porcinem MBP beobachtet, wobei das bovine MBP als Ersatz für das humane MBP verwendet wurde, da bei beiden das Epitop 129-139 identisch ist. Bei ihren Forschungen ging es um die Frage, ob das porcine MBP für die Humanmedizin von Interesse sein könnte.

Mit dem Circular dichroismus konnten MENDZ et al. (1985) zeigen, dass das MBP alleine eine ungeordnete Polypeptidkette darstellt, während das Spektrum des Komplexes aus bovinem MBP und Antikörper ergab, dass das MBP bei der Bindung seine Konformation nicht änderte.

Literatur

Die Ergebnisse der NMR weisen auf das Tyrosin (133) als zentrale Aminosäure, an der die Antikörperbindung stattfindet. Zum Serin bzw. Prolin liegen keine NMR-Ergebnisse vor, aber da im Epitop der Unterschied zwischen Rind und Schwein in diesen Aminosäuren liegt, ist vermutlich das aromatische Prolin beim Schwein der Grund sein, dass der Antikörper nicht binden kann

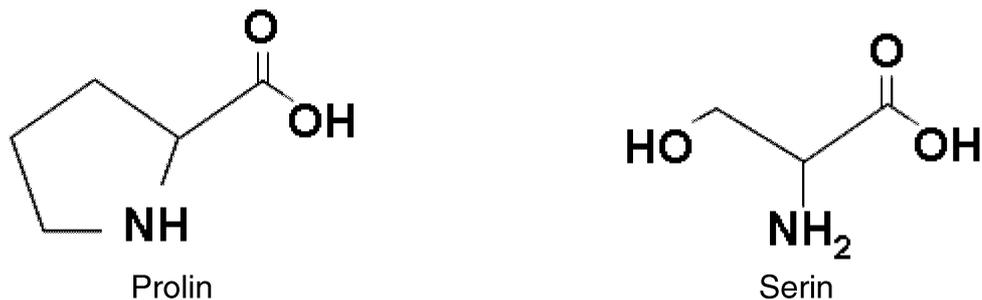


Abbildung 2: Strukturformeln von Prolin und Serin

Bei der NMR zeigte sich bei dem Komplex aus Antikörper und bovinem MBP, dass die Resonanz in ihrer Intensität um 70% sank, dass es aber nicht zu einer chemischen Verschiebung kam und dass das zentrale Tyrosin (133) durch die Bindung immobilisiert wurde. Das porcine MBP, das nicht mit dem Antikörper kreuzreagierte, zeigte keinen Abfall in der Intensität und auch keine chemische Verschiebung. Der Verlust an Intensität des Tyrosin(133)-Peaks beim bovinen MBP weist darauf hin, dass die Bindung an diesem zentralen Tyrosin stattfindet. Die gesunkene Relaxationszeit dieses Tyrosins führt zu einer erweiterten Resonanz. Es kommt am Epitop zu einer Konformationsänderung, aber nicht über das Epitop hinaus, so dass die nichtgebundenen Anteile frei beweglich sind und unspezifische Bindungen eingehen oder ihre Konformationen wechseln können (MENDZ et al., 1985). Daraus folgt, dass das Epitop 129-139 ein kontinuierliches Epitop ist, woraus sich die besondere Hitzestabilität des MBPs ableiten lässt.

Literatur

Neben der Sequenz vom porcinen MBP ist die Sequenz des MBPs des Huhns von Interesse, die hier mit der bovinen Sequenz verglichen wird:

```

1
MBP_CHICK ASQKRSSFRH GSKMASASTT DHARHGS.PR HRDSGLLDLSDL GRFFGGDRHV
MBP_BOVIN AAQKRPSQRS .KYLASASTM DHARHGFLPR HRDTGILDSL GRFFGSDRGA

51
MBP_CHICK PRRGFGKD.I HAARASHVGS IPQRSQHGRP GDDNPVVHFF KNIVSPRTPP
MBP_BOVIN PKRGSGKDGH HAARTTHYGS LPQKAQGHRP QDENPVVHFF KNIVTPRTPP

101
MBP_CHICK PMQAKGRGLS LTRFSWGGEG HKPGYGSG.K FYEHKSAHKG HKGSYHEGQG
MBP_BOVIN PSQKGKGRGLS LSRFSWGAEG QKPGFGYGGR ASDYKSAHKG LKG..HDAQG

151
MBP_CHICK TLSKIFKLGG SGSRPGSRSG SPVARR
MBP_BOVIN TLSKIFKLGG ...RD.SRSG SPMARR
176
```

Auch hier wird das Epitop des bovinen MBPs mit der entsprechenden Sequenz beim Huhn separat aufgeführt, so dass ersichtlich wird, dass sich die beiden Sequenzen im Epitop an sechs Positionen unterscheiden. Der Strich (___) in der Aminosäureabfolge des Huhns steht für eine Deletion.

```

131      133      135
Rind:    Gly-Gly-Arg- Ala- Ser -Asp- Tyr -Lys- Ser -Ala-His

132      134      136
Huhn:    Gly-___-Lys-Phe- Tyr -Glu- His -Lys- Ser -Ala-His
```

Aus dem Vergleich dieser zwei Sequenzen lässt sich die Vermutung ableiten, dass der monoklonale Antikörper, der die bovine Sequenz 129-139 detektiert, aufgrund der Sequenzunterschiede des MBPs des Huhns gegenüber dem bovinen MBP, keine Kreuzreaktion mit dem Epitop des Huhns eingeht.

4 Eigene Untersuchungen

In den eigenen Untersuchungen wurde unter Verwendung des im Kapitel 3.1.12 beschriebenen monoklonalen Antikörpers, der das bovine Epitop 129-139 des MBP detektiert, ein ELISA durchgeführt. Neben der Überprüfung der Bindungsfähigkeit des Antikörpers an bovinem MBP und an Rindergehirn, wurde das Auftreten von Kreuzreaktionen mit MBP anderer Spezies an Schweine- und Hühnergehirn untersucht. Weiterhin wurden Brühwürste mit verschiedenen Gehalten an Rindergehirn hergestellt, da der Produktionsprozess dieses Fleischerzeugnisses mehrere denaturierende Faktoren wie mechanische Zerkleinerung, Erhitzung und Zusatz von Chemikalien beinhaltet. Somit wurde von Anfang an die Praxistauglichkeit des etablierten ELISA sichergestellt.

4.1 Material

4.1.1 Untersuchungsmaterial

Als Untersuchungsmaterial wurde

- MBP,
- Gehirn von Rind, Schwein und Huhn,
- Brühwurst aus Schweine- oder Rindfleisch mit verschiedenen Gehalten von Rindergehirn,
- Innereien von Schwein und Rind und
- eine Delikatessleberwurst

verwendet.

Eigene Untersuchungen

MBP:

In den Vorversuchen wurde mit bovinem MBP der Firma Acris (BA461) gearbeitet, um die Bindungsfähigkeit verschiedener Antikörper gegenüber dem MBP abzuklären. Im Rahmen der Entwicklung eines Testkits kann reines MBP als Positivkontrolle dienen.

Gehirne von Rindern, Schweinen und Hühnern:

Die Gehirne von Rindern und Schweinen, bestehend aus Groß- und Kleinhirn und Medulla oblongata, wurden während der Schlachtung am Städtischen Schlacht- und Viehhof München entnommen. Teilweise wurden sie schon am selben Tag in Versuchen verwendet, teilweise aber auch erst eingefroren.

Die Hühnergehirne stammten aus einem Geflügelschlachtbetrieb im Landkreis Straubing und wurden bis zur Untersuchung eingefroren.

Im Rahmen der Probenherstellung erfolgten eine Homogenisierung der Gehirne mit einem Zerkleinerungsgerät (Moulinette, Ultra Turrax) und das Abwiegen in Portionen. Im Gegensatz zum Rindergehirn, welches sowohl selbst, als auch zugemischt zu Brät als Untersuchungsmaterial diente, wurde die Reaktivität des bovinen Antikörpers mit porcinem MBP und MBP von Hühnern ausschließlich an Gehirnen von Schweinen und Hühnern überprüft.

Die Proben wurden entweder roh belassen oder für 30 Minuten auf + 80°C bzw. + 115°C erhitzt. Während die rohen Proben am selben Tag in Versuche gingen, wurden die erhitzten Proben bis zur Untersuchung im Kühlschrank gelagert.

Brühwurst aus Schweine- oder Rindfleisch mit verschiedenen Gehalten von Rindergehirn:

Als Ausgangsmaterial wurde Rindfleisch und Schweinefleisch jeweils aus der Schulter genutzt. Makroskopisch sichtbares Binde-, Nerven- und Fettgewebe wurde mit einem Messer entfernt.

Um den Einfluss des im peripheren Nervensystem enthaltenen MBP quantifizieren zu können, wurde Brühwurst zum einen aus Schweinefleisch und zum anderen aus Rindfleisch hergestellt.

Eigene Untersuchungen

Für eine Gesamtmasse von 7 kg Brät aus **Schweinefleisch** wurden

- 3,5 kg Schweinefleisch,
- 1,75 kg Speck und
- 1,75 kg Wasser (25 % Schüttung)

bei 12°C gekuttert. Zusätzlich wurden die typischen Salze und Gewürze zugegeben:

- 105 g Nitritpökelsalz,
- 15,75 g Kutterhilfsmittel auf Phosphatbasis,
- 7 g Ascorbinsäure (Natrium-L (+)- ascorbat) und
- 35 g Gewürz (Ingwer, weißer Pfeffer, Muskat).

Für eine Menge von 5 kg **Rindfleischbrät** wurden

- 4 kg Rindfleisch und
- 1 kg Wasser (20 % Schüttung)

ebenfalls bei 12°C gekuttert. Weiterhin wurden

- 96 g Nitritpökelsalz,
- 12 g Kutterhilfsmittel auf Phosphatbasis und
- 4 g Ascorbinsäure

zugesetzt.

Nach Fertigstellung des Brätes wurde es portioniert und mit homogenisiertem Rindergehirn in Gewichtsanteilen von 0 % bis 20 % versetzt. Anschließend wurden das Brät und das Gehirn mit einem Zerkleinerungsgerät (Moulinette) zu einer homogenen Masse vermischt.

Eigene Untersuchungen

Das **Abfüllen** der hergestellten Proben erfolgte in 200 g Portionen in Einmachgläser mit einem Fassungsvermögen von 500 g. Es handelte sich hierbei um die kleinste erhältliche Größe, die mit einem Glasdeckel ausgestattet war.

Im Anschluss daran erfolgte eine **Weiterbehandlung** der Proben mit drei verschiedenen Temperaturen, wobei ein Drittel der Proben roh verblieb und bis zur Verwendung im Versuch, welcher noch am Tag der Probenherstellung durchgeführt wurde, im Kühlschrank gelagert wurde. Die übrigen zwei Drittel an Proben wurden im Ofen für 90 Minuten auf + 80°C bzw. auf + 115°C erhitzt und nach dem Abkühlen bis zum Versuch im Kühlschrank gelagert.

Innereien:

An Innereien wurden Leber, Herz, Zunge ohne Schleimhaut, Niere, Milz und Lunge von Rind und Schwein untersucht, wobei die Auswahl anhand der in den „Leitsätzen für Fleisch und Fleischerzeugnisse“ für Fleischerzeugnisse zugelassenen Innereien getroffen wurde. Vom Rind ist zwar generell die Milz und von bolzenschussbetäubten Rindern Lunge und Herz nicht mehr für Fleischerzeugnisse zugelassen, sie wurden der Vollständigkeit halber mit untersucht.

Die Innereien gingen zum einen nativ in den Versuch ein, und zum anderen wurden sie für 30 Minuten auf + 80°C erhitzt, wobei die Probenmenge 150 g betrug.

Leberwurst:

Da in früheren Jahren, wie in Kapitel 3.9.1 ausgeführt, manchmal ZNS in Leberwürsten nachweisbar war, wurde eine beliebig ausgewählte handelsübliche Delikatessleberwurst untersucht.

4.1.2 Arbeitsmaterial

4.1.2.1 Antikörper

In **Tabelle 4** sind die bei den Versuchen verwendeten Antikörper aufgelistet. Zusätzlich zu erwähnen ist, dass SM1455 mit der streng speziesspezifischen Sequenz 129-138 und SM1449 mit der Sequenz 36-50 des MBP reagieren. ab8764 reagiert ebenfalls mit der speziesspezifischen Sequenz des MBP und eine Kreuzreaktion beim MBP von Mensch, Affe, Rind, Kaninchen und Ratte ist möglich, aber keine mit dem von Meerschweinchen, Schwein oder Geflügel. Dieser Antikörper ist eigentlich für die Anwendung in der Immunhistochemie bestimmt, und es wird vom Hersteller auf dem Antikörper-Datenblatt gefordert, das Probenmaterial einer hohen Temperatur auszusetzen, da dies die antigenen Strukturen freilegt.

Die drei Antikörper SM1455, ab8764 und SM1449 sind nicht enzymmarkiert, weshalb drei weitere markierte Antikörper notwendig sind, um eine Farbreaktion durchzuführen. Es handelt sich dabei um SP1015HRP, der mit SM1455 reagiert, um R1370HRP, der an SM1449 bindet und um SP1014HRP, der die Farbreaktion für ab8764 vermittelt. Alle drei markierten Antikörper sind an Meerrettichperoxidase (HRP) gekoppelt.

Eigene Untersuchungen

Tabelle 4: Antikörper

Antikörper	Clonalität	Immunogen	Reinigungsgrad	Konzentration	Markierung	Lieferant
SM1455	monoclonal	bovines MBP (129-138)	Gewebskulturüberstand	chargenspezifisch, ca. 10-50 µg/ml	--	Acris/DPC Biermann
SP1015HRP	polyclonal	monoclonaler Maus IgG2a Antikörper	affinitätsgereinigt	0,4 mg/ml	Horseradishperoxidase (HRP)	
SM1449	monoclonal	Bovines MBP (36-50)	Aszites	1-5 mg/ml	--	
R1370HRP	--	Ratten IgG	affinitätsgereinigt	1 mg/ml	HRP	
ab8764	monoclonal	MBP vom Affen	Gewebskulturüberstand	5-10 µg/ml	--	
SP1014HRP	polyclonal	monoclonaler Maus IgG1 Antikörper	affinitätsgereinigt	0,4 mg/ml	HRP	

Eigene Untersuchungen

4.1.2.2 Chemikalien und Lösungen

An Chemikalien und Lösungen wurden die im Folgenden aufgelisteten Stoffe verwendet.

- Casein/PBS-Lösung (3 % w/v)

- HCl (0,1 mol/l, Merck)

- H₂CO₃ Bikarbonatpuffer (0,05 mol/l, pH 9,6)

- Citratpuffer (0,21 mol/l, pH 3,95) mit Zusatz von 3,15 mmol/l H₂O₂

- Histone, Type II-S, Sigma:

Die Histone wurden in 0,1 mol/l HCl aufgelöst und mit 0,1 mol/l NaOH bis pH 6 abgepuffert. GROOME (1980) verwendete die Histone bei seinem Nachweis von Antikörpern gegenüber MBP um direkte Bindungen von IgG in der Blutprobe an das Polystyren der ELISA-Platte zu reduzieren.

- MBP, bovines (BA461, Acris): 1 mg MBP/1 ml PBS

- PBS (0,01 mol/l, pH 7,0 -7,3)

- Sigmacote[®] (Sigma):

wurde zum Silikonisieren von Glasgefäßen verwendet, um zu verhindern, dass das klebrige Protein MBP an den Glaswänden der Probengefäße haften würde, dadurch aus den Probenextrakten entfernt werden würde und im Versuch nicht mehr nachgewiesen werden könnte.

- H₂SO₄-Lösung

189 ml Aqua destillata

11 ml konzentrierte H₂SO₄ (95-97 %, Merck)

- TMB-Lösung (0,001 mol/l 3,3';5;5'-Tetramethylbenzidine in 45 ml Methanol und

Eigene Untersuchungen

5 ml Aceton

- Substrat/Chromogenlösung: 20 Teile Citratpuffer und ein Teil Tetramethylbenzidine

- Tween[®]80= Polyoxyethylenesorbitan monooleate, Sigma

- Tween[®]20= Polyoxyethylenesorbitan monolaureate, Sigma

- Waschlösung (nach GROOME, 1980): 0,05 % (w/v) Tween[®]80

1,2 % (w/v) NaCl

Aqua destillata

4.1.2.3 ELISA-Platten

Als ELISA-Platten wurden Immuno[™] Modules, F8 Maxisorp Loose der Firma Nunc verwendet.

4.1.2.4 Geräte

Kutter von Eduard Müller & Söhne GmbH & CoKG, Saarbrücken

Moulinette Electronic, Type 89902, Modelle Depose, Moulinex

Ofen ClimaPlus Combi von RATIONAL

Ultra Turrax T25 von Janke & Kunkel GmbH & CoKG, IKA[®]-Labortechnik

4.2 Methoden

4.2.1 Indirekter ELISA

Die zentrale Reaktion in einem Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA) stellt die Bindung eines Antikörpers mit einem Antigen dar, wobei eine Vielzahl von Varianten im Versuchsaufbau möglich sind. In den in dieser Studie durchgeführten Versuchen, wurde eine Matrix, die ELISA-Platte, mit einem Antigen beschichtet. Es handelte sich hierbei im ersten Versuch um das MBP, in den weiteren Versuchen wurde mit Gehirnextrakt oder Brühwurstextrakt, worin das MBP enthalten war, beschichtet. Im nächsten Schritt wurde ein für das MBP spezifischer Antikörper (SM1455) in die Kavitäten der ELISA-Platten einpipettiert, der das MBP detektierte und daran band. Um die stattgefundenene Reaktion sichtbar zu machen, war ein zweiter enzymmarkierter Antikörper (SP1015HRP) notwendig, der sich an den Detektionsantikörper band. Die Enzymmarkierung ermöglichte eine Farbreaktion. Da in diesem Versuchsaufbau die Enzymmarkierung nicht an den Detektionsantikörper gekoppelt ist, sondern an einen zusätzlichen Antikörper, spricht man von einem „indirekten“ ELISA.

4.2.2 Probenaufbereitung:

Bei der Probenaufbereitung wurde 1 g Probe in 10 ml PBS bzw. 10 ml 0,1 molare Salzsäure gegeben und mit dem Ultra Turrax homogenisiert. Im Anschluss erfolgte eine Filtration durch einen Faltenfilter aus Papier (Faltenfilter: 3hw, d=185 mm, 65g/m², Filtrax). Das resultierende Extrakt wurde anschließend in die Kavitäten einpipettiert.

In den ersten nicht dargestellten Versuchen wurde mit PBS gearbeitet, welches durch seinen neutralen pH-Wert ein geeignetes Milieu für die Beschichtung der ELISA-Platte darstellt. In späteren Versuchen wurde aufgrund von Hinweisen aus der Literatur von DEIBLER et al. (1972), GROOME (1980), LEES et al. (1984) und TAKAMATSU et al. (1992) über die Isolierung von MBP eine Extraktion mit Salzsäure erprobt. Um hierbei den neutralen pH-Wert für die Bindung der Proteine, vor allem

Eigene Untersuchungen

des MBP, an das Polystyren der ELISA-Platte zu gewährleisten, wurde Bikarbonat in die Kavitäten der Mikrotiterplatten vorgelegt.

Um die Menge zu ermitteln, mit der 0,1 molare Salzsäure abgepuffert werden kann, wurde Bikarbonat zu Salzsäure titriert:

1 ml 0,1 molare HCl + 2 ml H₂CO₃ ergeben einen pH von 6,8 - 7.

Nachdem das **Verhältnis von 3:1** durch die Titration ermittelt wurde, konnte dies auf die Volumina im ELISA übertragen werden. In die **ersten Kavitäten** wurden deshalb 133 µl H₂CO₃ und 67 µl Extrakt einpipettiert. Die restlichen Kavitäten wurden mit 100 µl H₂CO₃ befüllt. Mit den insgesamt jeweils 200 µl aus den ersten Kavitäten wurde eine Verdünnungstitration im Verhältnis 1:2 durchgeführt. Um die HCl- und die PBS-Extraktion miteinander vergleichbar zu machen, wurde bei der PBS-Extraktion ebenfalls 67 µl PBS-Extrakt zu 133 µl H₂CO₃ gegeben und in die restlichen Kavitäten 100 µl H₂CO₃ vorgelegt.

