

Nachweis von tierischen Bestandteilen in Futtermitteln mit Hilfe molekularbiologischer Methoden:

Stand: August 2001

BSE und tierische Bestandteile in Futtermitteln:

Der erste BSE-Fall in Deutschland Ende November 2000 hat innerhalb kürzester Zeit zu einem generellen Verfütterungsverbot von proteinhaltigen Erzeugnissen aus Gewebe warmblütiger Landtiere und Fische an alle Nutztiere geführt (s. Tabelle 1), denn Tiermehl und Tierfett gelten als potentielle Infektionsquelle für die Erkrankung von Rindern an BSE (Bovine Spongiforme Enzephalopathie). In der zweiten Verordnung zur Änderung der Verfütterungsverbots-Verordnung vom 10. April 2001 wurden die proteinhaltigen Erzeugnisse oder Fette aus Geweben von Fischen zur Verfütterung an Nutztiere, die keine Wiederkäuer sind, wieder zugelassen (s. Tabelle 1).

Tabelle 1: Chronologie der Gesetzgebung:

- 1994: Verfütterungsverbot von Futtermitteln mit proteinhaltigen Erzeugnissen aus Säugetiergewebe an Wiederkäuer (§24a Abs. 2 Viehverkehrs-VO)
- 12/2000: Gesetz über das Verbot des Verfütterns, des innergemeinschaftlichen Verbringens und der Ausfuhr bestimmter Futtermittel vom 01. Dezember 2000 (Verfütterungsverbotsgesetz – VerfVerbG)
- 12/2000: Verordnung über die Erstreckung der Verbote des Gesetzes über das Verbot des Verfütterns, des innergemeinschaftlichen Verbringens und der Ausfuhr bestimmter Futtermittel (Verfütterungsverbots-Verordnung – VerfVerbV -) vom 27. Dezember 2000
- 01/2001: Erste Verordnung zur Änderung der Verfütterungsverbots-Verordnung vom 26. Januar 2001
- 02/2001 in Niedersachsen: Verordnung über das Verbot des Fütterns und Kirrens von Wild mit Futtermitteln tierischer Herkunft vom 05. Februar 2001 (Nds. GVBl. S.32)
- 02/2001: Gesetz zur Änderung futtermittelrechtlicher, tierkörperbeseitigungsrechtlicher und tierseuchenrechtlicher Vorschriften im Zusammenhang mit der BSE-Bekämpfung (BSE-Maßnahmengesetz) vom 19. Februar 2001
- 03/2001: Gesetz über das Verbot des Verfütterns, des innergemeinschaftlichen Verbringens und der Ausfuhr bestimmter Futtermittel vom 29. März 2001
- 04/2001: Zweite Verordnung zur Änderung der Verfütterungsverbots-Verordnung vom 10. April 2001

Mit dem Verfütterungsverbot geht ein Bedarf an analytischen Methoden zum Nachweis von tierischen Bestandteilen in Mischfuttermitteln einher. Mit der Mikroskopie steht bereits ein etabliertes und amtliches Untersuchungsverfahren zur Verfügung. Die Methode wurde in zahlreichen nationalen und internationalen Ringversuchen geprüft und hat sich bei der Kontrolle von Futtermitteln, gerade im Zusammenhang mit der BSE-Thematik, durchaus bewährt.

Da in der Mikroskopie charakteristische, mikroskopisch erfaßbare Strukturen, wie z.B. Knochenfragmente, Muskelfasern, Federn, Schuppen usw., detektiert werden, ergeben sich bei "strukturlosen" Proben, wie z.B. Gelatine, Tierfett usw. Probleme. Auch ist eine Zuordnung von nachgewiesenen Muskelfasern zu einer Tierart meistens nicht möglich. Bei der Beantwortung dieser Fragestellungen können molekularbiologische Methoden, wie z.B. die PCR-Methoden, die Mikroskopie in sinnvoller Weise unterstützen und ergänzen.

