

Knochenfragmente in Zuckerrübenschnitzeln

Aktualisierte Stellungnahme* Nr. 005/2005 des BfR vom 1. Dezember 2004

Zuckerrübenschnitzel entstehen als Nebenprodukt, wenn Zucker aus Zuckerrüben gewonnen wird. Sie werden zu Futtermitteln für lebensmittelliefernde Tiere verarbeitet und somit auch an Wiederkäuer verfüttert. In Zuckerrübenschnitzeln aus Deutschland wurden mikroskopisch Knochenfragmente und Haare nachgewiesen. Unklar ist, auf welchem Weg sie in das Futtermittel gelangt sind und von welcher Tierart sie stammen. Das Auffinden von Knochenfragmenten ist ein Hinweis auf tierisches Protein. Bei Knochenfragmenten von Wiederkäuern ist das Risiko einer Übertragung des BSE-Erregers auf lebensmittelliefernde landwirtschaftliche Nutztiere zu überprüfen.

Für die Einschätzung des BSE-Risikos ist die Herkunft der tierischen Bestandteile entscheidend. Bei den Knochenfragmenten kann es sich um Reste von Kleintierkadavern oder Beutetieren handeln. Darüber hinaus besteht die Möglichkeit, dass die Kontamination der Futtermittelproben auf den Einsatz organischer Düngemittel (z. B. Fleisch-Knochenmehl) zurückzuführen ist. Während die Verfütterung von Tiermehl und tierischem Eiweiß an lebensmittelliefernde Tiere seit 2001 wegen des Risikos der BSE-Übertragung grundsätzlich verboten ist, darf Tiermehl und Knochenmehl nach einer Hitzebehandlung mit 133 °C und 3 Bar Druck über mindestens 20 Minuten weiterhin als Dünger im Landbau verwendet werden. Voraussetzung dafür ist, dass das Tiermehl kein Risikomaterial von Wiederkäuern enthält.

In ersten Untersuchungen wurden nur Ratten oder Mäuse als Quelle tierischer Proteine in den Zuckerrübenschnitzeln identifiziert. Erbgut von Rindern wurde nicht nachgewiesen. Um die Frage der Herkunft endgültig zu klären, hat das BfR Proben von Zuckerrübenschnitzeln, in denen tierische Bestandteile nachgewiesen wurden, mit hochempfindlichen molekularbiologischen Methoden untersucht. Die Ergebnisse bestätigen die ersten Untersuchungen: In vier der zehn untersuchten Proben konnte Erbgut von Ratten nachgewiesen werden, zusätzlich in sieben Proben menschliches Erbgut und in zwei Fällen schweine-spezifische DNA. Genetisches Material vom Rind konnte nicht nachgewiesen werden. Damit geht von diesen mit Knochenfragmenten verunreinigten Zuckerrübenschnitzeln nach Ansicht des BfR kein BSE-Risiko aus. Grundsätzlich jedoch kann ein Risiko für lebensmittelliefernde Wiederkäuer, sich bei Aufnahme von Zuckerrübenschnitzeln, die über den Ackerboden mit tierischen Bestandteilen kontaminiert sind, mit BSE zu infizieren, unter Berücksichtigung der Kenntnisse zur Persistenz von Prionen im Boden, nicht ausgeschlossen werden. Ausgehend vom aktuellen Kenntnisstand wird das Risiko zwar gering eingeschätzt, beziffern lässt es sich jedoch nicht.

Zu dem Thema fand am 10. Januar 2005 am BfR ein Sachverständigengespräch¹ statt. Diskutiert wurden die zur Analyse von Futtermitteln geeigneten Methoden sowie erste Ergebnisse der Untersuchungen. Die vorliegenden analytischen Befunde der jüngsten Zeit zum Vorkommen tierischer DNA in Zuckerrübenschnitzeln deuten darauf hin, dass regelmäßig mit tierischer DNA in als Futtermittel verwendeten Erdfrüchten zu rechnen ist.

In Zuckerrübenschnitzeln aus Deutschland wurden Knochenfragmente und Haare mikroskopisch nachgewiesen. Die Verunreinigungen bewegen sich im unteren noch qualitativ nachweisbaren Bereich. Der Ursprung ist noch nicht abschließend geklärt.

