

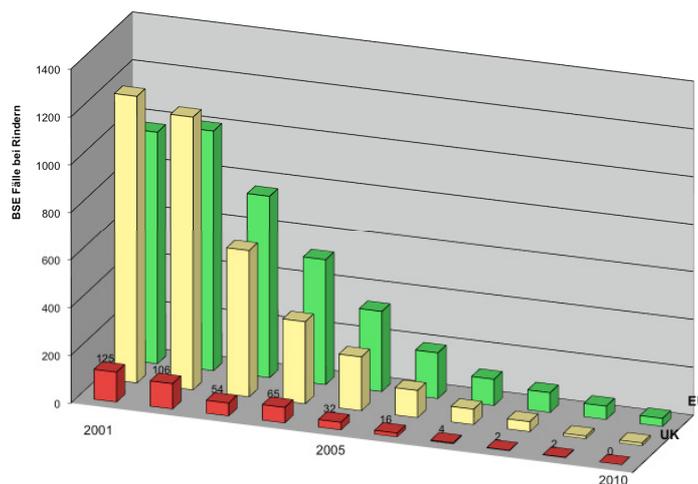
**BfR – Forum Verbraucherschutz  
Kontrolle in der Nahrungskette  
Besser Nachweisen – Besser Bewerten**

**Tierische Bestandteile in  
Futtermitteln – Neue Wege in der  
Analytik**

**J. Zagon, A. Lampen, G. Balizs und H. Broll  
Bundesinstitut für Risikobewertung (BfR), Berlin**

**Auswirkung der Maßnahmen**

**BSE in Europa\*, UK\*\* und DE seit 2001**



Quelle: \*[http://ec.europa.eu/food/food/biosafety/tse\\_bse/docs/annual\\_report\\_tse2008\\_en.pdf](http://ec.europa.eu/food/food/biosafety/tse_bse/docs/annual_report_tse2008_en.pdf)  
 \*\*[http://www.oie.int/print.php?p=http://www.oie.info/en\\_esbmonde.htm](http://www.oie.int/print.php?p=http://www.oie.info/en_esbmonde.htm)  
 \*\*\*<http://www.bmelv.de/SharedDocs/Standardartikel/Landwirtschaft/Tier/Tiergesundheit/BSE/BSE.html>

## Rechtlicher Hintergrund

### Verordnung (EG) Nr. 999/2001

- Vorschriften zur Verhütung, Kontrolle und Tilgung bestimmter transmissibler spongiformer Enzephalopathien
- Die Verfütterung von tierischen Proteinen an Nutztieren (mit Ausnahme von Haus- und Pelztieren) ist verboten.

## Neue gesetzliche Regelungen

### Verordnung (EG) No. 1069/2009

- ✓ Ersetzt VO (EG) No. 1774/2002
- ✓ Hygienevorschriften für nicht für den menschlichen Verzehr bestimmte tierische Nebenprodukte und zur Aufhebung der Verordnung (EG) Nr. 1774/2002 (Verordnung über tierische Nebenprodukte).
- ✓ Die Fütterung einer Art mit verarbeitetem tierischem Eiweiß, das aus Körpern oder Teilen von Körpern von Tieren derselben Art gewonnen wurde (Kannibalismus) ist verboten.

... **in Kraft seit 04. März 2011**

Produkt:	Verfütterung an:	NUTZTIER – GRUPPE:			
					
Verarbeitetes tierisches Protein		●	●	●	●
Aus Wiederkäuern gewonnene Gelatine		●	●	●	●
Blutprodukte		●	●	●	●
Hydrolysiertes Protein		●	●	●	●
Di-/Tricalciumphosphat tierischen Ursprungs (proteinfrei)		●	●	●	●
Futtermittel, die o.g. Proteine enthalten		●	●	●	●
Milch, Erzeugnisse auf Milchbasis und Kolostrum		●	●	●	●
Eier und Eierzeugnisse		●	●	●	●
Aus Nichtwiederkäuern gewonnene Gelatine		●	●	●	●
Aus Teilen von Nichtwiederkäuern sowie aus Wiederkäuerhäuten und -fellen hydrolysierte Proteine		●	●	●	●
Fischmehl		●	●	●	●
Blutmehl		●	●	●	●
Knollen- u. Wurzelfrüchte, wenn Spuren von Knochensplittern nachgewiesen werden		●	●	●	●
Ausgelassenes Wiederkäuerfett		●	●	●	●