Bevor die PCR-Methoden zum Nachweis tierischer Bestandteile in Futtermitteln detaillierter vorgestellt werden, soll das Prinzip der PCR-Methoden näher erklärt werden.

PCR (Polymerase Chain Reaction oder Polymerase-Kettenreaktion):

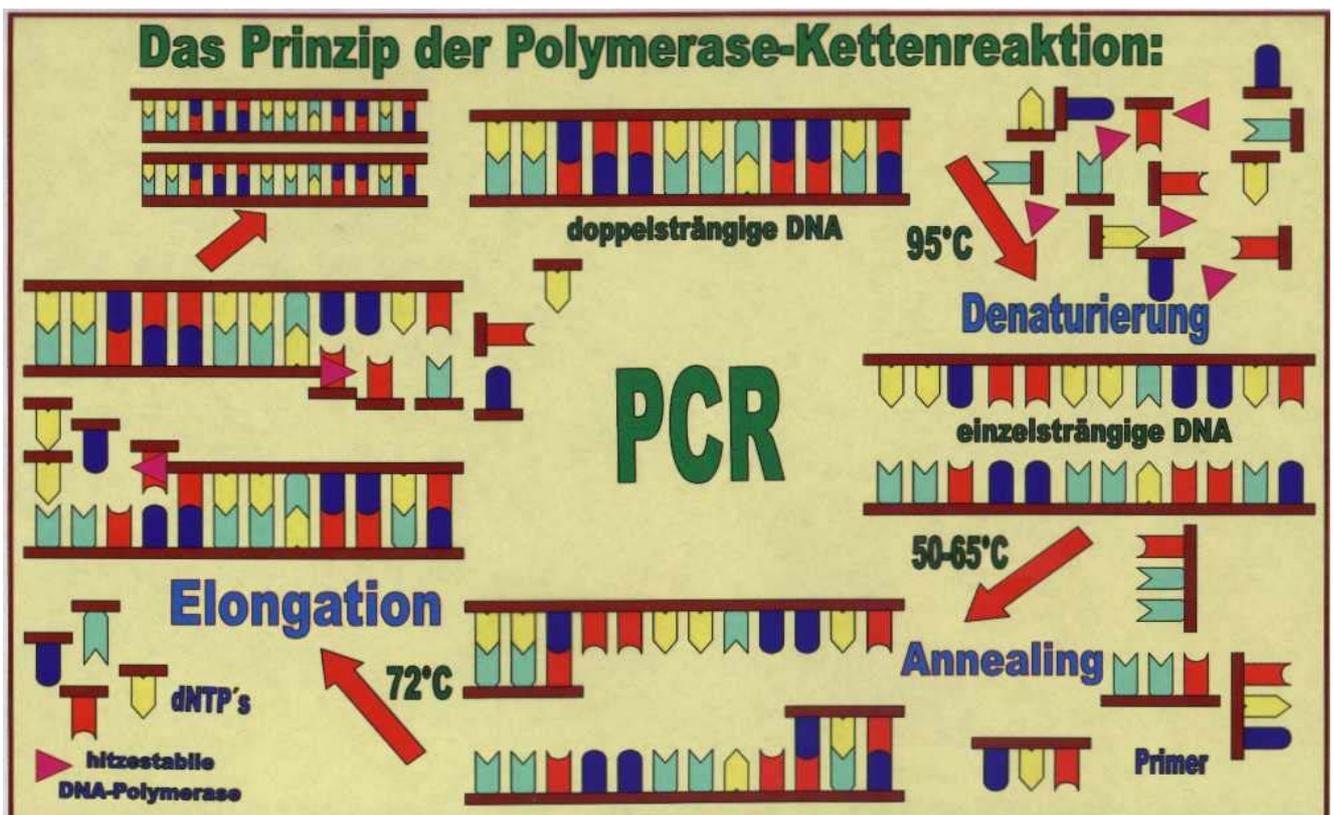
Molekularbiologische Nachweismethoden gewinnen in der Lebensmittel- und in der Futtermittel-Analytik zunehmend an Bedeutung. Die sogenannte Polymerase-Kettenreaktion ist dabei derzeit DIE Methode innerhalb der Molekularbiologie. Sie wurde 1985 von Kary Mullis entwickelt und hat sich innerhalb weniger Jahre zu einem elementaren und unersetzlichen Hilfsmittel in der Forschung und in der Analytik entwickelt.