¹ Teilnehmerliste am Ende des Dokuments.

Das BfR hatte folgende Aspekte des Befundes bewertet:

- Morphologie und Aussehen der Knochenfragmente
- Bestimmung der Tierarten in den Proben
- mögliche Eintragswege
- das Risiko der Übertragung von BSE

Ergebnis

Die Ergebnisse erster Untersuchungen deuteten darauf hin, dass es sich bei den tierischen Verunreinigungen um Überreste von Nagern (Ratten, Mäuse) handelt, die im Zuge der Ernte mittelbar in das Rohmaterial gelangt sind. Von diesen Verunreinigungen geht nach bisherigem Erkenntnisstand keine BSE-Gefahr aus. Weitere Untersuchungen mit hochempfindlichen molekularbiologischen Methoden bestätigten die Ergebnisse der ersten Untersuchung. Die Untersuchungen lieferten keine Hinweise auf Überreste von Rindern. Dagegen konnte sowohl menschliches als auch schweine-spezifisches Erbgut in einigen der Proben mit Hilfe der Polymerasekettenreaktion (PCR) nachgewiesen werden.

Begründung

Zuckerrübertrockenschnitzel und Zuckerrübenmelasseschnitzel als Futtermittel

Zuckerrübertrockenschnitzel sind ein Nebenerzeugnis der Lebensmittelproduktion, das bei der Zuckergewinnung aus Zuckerrüben anfällt und aus extrahierten getrockneten Schnitzeln besteht (Höchstgehalt an salzsäureunlöslicher Asche: 4,5% in der Trockenmasse).

Zuckerrübenmelasseschnitzel sind ebenfalls ein Nebenerzeugnis, das bei der Zuckergewinnung anfällt und durch Trocknung extrahierter, melassierter Pressschnitzel von Zuckerrüben gewonnen wird (Höchstgehalt an salzsäureunlöslicher Asche: 4,5% in der Trockenmasse). Beide Nebenerzeugnisse werden zu unterschiedlichen Anteilen vorwiegend in Rationen für Wiederkäuer und Pferde eingesetzt.

Futtermittelmikroskopie

Die amtliche Methode zur Untersuchung von Futtermitteln auf tierische Bestandteile ist die Mikroskopie (Richtlinie 2003/126/EG).

In Futtermitteln werden tierische Bestandteile anhand von tiercharakteristischen morphologischen Kennzeichen wie Knochenfragmente, Muskelfasern, Federn oder Haare noch in einer Größenordnung kleiner als 0,1% der Probe zuverlässig erkannt. Bei Vorliegen von Knochenfragmenten kann eine Quantifizierung auf Basis einer Schätzung erfolgen. Die Schätzung kann durch Vergleichsmischungen mit definierten Anteilen an Knochenfragmenten abgesichert werden.

Eine Differenzierung zwischen Landtieren und Fisch ist bei Feststellung von Knochenfragmenten mikroskopisch möglich, jedoch keine genauere Charakterisierung einer Tierespezies. Ringuntersuchungen haben gezeigt, dass Tiermehl von Landtieren in einer Größenordnung von 0,1% der Probe in Gegenwart von Fischmehl zweifelsfrei nachzuweisen ist.

Das Auffinden von Knochenfragmenten ist ein Indiz auf tierisches Protein. Der Eintrag morphologisch nicht charakteristischer tierischer Bestandteile wie beispielsweise Eingeweide, Gelatine oder Gülle lässt sich mikroskopisch nicht nachweisen.

Bodenproben wurden mikroskopisch bisher nicht routinemäßig auf das Vorkommen von Knochenfragmenten hin untersucht. Die Kenntnisse aus der Aufbereitung von Futtermittelproben mittels der amtlichen Methode lassen sich nicht einfach übertragen, da geeignete Anreicherungsverfahren noch nicht etabliert sind.