14.06.2012\_BfR - Forum Verbraucherschutz\_Kontrolle in der Nahrungskette Seite 5 

## ZWEITE TSE-ROADMAP DER EU-KOMMISSION

- Überprüfung der SRM-Liste (Stellungnahme EFSA für kleine Wiederkäuer, Ende 2010 erwartet)
- Lockerung des gegenwärtigen absoluten Verfütterungsverbots, sofern validierte tierartspezifische Tests verfügbar sind:
  - Toleranzschwelle für sehr kleine Mengen TP (Stellungn. EFSA, Ende 2010)
  - Aufhebung des Verfütterungsverbotes für Schweine, Geflügel, Fische jedoch ohne Umgehung des Intra-Spezies-Recycling
- Derzeitiger Stand der Analytik (EURL-AP):
  - Mikroskopie für die Zwecke der Quantifizierung nicht zuverlässig
  - Alternative Analytik schwierig durch hohen Degradationsgrad (Protein/DNA)

## NRL für Tierisches Protein in Futtermitteln

- PCR
- Immunoassays
- GTH, ... andere Verfahr.



<http://www.bfr.de/>

Abteilung Lebensmittelsicherheit, Prof.  
Dr. Dr. A. Lampen

Leitung NRL: Hermann Broll/Jutta  
Zagon

Max-Dohrn-Strasse 8-10  
10589 Berlin

### Mikroskopische Analyse



<http://www.lufa-nord-west.de/>

Institut für Futtermitteluntersuchung

Dr. Michael Egert

Jägerstr. 23 - 27  
26121 Oldenburg



## Mikroskopie

### Referenzmethode (VO (EG) Nr. 152/2009): **Mikroskopie**

Hohe Sensitivität (0,005%)  
Qualitativ

- Probleme:
- lange Ausbildungszeit/Erfahrung nötig,
  - subjektive Methode,
  - geringer Probendurchsatz,
  - quantitative Schätzwerte,
  - fehlende Artspezifität.



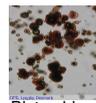
Rinderknochen  
BfR



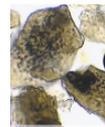
Fischschuppe  
EU-RL



Federmehl  
EU-RL



Blutmehl  
EU-RL



## Neue gesetzliche Regelungen

### **Verordnung (EG) No. 152/2009 zur Festlegung der Probenahmeverfahren und Analysemethoden für die amtliche Untersuchung von Futtermitteln**

- Annex enthält Methodenauflistung von Probenahme bis zur Analyse
- Mikroskopie
- als Ergänzung vorgesehen: PCR zur Tierartidentifizierung

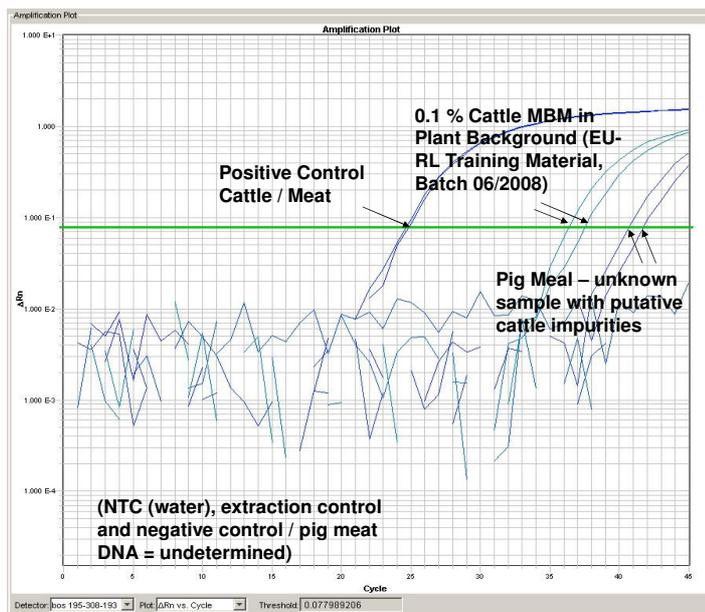
... **in Kraft seit 26. August 2009**

## DNA -Analytik

## Einfluss der Prozessierung auf DNA Qualität und Quantität:

- ☹️ **Wenig DNA**
- ☹️ **Hoher Fragmentierungsgrad**
- ☹️ **Ko-Extraktion potentieller DNA-Inhibitoren**