Es handelt sich bei der Polymerase-Kettenreaktion um eine Methode, mit der doppelsträngige DNA exponentiell vervielfältigt werden kann. Welcher DNA-Bereich vervielfältigt wird, hängt von den eingesetzten Primern ab. In Abhängigkeit von der DNA-Sequenz lagern sie sich an spezifische Stellen der DNA an. Das Enzym DNA-Polymerase beginnt an diesen Andockstellen mit der Vervielfältigung der DNA.

Das Prinzip einer PCR-Reaktion (s. Abbildung 1):

Die aus einer Probe zuvor isolierte doppelsträngige DNA wird durch kurzzeitiges Erhitzen auf 95 °C in zwei Einzelstränge getrennt (*Denaturierung*). Anschließend wird die Temperatur gesenkt, so daß sich die im Überschuß vorhandenen Primer an die für sie jeweils spezifische einzelsträngige Zielsequenz anlagern können (*Annealing*). Danach wird die Temperatur auf 72 °C erhöht und eine hitzestabile DNA-Polymerase verlängert die Primer bis wieder eine doppelsträngige DNA vorliegt (*Elongation*). Aus einem DNA-Doppelstrang sind somit in diesem ersten Zyklus zwei DNA-Doppelstränge geworden. Diese können jetzt wieder durch Erhitzen auf 95 °C in vier Einzelstränge getrennt werden usw.. Durch den kurzzeitigen periodischen Wechsel der Temperatur wird immer wieder DNA denaturiert, Primer lagern sich an und werden zum Doppelstrang ergänzt. Durch diese Wiederholung der Zyklen (*Denaturierung, Annealing, Elongation*) kommt es letztlich zu einer spezifischen Vervielfältigung (Amplifizierung) einer Zielsequenz mit definierter Größe.

Abbildung 1:



Mit Hilfe der PCR-Methode können somit Spuren von DNA, die in kleinsten Probenmengen enthalten sind, innerhalb kürzester Zeit zu nachweisbaren Mengen vervielfältigt werden.

Die PCR wird mittlerweile für ein breites Spektrum von Anwendungen genutzt. Einige der analytischen Anwendungen seien an dieser Stelle nur stichwortartig erwähnt: Nachweis von Krankheitserregern (Pilze, Viren, Bakterien), Genetischer Fingerabdruck, Stammbaumanalysen, Nachweis gentechnisch veränderter Produkte, Nachweis allergener Bestandteile, Mutationsanalysen, Tierartennachweis in Lebensmitteln, Nachweis tierischer Bestandteile in Futtermitteln und in pflanzlichen Fetten und viele weitere Anwendungen.

Für eine Verfielfältigung mit Hilfe der PCR benötigt man folgende Komponenten:

- Proben-DNA
- hitzestabile DNA-Polymerase
- die vier "Bausteine" der DNA (dNTP's, Desoxyribonucleosidtriphosphate)
- passende Oligonukleotide, sog. Primer
- Puffer
- Gefäß für den PCR-Ansatz
- PCR-Maschine, sog. Thermocycler



Die PCR-Methoden verfügen über eine hohe Empfindlichkeit und sollten daher auch eine verbesserte Überprüfung der Einhaltung des Fütterungsverbotes und somit den Nachweis geringster Mengen an tierischen Bestandteilen ermöglichen. Um auch tierische Bestandteile nachzuweisen, die mikroskopisch nicht nachweisbar sind, ist eine Ergänzung der Mikroskopie um eine PCR-Methode durchaus sinnvoll.