Möglicher Kontaminationspfad Boden

Einträge von Knochenfragmenten in den Boden erfolgen auf natürlichem Weg (z. B. verendete Tiere, Exkrememente) und durch Bodenbewirtschaftung (z. B. erntebedingt getötete Kleintiere, Bioabfälle, Torf, Klärschlamm, Tiermehldüngung).

An der Universität Göttingen wurden Feinsandfraktionen von verschiedenen Böden mikroskopisch auf Knochenfragmente hin untersucht. Neben Löss- und Aueböden aus Süd- und Ostdeutschland wurden auch Bodenproben einer so genannten „erschöpfenden Versuchsfeld“ (E-Feld) untersucht. Dieses E-Feld wurde seit 130 Jahren nicht mehr mit phosphathaltigen Substanzen gedüngt.

In zwei Drittel der ca. 200 untersuchten Bodenproben konnten Anteile von Knochenfragmenten von durchschnittlich 0,7% in der Feinsandfraktion nachgewiesen werden. Diese wurden sowohl in bewirtschafteten Böden als auch im Boden des E-Feldes nachgewiesen. Das Alter der Knochenfragmente konnte nicht bestimmt werden. Ergänzende mineralogische Untersuchungen wiesen auf eine Bodenpassage der Knochenfragmente hin.

Knochenfragmente der Feinsandfraktion können in die Epidermis von Wurzel- und Knollenfrüchten (z.B. Zuckerrübe, Sellerie) einwachsen. Durch Aufwirbeln der Ackerkrume bei Wind, Regen oder Mähdrusch ist die Kontamination auch oberirdischer Pflanzenteile durch Knochenfragmente oder andere Bodenpartikel möglich.

An der Universität Hohenheim wurden Bilanzierungen zum Eintrag von Knochenfragmenten in Böden durchgeführt. Auf Grundlage von Populationsuntersuchungen an Feldmäusen und der daraus abgeleiteten Knochenmenge wurde für 1 ha Ackerkrume eine theoretische Anhaftung von 0,0002 % an Zuckerrübenschnitzeln berechnet. Eine weitere Kalkulation mit ähnlichen Ergebnissen wurde auf Grundlage von Tiermehl als Dünger erstellt.

Die Untersuchungen beider Universitäten zeigen, dass Knochenfragmente in Böden ubiquitär vorkommen, wobei die Halbwertszeiten für die Knochenfragmente in Abhängigkeit von den jeweiligen physiko-chemischen und biologischen Parametern des Bodens stark schwanken. Eine Quantifizierung des Anteils von Knochenfragmenten in Böden lässt sich nicht allgemeingültig ableiten.

Bestimmung der Tierarten in den Proben

Nach den dem BfR aus Landesuntersuchungseinrichtungen vorliegenden Ergebnissen wurde in Rübenschnitzeln in einem **Screening auf Tierarten** mittels Polymerase-Kettenreaktion-(PCR)-Analyse Erbgut (DNA) nachgewiesen, das auf das Vorhandensein von Geflügel oder Säugern hinweist. In einer nachfolgenden **tierartsspezifischen PCR-Analyse** konnte keine DNA von Rind, Huhn oder Pute nachgewiesen werden, wohl aber nagetierspezifisches Erbgut.

Ob die negativen Befunde auf die Abwesenheit von wiederkäuer-spezifischen DNA-Sequenzen zurückzuführen sind, kann aufgrund der fehlenden Angaben für die Nachweisgrenzen der angewandten PCR-Analytik nicht bewertet werden. Vor allem der Nachweis nagetierspezifischer DNA kann nicht als Beweis für die Herkunft aus den Knochenfragmenten gelten. Dies ist nur dann eindeutig zu bestimmen, wenn die Knochenfragmentfraktion getrennt analysiert wird. Damit könnte die nagetierspezifische DNA auch aus einer Kontamination mit Nagetier-Exkrementen stammen.

Um die Herkunft der Verunreinigung endgültig zu klären, hat das BfR eine Tierartidentifizierung mittels hochempfindlicher molekularbiologischer Methoden vorgenommen. Untersucht wurden elf Proben: Zuckerrübetrockenschnitzel (pelletiert) und Zuckerrübenschnitzel (melassiert bzw. nicht-melassiert). Von den homogenisierten Proben wurden jeweils 10 x 200 mg Testmaterial für die PCR-Analytik entnommen. Nach der DNA-Extraktion erfolgte die Vereinigung der 10 DNA-Extrakte einer Untersuchungsprobe, um ausreichende Mengen an DNA für die Analyse zu gewinnen.