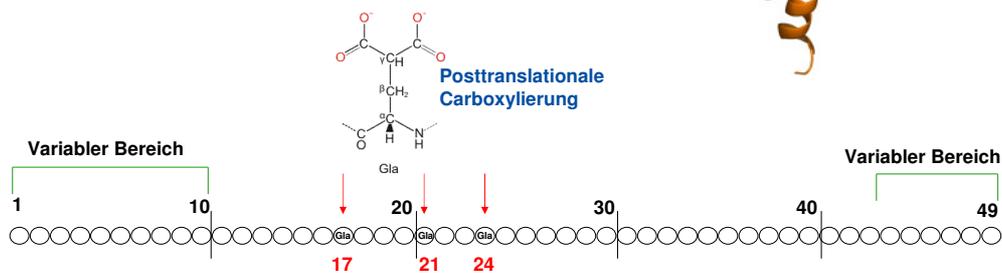
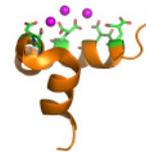
## Real time PCR



**Nachweis Rind in 0.1 % cattle MBM ist möglich!**

# Protein-Analytik

## Osteocalcin – ein stabiler Knochenmarker



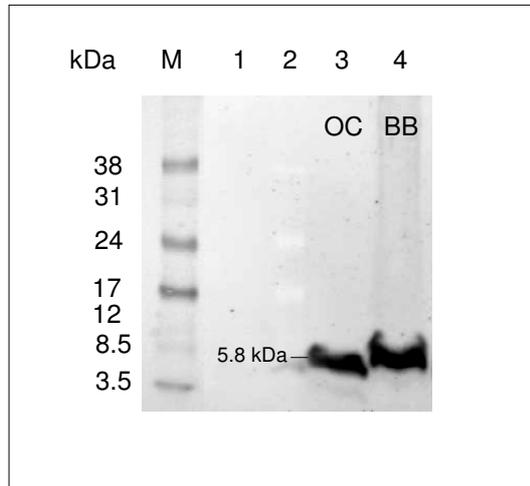
- Osteoblastenprodukt, 90 % in Knochen, 10 % Blutbahn
- 49 Aminosäuren – 5900 Da – Calciumbindung
- alpha-Helix (17%), hitzestabil (120 °C), in fossilen Knochen nachgewiesen
- 2-3 % des Knochenproteins
- hochkonservativ im Mittelbereich
- speziesvariabel am N- und C-terminalen Ende



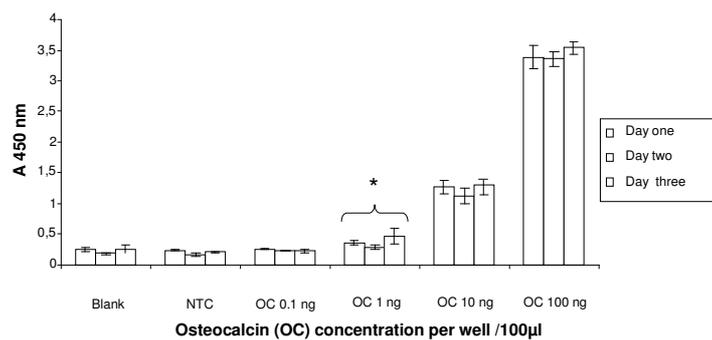
In Neandertaler-Knochen nachgewiesen

(MALDI-TOF)