Im Zusammenhang mit der BSE-Thematik haben daher die PCR-Methoden zur Tierartenbestimmung in Lebensmitteln und zum Nachweis tierischer Bestandteile in Futtermitteln an Bedeutung gewonnen.

Die PCR-Methoden zum Nachweis von Tierarten in fleischhaltigen Lebensmitteln wurden in erster Linie zur Kontrolle und Überprüfung von Fleisch- und Wurstwaren entwickelt. Diese Methoden erlauben die Überwachung von Deklarationen im Lebensmittelbereich. Im Zusammenhang mit BSE wurden diese Methoden besonders eingesetzt, um Rindbestandteile und sogenannte Risikomaterialien nachzuweisen. Die Nachweisgrenze dieser Methoden liegt etwa bei 1 %, was für deren ursprünglichen und eigentlichen Einsatzbereich, der Untersuchung von Fleisch- und Wurstwaren, durchaus ausreichen mag. Um das Totalverbot von Tiermehl im Futter zu überprüfen, reicht diese Nachweisgrenze hingegen nicht aus.

Darüber hinaus steht im Bereich der Futtermittelanalytik zunächst die grundsätzliche Frage nach dem Vorhandensein von tierischen Bestandteilen im Vordergrund, da das Verfüttern "von proteinhaltigen Erzeugnissen aus Gewebe warmblütiger Landtiere und Fische an alle Nutztiere" generell verboten ist (Ausnahme: proteinhaltige Erzeugnisse oder Fette aus Geweben von Fischen zur Verfütterung an Nutztiere, die keine Wiederkäuer sind). Von welcher Tierart potentielle tierische Bestandteile im Futtermittel stammen, ist daher für die Überprüfung des generellen Verfütterungsverbotes zunächst von untergeordneter Bedeutung.

Nachweis tierischer Bestandteile in Futtermitteln mit Hilfe der Polymerase-Kettenreaktion (PCR):

Der Nachweis tierischer Bestandteile in Futtermitteln und pflanzlichen Fetten mit Hilfe der PCR kann auf zweierlei Art geführt werden: a) mit sogenannten tierartspezifischen Primern oder b) mit sogenannten universellen Primern (s. Abbildung 2).

Bei einer Nachweismethode mit tierartspezifischen Primern werden DNA-Sequenzen nachgewiesen, die charakteristisch sind für jeweils eine Tierart. Die Analyse erlaubt dann eine Aussage darüber, ob Bestandteile dieser einen Tierart, z.B. Bestandteile vom Rind, in der untersuchten Probe vorhanden sind. Eine Aussage über das Vorhandensein tierischer Bestandteile von anderen Tierarten, z.B. vom Schwein, sind mit diesem Verfahren nicht möglich. Für jede nachzuweisende Tierart muß jeweils ein spezifischer Nachweis geführt werden.

Bei einer Nachweismethode mit universellen Primern werden DNA-Sequenzen nachgewiesen, die im Tierreich weit verbreitet sind, also ubiquitär vorkommen (z.B. mitochondriale Markergene wie das Cytochrom b-Gen). Die Analyse mit solchen universellen Primern erlaubt dann eine Aussage darüber, ob generell tierische Bestandteile, unabhängig von der Tierart, in der untersuchten Probe vorhanden sind. Eine anschließende enzymatische Spaltung der entstandenen PCR-Produkte (Amplifikat) ermöglicht nach deren größenmäßiger Auftrennung die Bestimmung der jeweils vorhandenen Tierarten.