In **Abbildung 11** werden die Extinktionen der PBS-Extraktion denen der HCl-Extraktion gegenübergestellt, wobei deutlich wird, dass die Salzsäure mehr MBP aus den Proben extrahiert, als das PBS. Somit führt die HCl-Extraktion zu einem sensitiveren Nachweis von MBP.

4.2.3 Versuchsablauf:

Zunächst wurde die Mikrotiterplatte mit MBP oder Extrakt **beschichtet**, indem eine Gesamtmenge von 200 µl MBP oder Extrakt und Bikarbonat in die ersten Kavitäten einpipettiert wurden. Die restlichen Kavitäten wurden mit je 100 µl PBS bzw. Bikarbonat befüllt. Dabei wurde jede Probe doppelt untersucht, um die Extinktionen miteinander vergleichen zu können. Diese sollten möglichst identisch sein.

Anschließend wurde eine **Verdünnungstitration** des MBP oder Extraktes im Verhältnis 1:2 durchgeführt. Dazu wurden aus den ersten Kavitäten jeweils 100 µl entnommen und in die nachfolgenden Kavitäten einpipettiert, so dass sich in den ersten Vertiefungen ein Volumen von 100 µl/Kavität und in der folgenden Reihe von Kavitäten ein Volumen von 200 µl/Kavität befand. Mit Hilfe der Pipette erfolgte durch wiederholtes Einsaugen und Ausstoßen eine homogene Vermischung. Die Titration

Eigene Untersuchungen

wurde bis zur letzten Kavitätenreihe wiederholt. Damit auch in diesen Kavitäten das Volumen nur 100 µl betrug, wurden die jeweils überschüssigen 100 µl verworfen. Nachdem die Kavitäten belegt worden waren, wurden die ELISA-Platten über Nacht inkubiert, um den enthaltenen Molekülen und vor allem dem MBP die Möglichkeit zu geben, sich an das Polystyren, der Matrix der ELISA-Platte, zu binden.

Nachdem am folgenden Morgen die Beschichtung beendet war, wurden zunächst möglicherweise noch freiliegende Bindungsstellen mit Casein **geblockt**, damit sich daran keine Antikörper binden konnten.

Im nächsten Schritt wurde der **Detektionsantikörper** zugegeben, bei dem es sich um SM1455, ab8764 oder SM1449 handelte. Während der Inkubationszeit band der Detektionsantikörper an das Antigen, in diesem Fall an das MBP.

Die verwendete Antikörperkonzentration von SM1455 betrug 0,5 µg/ml.

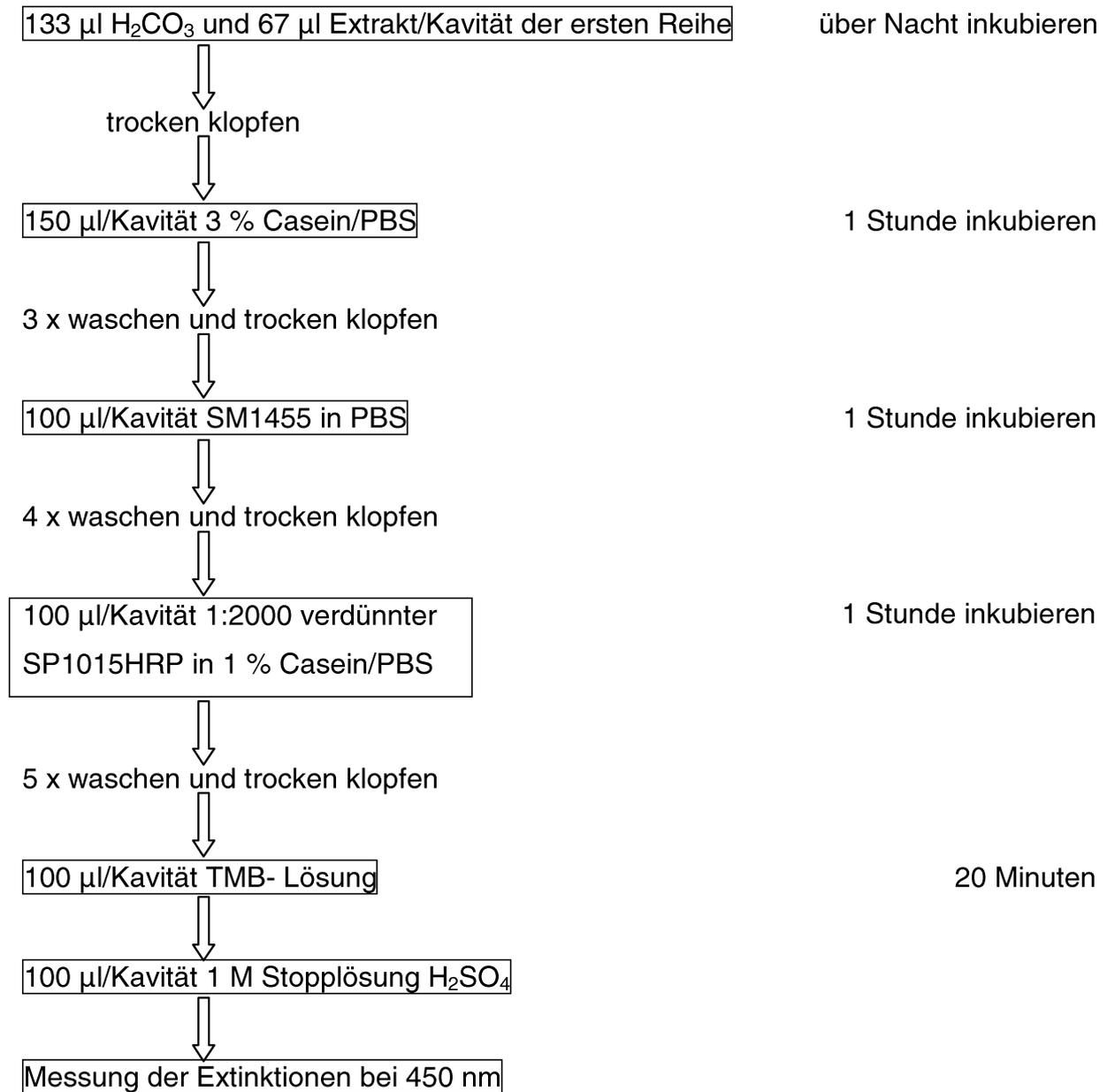
Zwischen den einzelnen Versuchsschritten wurde die ELISA-Platte jeweils **gewaschen**, um nicht gebundene Moleküle zu entfernen. Die Waschlösung wurde anschließend aus der Mikrotiterplatte ausgeklopft.

Um die stattgefundenene Reaktion zwischen MBP und Detektionsantikörper sichtbar machen zu können, wurde ein **enzymmarkierter Antikörper**, SP1015HRP, R1370HRP oder SP1014HRP einpipettiert. Alle drei Antikörper trugen dieselbe Markierung, so dass die abschließenden Schritte des Versuches mit denselben Substanzen durchgeführt werden konnten. Nachdem sich der markierte Antikörper an den Detektionsantikörper gebunden hatte, wurde das TMB zugegeben.

Das **TMB** wurde von der Meerrettichperoxidase zu einer blauen Substanz oxidiert. Nach einer Inkubationszeit von 20 Minuten wurde die Reaktion durch die Zugabe einer Stopplösung beendet, was zu einem Farbumschlag von blau nach gelb führte.

Am Schluss wurde die **Extinktion** bei 450 nm mit einem Photometer gemessen.

4.2.4 Protokoll der Versuche



4.2.5 Inkubationsbedingungen

Die Inkubation erfolgte bei Raumtemperatur. Während der Inkubation über Nacht befanden sich die ELISA-Platten in einer dunklen, feuchten Kammer, damit es nicht zur Austrocknung kommen konnte. Bei den stundenweisen Inkubationen erfolgt eine Durchmischung der Reagenzien auf dem Orbitalschüttler. Die 20-minütige Inkubation, in der die Enzymreaktion stattfand, wurde bei Raumtemperatur durchgeführt.

5 Ergebnisse

Die Ergebnisse wurden mit einem Mikrotiterplattenmeßgerät (Sunrise Remote, Tecan) bei einer Wellenlänge von 450 nm ermittelt und geben die Extinktionen bzw. die durch Absorption bedingte Lichtauslöschung in den Kavitäten der ELISA-Platte wieder.

5.1 Untersuchung der Reaktionsfähigkeit verschiedener Antikörper an reinem MBP

In diesem Versuch wurde überprüft, ob die drei Antikörper ab8764, SM1455 und SM1449 mit reinem bovinen MBP reagieren. Dabei wurde MBP sowohl nativ, als auch erhitzt untersucht.

Vorbereitung des MBP:

Das gefriergetrocknete MBP wurde in PBS mit einer Konzentration von 1 mg MBP/1 ml PBS aufgelöst. Für den Einsatz im Versuch wurde von dieser Lösung eine weitere Verdünnung von 10 µg/ml hergestellt, welche zur Hälfte für die Beschichtung der Mikrotiterplatte verwendet wurde. Die zweite Hälfte der 10 µg/ml-Verdünnung wurde einer Vorbehandlung im Wasserbad unterzogen. Um Bedingungen der Brühwurstherstellung zu simulieren und die in der Literatur beschriebene Hitzeunempfindlichkeit des MBP zu überprüfen, wurde sie für 10 Minuten einer Temperatur von + 75°C ausgesetzt.

Ergebnisse

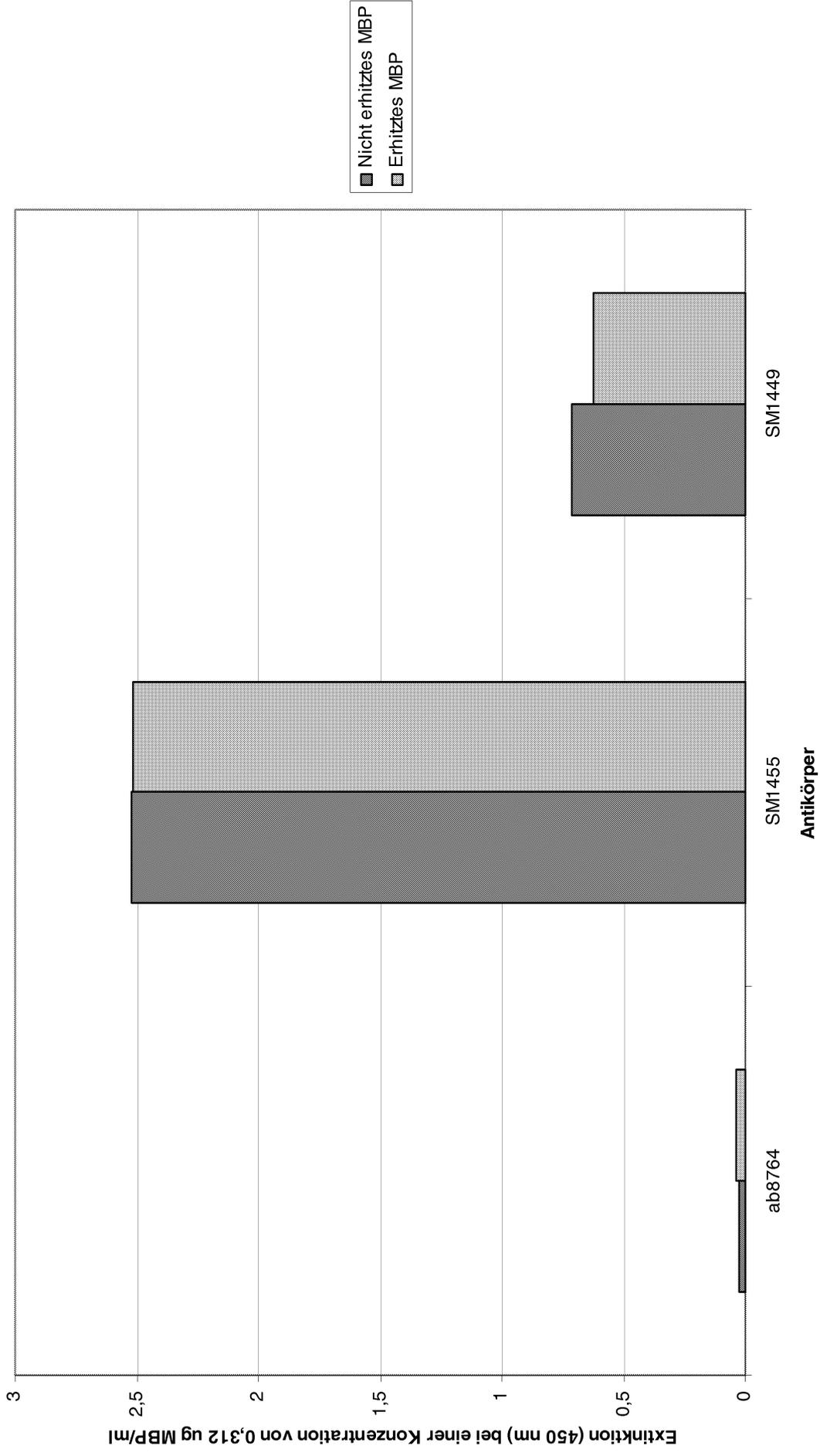


Abbildung 3: Vergleich der Bindung verschiedener Antikörper an bovinem MBP

Ergebnisse

Wie in **Abbildung 3** ersichtlich ist, reagierte **ab8764** nicht mit dem MBP. Die mit diesem Antikörper erzielten Extinktionen lagen unter 0.100 und wurden als negativ bewertet. Daraus konnte geschlossen werden, dass ab8764 nicht für die Anwendung im ELISA geeignet ist, weshalb dieser Antikörper nicht weiter verwendet wurde.

SM1449 reagierte gut mit dem bovinen MBP und führte zu Extinktionen über 0.500. Bei der erhitzten Probe konnte ein etwas niedrigerer Wert als bei der nativen Probe beobachtet werden.

Der Antikörper **SM1455** reagierte am besten von den drei untersuchten Antikörpern sowohl mit dem nativen, als auch mit dem erhitzten MBP. Im Gegensatz zu dem Antikörper SM1449 konnte bei SM1455 keine verringerte Reaktion mit dem erhitzten MBP gegenüber der nativen Probe festgestellt werden.

Da das MBP mit SM1455 und SM1449 nachweisbar war, konnte weiterhin geschlossen werden, dass das MBP in PBS löslich ist.

Die Ergebnisse dieses Versuches zeigten, dass eine Beschichtung der ELISA-Platten mit MBP praktikabel war. Aus diesem Grund wurde der bisherige Versuchsaufbau des indirekten ELISA für die folgenden Untersuchungen von Brühwurst beibehalten. Da SM1455 die speziesspezifische Sequenz 129-139 detektiert und gut mit dem bovinen MBP reagiert, wurde dieser Antikörper weiter verwendet.

5.2 Untersuchung von Gehirn von Rind, Schwein und Huhn

Dieser Versuch sollte zum einen abklären, ob der Antikörper SM1455 auch mit dem MBP in Rindergehirn reagiert. Zum anderen wurde untersucht, ob eine Kreuzreaktivität des Antikörpers mit dem MBP von Schwein und Huhn vorliegt. Da weder porcines MBP noch MBP vom Huhn im Handel erhältlich ist, wurde versucht diesen Mangel durch die Untersuchung von Gehirn dieser beiden Spezies zu kompensieren.

Probenvorbehandlung:

Die Proben wurden nach der Homogenisierung entweder roh belassen oder für 30 Minuten auf + 80°C bzw. + 115°C erhitzt.

Ergebnisse

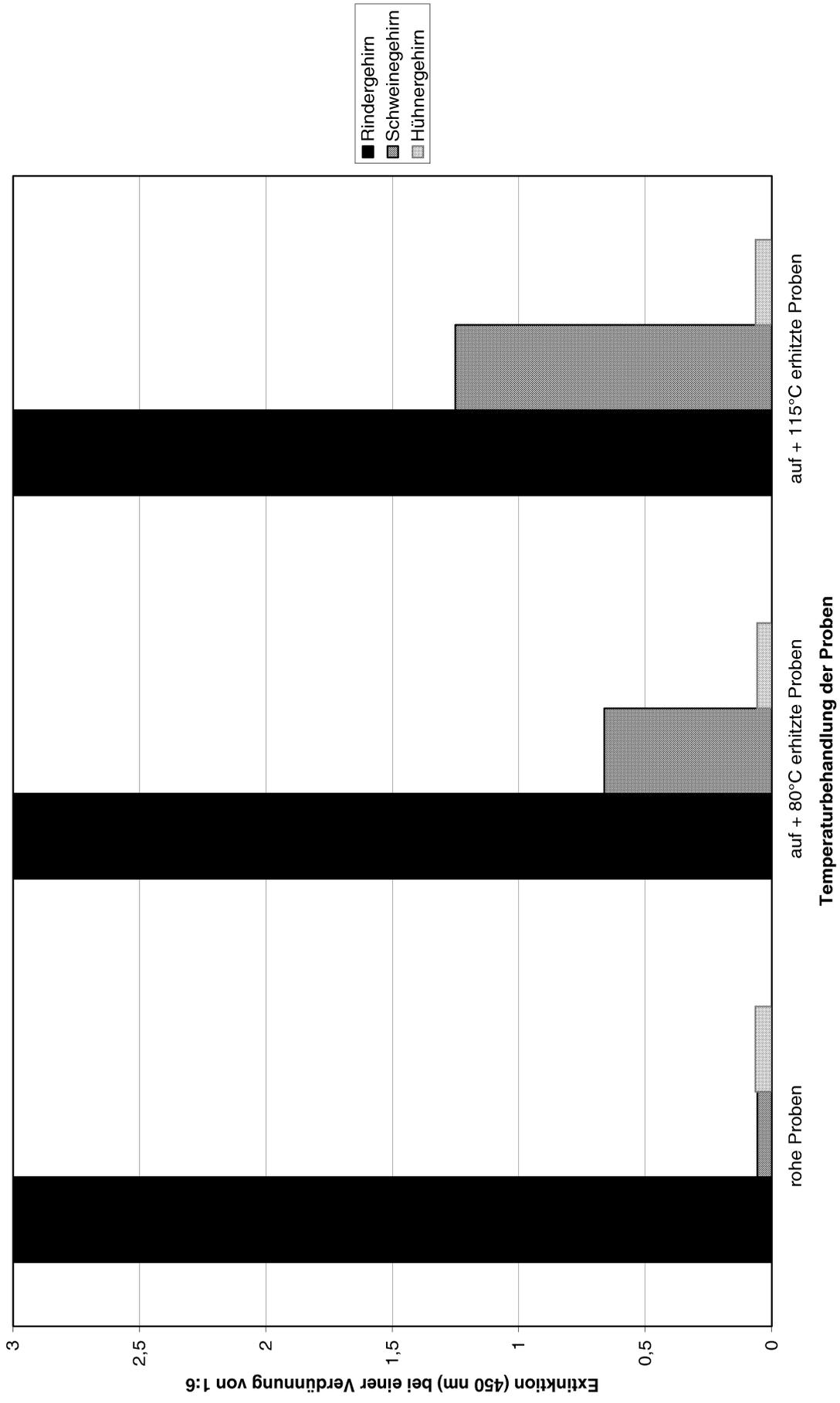


Abbildung 4: Untersuchung der Kreuzreaktivität des verwendeten Antikörpers

Ergebnisse

Die Ergebnisse aus den Untersuchungen von Rindergehirn, Schweinegehirn und Hühnergehirn werden in **Abbildung 4** graphisch gegenübergestellt. Auffallend ist, dass unabhängig von der Temperaturbehandlung bei der Untersuchung von **Rindergehirn** stark positiven Reaktionen auftraten. Die Extinktionen lagen über alle Titerstufen hinweg über 3.000 und es war eine Ausfällung von Substrat zu beobachten, so dass in diesem Fall eine „over-Reaktion“ vorlag.