## Western-blot mit gegen bovines Osteocalcin generiertem Antikörper

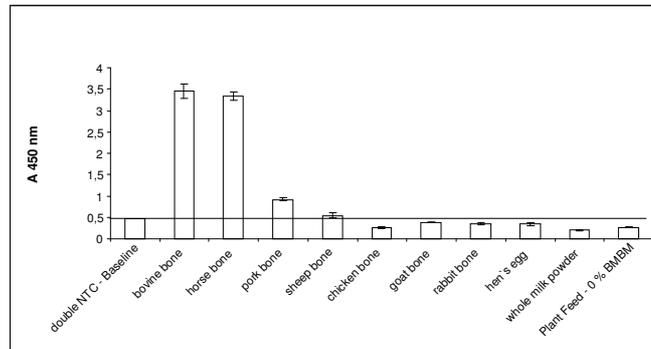


## Sandwich-ELISA - Nachweisgrenze

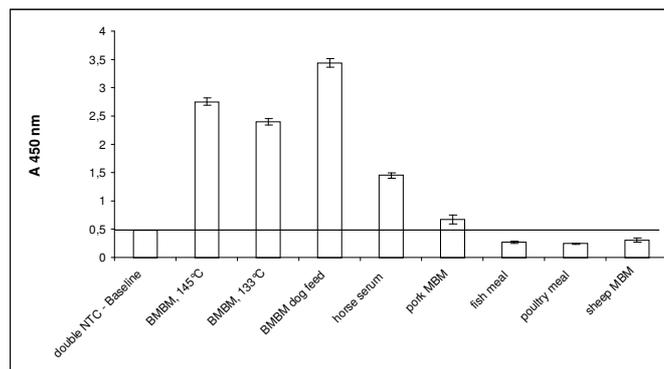


Standard	Day one		Day two		Day three		Interassay variation CV (%)
	Mean	SD	Mean	SD	Mean	SD	
Blank	0,246	0,041	0,182	0,01	0,258	0,058	17,9
NTC	0,241	0,014	0,168	0,014	0,207	0,01	17,8
OC 0.1 ng	0,261	0,014	0,229	0,004	0,226	0,031	8,1
OC 1 ng	0,363	0,043	0,288	0,037	0,46	0,123	23,3
OC 10 ng	1,267	0,1	1,125	0,127	1,309	0,174	7,8
OC 100 ng	3,386	0,196	3,36	0,113	3,536	0,103	2,8

## Sandwich-ELISA - Spezifität



## Sandwich-ELISA – reale Proben



## Massenspektrometrische Methoden zur Bestimmung von Osteocalcin (OC) in Knochen und in „meat and bone meal“ (MBM)

- MALDI/TOF Massenspektrometrie (nur für die qualitative Analyse)
- HPLC- Q/TOF (Quadrupol / Time-of Flight) Massenspektrometrie (ggf. auch geeignet für die Quantifizierung)

Die Bestimmung erfolgt aufgrund der unterschiedlichen Massen der einzelnen Molekülen bzw. der Peptide

Aminosäuresequenz von Osteocalcin der diversen Spezies (Unterschiede in Rot markiert). Humanes OC als interner Standard.

<i>Bos taurus</i>	YLDHW LGAPA PYPDP LEPKR EVCEL NPDCD ELADH IGFQE AYRRF YGPV
<i>Sus scrofa</i>	...G .....R.....IA
<i>Homo sapiens</i>	..YQ. ....V .....R.....
<i>Gallus gallus</i>	HYAQD S.VAG AP.N. ..AQ. ....S.....Q.....