Folgende spezifische PCR-Analysen wurden an den Proben durchgeführt:

- Pflanzen-spezifische PCR
- Spezifische PCR für Rind
- Spezifische PCR für Ratte
- Zwei unterschiedliche für Säugetiere spezifische PCR-Systeme

In einer Kontrolle der Amplifizierbarkeit (Möglichkeit der Vervielfältigung) der DNA konnte mit Hilfe eines pflanzenspezifischen PCR-Systems in allen Proben DNA nachgewiesen werden. Falsch negative Ergebnisse aufgrund einer vorliegenden Störung im Reaktionsansatz (Inhibition) in den anschließenden Analysen können somit ausgeschlossen werden.

In allen Proben wurde Säugetier-DNA nachgewiesen. Einige der Proben reagierten in der PCR schwach-positiv auf Ratten-DNA. Die Spezies Rind war in keiner Probe nachweisbar. Die Sensitivität aller hier verwendeten Systeme liegt bei zehn Genomkopien. Das heißt, mindestens zehn Genomkopien müssen im Reaktionsansatz vorhanden sein, um einen positiven Nachweis zu führen. Bei einer theoretischen Genomgröße von 0,4 pg für die Spezies Rind bedeutet dies beispielsweise, dass beim Einsatz von insgesamt 10 ng isolierter DNA in der PCR eine Nachweisgrenze von 0,04 % Rind-DNA besteht. Trotz der negativen Ergebnisse kann deshalb nicht völlig ausgeschlossen werden, dass Rind-DNA unterhalb dieser Nachweisgrenze in den Proben enthalten ist.

Die hier dargestellten Untersuchungsergebnisse sind rein qualitativ, Mengenaussagen können aufgrund der eingesetzten Analytik nicht getroffen werden. Zudem waren die isolierten DNA-Mengen zu gering, um quantitative Verfahren anzuwenden. Sämtliche eingesetzte Kontrollen waren einwandfrei. Das zeigt, dass sämtliche Analysen korrekt durchgeführt wurden.

Um eine Identifizierung der Tierart vorzunehmen, erfolgte eine Sequenzanalyse der mit Hilfe des säugetierspezifischen Systems (*cytb* Gen) vervielfältigten DNA-Abschnitte (Amplifikate).

Die noch auszuwertenden Ergebnisse beziehen sich auf die Gesamtprobe und lassen keinen direkten Schluss auf die Herkunft der Knochenfragmente zu. Um diese Frage zu klären, müsste eine Trennung der Knochenfraktion und eine anschließende Analyse dieser Fraktion erfolgen. Selbst wenn die Trennung erfolgreich wäre, kann aufgrund der Verarbeitung der

Futtermittelproben die DNA entweder bereits eliminiert oder so stark geschädigt sein, dass ein analytischer Nachweis mittels PCR nicht mehr möglich ist.

Risiko der Übertragung von BSE

Ein Risiko, dass sich Wiederkäuer durch die Verfütterung dieser mit tierischen Überresten kontaminierten Zuckerrübenschnitzel mit BSE infizieren, ist nach den Analysenergebnissen somit nicht gegeben.

Als Quelle tierischer Bestandteile in den Zuckerrübenschnitzeln konnten nur Ratten, Mäuse und Schwein sicher identifiziert werden. DNA von Rindern wurde nicht nachgewiesen. Die Gefahr, dass Feldnager BSE-infiziert sein könnten, wird angesichts des Fehlens jeglicher Hinweise auf eine BSE-Übertragung durch direkten Kontakt mit Rindern oder deren Ausscheidungen (Kot, Harn, Milch) als sehr gering eingeschätzt. Auch eine BSE-Infektion von Feldnagern über ausgebrachte Düngemittel ist aufgrund der vor mehreren Jahren eingeführten BSE-Maßnahmen heute sehr unwahrscheinlich.