Weiterhin zeigt dieser Versuch:

- dass MBP auch in einem Medium wie Gehirn nachgewiesen werden kann.
- dass der verwendete Antikörper SM1455 für den Nachweis geeignet ist.
- dass MBP sehr unempfindlich gegenüber dem Homogenisieren und dem Erhitzen zu sein scheint, da bei allen drei Temperaturen ein stark positiver Nachweis möglich ist.

Die Untersuchung von **Schweinegehirn** ergab bei der rohen Probe für diese Untersuchung ein negatives Ergebnis, da die Extinktionen unter 0.100 lagen, was ebenfalls als negativ bewertet wurde. Erst bei den erhitzten Proben war ein positiver Nachweis von porcinen MBP zu verzeichnen, der bei der auf + 80°C erhitzten Probe mit Extinktionen um 0.600 geringer ausfiel, als bei der auf + 115°C erhitzten Probe. Bei dieser lagen die Extinktionen bei 1.200. Diese Ergebnisse bei den erhitzten Schweinegehirnproben stellen eine falschpositive Reaktion dar, die wahrscheinlich auf eine durch den Erhitzungsprozess bedingte Strukturveränderungen am porcinen MBP zurückzuführen ist. Somit liegt eine Kreuzreaktivität zwischen erhitztem porcinen MBP und dem Antikörper SM1455 vor, die sich mit ansteigender Temperatur verstärkt. Allerdings ist diese Reaktion deutlich geringer, als die Reaktion von SM1455 mit Rindergehirn.

In **Abbildung 4** sind ebenfalls die Ergebnisse dargestellt, die bei der Analyse von **Hühnergehirn** gewonnen wurden. Wie bereits der Sequenzvergleich in Kapitel 3.1.12 vermuten ließ, trat zwischen dem Antikörper SM1455 und dem MBP vom Huhn keine Kreuzreaktivität auf, so dass alle Extinktionen unter 0.100 lagen, was als negativ bewertet wurde. Es konnte festgestellt werden, dass der Nachweis von MBP des Huhnes bei der Verwendung von SM1455 zu negativen Ergebnissen führt.

5.3 Untersuchung von Brühwurst aus Schweinefleisch

Zunächst wurden Proben aus Schweinefleisch hergestellt und mit verschiedenen prozentualen Anteilen von Rindergehirn versetzt. Neben Proben, die nativ untersucht wurden, wurden einige Proben einer Temperaturbehandlung von + 80°C bzw. + 115°C für 90 Minuten ausgesetzt. Dabei wurde eine so lange Erhitzungsdauer gewählt, um zu überprüfen, ob das MBP auch nach dieser Behandlung noch nachweisbar ist.

5.3.1 Brät mit Rindergehirn:

Im Anschluss an die Probenherstellung wurden die rohen Proben mit HCl extrahiert. Mit dem Extrakt erfolgte die Beschichtung der Mikrotiterplatte.

Ergebnisse

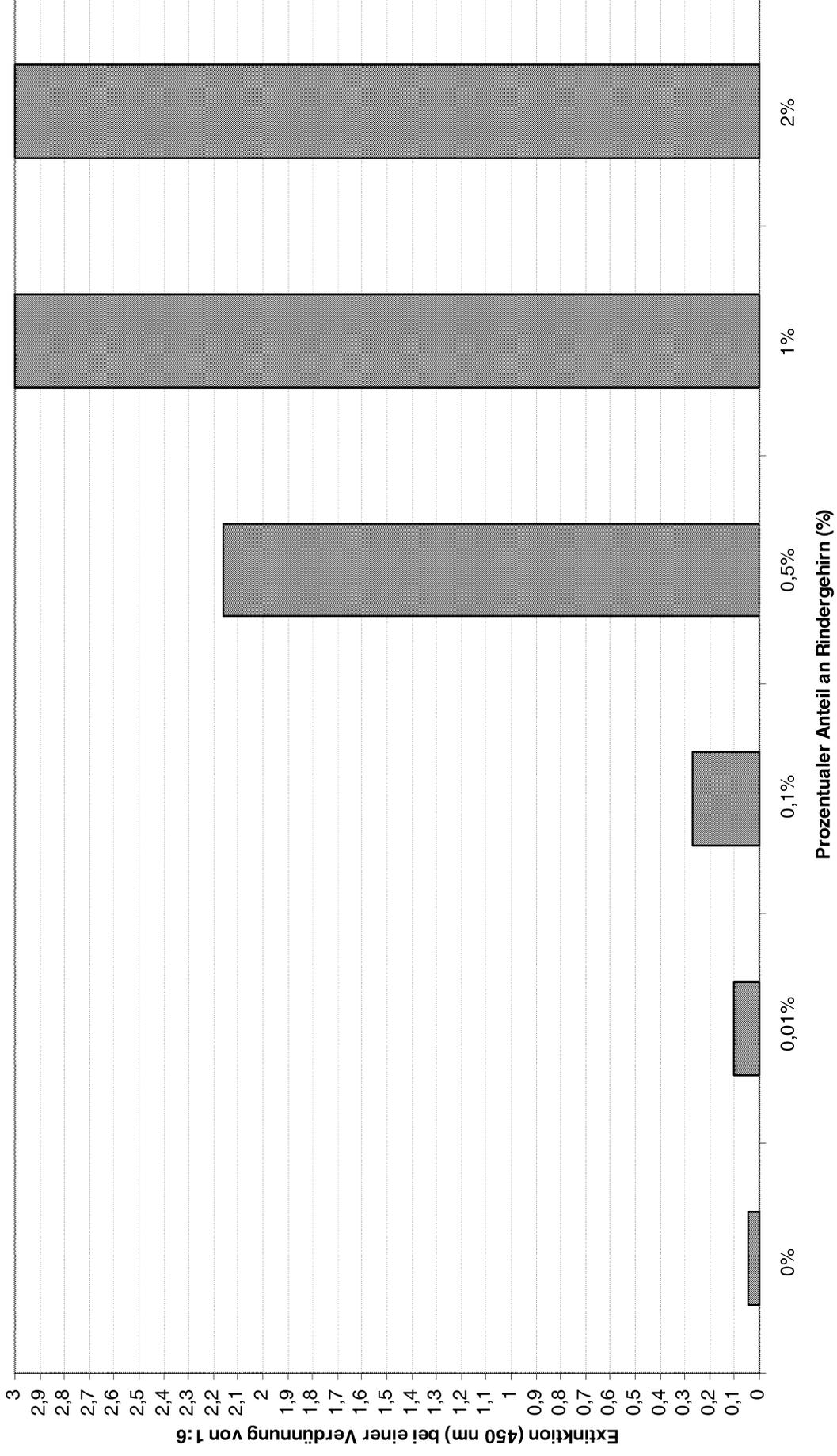


Abbildung 5: Nachweis von MBP in Proben aus Schweinefleischbrät

Ergebnisse

Abbildung 5 zeigt die Extinktionen, die bei der Untersuchung der nativen Proben ermittelt wurden. Während die Probe ohne Rindergehirn mit Extinktionen unter 0.100 zu einem als negativen beurteilten Ergebnis führte, lag bei einem Anteil von 0,1 % Rindergehirn mit Extinktionen über 0.200 bereits ein positiver Nachweis von bovinem MBP vor. Somit liegt die Nachweisgrenze für Proben aus Schweinefleischbrät bei 0,1% Rindergehirn bei einem Cut-off von 0.200 und einer Antikörperkonzentration von SM1455 von 0,5 µg/ml.

Während die Extinktionen bei den Proben bis 0,1 % Rindergehirn gleichmäßig anstiegen, kam es bei einem Prozentsatz von 0,5 % zu einem sprunghaften Anstieg der Extinktionen. Bei den folgenden Proben mit 1 % bzw. 2 % Rindergehirn war der Nachweis von MBP so stark, dass eine „over-Reaktion“ auftrat.

5.3.2 Auf + 80°C erhitzte Brühwurst mit Rindergehirn:

In der folgenden **Abbildung 6** werden die Ergebnisse dargestellt, die bei der Analyse von Brühwurst aus Schweinefleisch, die auf + 80°C erhitzt wurde, erzielt wurden.

Ergebnisse

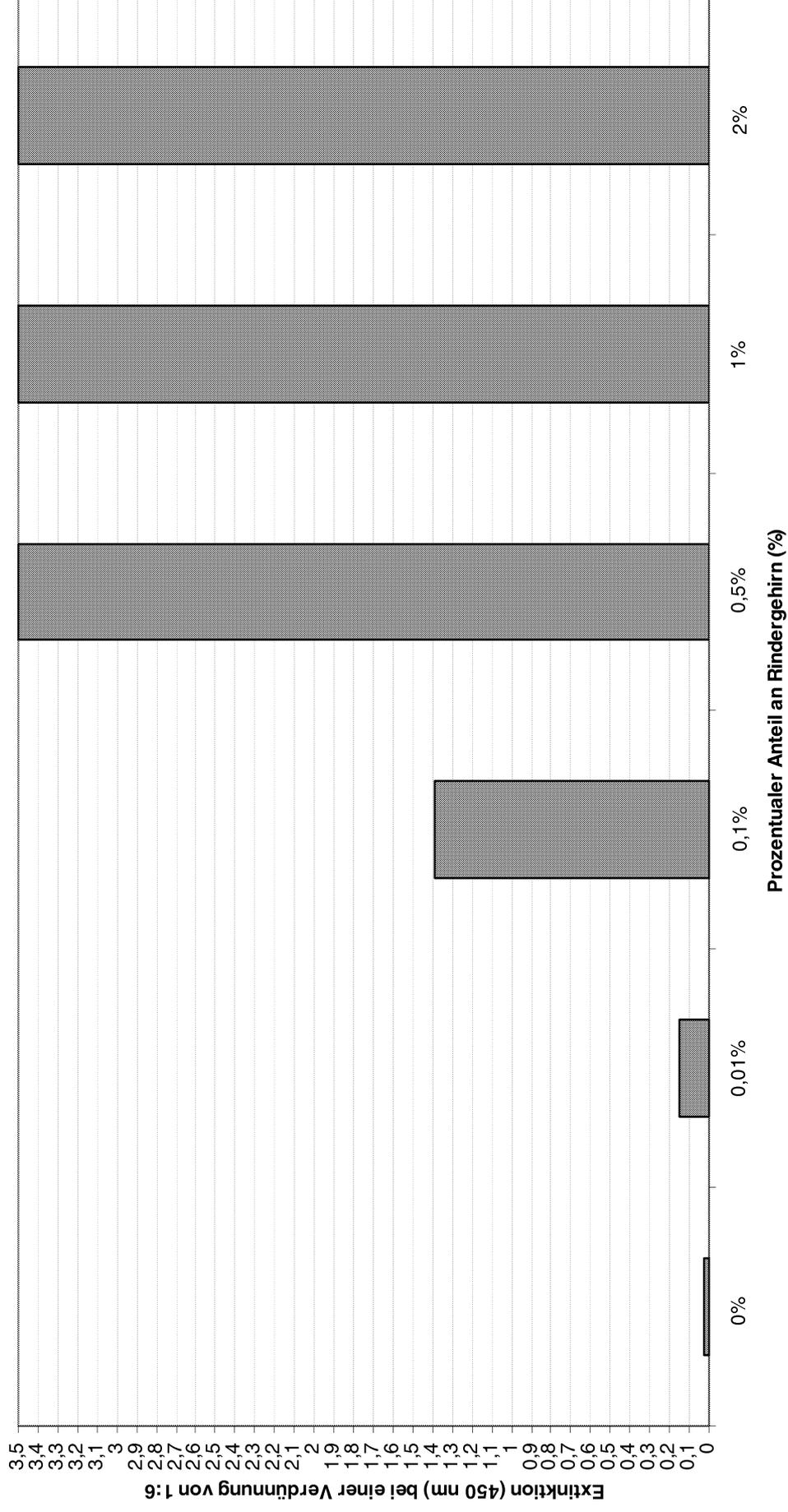


Abbildung 6: Nachweis von MBP in erhitzten Proben (+80°C) aus Schweinefleischbrühwurst

Ergebnisse

Wie bei den rohen Proben führte die erhitzte Probe ohne Rindergehirn zu einem negativen Ergebnis, während bereits ein niedriger Gehalt von 0,01 % Rindergehirn einen positiven Nachweis von MBP erbrachte. Folglich ergibt sich auch bei den auf + 80°C erhitzten Proben eine Nachweisgrenze von 0,1% Rindergehirn bei einem Cut-off von 0.500 und einer Antikörperkonzentration von SM1455 von 0,5 µg/ml.

Bei den Proben mit 0,1 % und 0,5 % Rindergehirn lagen die Extinktionen vergleichsweise höher, als die Extinktionen der rohen Proben. Schon bei einem Anteil von 0,5 % Rindergehirn trat bei den erhitzten Proben eine „over-Reaktion“ auf. Somit kann festgestellt werden, dass der Nachweis von MBP und somit von bovinem ZNS in auf + 80°C erhitzten Proben sensitiver ist, als in nativen Proben.

5.3.3 Auf + 115°C erhitzte Brühwurst mit Rindergehirn:

Abbildung 7 zeigt die Extinktionen, die bei der Untersuchung von Brühwurst, die auf + 115°C erhitzt wurde, gemessen wurden. Das in diesem Versuch verwendete Rindergehirn bestand ausnahmsweise ausschließlich aus Großhirn ohne Kleinhirn und ohne Medulla oblongata.

Ergebnisse

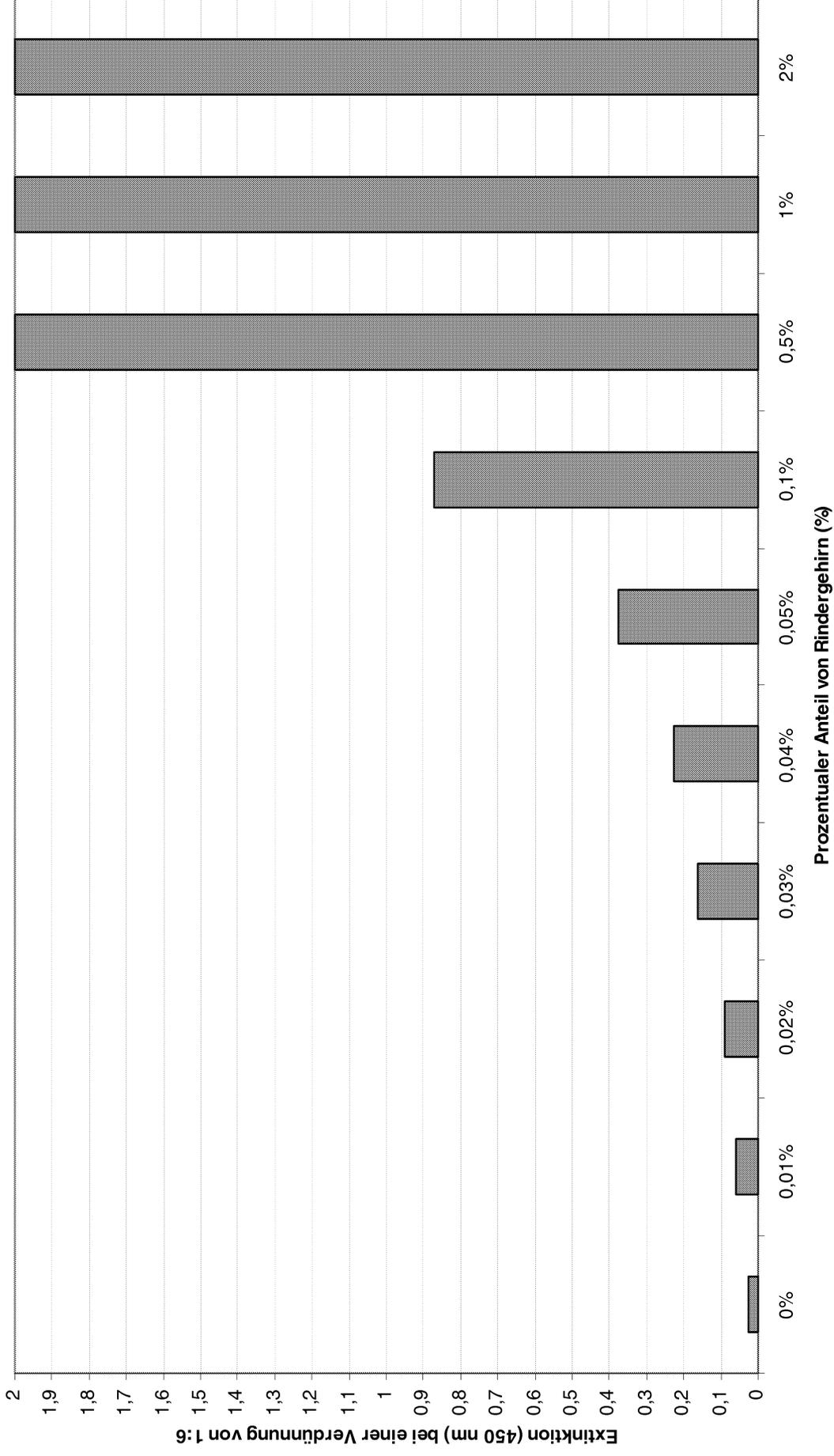


Abbildung 7: Nachweis von MBP in erhitzten Proben (+15°C) aus Schweinefleischbrühwurst

Ergebnisse

In **Abbildung 7** ist ersichtlich, dass ein Gehalt von 0,03 % Rindergehirn zu einem positiven Nachweis von MBP führte. In Proben mit niedrigeren Anteilen war der Nachweis negativ. Somit lag bei den auf +115°C erhitzten Proben die Nachweisgrenze bei 0,05% Rindergehirn bei einem Cut-off von 0.200 und einer Antikörperkonzentration von SM1455 von 0,5 µg/ml.

Eine Gemeinsamkeit mit den auf + 80°C erhitzten Proben bestand wiederum darin, dass ab einem Anteil von 0,5 % Rindergehirn eine „over-Reaktion“ auftrat.

Derselbe Versuch wurde mit einem vollständigen Gehirn wiederholt und ergab weitgehend dieselben Ergebnisse.

5.4 Untersuchung von Brühwurst aus Rindfleisch

Nachdem die Proben aus Schweinefleisch untersucht worden waren, wurden erneut Brühwurstproben hergestellt. Diese enthielten kein Schweinefleisch oder Schweinespeck, sondern nur Rindfleisch und wurden mit verschiedenen prozentualen Anteilen von Rindergehirn versetzt. Wiederum wurde ein Drittel der Proben nativ belassen, während die restlichen zwei Drittel der Proben einer Temperaturbehandlung von + 80°C bzw. + 115°C für 90 Minuten ausgesetzt wurden.

5.4.1 Brät mit Rindergehirn:

Aufgrund der kurzen Haltbarkeit fand zunächst die Untersuchung der rohen Proben statt, deren Ergebnisse in **Abbildung 8** dargestellt sind.