## Massenspektrometrie



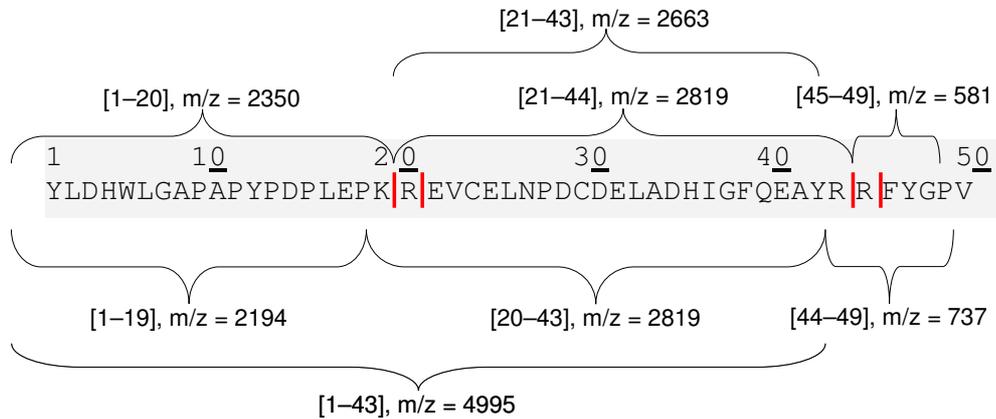
MALDI-TOF-MS



ESI-qTOF-MS

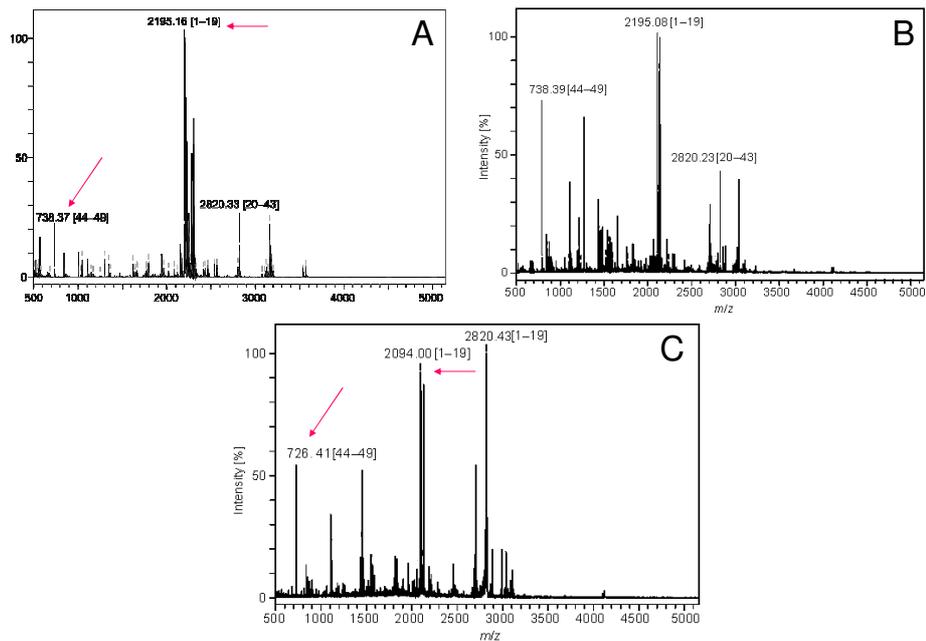
## Theoretische Peptidmassen\*

Osteocalcin (bovine)



\* Nach der Protonierung ist die Masse= M + 1

## MALDI/TOF - Spektrum der trypsinieren bovine OC Standard (A) und der Extrakte von bovinem Knochen (B) und porcinem MBM (C)



## Anwendung der Massenspektrometrie zur Tierartidentifizierung

- Vorteile
  - Sichere (speziesspezifische) Identifizierung aufgrund der Massenunterschiede
  - Geeignet als „Bestätigungsmethode“
  - Potentieller „Golden Standard“
  - MALDI/TOF für die qualitative Analytik
  - Q/TOF ist ggf. geeignet auch für die Quantifizierung
- Nachteile
  - Aufwendige Probenvorbereitung eine Serie dauert ca. 3 - 4 Arbeitstage
  - Hohe Investitionskosten
  - Referenzdatenbank notwendig

**Balitz, G., Weise, C., Rozycki, C., Opialla, T., Sawada, S., Zagon, J. and Lampen, A. (2011).** Determination of osteocalcin in meat and bone meal of bovine and porcine origin matrix-assisted laser desorption ionization/time-of-flight mass spectrometry and high-resolution hybrid mass spectrometry. *Analytica Chimica Acta* **693**, 89-99.

## FAZIT

- Osteocalcin ist in hoch verarbeitetem MBM sowohl immunologisch als auch spektrometrisch nachweisbar;
- Im ELISA keine Kreuzkontamination mit Pflanzenmischfutter;
- Der Nachweis von 0.1 % MBM in Pflanzenmischfutter ist möglich, bewegt sich aber an der Nachweisgrenze (LOD);
- Durch Wahl der Sequenzen zur Herstellung von Antikörper können gezielt Tierarten/Gruppen diskriminiert werden (Ratte, Maus, Huhn, Fisch);
- Massenspektrometrie erlaubt grundsätzlich die Tierartdiff.;
- DNA-Analytik ideal für Tierartdiff., aber Sensitivität muss verbessert werden.



Almut Leffke



Hermann Broll



Almuth Spiegelberg



Bettina Linke

## Vielen Dank für die Aufmerksamkeit

NRL TP – Mitarbeiter am „Tag der Offenen Tür“

Bundesinstitut für Risikobewertung

Max-Dohrn-Str. 8-10 • D-10589 Berlin

Tel. +49 30 - 184 12 - 3639 • Fax +49 30 - 184 12 - 3715

bfr@bfr.bund.de • www.bfr.bund.de



Jutta Zagon