Sachverständigengespräch „Knochenfragmente in Zuckerrübenschnitzeln“

Das Bundesinstitut für Risikobewertung hat am 10. Januar 2005 ein Sachverständigengespräch mit Experten von Landwirtschaftlichen Untersuchungs- und Forschungsanstalten, Universitäten und Bundesforschungsanstalten zu den Befunden von Knochenfragmenten in Zuckerrübenschnitzeln durchgeführt. Diskutiert wurden folgende Tagesordnungspunkte:

- Futtermittel-Mikroskopie
- Polymerase-Chain-Reaction (PCR)
- Möglicher Kontaminationspfad Boden – Erste Untersuchungsergebnisse

Die Ergebnisse dieser Veranstaltung sind im Folgenden zusammengefasst:

1. Die Mikroskopie ist die amtliche Methode zum Nachweis von tierischen Bestandteilen in Futtermitteln. Sie ermöglicht den Nachweis von tiercharakteristischen, morphologischen Strukturen wie Knochenfragmenten, Muskelfasern, Haaren und Federn. Mit der Methode der Polymerase-Kettenreaktion (PCR) können die von der Mikroskopie als positiv befundenen Proben hinsichtlich der Tierart spezifiziert werden.
2. Die durch Mikroskopie festgestellten Funde von Knochenfragmenten in Futtermittelproben sind ein Indiz für das Vorkommen weiterer tierischer Proteine (Reste von Kleintierkadavern oder Beutetieren, Einsatz organischer Düngemittel wie z. B. Fleisch-Knochenmehl). Die Herkunft der Knochenfragmente ist mikroskopisch nicht bestimmbar.
3. Fehlt ein mikroskopischer Nachweis von Knochenfragmenten in der Futtermittelprobe, ist trotzdem grundsätzlich keine Aussage darüber möglich, ob tierisches, morphologisch nicht charakterisierbares Material in der Probe vorhanden ist oder nicht (z. B. organische Düngemittel: Gülle).
4. Knochenfragmente sind in den oberflächennahen Schichten sowohl naturbelassener als auch kulturell genutzter Böden zu finden. Knochenfragmente können als Bestandteile der Feinsandfraktion auch an geernteten und gewaschenen Erdfrüchten haften. Zudem können sie in die Epidermis einiger Knollen- und Wurzelfrüchte eingewachsen sein (mögliche Anhaftungen bzw. Inkorporationen sowohl in Futtermitteln als auch in Lebensmitteln wie: Zuckerrübe, Futterrübe, Mohrrübe, Sellerie, Wirsing, Silagen, Heu).

Eine Kontamination von Ackerfrüchten mit Knochenfragmenten aus der Ackerkrume kann auch durch die Aufwirbelung von Knochenpartikeln durch Regentropfen hervorgerufen werden. Zudem scheint eine Kontamination des Erntegutes z. B. durch Staubeentwicklung beim Mähdrusch oder der Silage- und Heubereitung möglich.

5. Eine Abschätzung des Alters der Knochenfragmente kann mit den Methoden der Mikroskopie und PCR nicht vorgenommen werden. Somit kann selbst bei einem Nachweis von Knochenfragmenten in der Futtermittelprobe nicht unterschieden werden, ob diese Fragmente vor oder nach dem Inkrafttreten des Verfütterungsverbots und der Regelungen hinsichtlich des spezifizierten Risikomaterials (SRM) in das System Boden eingetragen wurden.
6. Obwohl die DNA-Analytik eine grundsätzliche Unterscheidung unterschiedlicher Tierarten ermöglicht, ist es im Einzelfall nicht möglich, zwischen natürlich vorhandener tierischer DNA (verendete Tiere) und vom Menschen zugeführter tierischer DNA (Tiermehl, Dünger) in der Futtermittelprobe oder dem Boden zu unterscheiden.
7. Die vorliegenden analytischen Befunde der jüngsten Zeit zum Vorkommen tierischer DNA in Zuckerrübenschnitzeln deuten darauf hin, dass regelmäßig mit tierischer DNA in als Futtermittel verwendeten Erdfrüchten zu rechnen ist. Eine Verunreinigung mit Rinder-DNA wurde bisher nicht festgestellt.
8. Ein Risiko für lebensmittelliefernde Wiederkäuer, sich bei Aufnahme der untersuchten Zuckerrübenschnitzel mit BSE zu infizieren, ist nach den vorliegenden Analyseergebnissen nicht zu erkennen. Grundsätzlich kann ein Risiko durch Kontaminationen mit tierischen Bestandteilen aus Ackerböden unter Berücksichtigung der Persistenz von Prionen im Boden zwar nicht ausgeschlossen, aber als nicht bezifferbar eingeschätzt werden.