Ergebnisse

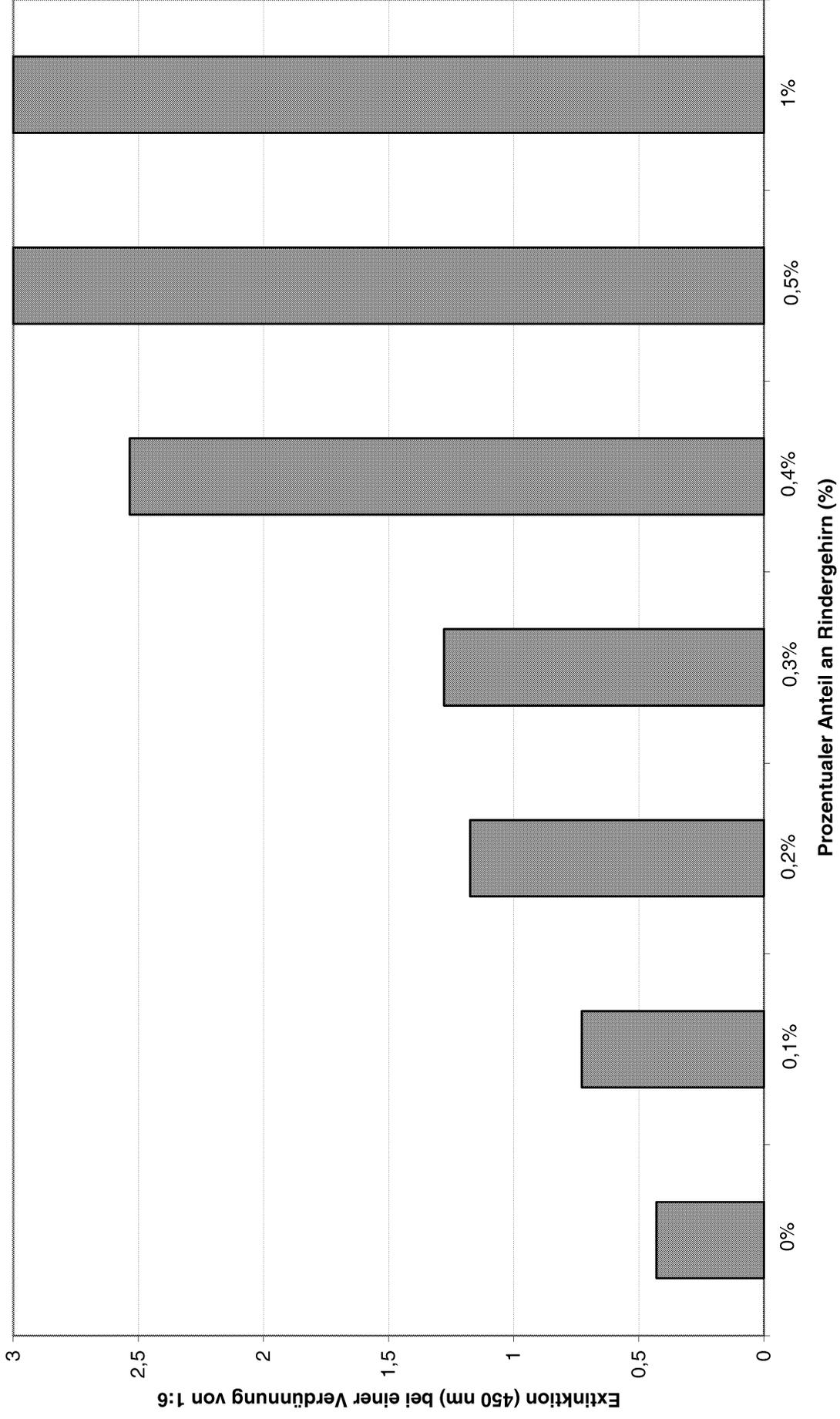


Abbildung 8: Nachweis von MBP in Proben aus Rindfleischbrät

Ergebnisse

Wie beim Vergleich von **Abbildung 8** mit **Abbildung 5** auffällt, lagen die Extinktionen der verschiedenen Proben aus Rindfleischbrät über denen der vergleichbaren Proben aus Schweinefleischbrät. Dies ist auf das Vorhandensein von peripheren Nerven im Muskelfleisch zurückzuführen. Die Untersuchung der rohen Probe aus Rindfleischbrät ohne Rindergehirn führte zu Extinktionen bei 0.430, während bei einem Gehalt von 0,1 % Rindergehirn Extinktionen von durchschnittlich 0.728 zu verzeichnen waren. Daraus ergab sich für Proben aus Rindfleischbrät eine Nachweisgrenze von 0,1 % Rindergehirn bei einem Cut-off von 0.500 und einer Antikörperkonzentration von SM1455 von 0,5 µg/ml.

Eine „over-Reaktion“ war ab einem Anteil von 0,5 % Rindergehirn zu beobachten.

5.4.2 Auf + 80°C erhitzte Brühwurst aus Rindfleisch mit Rindergehirn:

In **Abbildung 9** sind die Ergebnisse dargestellt, die bei der Untersuchung von auf + 80°C erhitzten Proben ermittelt wurden.

Ergebnisse

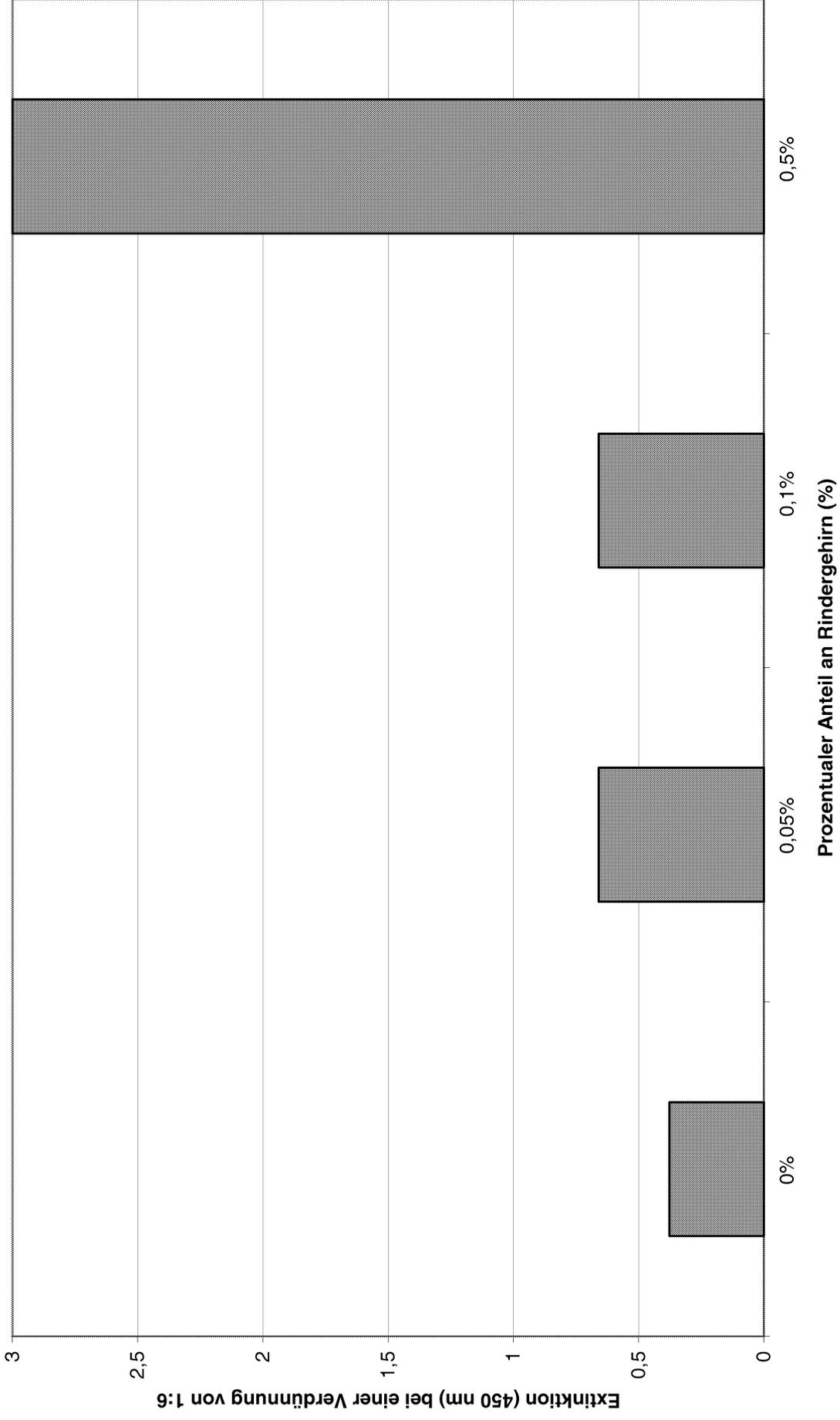


Abbildung 9: Nachweis von MBP in erhitzten Proben (+80°C) aus Rindfleischbrühwurst

Ergebnisse

Wie auch bei den rohen Proben lagen die Extinktionen der auf + 80°C erhitzten Rindfleischproben über denen der entsprechenden Schweinefleischproben, wie beim Vergleich von **Abbildung 6** mit **Abbildung 9** deutlich wird. Auch in diesem Fall war dies auf den Einfluss der peripheren Nerven im Rindfleisch zurück zu führen.

Die Extinktionen der Proben mit 0,05% und 0,1% lagen in der 1:6 Verdünnung auf gleicher Höhe. Für die auf + 80°C erhitzten Proben aus Rindfleisch kann eine Nachweisgrenze von 0,1 % Rindergehirn bei einem Cut-off von 0.500 und einer Antikörperkonzentration von SM1455 von 0,5 µg/ml festgelegt werden. Ab einem Anteil von 0,5 % Rindergehirn trat eine „over-Reaktion“ auf.

5.4.3 Auf + 115°C erhitzte Brühwurst aus Rindfleisch mit Rindergehirn:

Die Proben dieses Versuches wurden für 90 Minuten auf + 115°C erhitzt und führten zu den in **Abbildung 10** aufgeführten Ergebnissen.

Ergebnisse

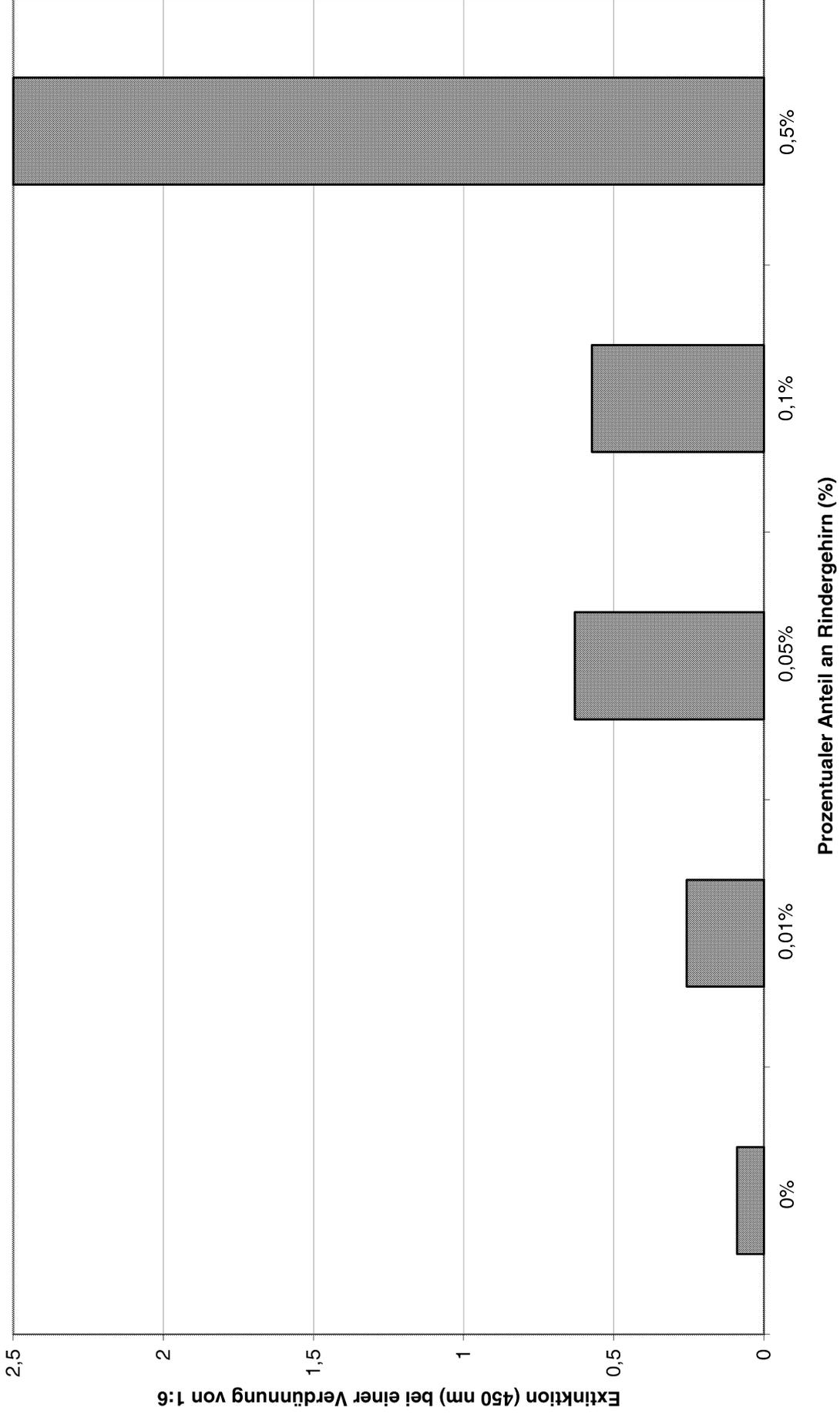


Abbildung 10: Nachweis von MBP in erhitzten Proben (+ 115°C) aus Rindfleischbrühwurst

Ergebnisse

Auch bei den in **Abbildung 10** dargestellten Rindfleischproben lagen die Extinktionen aufgrund der in der Muskulatur vorhandenen peripheren Nerven über denen der entsprechenden Schweinefleischproben, die in **Abbildung 7** aufgeführt sind. Die Extinktionen der Probe mit 0,1% Rindergehirn lagen unter den Extinktionen der Probe mit 0,05% ZNS. Maximale Extinktionen, verbunden mit einer „over-Reaktion“, wurden in diesem Versuch ebenfalls bei der Probe mit einem Gehalt von 0,5 % Rindergehirn verzeichnet.

Die Nachweisgrenze für die auf + 115°C erhitzten Proben aus Rindfleisch konnte bei einem Anteil von 0,05 % Rindergehirn, einem Cut-off von 0.500 und einer Antikörperkonzentration von SM1455 von 0,5 µg/ml festgelegt werden.

5.4.4 Vergleich der HCl-Extraktion mit der PBS-Extraktion am Beispiel der auf + 115°C erhitzten Brühwurstproben mit Rindergehirn:

In diesem Versuch erfolgte eine Gegenüberstellung der HCl-Extraktion mit der PBS-Extraktion, die in den ersten nicht dargestellten Versuchen durchgeführt worden war. Dazu wurde in dem einen Versuchsansatz jeweils 1 g Wurst mit 10 ml **PBS**, im Parallelansatz mit 10 ml 0,1 molarer **HCl** homogenisiert und filtriert

Außerdem wurde sowohl HCl, als auch PBS nativ im Versuch untersucht, um auszuschließen, dass diese beiden Extraktionsmittel selbst zu einer Reaktion führten.

Ergebnisse

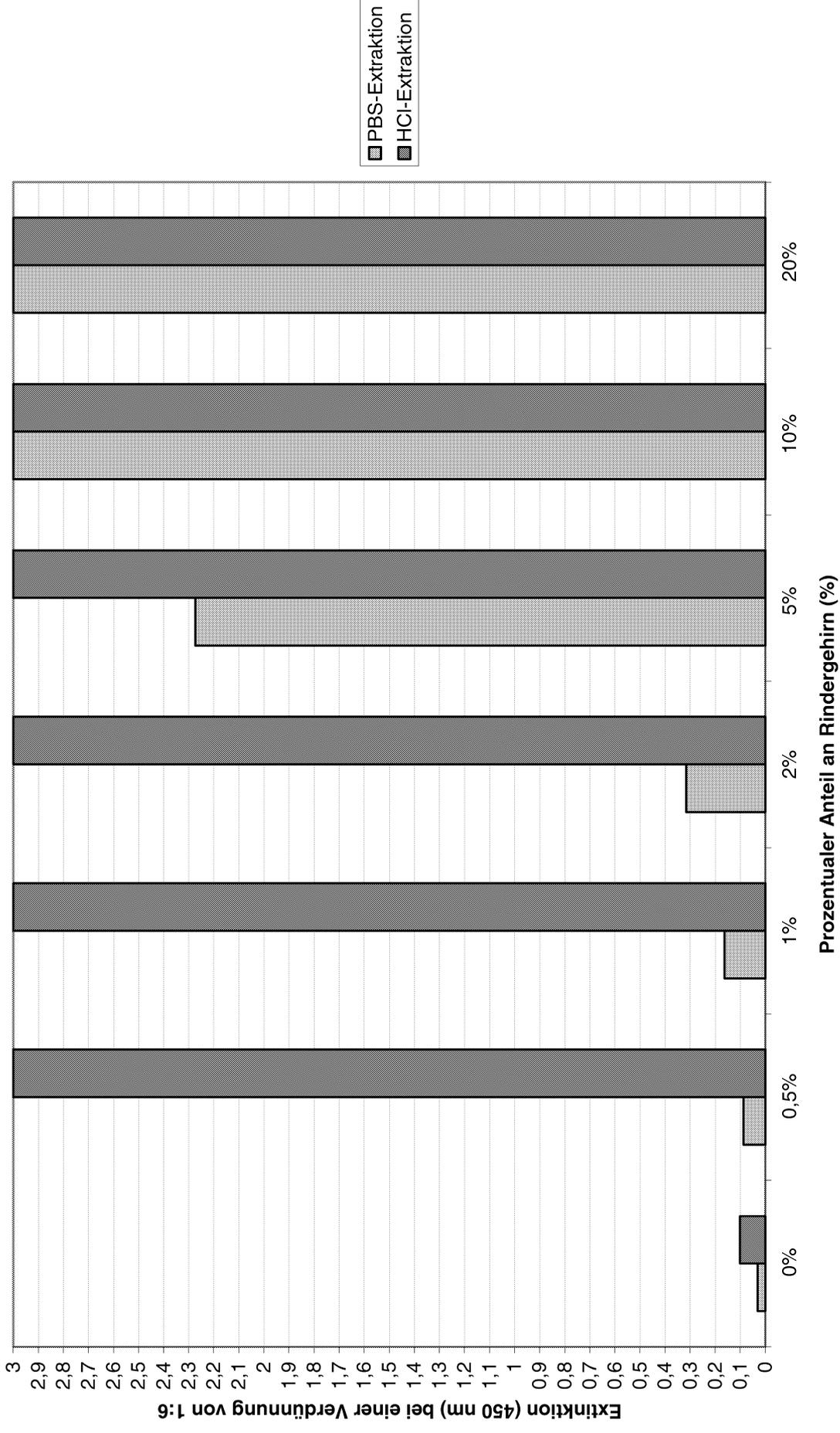


Abbildung 11: Vergleich der HCl-Extraktion mit der PBS-Extraktion an erhitzten Proben (+ 1 15°C) aus Rindfleischbrühwurst

Ergebnisse

In diesem Versuch konnte ermittelt werden, dass weder HCl noch PBS selbst eine Reaktion auslösten (nicht dargestellt), so dass eine Verfälschung der Ergebnisse durch diese beiden Extraktionsmittel ausgeschlossen werden konnte.

Die weiteren Ergebnisse sind in **Abbildung 11** dargestellt. Es ist ersichtlich, dass mit Hilfe der HCl-Extraktion sehr viel höheren Extinktionen ermittelt werden konnten, als bei denselben Proben, die mit PBS extrahiert worden waren. Bei der Probe mit 0,5 % Rindergehirn konnte mit der HCl-Extraktion so viel MBP extrahiert werden, dass es zu einer „over-Reaktion“ kam, während mit der PBS-Extraktion nur so wenig MBP aus der Probe gelöst wurde, dass die Extinktion unter 0.100 lag und der Nachweis somit negativ war.

Gleichzeitig war der Nachweis von MBP in der Probe ohne Rindergehirn unter Nutzung der HCl-Extraktion negativ.

Um diese Differenzen zahlenmäßig ausdrücken zu können, wurden die Titer der beiden Extraktionsverfahren anhand der in diesem Versuch ermittelten Extinktionen errechnet. Dabei ergab sich für die PBS-Extraktion ein Titer von 1,477 und für die HCl-Extraktion ein Titer von 648,5 jeweils bezogen auf die Extinktion 1.000. Durch Division dieser beiden Werte ergab sich, dass die HCl-Extraktion um den Faktor 439 mehr MBP aus den Proben extrahiert, als die PBS-Extraktion. Folglich ist die HCl-Extraktion das weitaus geeignetere Verfahren der Probenaufbereitung.