Beide vorgestellten Verfahren besitzen in der Praxis Vor- und Nachteile (s. Tabelle 2). Da das Verfüttern von proteinhaltigen Erzeugnissen und von Fetten aus Gewebe warmblütiger Landtiere an Nutztiere generell verboten ist (BGBl. I Nr. 52, S. 1635) erscheint allerdings zunächst eine allgemeine Prüfung auf das Vorhandensein von tierischen Bestandteilen sinnvoll. Dazu sind besonders die universellen Nachweissysteme geeignet. Eine Bestimmung der vorhandenen Tierarten ist über eine anschließende Restriktionsspaltung möglich. Den Futtermittelherstellern und auch den Überwachungsorganen bietet die Bestimmung der Tierart eine Hilfestellung bei der Rückverfolgung eines potentiellen Eintrages bis zur Quelle.

Im Gegensatz zu den universellen Analyseverfahren erlaubt ein spezifischer Tierartennachweis immer nur eine Aussage über das Vorhandensein oder die Abwesenheit einer einzigen Tierart.

Erarbeitung neuer Untersuchungsmethoden im VDLUFA:

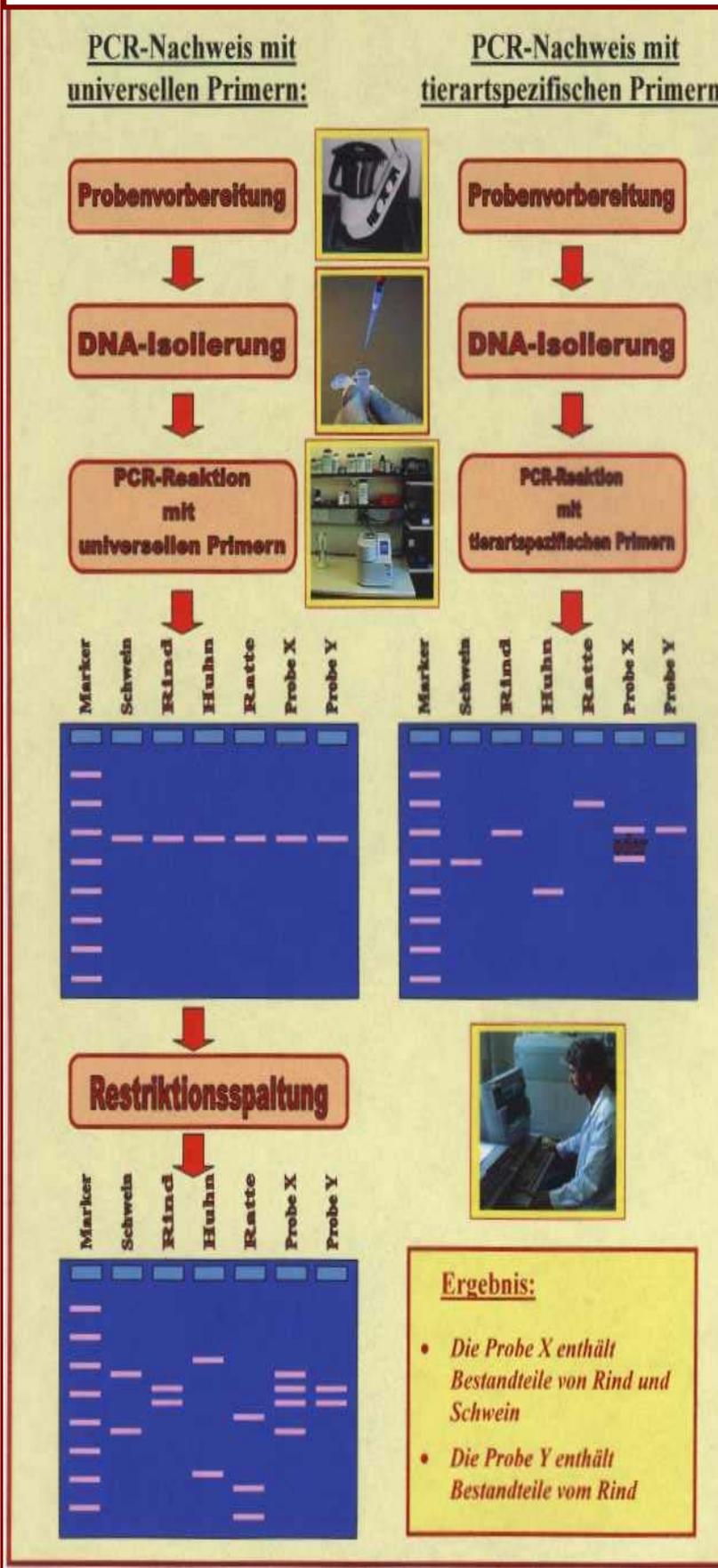
Der Arbeitskreis PCR-Analytik der Fachgruppe Futtermittel des VDLUFA (Verband Deutscher Landwirtschaftlicher Untersuchungs- und Forschungsanstalten e.V.) arbeitet derzeit sehr intensiv an der Erarbeitung von DNA-Methoden zum Nachweis tierischer Bestandteile in Futtermitteln und in pflanzlichen Fetten.