**Teilnehmer am Sachverständigengespräch des BfR am 10. Januar 2005 zum Thema
„Knochenfragmente in Zuckerrübenschnitzeln“**

Bundesforschungsanstalten und Universitäten

Dir. & Prof., Prof. Dr. sc. agr. habil., Dr. rer. nat. habil. Ewald Schnug
Bundesforschungsanstalt für Landwirtschaft
Institut für Pflanzenernährung und Bodenkunde

Dr. Andreas Berk
Bundesforschungsanstalt für Landwirtschaft
Institut für Tierernährung

Prof. Dr. Hans Schenkel
Universität Hohenheim
Landesanstalt für Landwirtschaftliche Chemie

Dr. Regina Modi
Universität Hohenheim
Landesanstalt für Landwirtschaftliche Chemie

Prof. Dr. Brunk Meyer
Institut für Bodenwissenschaft

Dr. Klaus-Wenzel Becker
Institut für Bodenwissenschaft

Landesuntersuchungs-und Forschungsanstalten

Dr. Inge Paradies-Severin
LUFA Nord-West
Institut für Düngemittel und Saatgut

Dr. Jörg Winkler
HDLGN
LUFA Kassel

Britta Hertel
HDLGN
LUFA Kassel

Dr. Diana Hormisch
LUFA Speyer

Dr. Brigitte Roth
LUFA Augustenberg

Dr. Jens Schönherr
Sächsische Landesanstalt für Landwirtschaft
Fachbereich Landwirtschaftliche Untersuchungen/LUFA

Dr. Michael Egert
LUFA Nordwest - Standort Oldenburg
Landwirtschaftskammern Weser-Ems und Hannover

Inge Sloom
LUFA Nord-West
Landwirtschaftskammern Weser-Ems und Hannover

Bundesbehörden

Dr. Arnhild Wolter
Bundesministerium für Verbraucherschutz, Ernährung und Landwirtschaft
Referat 318

Dr. Claus Bannick
Umweltbundesamt

Bundesinstitut für Risikobewertung

Prof. Dr. Reiner Wittkowski
Vizepräsident des BfR, kommissarischer Leiter der Abteilung 5, Lebensmittelsicherheit

Dr. Monika Lahrssen-Wiederholt
Fachgruppe 54, Kontaminanten in der Nahrungskette und Futtermittelsicherheit

Dr. Helmut Schafft
Fachgruppe 54, Kontaminanten in der Nahrungskette und Futtermittelsicherheit

Dr. Klaus Lucas
Fachgruppe 54, Kontaminanten in der Nahrungskette und Futtermittelsicherheit

Dipl.-Ing. Christian Boess
Fachgruppe 54, Kontaminanten in der Nahrungskette und Futtermittelsicherheit

Dr. Heike Itter
Fachgruppe 54, Kontaminanten in der Nahrungskette und Futtermittelsicherheit

Dr. Eberhard Schmidt
Fachgruppe 54, Kontaminanten in der Nahrungskette und Futtermittelsicherheit

Dr. Jutta Zagon
Fachgruppe 56, Produktidentität, Rückverfolgbarkeit und neuartige Lebensmittel

Hermann Broll
Fachgruppe 56, Produktidentität, Rückverfolgbarkeit und neuartige Lebensmittel

Dr. Ekkehard Weise
Abteilung 4, Biologische Sicherheit

Dr. Thomas Höfer
Abteilung 6, Sicherheit von Stoffen und Zubereitungen