Ergebnisse

Einfluss des peripheren Nervensystems in Muskelfleisch auf den Nachweis von MBP in Brühwürsten:

Da das MBP sowohl im ZNS wie auch in geringerer Menge im peripheren Nervensystem vorhanden ist, ist es für die Festlegung einer einheitlichen Nachweisgrenze wichtig zu wissen, ob der etablierte ELISA so sensitiv ist, dass er das MBP des PNS nachweist.

Zu diesem Zweck werden in der folgenden **Tabelle 5** die Extinktionen gegenübergestellt, die bei der Messung der **Proben ohne Zusatz von Rindergehirn** bei einer Antikörperkonzentration von 0,5 µg/ml ermittelt werden konnten. Die Werte, bei denen es sich um Mittelwerte handelt, wurden jeweils der 1:6 Verdünnung entnommen. Die Messung der Extinktionen erfolgte bei 450 nm.

Tabelle 5: Einfluss des peripheren Nervensystems auf die Extinktionen

Extinktion	Brühwurst aus Schweinefleisch	Brühwurst aus Rindfleisch
Temperatur		
roh	0.046	0.286
+ 80°C	0.029	0.213
+ 115°C	0.057	0.096

Es ist ersichtlich, dass die Extinktionen bei den Proben aus Schweinefleisch unter 0.100 liegen, weshalb der Nachweis von MBP als negativ bewertet wird. Im Gegensatz dazu liegen die Extinktion des Rindfleischbrätes und der auf + 80°C erhitzten Brühwurst aus Rindfleisch über 0.100, weshalb der Nachweis von MBP durch periphere Nerven als positiv zu beurteilen ist. Bei der auf + 115°C erhitzten Probe tritt ein deutlicher Abfall des Wertes auf.

Anhand dieser Gegenüberstellung ist ersichtlich, dass der entwickelte ELISA so sensitiv ist, dass das bovine MBP des peripheren Nervengewebes in Rindfleischproben nachgewiesen wird.

Ergebnisse

Auch bei den Proben mit Rindergehirn liegen die Werte bei den Rindfleischproben über denen der entsprechenden Proben aus Schweinefleisch, wie aus den Abbildungen 5 bis 10 ersichtlich ist.

Einfluss der Temperaturbehandlung auf den Nachweis von MBP:

Abbildung 12 zeigt den Nachweis von Rindergehirn in **Brühwurst aus Rindfleisch**. In dem Diagramm werden die Ergebnisse, die nach den verschiedenen Temperaturbehandlungen der Proben erzielt wurden, gegenübergestellt. Bei den Extinktionen handelt es sich um Werte aus der 1:3 Verdünnung, die bei einer Antikörperkonzentration (SM1455) von 0,5 µg/ml und einer Wellenlänge von 450 nm gemessen wurden.

Diese Darstellung zeigt, dass mit steigendem ZNS-Zusatz auch die Extinktionen ansteigen. Die Werte sind bei den auf + 80°C erhitzten Proben etwas höher, als bei den rohen und den auf + 115°C erhitzten Proben.

Die Kurven der drei mit verschiedenen Temperaturen behandelten Probenarten verlaufen parallel zueinander, was darauf schließen lässt, dass die Art der Temperaturbehandlung keinen bzw. kaum Einfluss auf die Proben aus Rindfleisch für einen Nachweis von MBP ausübt.

Abbildung 13 stellt den Nachweis von Rindergehirn in **Brühwurst aus Schweinefleisch** dar. Wie in Abbildung 12 werden auch in diesem Diagramm die Ergebnisse, die nach den verschiedenen Temperaturbehandlungen der Proben gewonnen wurden, gezeigt. Bei den Extinktionen handelt es sich um Werte der 1:6 Verdünnung, die bei einer Antikörperkonzentration (SM1455) von 0,5 µg/ml und einer Wellenlänge von 450 nm gemessen wurden.

Es ist ersichtlich, dass bei den auf + 80°C erhitzten Proben der Anstieg der Extinktionen zwischen einem Gehalt an Rindergehirn von 0,01 zu 0,1 % größer ist, als bei den anderen Proben. Damit ist der Nachweis von MBP in diesen auf + 80°C erhitzten Proben sensitiver, als bei den rohen und den auf + 115°C erhitzten Proben. Die niedrigsten Extinktionen sind, bezogen nur auf die Proben mit ZNS-Zusatz, bei den rohen Proben zu verzeichnen, weshalb hier der Nachweis im Vergleich zu erhitzten Proben weniger sensitiv ist.

Ergebnisse

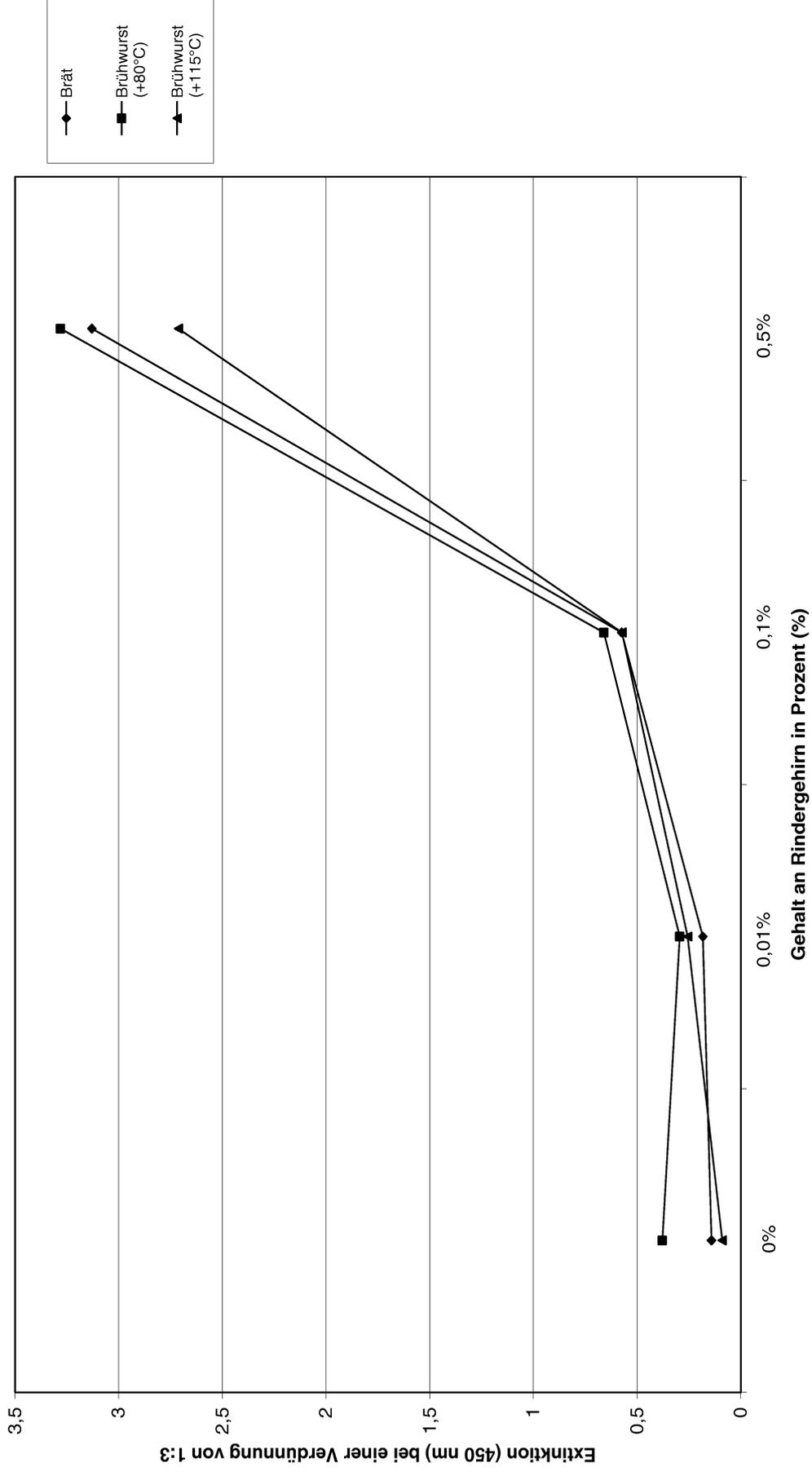


Abbildung 12: Einfluss der Temperaturbehandlung auf den Nachweis von MBP in Brühwurst aus Rindfleisch

Ergebnisse

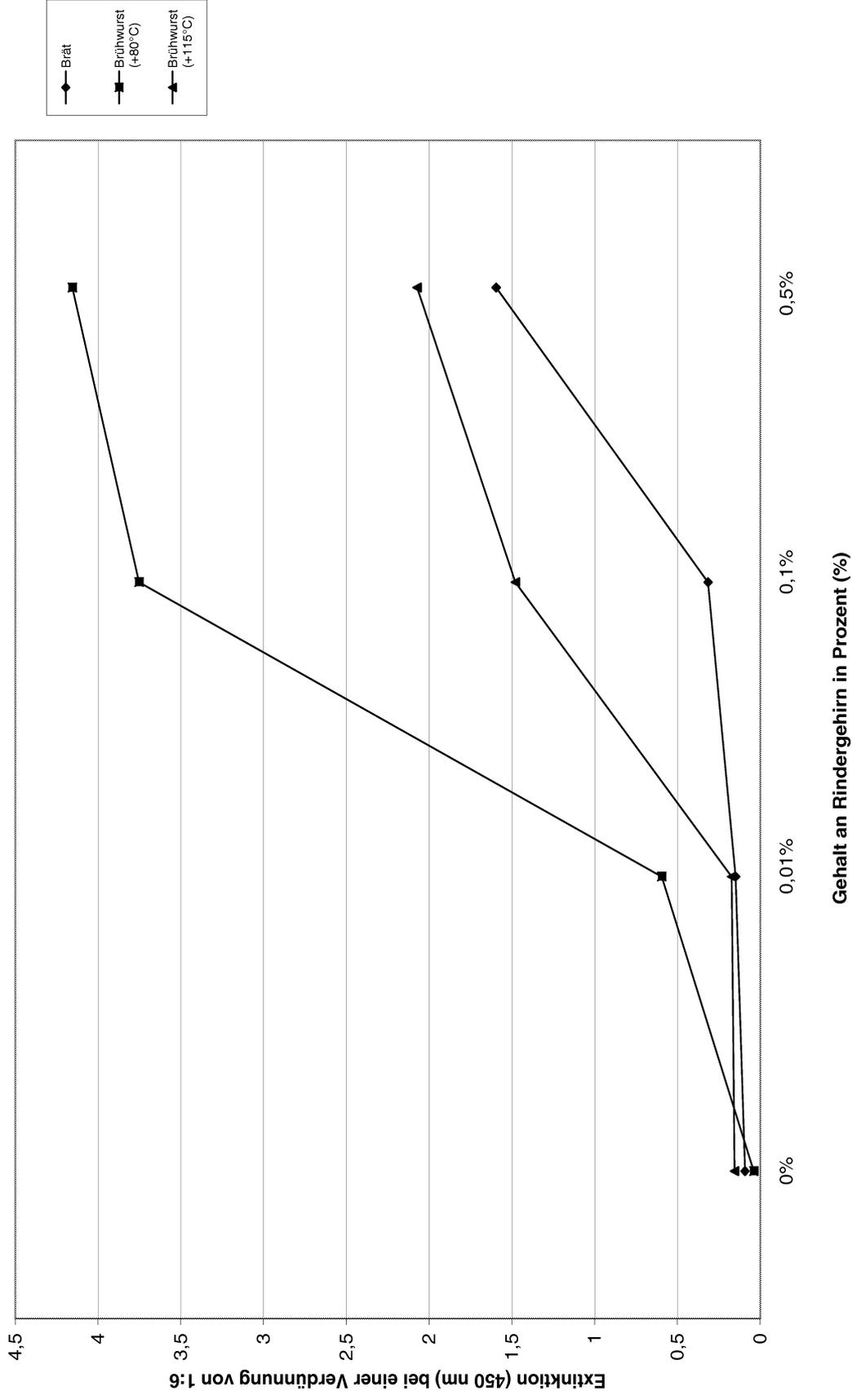


Abbildung 13: Einfluss der Temperaturbehandlung auf den Nachweis von MBP in Brühwurst aus Schweinefleisch

5.5 Innereien von Rind und Schwein

Neben dem peripheren Nervengewebe im Muskelfleisch war auch von Interesse, ob mit dem Antikörper SM1455 in Innereien Nervengewebe nachweisbar war. Die Auswahl der untersuchten Innereien wurde entsprechend der „Leitsätze für Fleisch und Fleischerzeugnisse“ getroffen und beinhaltete Leber, Herz, Zunge ohne Schleimhaut, Niere, Milz und Lunge von Rind und Schwein.

Zum einen wurden die Innereien nativ, zum anderen nach einer 30 minütigen Erhitzung untersucht. Die Probenextraktion wurde analog zur Extraktion der Brühwurstproben durchgeführt, indem 1 g Probe mit 10 ml 0,1 molarer HCl homogenisiert und anschließend filtriert wurde.

5.5.1 Innereien des Schweins:

Zunächst wurden die Organe vom Schwein untersucht und die Ergebnisse in **Abbildung 14** dargestellt.

Ergebnisse

Nachweis von MBP in Innereien des Schweins

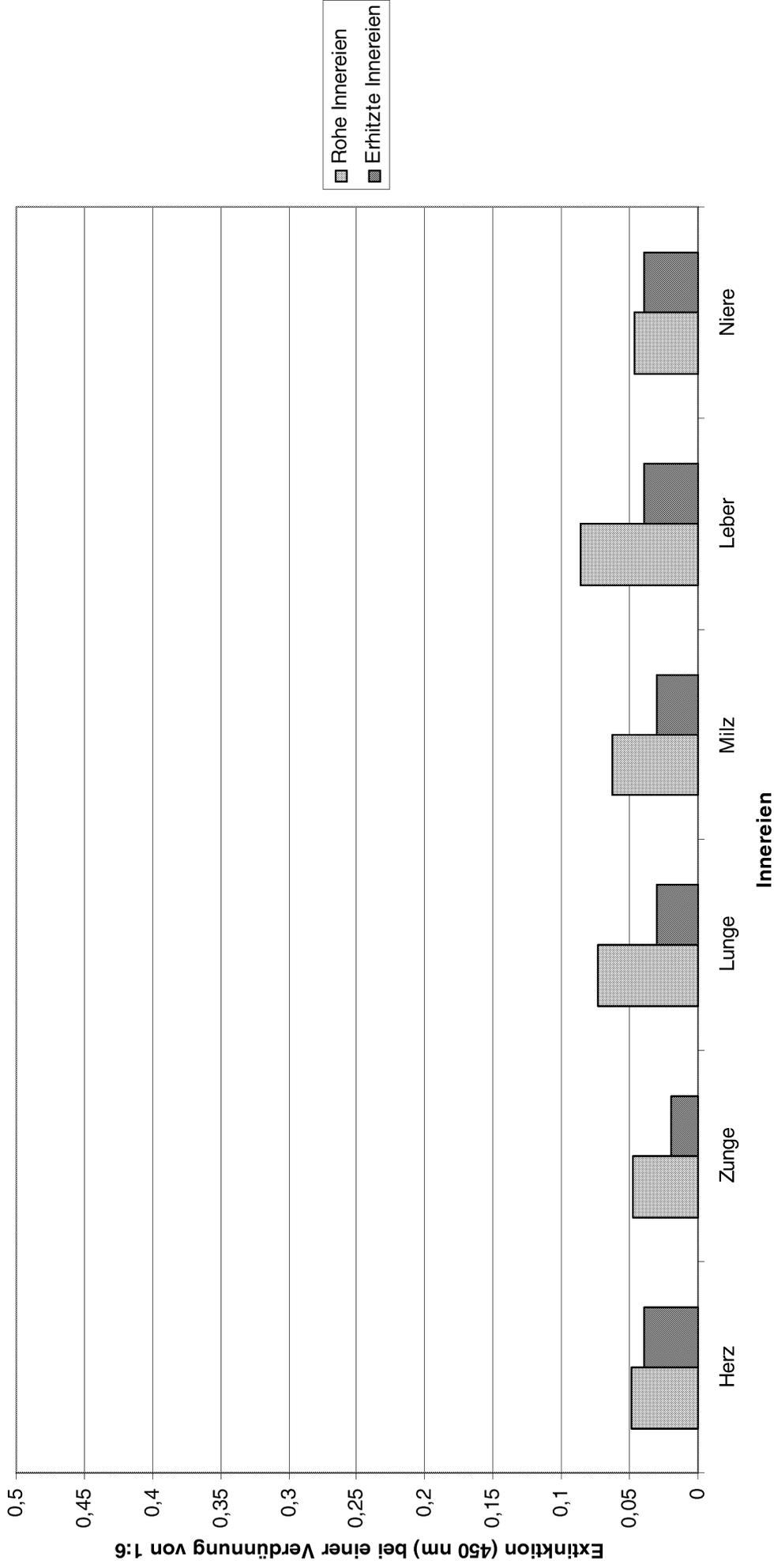


Abbildung 14: Nachweis von MBP in Innereien des Schweins

Ergebnisse

Wie in **Abbildung 14** ersichtlich ist, liegen die Extinktionen aller Organe des Schweins unter 0.100. Damit kann der Nachweis von MBP in den untersuchten Innereien als negativ bewertet werden und eine Beeinflussung von Messergebnissen ist in Fleischerzeugnissen durch diese Innereien nicht zu erwarten.

5.5.2 Innereien des Rindes:

Da der etablierten ELISA so sensitiv war, dass peripheres Nervengewebe im Muskelfleisch des Rindes detektiert wurde, war es wichtig zu untersuchen, ob eine Beeinflussung von Messergebnissen durch bovine Innereien in Fleischerzeugnissen möglich ist.

Ergebnisse

Nachweis von MBP in Innereien des Rindes

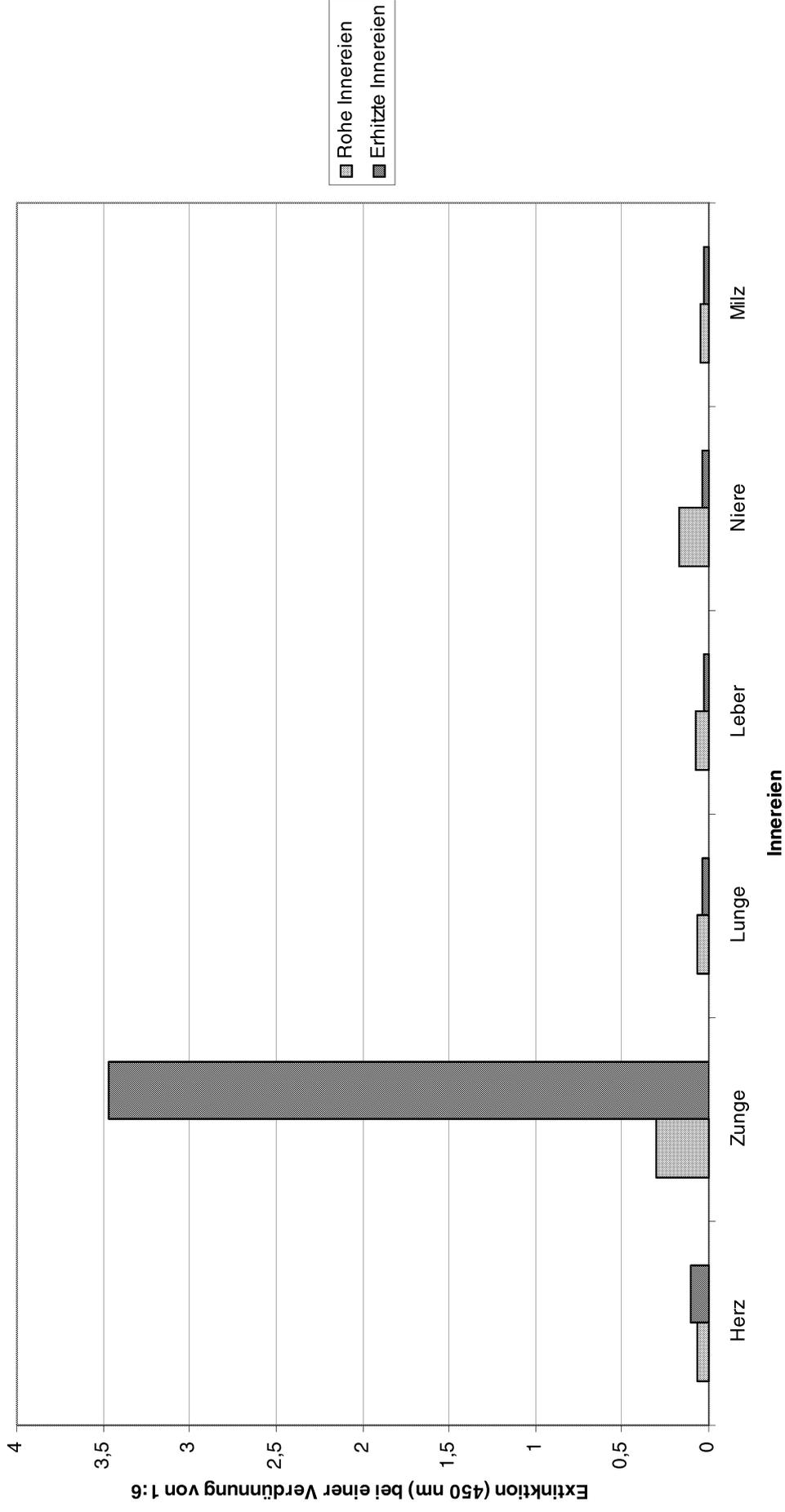


Abbildung 15: Nachweis von MBP in Innereien des Rindes

Ergebnisse

Bei der Untersuchung von Lunge, Leber, Milz und erhitzter Niere des Rindes ergaben sich nur Extinktionen, die unter 0.100 lagen und somit als negativ beurteilt wurden.

Bei der rohen Rinderniere kam es in Zusammenwirken mit der Salzsäure zu einer Hintergrundreaktion, die in den verschiedenen Verdünnungsstufen nicht abnahm. Dieser Versuch wurde sowohl mit Salzsäure, als auch mit PBS wiederholt, wobei sich ergab, dass bei der PBS-Extraktion keine Hintergrundreaktion auftrat. Deshalb scheint diese Reaktion durch den Kontakt von HCl mit rohem Rindernierengewebe bedingt zu sein. Die Wiederholung dieses Versuches mit Salzsäure führte wiederum zu einer Hintergrundreaktion.

Bei der Untersuchung von erhitztem Rinderherz wurden Extinktionen ermittelt, die durchschnittlich bei 0.100 lagen. Diese Untersuchung wurde zweimal durchgeführt, wobei einmal Werte knapp über 0.100 und beim zweiten Mal unter 0.100 ermittelt wurden. Folglich ist davon auszugehen, dass im Zusammenhang mit erhitztem Rinderherz Extinktionen über 0.100 möglich sind, die als positiv zu bewerten wären.

Beim Rind ergab die Zunge sowohl roh, wie auch erhitzt einen positiven Nachweis für MBP. Die Extinktionen der rohen Zunge lagen unter 0.500, während die erhitzte Zunge zu Werten über 3.000 führte.

Die Ursache für die hohen Extinktionen der Zunge ist in der Vielzahl von Nerven zu suchen, die in der Zunge vorhanden sind. Dazu zählen der Ramus lingualis, der Nervus glossopharyngeus, der Nervus vagus und der Nervus lingualis, die für die Sensibilität zuständig sind, die Chorda tympani, die die Geschmacksempfindung ermöglicht und der Nervus hypoglossus, der die Zunge motorisch innerviert (DYCE et al., 1997).

In den „Leitsätzen für Fleisch und Fleischerzeugnisse“ sind verschiedene Wurstsorten aufgeführt, denen Zunge zugesetzt werden kann, wobei aber keine Festlegung auf eine Tierart erfolgt. Am Bekanntesten sind dabei die Zungenwurst, die auch Süddeutsche Mortadella genannt wird und die Zungenblutwurst, die nicht unter 35 % Zungeneinlage enthalten darf.

Jedoch stellt die positive Reaktion bei der Untersuchung von Rinderzunge in der Praxis keine Einschränkung des erarbeiteten Nachweisverfahrens dar, da

Ergebnisse

Rinderzunge deutlich teurer als Schweinezunge ist und deshalb als Delikatesse am Stück verkauft wird, wohingegen Schweinezunge zu Fleischerzeugnisse zugefügt wird. Häufig wird versucht, die Kosten der Herstellung von Fleischerzeugnissen noch weiter zu senken. Dies kann dadurch erfolgen, dass, unter Deklarationsänderung, Einlagen von Schweinezunge durch gepökelttes Schweinefleisch ersetzt werden.

Aus den Ergebnissen der Untersuchung von Innereien des Rindes kann zusammenfassend festgestellt werden, dass zwar bei roher Niere, erhitztem Herz und roher Zunge Extinktionen über bzw. bei 0.100 zu erwarten sind. Allerdings schränken diese Ergebnisse die Verwendung dieses Testsystems nicht ein, da der mit der Nachweisgrenze verbundene Cut-off bei 0.500 festgelegt wird, wie in Kapitel 5.7 erläutert wird.

5.6 Handelsübliche Leberwurst

Wie in Kapitel 3.1.9 erwähnt, konnte bis vor einigen Jahren in manchen Leberwürsten ZNS nachgewiesen werden. Deshalb, und um das entwickelte Nachweisverfahren an einem handelsüblichen Fleischerzeugnis auszuprobieren, wurde eine Delikatessleberwurst untersucht. Der Nachweis fiel negativ aus.

5.7 Bestimmung der Nachweisgrenze

Die Nachweisgrenze ergab sich aus den durchgeführten Versuchen und sollte möglichst einheitlich sein. Durch Vergleich der Extinktionen der 1:6 Verdünnung konnte ein Anteil von 0,1 % Rindergehirn als niedrigster gemeinsamer Nenner ermittelt werden, wobei der Cut-off 0.500 betrug.

Die Nachweisgrenze wird auf 0,1 % Rindergehirn in Brühwurst bzw. Fleischerzeugnissen mit einem Cut-off von 0.500 festgelegt. Die Antikörperkonzentration von SM1455 beträgt 0,5 µg/ml.

Dies bedeutet für die Untersuchungen von Brühwurst, dass im Falle von gemessenen Extinktionen von 0.500 und darüber mindestens 0,1 % ZNS vom Rind in die Herstellung der Brühwurst einbezogen wurde.

Diese Nachweisgrenze kann für alle Brühwurstproben gelten, mit Ausnahme der **Proben aus Schweinefleischbrät**. Hier betragen die Extinktionen bei der Probe mit 0,1 % Rindergehirn im Durchschnitt 0.268 und liegen damit unter 0.500. Dementsprechend gibt es für die Proben aus Schweinefleischbrät zwei Möglichkeiten, eine Nachweisgrenze zu bestimmen. Entweder die Nachweisgrenze liegt bei 0,1 % Zusatz an Rindergehirn und der Cut-off beträgt 0.200, oder sie wird auf 0,4 % ZNS-Gehalt festgelegt, wobei der Cut-Off dann bei 0.500 liegt.

Die Extinktionen der erhitzten Rinderzunge und vom erhitzten Schweinegehirn lagen in der 1:6 Verdünnung über 0.500 und würden damit in der Theorie eine Einschränkung dieser Nachweisgrenze darstellen. In der Praxis jedoch bestehen diese Einschränkungen nicht, da Rinderzunge, wie in Kapitel 5.5.2 erläutert, nicht in Fleischerzeugnissen verwendet wird. In Bezug zum Schweinegehirn ist festzustellen, dass in Versuch 5.2 reines Schweinegehirn untersucht wurde, welches jedoch in Fleischerzeugnissen durch die anderen Zutaten verdünnt vorliegen würde. Um festzulegen, ab welchem Prozentanteil an Schweinegehirn in Fleischerzeugnissen ein positiver Nachweis von MBP vorliegen würde, werden zusätzliche Versuche zu dieser Fragestellung erfolgen.

6 Diskussion

Die Zielsetzung dieser Arbeit war es, einen speziesspezifischen Test zum Nachweis von bovinem ZNS in Fleischerzeugnissen zu entwickeln. Da Rinder von der Krankheit BSE betroffen sein können, besteht bei Verzehr von infiziertem Rindergehirn die Gefahr der Übertragung dieser Krankheit auf den Menschen. Die beiden Testkits RIDASCREEN® Risk Material Test und ScheBo® Brainostic™ Test, die bereits im Handel erhältlich waren, können nicht zwischen Nervengewebe vom Rind und vom Schwein unterscheiden. Dies ist aber wichtig, weil bei Schweinen bisher noch keine natürliche Prioneninfektion nachgewiesen wurde, und das Gehirn dieser Tierart deshalb nach dem derzeitigen Stand der Wissenschaft kein Risiko darstellt. Auch im Hinblick auf in verschiedenen Untersuchungen beobachtete falschpositive Reaktionen des einen Testsystems gegenüber Schweine- und Geflügelfleisch (HORLACHER et al., 2001 und 2002b), die zu wirtschaftlichen Folgen für die Hersteller geführt haben, war die Erstellung eines speziesspezifischen Nachweisverfahrens notwendig.

Anforderungen an das Myelin Basic Protein

Die beiden wichtigsten Voraussetzungen für die Etablierung eines solchen Nachweises bestanden darin, dass der Marker spezifisch für Nervengewebe war und Sequenzunterschiede aufwies, die eine Differenzierung der Tierarten erlaubte. Wünschenswert wäre es auch gewesen, wenn dieses Protein auf das ZNS begrenzt wäre, damit die Messergebnisse nicht durch periphere Nerven verfälscht werden könnten.

Im Rahmen der Recherche wurde das Myelin Basic Protein (MBP) ermittelt, welches nur im Myelin vorkommt (LEES et al., 1984) und somit spezifisch für Nervengewebe ist. Es ist im ZNS und auch im PNS vorhanden. Von Vorteil ist allerdings, dass der Gehalt an MBP im peripheren Nervensystem um ungefähr die Hälfte geringer ist als im ZNS (KURSULA, 2001). Dies führt dazu, dass das periphere Nervengewebe die Ergebnisse beeinflusst, was beim Vergleich der Extinktionen der untersuchten Proben aus Schweinefleisch mit denen aus Rindfleisch ersichtlich ist. Aus diesem Grund musste die Nachweisgrenze auch bei einem höheren prozentualen Anteil an

Diskussion

Rindergehirn in Fleischerzeugnis festgelegt werden. Trotzdem ist festzustellen, dass, wie noch erläutert werden wird, die Nachweisgrenze unter der des RIDASCREEN® Risk Material Testes und des ScheBo® Brainostic™ Testes liegt.

Spezifität des MBP-ELISA

Obwohl das MBP von Rind und Schwein weitgehend übereinstimmende Sequenzen hat, war eine Differenzierung aufgrund eines Sequenzunterschiedes in Position 129-139 möglich. HRUBY et al. (1984) und MENDZ et al. (1985) beobachteten, dass die Herstellung eines monoklonalen Antikörpers, der spezifisch an das bovine Epitop bindet, möglich ist. Dieser Antikörper wurde in den eigenen Untersuchungen eingesetzt und ermöglichte einen sehr sensitiven und spezifischen Nachweis von bovinem MBP und damit von Nervengewebe des Rindes.

Während es bei der rohen Probe aus Schweinegehirn zu keiner Reaktion mit dem Antikörper kam, war bei den erwärmten Proben aufgrund der Erhitzung eine geringe falschpositive Reaktion zu beobachten. Diese ist vermutlich durch die im Epitop des porcinen MBP vorhandenen Prolin bedingt. Beim Prolin handelt es sich um eine aromatische Aminosäure, deren aromatischer Ring möglicherweise durch die Erhitzung zerstört wird. Aufgrund der großen strukturellen Ähnlichkeit zwischen der Aminosäure Serin, welche im Epitop des bovinen MBP vorliegt und dem Prolin ist denkbar, dass der verwendete monoklonale Antikörper an das porcine MBP binden kann, wenn der aromatische Ring des Prolin durch die Erhitzung zerstört ist.

Beim Einsatz von Schweinegehirn in Fleischerzeugnissen wird es durch die anderen Zutaten zu einer Verdünnung kommen. Um eine Aussage zu treffen, welcher prozentuale Anteil von Schweinegehirn zu einem positiven Nachweis von MBP und somit von ZNS führt, werden noch Untersuchungen durchgeführt.

Auch die Untersuchung von Gehirn vom Huhn führte zu keiner Reaktion mit dem monoklonalen Antikörper.

Zusammenfassend kann festgestellt werden, dass der etablierte MBP-ELISA speziesspezifisch gegenüber Hühnergehirn ist. In Bezug zu Schweinegehirn besteht eine eingeschränkte Speziesspezifität. Somit wurde mit diesem Nachweisverfahren ein Fortschritt gegenüber dem RIDASCREEN® Risk Material Test und dem ScheBo® Brainostic™ Testes erzielt.

Diskussion

Eigenschaften des MBP

Weiterhin handelt es sich bei Fleischerzeugnissen um Untersuchungsmaterial, welches bei der Herstellung in vielen Fällen Hitze ausgesetzt wird und mit Salzen und Gewürzen versetzt wird. Aus der Literatur ist bekannt, dass der Nachweis der Neuronenspezifischen Enolase, die dem ScheBo[®] Brainostic[™] Test zugrunde liegt, temperaturabhängig ist (LÜCKER et al., 2000; NAGEL et al., 2002), und dass die Detektion des Sauren Gliafaserproteins, welches der Marker des RIDASCREEN[®] Risk Material Test ist, durch die Zugabe von Gewürzen beeinträchtigt ist (SCHMIDT et al., 2001). Deshalb ist es von Vorteil, dass der gefundene Marker eine Unempfindlichkeit gegenüber Hitze und Chemikalien aufweist.

Anhand der Literatur war ersichtlich, dass eine solche Widerstandsfähigkeit gegenüber Erhitzung (EYLAR et al., 1970; GROOME, 1980) und Chemikalien (EYLAR et al., 1970, GROOME, 1980) beim MBP vorlag. In den eigenen Versuchen konnte dies eindrucksvoll bestätigt werden. Obwohl das MBP lang anhaltenden hohen Temperaturen ausgesetzt war und Nitritpökelsalz in das Brät untergemischt worden war, konnte das MBP auch in Brühwürsten mit sehr niedrigen ZNS-Anteilen deutlich nachgewiesen werden.

Nachweis von MBP in Innereien

Da in Fleischerzeugnissen entsprechend der Leitsätze auch Innereien wie Herz, Lunge, Leber, Milz, Zunge ohne Schleimhaut und Niere vorhanden sein können, wurden auch diese Organe auf MBP hin untersucht. Dabei zeigte sich, dass die Rinderzunge aufgrund ihrer starken Innervierung (DYCE et al., 1997) zu einem positiven Nachweis führte. Jedoch im Gegensatz zu den entsprechend der „Leitsätze für Fleisch und Fleischerzeugnisse“ möglichen Verarbeitungstechnologien wird die Rinderzunge, aufgrund ihres Preises, überwiegend am Stück verkauft. Alle anderen untersuchten Innereien führten zu Extinktionen, die unter dem zur Nachweisgrenze gehörenden Cut-off von 0.500 liegen und können somit die Ergebnisse nicht verfälschen.

Probenextraktion

Zunächst wurden die Proben ausschließlich mit PBS extrahiert, da es sich aufgrund des pH-Wertes hierbei um ein gängiges Extraktionsmittel handelt. Das mit PBS gewonnene Extrakt konnte sofort in die Mikrotiterplatte pipettiert werden, da durch

Diskussion

den neutralen pH-Wert ein geeignetes Milieu für die Bindung der Proteine an die Mikrotiterplatte gegeben ist.

Um die Ergebnisse zu verbessern, wurde nach Hinweisen aus der Literatur (DEIBLER et al., 1972, GROOME, 1980, LEES et al., 1984, TAKAMATSU et al., 1992) eine Extraktion mit Salzsäure erprobt. Um hierbei den neutralen pH-Wert für die Bindung an die ELISA-Platte zu gewährleisten, wurde Bikarbonat in die Kavitäten der Mikrotiterplatten vorgelegt.

Im Vergleich dieser beiden Extraktionsmittel zeigte sich, dass die Salzsäure deutlich mehr MBP aus den Proben extrahierte, als das PBS und deshalb zur Verbesserung des MBP-ELISA beitrug. Deshalb wurden die Proben in allen weiteren Versuchen mit Salzsäure extrahiert.

Indirekter ELISA

Da es sich bei den Extrakten von Gehirn und Brühwurst um sehr heterogene Gemische handelte, wurde zu Beginn mit drei verschiedenen Detektionsantikörpern gearbeitet, um eventuell einen Sandwich-ELISA zu etablieren. Da sich jedoch der anfänglich durchgeführte indirekte ELISA zum Nachweis von reinem MBP als geeignet erwies, wurde auch in allen folgenden Versuchen darauf zurückgegriffen.

Sensitivität

Zurzeit sind der RIDASCREEN® Risk Material 10/5 Test und der RIDASCREEN® Risk Material Test der Firma R-Biopharm im Handel erhältlich, die beide das Saure Gliafaserprotein nachweisen. Die Nachweisgrenze des ersten Testes beträgt 0,1 % ZNS-Gewebe (N.N., 2002e), die vom RIDASCREEN® Risk Material 0,2 % ZNS-Gewebe. (N.N., 2001d).

Der ScheBo® Brainostic™ Test, der die Neuronenspezifische Enolase detektiert, wurde aus dem Handel genommen. Vermutlich wurde dieser Test aufgrund seiner geringeren Sensitivität, seiner längeren Durchführungszeit und seines höheren Preises gegenüber dem RIDASCREEN® Risk Material 10/5 Test zu wenig nachgefragt (Kapitel 3.1.10.1). Die Nachweisgrenze dieses Verfahrens lag bei 0,25 % ZNS-Gewebe (N.N., 2001c).

Im Vergleich zu diesen Testsystemen, die Nervengewebe tierartunabhängig in Fleischerzeugnissen nachweisen, ist der in dieser Arbeit entwickelte MBP-ELISA mit

Diskussion

einer Nachweisgrenze von 0,1 % Rindergehirn in Brühwurst bzw. Fleischerzeugnissen sensitiver.

Anwendung des MBP-ELISA nach Holtbecker und Stolle

Bei dem in diesem Forschungsvorhaben etablierten indirekten ELISA handelt es sich um ein sensibles und spezifisches Nachweisverfahren, welches in kurzer Zeit durchgeführt werden kann.

Die Testdauer betrug in den Versuchen insgesamt einen Arbeitstag, wobei diese Zeit durch die Anzahl der aufzuarbeitenden Proben, die in den Versuchen möglichst hoch war, beeinflusst ist. Im Rahmen der Entwicklung eines Testkits wird sich die Dauer wahrscheinlich verkürzen lassen. Zurzeit finden Besprechungen mit der Industrie über die Herstellung eines kommerziell erhältlichen Testkits statt.

Die Probenaufarbeitung ist bei anderen Verfahren, wie zum Beispiel der Immunhistochemie, oder anderen Markern (SANDMEIER et al., 2003) arbeitsaufwendig. Beim MBP-ELISA kann sie innerhalb kurzer Zeit durchgeführt werden, wobei die parallele Aufarbeitung einer Reihe von Proben möglich ist.

Eine Anwendung kann in jedem Labor ohne zusätzlichen apparativen Aufwand stattfinden, wobei die Handhabung nach einer Einarbeitungsphase keine Schwierigkeiten darstellt.

Im Sinne des Verbraucherschutzes besteht ein Bedarf an einem speziesspezifischen Testsystem, wie es in dieser Studie entwickelt wurde, da nach wie vor weltweit BSE-Fälle auftreten.

Immer wieder auch in Ländern, die bis zu einem positiven Nachweis als frei von BSE galten, wie das Beispiel der USA zeigt, bei denen Anfang des Jahres 2004 bei einem Rind BSE nachgewiesen wurde.

Mit diesem Testsystem könnte auch der Warenverkehr in der EU und mit Drittländern überprüft werden, um sicherzustellen, dass EU-Vorgaben wie die Behandlung von Rindergehirn als SRM und nicht als Zutat für Fleischerzeugnisse eingehalten werden.

7 Schlussfolgerungen

1. Aufgrund seiner Eigenschaften ist das MBP ein geeigneter Marker für den Nachweis von Nervengewebe in Fleischerzeugnissen.
2. Der MBP-ELISA ermöglicht einen sensitiven und spezifischen Nachweis von bovinem Nervengewebe.
3. Eine Anwendung ist bei rohen und erhitzten Fleischerzeugnissen möglich.
4. Im Gegensatz zu anderen Ansätzen zur Entwicklung eines speziesspezifischen Nachweisverfahrens von bovinem ZNS in Fleischerzeugnissen, wie Nachweis von m-RNA oder Bestimmung der Fettsäuremethylester, handelt es sich beim MBP-ELISA um ein praxistaugliches und unaufwendiges Nachweisverfahren.

8 Zusammenfassung

Bis vor wenigen Jahren war es üblich, Gehirne von Rindern und Schweinen in Fleischerzeugnisse zu mischen. Erst nachdem die Bovine Spongiforme Enzephalopathie entdeckt worden war, wurde Rindergehirn zum Spezifizierten Risikomaterial deklariert, da bei einer Infektion vor allem in diesem Organ die pathogenen Prionen vorhanden sind.

Daraufhin entwickelte Testsysteme zum Nachweis von ZNS in Fleischerzeugnissen ermöglichten keinen gezielten Nachweis von bovinem Nervengewebe. Dies führte im Falle eines Testsystems zu falschpositiven Ergebnissen bei Schweinefleisch und Geflügelfleisch, begleitet von wirtschaftlichen Folgen für die Hersteller von Fleischerzeugnissen.

In dieser Arbeit wurde ein speziesspezifisches Nachweisverfahren für bovines Nervengewebe in Fleischerzeugnissen entwickelt. Dabei handelt es sich um einen indirekten ELISA, der auf der Detektion des Myelin Basic Protein (MBP) basiert. Unter Verwendung eines monoklonalen Antikörpers wird ein kontinuierliches Epitop dieses Proteins nachgewiesen. Dieses Epitop ist wahrscheinlich auch dafür verantwortlich, dass der Nachweis des MBP auch nach lang anhaltenden und hohen Temperaturen, die zur Denaturierung anderer Proteine führen würden, noch möglich ist.

Die Nachweisgrenze konnte auf 0,1 % Rindergehirn in Brühwurst bzw. Fleischerzeugnissen mit einem Cut-off von 0.500 festgelegt werden. Damit stellt der etablierte MBP-ELISA ein sensitives Verfahren dar, welches den speziesspezifischen Nachweis von bovinem Nervengewebe in Fleischerzeugnissen ermöglicht.

Für den Verbraucherschutz wird mit dem MBP-ELISA die Möglichkeit eröffnet, das Verwendungsverbot von Rindergehirn zu kontrollieren.

9 Summary

Detection of bovine nerve tissue as specified risk material in meat products via development of a species-specific ELISA suitable for routine analysis based on the Myelin Basic Protein

Some years ago, it was common practice to include brains of cattle and pigs in meat products. Shortly after the emergence of Bovine Spongiforme Encephalopathy, bovine brain was declared as specified risk material, due to the fact that, in case of an infection, pathogenic prions are mainly present in this organ.

Test systems, which were thereupon developed for the detection of central nervous system tissue in meat products did not allow the specific detection of bovine nerve tissue. One test system, even yielded false positive results for pork and poultry meat, a fact which was accompanied by commercial consequences for some producers of meat products.

In this study, a method was generated for the species-specific detection of bovine nerve tissue in meat products. The method is an indirect ELISA, based on the detection of Myelin Basic Protein (MBP), using a monoclonal antibody against a continuous epitope. The detection of MBP is even possible after extended treatment at high temperatures, which is probably due to the continuous epitope.

The detection limit was set at 0,1% bovine brain in scalding sausages, respectively meat products, with a cut-off of 0.500. Therefore, the MBP-ELISA is a sensitive method for the species-specific detection of bovine nerve tissue in meat products.

Taking into consideration consumer protection aspects, the MBP-ELISA thus provides the means to control the absence of bovine brain in meat products.

10 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: In Europa zugelassene Schnelltests	13
Tabelle 2: Spezifiziertes Risikomaterial (SRM) bei Rindern laut VO (EG) 1139/2003 vom 27.06.2003.....	14
Tabelle 3: Für die verschiedenen Marker durchgeführte Verfahren.....	37
Tabelle 4: Antikörper	49
Tabelle 5: Einfluss des peripheren Nervensystems auf die Extinktionen.....	79
Tabelle 6: Recherchierte Proteine	117

11 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Topographie des Lendenbereichs (N.N., 2002g)	25
Abbildung 2: Strukturformeln von Prolin und Serin	42
Abbildung 3: Vergleich der Bindung verschiedener Antikörper an bovinem MBP	58
Abbildung 4: Untersuchung der Kreuzreaktivität des verwendeten Antikörpers	61
Abbildung 5: Nachweis von MBP in Proben aus Schweinefleischbrät	64
Abbildung 6: Nachweis von MBP in erhitzten Proben (+ 80°) aus Schweinefleischbrühwurst	66
Abbildung 7: Nachweis von MBP in erhitzten Proben (+ 115°C) aus Schweinefleischbrühwurst	68
Abbildung 8: Nachweis von MBP in Proben aus Rindfleischbrät	71
Abbildung 9: Nachweis von MBP in erhitzten Proben (+ 80°C) aus Rindfleischbrühwurst	73
Abbildung 10: Nachweis von MBP in erhitzten Proben (+ 115°C) aus Rindfleischbrühwurst	75
Abbildung 11: Vergleich der HCl-Extraktion mit der PBS-Extraktion an erhitzten Proben (+ 115°C) aus Rindfleischbrühwurst	77
Abbildung 12: Einfluss der Temperaturbehandlung auf den Nachweis von MBP in Brühwurst aus Rindfleisch	81
Abbildung 13: Einfluss der Temperaturbehandlung auf den Nachweis von MBP in Brühwurst aus Schweinefleisch	82
Abbildung 14: Nachweis von MBP in Innereien des Schweins	84
Abbildung 15: Nachweis von MBP in Innereien des Rindes	86

12 Abkürzungsverzeichnis

BgVV	Bundesinstitut für gesundheitlichen Verbraucherschutz und Veterinärmedizin
BfR	Bundesinstitut für Risikobewertung
BSE	Bovine Spongiforme Encephalopathie
bzw.	beziehungsweise
°C	Grad Celsius
CJD	Creutzfeldt-Jakob Krankheit
CWD	Chronic Wasting Disease
DLG	Deutsche Landwirtschafts-Gesellschaft
ELISA	Enzyme Linked Immunosorbent Assay
FAME	Fettsäuremethylester
g	Gramm
GC-MS	Gaschromatographie- Massenspektroskopie
GFAP	Glial Fibrillary Acidic Protein
HCl	Salzsäure
H ₂ CO ₃	Bicarbonat
H ₂ O ₂	Wasserstoffperoxid
HRP	Horseradishperoxidase/ Meerrettichperoxidase
H ₂ SO ₄	Schwefelsäure
i.m.	intramuskulär
INV	Integriertes Nachweisverfahren
i.p.	intraperitoneal
KH ₂ PO ₄	Kaliumdihydrogenphosphat
l	Liter
LS.-Nr.	Leitsatz-Nummer
M	Mol
MBP	Myelin Basic Protein
mg	Milligramm
ml	Milliliter
m-RNA	messenger-RNA

Abkürzungsverzeichnis

NaCl	Natriumchlorid
Na ₂ CO ₃	Natriumcarbonat
NaHCO ₃	Natriumhydrogencarbonat
Na ₂ HPO ₄	di-Natriumhydrogenphosphat-Dihydrat
nm	Nanometer
NMR	magnetische Kernresonanzspektroskopie
NSE	Neuronenspezifische Enolase
OSP	Oligodendrocyte Specific Protein
PBS	Phosphate Buffered Saline
PCR	Polymerase Kettenreaktion
PNS	Peripheres Nervensystem
PrP	Prionprotein
PrP ^C	celluläres Prionprotein
PrP ^{Sc}	pathogenes Prionprotein
RNA	Ribonukleinsäure
SRM	Spezifiziertes Risikomaterial
TSE	Transmissible Spongiforme Encephalopathie
vCJD	neue Variante der Creutzfeld-Jakob Krankheit
VO	Verordnung
ZNS	Zentrales Nervensystem
RT-PCR	Reverse Transkription-Polymerase Kettenreaktion
RFLP	Restriktionsfragmentlängenpolymorphismus
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
usw.	und so weiter

13 Literaturverzeichnis

ANIL M.H., LOVE S., HELPS C.R., MCKINSTRY J.L., BROWN S.N., PHILIPS A., WILLIAMS S., SHAND A., BAKIREL T. AND HARBOUR D. (2001) Jugular venous emboli of brain tissue induced in sheep by the use of captive bolt guns. Veterinary Record 148: 619-620

AUPPERLE H., LÜCKER E., OVERHOFF M. UND SCHOON H.-A. (2002) Verfahren zum Nachweis von im Hinblick auf die BSE unerwünschten Zutaten in Fleischerzeugnissen. Fleischwirtschaft 3: 100-104

BANDICK N. (2003) Fleischgewinnung unter dem Gesichtspunkt der BSE. Fleischwirtschaft 7: 107-108

BENTHLIN F. (1940) Die Fleischwarenherstellung Band II, Die Leberwurst. Verlag Hans Holzmann

BERG C., SCHOEN H. UND WESTARP J. (2002) Untersuchungen von Fleisch und Fleischerzeugnissen auf ZNS-Gewebe. Fleischwirtschaft 5: 105-107

BgVV (2001) Fleischhygienerechtliche Maßregelungen von Tierkörpern bei positivem BSE-Befund. Stellungnahme des BgVV vom 10.1.2001

BOSQUE P.J., RYOU C., TELLING G., PERETZ D., LEGNAME G., DEARMOND S.J. AND PRUSINER S.B. (2002) Prions in skeletal muscle. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 99 (6): 3812-3817

BRAUN U., KIHM U., PUSTERLA N. UND SCHÖNMANN M. (2001) Klinischer Untersuchungsgang bei Verdacht auf bovine spongiforme Enzephalopathie (BSE). Deutsches Tierärzteblatt 2: 124-129

Literaturverzeichnis

BROWN D.R. (2001) Copper and prion disease. Brain Res. Bull. 55 (2): 165-173

CONRATHS F.J., GROSCHUP M.H. UND SELHORST T. (2002a) Zwei Jahre BSE bei in Deutschland geborenen Rindern. Deutsches Tierärzteblatt 12: 1264-1272

CONRATHS F.J., SELHORST T. UND GROSCHUP M.H. (2002b) Bovine Spongiforme Enzephalopathie (BSE) bei in Deutschland geborenen Rindern. Bundesgesundheitsblatt-Gesundheitsforschung-Gesundheitsschutz 45: 527-533

DAHMS S. (2003) Epidemiologische Modellbildung am Beispiel BSE- Betrachtungen aus statistischer Sicht. Berl. Münch. Tierärztl. Wschr. 116: 22-30

DEALLER S.F. AND LACEY R.W. (1990) Transmissible spongiform encephalopathies: The threat of BSE to man. Food Microbiology 7: 253-279

DEIBLER G.E., MARTENSON R.E. AND KIES M.W. (1972) Large scale preparation of myelin basic protein from central nervous tissue of several mammalian species, Preparative Biochemistry 2 (2): 139-165

DYCE K.M., SACK W.O. UND WENSING C.J.G. (Hrsg.) (1997) Anatomie der Haustiere. Enke

EYLAR E.H., CACCAM J. AND JACKSON J.J. (1970) Experimental Allergic Encephalomyelitis, Science 168: 1220-1223

FRIES R., EGGERS T., HILDEBRANDT G., RAUSCHER K., BUDA S. AND BUDRAS K.-D. (2003) Autonomous nervous system with respect to dressing of cattle carcasses and its probable role in transfer of PrP^{res} Molecules. Journal of Food Protection 66 (5): 890-895

GARLAND T., BAUER N. AND BAILEY M. (1996) Brain emboli in the lungs of cattle after stunning. The Lancet 348: 610

Literaturverzeichnis

GASSET M., BALDWIN M.A., LLOYD D.H., GABRIEL J.-M., HOLTZMAN D.M., COHEN F., FLETTERICK R. AND PRUSINER S.B. (1992) Predicted alpha-helical regions of the prion protein when synthesized as peptides form amyloid. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89: 10940-10944

GÖBEL S., SELHORST T., STAUBACH C. UND KRAMER M. (2003) BSE - Aktuelle epidemiologische Situation in Deutschland. Symposium Bayerische BSE-Risikoanalyse, 24.3.2003 in München

GROOME N. P. (1980) Enzyme-linked immunosorbent assay for myelin basic protein and antibodies to myelin basic protein. J. Neurochem. 35: 1409-1417

HAJMEER M., CLIVER D.O. AND PROVOST R. (2003) Spinal cord tissue detection in comminuted beef: comparison of two immunological methods. Meat science 65: 757-763

HERDE K.A., BERGMANN M., BÜLTE M., LEISER R. AND WENISCH S. (2003) Glial proteins as species-specific markers for the detection of central nervous system tissue in heat-treated meat products. Poster, Tagung Prion Diseases: from basic research to intervention concepts 08.-10.10.2003 München

HILDEBRANDT G., LÜCKER E. UND RAUSCHER K. (2001) BSE-Risiko der Lebensmittel Fleisch und Milch. Bundesgesundheitsblatt-Gesundheitsforschung-Gesundheitsschutz 44 (5): 437-449

HÖRNLIMANN B. (2001) Portrait der BSE beim Rind. In: Prionen und Prionkrankheiten, HÖRNLIMANN B., RIESNER D. und KRETZSCHMAR H. (eds.), De Gruyter, 173-180

HÖRNLIMANN B., DOHERR M.G. UND GROSCHUP M.H. (2001a) Die Überwachung der Prionkrankheiten des Tieres. In: Prionen und Prionkrankheiten, HÖRNLIMANN B., RIESNER D. and KRETZSCHMAR H. (eds.), De Gruyter, 272-276

Literaturverzeichnis

HÖRNLIMANN B. UND INFANGER P. (2001b) BSE-Bekämpfung zum Schutz der Verbraucher und der Tierpopulation: international zu empfehlende Maßnahmen. In: Prionen und Prionkrankheiten, HÖRNLIMANN B., RIESNER D. und KRETZSCHMAR H. (eds.), De Gruyter, 470-492

HORLACHER S., SIMON P. UND BÜLTE M. (2001) Bestimmung des ZNS-Gehaltes und der Tierart in Fleischerzeugnissen. Fleischwirtschaft 12: 107-108

HORLACHER S., LÜCKER E., EIGENBRODT E. UND WENISCH S. (2002a) ZNS-Emboli in der Rinderlunge. Berl. Münch. Tierärztl. Wschr. 115: 1-5

HORLACHER S., SIMON P. UND BÜLTE M. (2002b) Vergleich zweier ZNS-Nachweisverfahren in Lebensmitteln. Fleischwirtschaft 1: 91-93

HRUBY S. , ALVORD E.C., MARTENSON R.E., DEIBLER G.E., HICKEY W.F. AND GONATAS N.K. (1984) Epitopes in myelin basic protein reactive with monoclonal antibodies. In: Experimental allergic encephalomyelitis, ALVORD E.C., KIES M.W. AND SUCKLING A.J. (eds.), Alan R. Liss, Inc., New York 271-276

JACKSON G.S., MURRAY I., HOSSZU L.L.P., GIBBS N., WALTHO J.P., CLARKE A.R. AND COLLINGE J. (2001) Location and properties of metal-binding sites on the human prion protein. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 98: 8531-8535

KAPLAN M.P., CHIN S.S.M., FLIEGNER K.H. AND LIEM R.K.H. (1990) α -Internexin, a novel neuronal intermediate filament protein, precedes the low molecular weight Neurofilament protein (NF-L) in the developing rat brain. The Journal of Neuroscience 10 (8): 2735-2748

KELLEY L.C., HAFNER S., MCCASKEY P.C., SUTTON M.T. AND LANGHEINRICH K.A. (2000) An evaluation of methods for the detection of spinal cord in product derived from advanced meat recovery systems. Journal of Food Protection 63 (8): 1107-1112

Kemeny D.M. (Hrsg.) (1994) ELISA. G.Fischer: 78

Literaturverzeichnis

KOCISKO D.A., COME J.H., PRIOLA S.A., CHESEBRO B., RAYMOND G.J., LANSBURY P.T. AND CAUGHEY B. (1994) Cell-free formation of protease-resistant prion protein. *Nature* 370: 471-474

KRAMER R. (1983) *Fleisch in der internationalen Küche*. BLV 291

KRAMER M.L., KRATZIN H.D., SCHMIDT B., RÖMER A., WINDL O., LIEMANN S., HORNEMANN S. AND KRETZSCHMAR H. (2001) Prion protein binds copper within the physiological concentration range. *Journal of Biological Chemistry* 276 (20): 16711-16719

KURSULA P. (2001) The current status of structural studies on proteins of the myelin sheath. *International Journal of Molecular Medicine* 8: 475-479

LANGE B., ALTER T., OVERHOFF M. UND LÜCKER E. (2002) Molekularbiologische Untersuchungen zur gewebe- und tierartspezifischen Erfassung von spezifizierten Risikomaterialien (SRM) in Fleisch und Fleischerzeugnissen. Poster 43. Arbeitstagung des Arbeitsgebietes Lebensmittelhygiene vom 24.-27.09.2002, Garmisch-Partenkirchen

LEES M. B. AND BROSTOFF S. W. (1984) Proteins of myelin. In: *Myelin*, Morell P. (eds.), Plenum Press: 197-217

LINKE H. (1959) Histologischer Nachweis von Gehirn in Brühwürsten. *Fleischwirtschaft* 12: 999-1002

LÜCKER E. UND BÜLTE M. (1997) Verfahren zum Nachweis von im Hinblick auf die Bovine Spongiforme Enzephalopathie (BSE) unerwünschten Zutaten in Fleischerzeugnissen (1). *Fleischwirtschaft* 9: 836-840

LÜCKER E., HORLACHER S., EIGENBRODT E. UND BÜLTE M. (1999a) Neue Ergebnisse zum Nachweis von Zentralem Nervengewebe in Fleischerzeugnisse. 40.

Literaturverzeichnis

Arbeitstagung des Arbeitsgebietes Lebensmittelhygiene vom 29.09.-01.10.1999, Garmisch-Partenkirchen

LÜCKER E., EIGENBRODT E., WENISCH S., FAILING K., LEISER R. AND BÜLTE M. (1999b) Development of an integrated procedure for the detection of central nervous tissue in meat products using cholesterol and neuron-specific enolase as markers. *Journal of Food Protection* 62 (3): 268-276

Lücker E., Horlacher S., Eigenbrodt E. UND Bülte M. (2000) Verfahren zum Nachweis von im Hinblick auf BSE unerwünschten Zutaten in Fleischerzeugnissen (3). *Fleischwirtschaft* 5: 74-77

LÜCKER E. UND SCHLOTTERMÜLLER B. (2001) Verfahren zum Nachweis von im Hinblick auf die BSE unerwünschten Zutaten in Fleischerzeugnissen (5). *Fleischwirtschaft* 11: 102-107

LÜCKER E., SCHLOTTERMÜLLER B. AND MARTIN A. (2002a) Studies on contamination of beef with tissue of the central nervous system (CNS) as pertaining to slaughtering technology and human BSE-exposure risk. *Berl. Münch. Tierärztl. Wschr.* 115: 118-121

LÜCKER E., HARDT M. AND GROSCHUP M.H. (2002b) Detection of CNS and PrP^{Sc} in meat products. *Berl. Münch. Tierärztl. Wschr.* 115: 111-117

LÜCKER E., BIEDERMANN W., LACHHAB S. UND HENSEL A. (2002c) Verfahren zum Nachweis von im Hinblick auf die BSE unerwünschten Zutaten in Fleischerzeugnissen (7). *Fleischwirtschaft* 10: 123-128

MALCHOW M. (2003) Die nächste Generation in der BSE-Analytik: Micromethode und Automatisierungsmodelle. Bio-Rad Laboratories GmbH, Heidemannstr. 164, 80939 München

MATTHEWS D. (2003) BSE: a global update. *Journal of Applied Microbiology* 94, Supplemente 1: 120S-125S

Literaturverzeichnis

MATTHEWS D. AND COOKE B.C. (2003) The potential for transmissible spongiform encephalopathies in non-ruminant livestock and fish. Rev. sci. tech. Off. int. Epiz. 22: 283-296

MENDZ G.L., MOORE W.J., EASTERBROOK-SMITH S. AND LINTHICUM D.S. (1985) Proton-n.m.r. study of interaction of myelin basic protein with a monoclonal antibody. Biochem. J. 228: 61-68

MOJE M., HOFFMANN A., TROEGER K., JANKOWITSCH UND KOLB R. (2001) Nachweis von Gewebe des Zentralen Nervensystems auf enthäuteten Rinderköpfen und in der rechten Herzkammer nach Bolzenschußbetäubung. www.bfa-fleisch.de

MOUDJOU M., FROBERT Y., GRASSI J. AND LA BONNADIÈRE C. (2001) Cellular prion protein status in sheep: tissue-specific biochemical signatures. Journal of General Virology 82: 2017-2024

N.N. (1974) Fleischverarbeitung. (Autorenkollektiv) VEB Fachbuchverlag Leipzig 102

N.N. (1980) Burda Kochbuch Nr.124 Fleisch. Verlag Aenne Burda 111

N.N. (1994) Entscheidung 94/381/EG vom 27.6.1994 über Schutzmaßnahmen in Bezug auf die spongiforme Rinderenzephalopathie und die Verfütterung von aus Säugetieren gewonnenen Futtermitteln

N.N. (1997) 3. Bekanntmachung über die Registrierung, Zulassung und Nachzulassung von Arzneimitteln (Sicherheitsanforderungen an Arzneimittel aus Körperbestandteilen von Rind, Schaf oder Ziege zur Vermeidung des Risikos einer Übertragung von BSE bzw. Scrapie). Aufruf des Bundesinstituts für Arzneimittel und Medizinprodukte (Nr.3): Hilfsstoffe und Produktionshilfsstoffe, die aus tierischen Fetten hergestellt werden. Bundesanzeiger, Berlin. Nr. 81, 30.April 1997: 5478

N.N. (2000) Gesetz über das Verbot des Verfütterns, des innergemeinschaftlichen Verbringens und der Ausfuhr bestimmter Futtermittel vom 1.12.2000. Bundesgesetzblatt 2000, Tl. I, Nr. 52, S.1635-1636

Literaturverzeichnis

N.N. (2001a) Deutsche Lebensmittelbuchkommission, Leitsätze für Fleisch und Fleischerzeugnisse, Leitsatz-Nr. 1.22 und 1.61. Deutsches Lebensmittelbuch

N.N. (2001b) Fleischhygienerechtliche Maßregelungen von Tierkörpern bei positivem BSE-Befund. Stellungnahme des BgVV vom 10.01.2001, www.bfr.bund.de

N.N. (2001c) Schebo® Brainostic™ Test, Gebrauchsanweisung

N.N. (2001d) RIDASCREEN® Risk Material, Gebrauchsanweisung

N.N. (2002a) BSE-Sicherheit von Gelatine. Stellungnahme der Fachvereinigung Gelatine des Verbandes der Chemischen Industrie

N.N. (2002b) Bekanntmachung der Neufassung der BSE-Untersuchungsverordnung. Bundesgesetzblatt 30.9.2002, Teil I Nr. 69: 3730-3732

N.N. (2002c) Scientific opinion on stunning methods and BSE risks. (The risk of dissemination of brain particles into the blood and carcass when applying certain stunning methods.) Scientific Steering Committee, 10./11.01.2002

N.N. (2002d) Report on the current state of knowledge on the TSE infectivity clearance capacity of various gelatine production processes. Scientific Steering Committee, TSE/BSE ad hoc group, 05.09.2002

N.N. (2002e) RIDASCREEN® Risk Material 10/5, Gebrauchsanweisung

N.N. (2002f) Update of the opinion on TSE infectivity distribution in ruminant tissues, initially adopted by the Scientific Steering Committee at its meeting of 10./11.01.2002 and amended at its meeting of 07./08.11.2002

N.N. (2002g) Periphere Nervenzellen als Risikomaterial. DLG-Empfehlung zur Entfernung von extracerebrospinalen Neuronen. Deutsche Landwirtschaftliche Gesellschaft e.V.

Literaturverzeichnis

N.N. (2003a) Opinion on: The feeding of wild fishmeal to farmed fish and recycling of fish with regard to the risk of TSE. Scientific Steering Committee, 06./07.03.2003

N.N. (2003b) Vo (EG) 1053/2003 der Kommission vom 19.6.2003 zur Änderung der Vo (EG) 999/2001 des Europäischen Parlaments und des Rates über Schnelltests

N.N. (2003c) Updated opinion on the safety with regard to TSE risks of gelatine derived from ruminant bones or hides adopted by the Scientific Steering Committee at its meeting of 6-7 March 2003.

N.N. (2004) EU-Kommission erwartet neuen Anstieg der BSE-Zahlen in Deutschland. Deutsches Tierärzteblatt 02/2004:178

Nagel E. UND Miersch T. (2002) Nachweis von ZNS-Material in hocherhitzten Lebensmitteln. 43. Arbeitstagung des Arbeitsgebietes Lebensmittelhygiene vom 24.-27.09.2002, Garmisch-Partenkirchen

NGUYEN J., BALDWIN M.A., COHEN F.E. AND PRUSINER S.B. (1995) Prion protein peptides induce alpha-helix to beta-sheet conformational transitions. Biochemistry 34: 4186-4192

NIEDERER M. UND BOLLHALDER R. (2001) Identification of species specific central nervous tissue by gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS) – a possible method for supervision of meat products and cosmetics. Mitt. Lebensm. Hyg. 92: 133-144

NITSCH P. UND WACHSMANN G. (2001) Nachweis von Hirngewebs- und Rückenmarksanteilen in Fleischgemengen. Fleischwirtschaft 3: 76-78

OIDTMANN B., SIMON D., HOLTKAMP N., HOFFMANN R. AND BAIER M. (2003) Identification of cDNAs from Japanese pufferfish (*Fugu rubripes*) and Atlantic salmon (*Salmo salar*) coding for homologues to tetrapod prion proteins. FEBS Letters 538:96-100

Literaturverzeichnis

OSTERTAG R. (Hrsg.) (1932) Lehrbuch der Schlachtvieh- und Fleischschau. Enke
16

PAN K.M., BALDWIN M., NGUYEN J., GASSET M., SERBAN A., GROTH D., MEHLHORN I.,
HUANG Z., FLETTERICK R.J., COHEN F.E. AND PRUSINER S.B. (1993) Conversion of
alpha-helices into beta-sheets features in the formation of the scrapie prion proteins.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90: 10962-10966

RIESNER D. (2001) Die Scrapie-Isoform des Prion-Proteins PrP^{Sc} im Vergleich zur
zellulären Isoform PrP^C. In: Prionen und Prionkrankheiten, HÖRNLIMANN B., RIESNER
D. UND KRETZSCHMAR H. (eds.) De Gruyter 81-91

RUFFING M. UND WINDEMANN H. (2001) Die Prävention von Prionkrankheiten in der
Arzneimittel- und Kosmetikproduktion. In: Prionen und Prionkrankheiten, HÖRNLIMANN
B., RIESNER D. UND KRETZSCHMAR H. (eds.), De Gruyter 401-414

SANDMEIER B., BECKER C.-M., ROTHENEDER R., GAREIS M. UND PISCHETSRIEDER M.
(2003) Nachweis von ZNS-Kontaminationen in Fleisch. 54. Arbeitstagung der
Lebensmittelchemischen Gesellschaft, Fachgruppe in der Gesellschaft Deutscher
Chemiker, Regionalverband Bayern, in der Technischen Universität München,
Garching, 24.03.2003

SCHMECHEL D., MARANGOS P.J., ZIS A.P., BRIGHTMAN M. AND GOODWIN F.K. (1978)
Brain enolases as specific markers of neuronal and glial cells. Science 199: 313-314

SCHMIDT K.-F. (Hrsg.) (1996) Wurst aus eigener Küche. Parey 59

SCHMIDT G.R., HOSSNER K.L., YEMM R.S., GOULD D.H. AND O`CALLAGHAN J.P. (1999)
An enzyme-linked immunosorbent assay for glial fibrillary acidic protein as an
indicator of the presence of brain or spinal cord in meat. Journal of Food Protection
62 (4): 394-397

Literaturverzeichnis

SCHMIDT G.R., YEMM R.S., CHILDS K.D., O`CALLAGHAN J.P. AND HOSSNER K.L. (2001) The detection of central nervous system tissue on beef carcasses and in comminuted beef. *Journal of Food Protection* 64 (12): 2047-2053

SCHNEIDER E., KERP B., CURTUI V. AND USLEBER E. (2003) Towards species-specific immunoassays against bovine central nervous tissue marker proteins. Poster, Tagung Prion Diseases: from basic research to intervention concepts 08.-10.10.2003 München

SCHÖNENBRÜCHER H., ABDULMAWJOOD A. AND BÜLTE M. (2003a) Real time RT-PCR for detection of bovine-specific central nervous system tissues as BSE risk material in meat and meat products. Poster, Tagung Prion Diseases: from basic research to intervention concepts 08.-10.10.2003 München

SCHÖNENBRÜCHER H., ABDULMAWJOOD A. AND BÜLTE M. (2003b) Spezifischer Nachweis des sauren Gliafaserproteins der Tierart Schwein in prozessierten Lebensmitteln mit einem Sybr® Green Real Time-Assay. Poster 44. Tagung des Arbeitsgebietes Lebensmittelhygiene vom 29.09-02.10.2002, Garmisch-Partenkirchen

SCHÜTT-ABRAHAM I. (2002) BSE-Präventivmaßnahmen bei der Schlachtung von Rindern. *Berl. Münch. Tierärztl. Wschr.* 115: 125-130

SCHWÄGELE F., MÜLLER E., FISCHER K., KOLB R., MOJE M. UND TROEGER K. (2002) Nachweis von Gewebe des ZNS auf Rinderschlachtierkörpern nach Absaugen des Rückenmarks. *Fleischwirtschaft* 6: 118-120

SEYBOLDT C., JOHN A., MUEFFLING T.V., NOWAK B. AND WENZEL S. (2003) Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction Assay for species-specific detection of bovine central nervous system tissue in meat and meat products. *Journal of Food Protection* 66 (4): 644-651

Literaturverzeichnis

SMITH P.G. (2003) The epidemics of bovine spongiform encephalopathy and variant Creutzfeldt-Jakob disease: current status and future prospects. *Bulletin of the World Health Organization* 81 (2): 123-130

SPIELHAUPTER C. AND SCHÄTZL H. M. (2001) PrP^C directly interacts with proteins involved in signaling pathways. *The Journal of Biological Chemistry* 276 (48): 44604-44612

SUZUKI T., KUROKAWA T., HASHIMOTO H. AND SUGIYAMA M. (2002) cDNA sequence and tissue expression of Fugu rubripes prion protein-like: a candidate for the teleost orthologue of tetrapod PrPs. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 294: 912-917

TAKAMTSU K. AND TATEMOTO K. (1992) Isolation and characterization of two novel peptide amides originating from myelin basic protein in bovine brain. *Neurochemical Research* 17 (3): 239-246

Tanaka J., Ogawara M., Ando S., Shibata M., Yatani R., Kusagawa M. and Inagaki M. (1993) Phosphorylation of a 62 kD porcine α -Internexin, a newly identified intermediate filament protein. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 196 (1): 115-123

TAPIA F.J., POLAK J.M. AND BARBOSA A.J.A. (1981) Neuron-specific enolase is produced by neuroendocrine tumors. *Lancet* 1: 808-811

TERRY L.A., MARSH S., RYDER S.J., HAWKINS S.A.C., WELLS G.A.H. AND SPENCER Y.I. (2003) Detection of disease-specific PrP in the distal ileum of cattle exposed orally to the agent of bovine spongiform encephalopathy. *Veterinary Record* 152: 387-392

TERSTEEG M.H.G., KOOLMEES P.A. AND VAN KNAPEN F. (2002) Immunohistochemical detection of brain tissue in heated meat products. *Meat Science* 61: 67-72

Literaturverzeichnis

THOMZIG A., KRATZEL C., LENZ G., KRÜGER D. AND BEEKES M. (2003) Widespread PrP^{Sc}

Accumulation in muscles of hamsters orally infected with scrapie. EMBO reports 4 (5): 530-533

TROEGER K., SCHURR B., WACHSMANN G., KOLB R. UND BEHRSCHEMIDT M. (2002) Vorbeugende Maßnahmen gegen eine mögliche BSE-Gefährdung. Fleischwirtschaft 10: 129-135

VERDRAGER J. (1996) Creutzfeldt-Jakob disease. The Lancet 347: 1704

WELLS G.A.H., HAWKINS S.A.C., AUSTIN A.R., RYDER S.J., DONE S.H., GREEN R.B., DEXTER I., DAWSON M. AND KIMBERLIN R.H. (2003) Studies on the transmissibility of the agent of bovine spongiform encephalopathy to pigs. Journal of general virology 84, 1021-1031

WENISCH S., LÜCKER E., EIGENBRODT E., BÜLTE M. UND LEISER R. (2000) Verfahren zum Nachweis von im Hinblick auf BSE unerwünschten Zutaten in Fleischerzeugnissen (4). Fleischwirtschaft 7: 69-72

WILESMITH J.W., WELLS G.A.H., CRANWELL M.P. AND RYAN J.B.M. (1988) Bovine spongiform encephalopathy: epidemiological studies. Veterinary Record 123: 638-644

WILLIAMS E.S. AND MILLER M.W. (2002) Chronic Wasting Disease in deer and elk in North America. Rev. Sci. Tech. 21(2):305-316

14 Danksagung

Zum Abschluss bedanke ich mich bei Herrn Professor A. Stolle für die Überlassung des Themas und die jederzeit gewährte, freundliche Unterstützung bei der Anfertigung dieser Arbeit.

Sehr herzlich bedanken möchte ich mich bei Frau Dr. C. Ritter und Frau Dr. U. Koch für die hilfsbereite Betreuung und Unterstützung meiner Arbeit.

Ganz besonderer Dank gilt Herrn M. Moravek für die Weitergabe seiner serologischen Fachkenntnisse an mich und für das Stellen von konstruktiven Fragen.

Mein Dank gilt weiterhin Herrn F. Blesenberger für seine freundliche Hilfe bei der Probenherstellung.

Herrn Dr. M. Bucher danke ich herzlich für die Durchsicht meines Manuskriptes.

An Frau Dr. B. Sperner ist mein Dank für die Durchsicht des „summary“ gerichtet.

Bei Frau Dr. T. Grünewald bedanke ich mich für ihre kompetente Hilfe bei Computerfragen.

An dieser Stelle sei allen Mitarbeitern des Institutes ein Dank für die nette und hilfsbereite Aufnahme ins Institut ausgesprochen.

15 Anhang

Dieses Kapitel enthält die Tabelle 6, in der alle Proteine aufgelistet sind, über die im Rahmen der Fragestellung dieser Arbeit Informationen recherchiert wurden.

Tabelle 6: Recherchierte Proteine

Marker	nicht hirnspezifisch	nicht im Gehirn vorhanden	Protein beim Rind noch nicht untersucht	Protein beim Schwein noch nicht untersucht	Sonstiges
Alpha-actin 1	X				
Alpha-(1,6)-fucosyltransferase	X				
Alpha- internexin					Sequenz beim Rind nicht bekannt
4-Aminobutyrate aminotransferase	X				
Annexin V	X				
Apolipoprotein A-I precursor	X				
Beta-synuclein				X	
Brain-derived neurotrophic factor	X				
Brain-derived neurotrophic factor precursor	X				
Brain natriuretic peptide	X				

Anhang

Marker	nicht hirnspezifisch	nicht im Gehirn vorhanden	Protein beim Rind noch nicht untersucht	Protein beim Schwein noch nicht untersucht	Sonstiges
Brain-specific homeobox/POU domain Protein			X		Keine Artikel veröffentlicht, Eigenschaften vom Protein unbekannt
Brain-specific protein, 25k (p25)	X			X	Proteineigenschaften unbekannt; beim Menschen in verschiedenen Geweben mit RT-PCR nachgewiesen
Clusterin precursor	X				
Cofilin	X				
C-type natriuretic peptide precursor	X				
Delta sleep-inducing peptide immunoreactor			X		
Dextrin	X				

Anhang

Marker	nicht hirnspezifisch	nicht im Gehirn vorhanden	Protein beim Rind noch nicht untersucht	Protein beim Schwein noch nicht untersucht	Sonstiges
Dipeptidyl peptidase IV like protein					tritt in 2 Isoformen auf, von denen nur eine hirnspezifisch ist
Elongation factor 1-alpha	X				
Endoplasmin precursor	X				
Glial hyaluronate-binding protein				X	
Glucagon precursor	X				
Glutamate carboxypeptidase II	X				
Glutamic acid decarboxylase	X				
Glycolipid transfer protein	X				

Anhang

Marker	nicht hirnspezifisch	nicht im Gehirn vorhanden	Protein beim Rind noch nicht untersucht	Protein beim Schwein noch nicht untersucht	Sonstiges
Glycopeptide N-tetradecanoyltransferase 1					aufgrund der Literatur wahrscheinlich nicht hirnspezifisch
Heat shock protein HSP 90-alpha	X				
Histamine H3 receptor				X	
Latrophilin-1	X				
Latrophilin-3	X				
Mother against decapentaplegic homolog 3	X				
NADH-cytochrome b5 reductase	X				
Neurexin I beta und III beta	X				in Lunge nachgewiesen

Anhang

Marker	nicht hirnspezifisch	nicht im Gehirn vorhanden	Protein beim Rind noch nicht untersucht	Protein beim Schwein noch nicht untersucht	Sonstiges
Neurocalcin gamma 1				X	
Neurokinin B	X				
Neuromedin B-32	X				
Neuropeptide Y	X				
Neurotensin	X				
NT-3 growth factor receptor precursor	X				
P65 = neuron-specific Ash/Grb-2SH3 domain-binding protein	X				in Lunge nachgewiesen
P150 = neuron-specific Ash/Grb-2SH3 domain-binding protein	X				in Leber nachgewiesen

Anhang

Marker	nicht hirnspezifisch	nicht im Gehirn vorhanden	Protein beim Rind noch nicht untersucht	Protein beim Schwein noch nicht untersucht	Sonstiges
6-phosphofructo-2-kinase					zu diesem Protein gibt es in verschiedenen Geweben Isoformen, von denen eine Isoform hirnspezifisch ist
Prolyl endopeptidase	X				
Protein-glutamine gamma-glutamyltransferase	X				
Solute carrier family 2, facilitated glucose transporter, member 1	X				
Succinyl-CoA ligase	X				
Synaptotjanin 1	X				

Anhang

Marker	nicht hirnspezifisch	nicht im Gehirn vorhanden	Protein beim Rind noch nicht untersucht	Protein beim Schwein noch nicht untersucht	Sonstiges
Syntaxin 1A und 1B					eine Aussage erfordert zusätzliche intensive Recherchen
Tenascin precursor		X			nicht im adulten Gehirn vorhanden
Ubiquitin	X				
Ubiquitin-conjugating enzyme E2	X				im Thymus
Versican core protein precursor				X	Artikel über das porcine Protein unveröffentlicht
Zonadhesin precursor		X			