Ansatzpunkt ist dabei nicht die Umgestaltung von Methoden, die für den Tierartennachweis in Fleisch- und Wurstwaren entwickelt wurden, sondern der systematische Aufbau von PCR-Methoden, die den speziellen und vom Lebensmittelbereich durchaus verschiedenen Anforderungen des Futtermittelbereiches Rechnung tragen.

Das Ziel der Arbeiten ist letztlich eine validierte PCR-Methode, mit der tierische Bestandteile in Mischfuttermitteln, aber auch in Rohstoffen und Einzelkomponenten mit ausreichender Sensitivität nachgewiesen werden können.

Abbildung 2: Nachweis tierischer Bestandteile mit universellen und tierartspezifischen Primern.

Tabelle 2. Vor- und Nachteile von universellen und tierartspezifischen Primern.



Universelle Primer:

- *Vorteile:*
 - Verschiedene Tierarten werden mit nur einem Primerpaar identifiziert
 - Die genaue DNA-Sequenz der jeweiligen Tierart ist nicht erforderlich
 - Ist für die allgemeine Prüfung auf das Vorhandensein von tierischen Bestandteilen geeignet
- *Nachteile:*
 - Für die Bestimmung der Tierart ist eine Restriktionsspaltung erforderlich
 - Eine unterschiedlich starke Amplifikation verschiedener Tierarten ist möglich
 - Es sind größere Amplifikate für die Restriktionsspaltung erforderlich
 - Rassenspezifische Sequenzunterschiede können zu Variationen im Restriktionsfragmentmuster führen

Tierartspezifische Primer:

- *Vorteile:*
 - Direkter Nachweis einer bestimmten Tierart
 - Eine Restriktionsspaltung der Amplifikate kann entfallen
 - Nachweis auch bei Proben mit hoch-gradig degradiertes DNA möglich, da kleine Amplifikate ausreichen
 - Geeignet zur Analyse von Gemischen aus verschiedenen Tierarten
- *Nachteile:*
 - Für jede Tierart ist ein spezifisches Primerpaar erforderlich
 - Sehr umfangreiche DNA-Sequenzinformationen sind erforderlich
 - Für die allgemeine Prüfung auf das Vorhandensein von tierischen Bestandteilen nicht geeignet

Entscheidend für eine PCR-Methode ist die Auswahl geeigneter Primer. Um generell tierische Bestandteile unabhängig von der Tierart nachweisen zu können, benötigt man ein Primerpaar, mit dem ein Gen nachgewiesen wird, das in allen Tieren vorkommt. Das in den Mitochondrien vorkommende Cytochrom b-Gen erfüllt diese Voraussetzungen. Es ist für den Energiestoffwechsel der Tiere essentiell und ist daher im Tierreich ubiquitär verbreitet. Teilbereiche dieser DNA weisen rassen- oder auch artübergreifende Gemeinsamkeiten auf. Die DNA-Sequenzen solcher konservierten Bereiche, beinhalten meist die Information für lebenswichtige Proteine. Die Basenabfolge solcher essentiellen Gene hat sich im Laufe der Evolution nur geringfügig geändert. Die Bindungsstellen der Primerpaare weisen daher zur DNA verschiedener Tierarten ein hohes Maß an Übereinstimmung auf. Unabhängig von der Tierart werden mit Hilfe der PCR gleich lange DNA-Fragmente vervielfältigt. Dennoch zeichnen sich diese DNA-Fragmente in den sog. variablen Bereichen durch tierartspezifische Sequenzunterschiede aus. Aufgrund dieser Sequenzunterschiede zwischen den PCR-Produkten der DNA verschiedener Tierarten entstehen nach enzymatischer Spaltung DNA-Fragmente mit für die jeweilige Tierart charakteristischer Länge. Diese tierartspezifische Analyse der DNA-Fragmente wird auch als Restriktionsfragmentlängenpolymorphismus (RFLP) bezeichnet (s. Abbildung 3).

Tiermehl wird bei ordnungsgemäßer Produktion für mindestens 20 Minuten bei einem Druck von 3 bar auf eine Temperatur von 133 °C erhitzt. Die DNA unterliegt bei diesem und auch bei anderen Prozessierungsschritten einer starken Degenerierung. Das ursprünglich langkettige DNA-Molekül wird in kurze Bruchstücke zerlegt. Dies hat zur Folge, daß nicht mehr beide Primer auf einem DNA-Bruchstück binden können und somit keine Vervielfältigung der entsprechenden Abschnitte stattfinden kann. Um auch Spuren dieser stark degenerierten DNA erfolgreich mit Hilfe einer PCR-Reaktion nachweisen zu können, müssen die Primerpaare so gewählt werden, daß auch solch kleine DNA-Fragmente noch vervielfältigt werden.

Im ersten Schritt der Methodenentwicklung wurden verschiedene Primerpaare unter Berücksichtigung der genannten Vorgaben gesucht und ausgewählt. Da die Methode auch eine Tierartendifferenzierung über RFLP-Analyse erlauben soll, wurden die Restriktionsschnittstellen ermittelt, die eine Identifizierung einzelner Tierarten ermöglichen. Eine Tierartidentifizierung soll einerseits Auskunft über eine potentielle BSE-Übertragungsfahr (Rind, Schaf) geben, andererseits aber auch eine Identifizierung von tierischen Futtermittelkontaminationen (Mäuse, Schnecken etc.) ermöglichen.

Mit dem neu erarbeiteten universellen PCR-Nachweisverfahren wurden im Arbeitskreis PCR-Analytik bereits gute Erfolge und Fortschritte erzielt. Die Methode wurde in einem ersten Ringversuch geprüft und wird derzeit weiter intensiv getestet.

Analysemethoden sind aber immer erst dann für eine praktische Anwendung geeignet, wenn durch Validierung Aussagen zur Nachweis- und Bestimmbarkeitsgrenze, zur Wiederholbarkeit und zur Vergleichbarkeit gemacht werden können. Diese erforderlichen Arbeiten werden gegenwärtig durchgeführt. Nach erfolgreichem Abschluß der Methodvalidierung steht zukünftig eine Methode zur Verfügung, mit deren Hilfe einerseits mikroskopische Befunde bestätigt werden und andererseits auch strukturlose tierische Bestandteile, die mikroskopisch nicht erfaßbar sind, nachgewiesen werden können. Die PCR-Methode kann die Mikroskopie somit in sinnvoller Weise ergänzen und eine verbesserte Überwachung des generellen Verfütterungsverbotes ermöglichen. Der VDLUFA hofft, damit einen Beitrag zu leisten, das Vertrauen der Verbraucher in die Landwirtschaft wiederzugewinnen.

Abbildung 3:

