

Aus dem Institut für Tierärztliche Nahrungsmittelkunde
der Justus-Liebig-Universität zu Gießen

Nachweis von zentralnervösem Gewebe in Lebensmitteln im Hinblick auf die bovine spongiforme Enzephalopathie (BSE)

Inaugural-Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades
beim Fachbereich Veterinärmedizin
der Justus-Liebig-Universität Gießen

Eingereicht von
Sabine Horlacher

Gießen 2002

Aus dem Institut für Tierärztliche Nahrungsmittelkunde
der Justus-Liebig-Universität zu Gießen

Betreuer: Prof. Dr. E. Lücker

Nachweis von zentralnervösem Gewebe in Lebensmitteln im Hinblick auf die bovine spongiforme Enzephalopathie (BSE)

Inaugural-Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades
beim Fachbereich Veterinärmedizin
der Justus-Liebig-Universität Gießen

Eingereicht von
Sabine Horlacher
Tierärztin aus Öhringen

Gießen 2002

Mit Genehmigung des Fachbereichs Veterinärmedizin
der Justus-Liebig-Universität Gießen

Dekan: Prof. Dr. Dr. h.c. B. Hoffmann

1. Berichterstatter: Prof. Dr. E. Lücker
2. Berichterstatter: Prof. Dr. E. Eigenbrodt

Tag der mündlichen Prüfung: 25. Juni 2002

Inhaltsverzeichnis

1	EINLEITUNG	1
2	LITERATURÜBERSICHT	4
2.1	ALLGEMEINES ÜBER TRANSMISSIBLE SPONGIFORME ENZEPHALOPATHIEN (TSE)	4
2.1.1	TRANSMISSIBLE SPONGIFORME ENZEPHALOPATHIEN BEIM TIER	4
2.1.1.1	Bovine spongiforme Enzephalopathie (BSE)	5
2.1.1.2	Scrapie	6
2.1.1.3	„BSE“ bei Schafen	7
2.1.2	TRANSMISSIBLE SPONGIFORME ENZEPHALOPATHIEN BEIM MENSCHEN	8
2.1.2.1	Creutzfeldt-Jakob-Krankheit (CJD)	9
2.1.2.2	Variante der Creutzfeldt-Jakob-Krankheit (vCJD)	10
2.1.2.3	Kuru	12
2.2	URSACHEN DER BSE	13
2.2.1	TSE-ERREGER	13
2.2.2	DIAGNOSTIK DER BSE	17
2.2.3	ÄTIOLOGIE, VERBREITUNG UND EXPERIMENTELLE ÜBERTRAGUNG	20
2.2.3.1	Speziesbarriere	26
2.2.3.2	Experimentelle Übertragbarkeit	27
2.2.4	vCJD IST HUMANE BSE	30
2.2.5	RISIKOEINSCHÄTZUNG ANHAND DES INFEKTIOSEN EINTRAGS	31
2.2.5.1	Hirnzusatz in Fleischerzeugnissen	36
2.2.5.2	Separatorenfleisch in Fleischerzeugnissen	37
2.2.5.3	Lunge in Fleischerzeugnissen	38
2.3	VERBRAUCHERSCHUTZ	39
2.3.1	MAßNAHMEN	39
2.3.2	NOTWENDIGKEIT EINES NACHWEISVERFAHRENS	42
2.4	CHOLESTEROL	43
2.5	NEURONENSPEZIFISCHE ENOLASE (NSE)	44
2.6	SAURES GLIAFASERPROTEIN (GFAP)	46
3	MATERIAL UND METHODEN	48
3.1	UNTERSUCHUNGSMATERIAL	48
3.1.1	LABORINTERNE STANDARDS	48
3.1.1.1	Geräte, Zutaten und Zusatzstoffe	48
3.1.1.2	Rohwurststandard	49
3.1.1.3	Brühwurststandard	51
3.1.1.4	Kochwurststandard	53
3.1.2	EXTERNE STANDARDS	57
3.1.2.1	Schweizer Referenzmaterial	57
3.1.2.2	Frankfurter Referenzmaterial	58

3.1.3	FELDPROBEN	58
3.1.3.1	Roh-, Brüh-, Kochwurst und andere Erzeugnisse	58
3.1.3.2	Organe	61
3.2	ENZYMATISCHE GESAMTCHOLESTEROLBESTIMMUNG	61
3.2.1	MATERIALIEN	61
3.2.1.1	Geräte	61
3.2.1.2	Material	62
3.2.1.3	Chemikalien	62
3.2.2	METHODE	63
3.2.2.1	Prinzip	63
3.2.2.2	Probenvorbereitung	64
3.2.2.3	Herstellung der Probenlösung	65
3.2.2.4	Herstellung des Bestimmungsansatzes für die Spektralphoto- metrie	65
3.2.2.5	Berechnung des Gesamtcholesterolwertes	66
3.2.2.6	Auswertung	68
3.2.2.6.1	Statistik	68
3.2.2.6.2	Berechnung des Gesamtcholesterolgehaltes	68
3.2.2.6.3	Cutoff-Point für den Nachweis von zentralnervösem Gewebe	69
3.3	IMMUNCHEMISCHES ZNS-NACHWEISVERFAHREN	70
3.3.1	MATERIALIEN	70
3.3.1.1	Geräte	70
3.3.1.2	Material	70
3.3.1.3	Chemikalien	71
3.3.1.3.1	Zusammensetzung der Stammlösungen	73
3.3.2	METHODE	74
3.3.2.1	Prinzip	74
3.3.2.2	Probenvorbereitung	76
3.3.2.3	Herstellung der Probenlösung	77
3.3.2.3.1	Rohwurst	77
3.3.2.3.2	Brühwurst	77
3.3.2.3.3	Kochwurst	77
3.3.2.3.4	Sonstige Erzeugnisse und Organe	78
3.3.2.4	Herstellung des Probenansatzes	78
3.3.2.5	SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)	79
3.3.2.6	Westernblot	80
3.3.2.7	Immunreaktion	81
3.3.2.8	Auswertung	82
3.3.3	MAXIMIERUNG DER IMMUNCHEMISCHEN AKTIVITÄT	83
3.3.3.1	Optimierung des Extraktionsmittels	83
3.3.3.2	Konzentrierung der Extrakte	83
3.3.3.2.1	Materialien	83
3.3.3.2.2	Prinzip	84
3.3.3.2.3	Durchführung der Mikrokonzentration	84
3.3.3.2.4	Auswertung	84
3.4	REDUKTION DER IMMUNCHEMISCHEN NSE-AKTIVITÄT DURCH ERHITZEN	85
3.4.1	MATERIALIEN	85

3.4.1.1	Geräte	85
3.4.1.2	Material	85
3.4.2	METHODE	85
3.4.2.1	Probenvorbereitung	85
3.4.2.2	Erhitzung	86
3.4.2.2.1	Bestimmung der Kerntemperatur	87
4	ERGEBNISSE	88
4.1	ENZYMATISCHE GESAMTCHOLESTEROLBESTIMMUNG	88
4.1.1	LABORINTERNE STANDARDS	88
4.1.1.1	Rohwurststandard	88
4.1.1.2	Brühwurststandard	89
4.1.1.3	Kochwurststandard	92
4.1.2	EXTERNE STANDARDS	97
4.1.2.1	Schweizer Referenzmaterial	97
4.1.2.2	Frankfurter Referenzmaterial	99
4.1.3	FELDPROBEN	100
4.1.3.1	Rohwurst	100
4.1.3.2	Brühwurst	102
4.1.3.3	Kochwurst	104
4.1.3.3.1	Leberwurst	104
4.1.3.3.2	Kochmettwurst	112
4.1.3.3.3	Blutwurst	114
4.1.3.3.4	Sülzwurst	116
4.1.3.4	Erzeugnisse aus zerkleinertem Fleisch und andere Lebens- mittel	117
4.1.3.5	Organe	119
4.2	IMMUNCHEMISCHES ZNS-NACHWEISVERFAHREN	120
4.2.1	MAXIMIERUNG DER IMMUNCHEMISCHEN AKTIVITÄT	120
4.2.1.1	Optimierung des Extraktionsmittels	120
4.2.1.2	Konzentrierung der Extrakte	124
4.2.2	LABORINTERNE STANDARDS	127
4.2.2.1	Rohwurststandard	128
4.2.2.2	Brühwurststandard	129
4.2.2.3	Kochwurststandard	130
4.2.3	EXTERNE STANDARDS	131
4.2.3.1	Schweizer Referenzmaterial	131
4.2.3.2	Frankfurter Referenzmaterial	135
4.2.4	FELDPROBEN	136
4.2.4.1	Rohwurst	136
4.2.4.2	Brühwurst	137
4.2.4.3	Kochwurst	139
4.2.4.3.1	Leberwurst	139
4.2.4.3.2	Kochmettwurst	146
4.2.4.3.3	Blutwurst	149
4.2.4.3.4	Sülzwurst	150

4.2.4.4	Erzeugnisse aus zerkleinertem Fleisch und andere Lebensmittel	150
4.2.4.5	Organe	150
4.3	REDUKTION DER IMMUNCHEMISCHEN NSE-AKTIVITÄT DURCH ERHITZEN	154
4.3.1	BRÜHWURSTSTANDARD MIT 10 % HIRNANTEIL	154
4.3.2	BRÜHWURSTSTANDARD MIT 5 % HIRNANTEIL	157
4.3.3	BRÜHWURSTSTANDARD MIT 1 % HIRNANTEIL	159
4.3.4	KOCHWURSTSTANDARD MIT 10 % HIRNANTEIL	160
5	DISKUSSION	165
5.1	ENZYMATISCHE GESAMTCHOLESTEROLBESTIMMUNG	165
5.1.1	LABORINTERNE STANDARDS	165
5.1.2	EXTERNE STANDARDS	166
5.1.2.1	Schweizer Referenzmaterial	166
5.1.2.2	Frankfurter Referenzmaterial	167
5.1.3	FELDPROBEN	168
5.1.3.1	Rohwurst	168
5.1.3.2	Brühwurst	168
5.1.3.3	Kochwurst	169
5.1.3.3.1	Leberwurst	169
5.1.3.3.2	Kochmettwurst	171
5.1.3.3.3	Blutwurst, Sülzwürste sowie sonstige Erzeugnisse	171
5.1.3.4	Organe	172
5.1.4	FESTLEGUNG DER CUTOFF-POINTS	173
5.1.5	ZNS VERDÄCHTIGE UND POSITIVE PROBEN	175
5.2	IMMUNCHEMISCHES ZNS-NACHWEISVERFAHREN	177
5.2.1	MAXIMIERUNG DER IMMUNCHEMISCHEN AKTIVITÄT	180
5.2.1.1	Optimierung des Extraktionsmittels	180
5.2.1.2	Konzentrierung der Extrakte	180
5.2.2	LABORINTERNE STANDARDS	181
5.2.3	EXTERNE STANDARDS	182
5.2.3.1	Schweizer Referenzmaterial	182
5.2.3.2	Frankfurter Referenzmaterial	183
5.2.4	FELDPROBEN	184
5.2.4.1	Rohwurst	186
5.2.4.2	Brühwurst	186
5.2.4.3	Kochwurst	187
5.2.4.3.1	Leberwurst	187
5.2.4.3.2	Kochmettwurst	187
5.2.4.3.3	Blutwurst, Sülzwürste sowie sonstige Erzeugnisse	188
5.2.4.4	Organe	188
5.3	REDUKTION DER IMMUNCHEMISCHEN NSE-AKTIVITÄT DURCH ERHITZEN	191
5.3.1	BRÜHWURSTSTANDARD MIT 10 % HIRNANTEIL	192
5.3.2	BRÜHWURSTSTANDARD MIT 5 % HIRNANTEIL	192
5.3.3	BRÜHWURSTSTANDARD MIT 1 % HIRNANTEIL	193

5.3.4	KOCHWURSTSTANDARD MIT 10 % HIRNANTEIL	193
6	ZUSAMMENFASSUNG	195
7	SUMMARY	197
8	LITERATURVERZEICHNIS	199
9	ABBILDUNGSVERZEICHNIS	219
10	VERZEICHNIS DER GLEICHUNGEN	222
11	TABELLENVERZEICHNIS	223
12	VERZEICHNIS DER ANHANGSTABELLEN	226
13	ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	227
14	ANHANG	230
14.1	CHOLESTEROL	230
14.2	NEURONENSPEZIFISCHE ENOLASE (NSE)	231
14.3	SAURES GLIAFASERPROTEIN	232
14.4	ERGEBNISSE	232
14.4.1	DENSITOMETRIE DER LABORINTERNEN STANDARDS	232
14.4.2	FELDPROBEN	233
14.4.3	REDUKTION DER IMMUNCHEMISCHEN NSE-AKTIVITÄT DURCH ERHITZEN	255
14.4.4	MAXIMIERUNG DER IMMUNCHEMISCHEN AKTIVITÄT	260

1 Einleitung

Die bovine spongiforme Enzephalopathie (BSE) wurde 1986 erstmals bei zwei Kühen im Vereinigten Königreich beschrieben (WELLS et al., 1987). Es handelt sich hierbei um eine neuartige übertragbare, infektiöse, chronisch progressiv und letal verlaufende Degenerationskrankheit des zentralen Nervensystems (SCHICKER, 1998), die mit histopathologisch typischen schwammartigen Veränderungen im Gehirn einhergeht. Nach derzeitiger wissenschaftlicher Meinung (HORN et al., 2001) wurde der Krankheitserreger durch mangelhaft erhitzte Fleisch- und Knochenmehle (VANDEVELDE et al., 1992; KIMBERLIN und WILESMITH, 1994; TAN et al., 1999), die bis 1988 legal an Wiederkäuer und bis 1996 an andere landwirtschaftliche Nutztiere verfüttert wurden (Feed-Ban 1988 sowie 1996), verbreitet. Der Ursprung des Erregers ist noch nicht geklärt, jedoch kann Scrapie von Schafen als Ursache nicht ausgeschlossen werden (HORN et al., 2001). Dagegen scheint die von Lord Phillips propagierte Theorie (PHILLIPS et al., 2000), daß der Erreger von BSE-Rindern stammte, die vor 1985 erkrankten und unerkannt geblieben sind, eher spekulativ (HORN et al., 2001). Bislang sind ca. 181.000 Rinder in Europa von der Krankheit betroffen, davon 178.644 allein im Vereinigten Königreich (Dez. 2001).

Die ersten Fälle der Variante der Creutzfeldt-Jakob-Krankheit (vCJD) traten 1995 im Vereinigten Königreich auf (WILL et al., 1996a). Derzeit besteht kein Zweifel daran, daß vCJD die humane Form der BSE ist (HILL et al., 1997a; BRUCE et al., 1997; ALMOND und PATTISSON, 1997). Die infektiöse Dosis sowie der Übertragungsweg sind zwar noch nicht geklärt, jedoch ist die Aufnahme von hoch infektiösem Material über die menschliche Nahrungskette am wahrscheinlichsten (WILL, 1999; LASMÉZAS et al., 2001). Die höchsten Infektionstiter finden sich im Gewebe des zentralen Nervensystems (ZNS) von Rindern, Schafen und Ziegen (SSC, 1999a und 1999b). Neben dem ZNS als Hauptträger der BSE-Infektiosität beurteilt das Scientific Steering Committee die Wirbelsäule (SSC, 1998) sowie die Lunge (SSC, 2001a) als potentiell infektiös, da die Verschleppung von zentralnervösem Gewebe durch den Einsatz bestimmter

Betäubungs- (ANIL et al., 1999; HORLACHER et al., 2002; SSC, 2002) und Schlachtmethoden (HORLACHER und BÜLTE, 2001; MARTIN et al., 2001) möglich erscheint. Die Herstellung von Separatorenfleisch aus Rinderwirbelsäulen sowie die Verwendung von luft-injizierenden Betäubungsgeräten und eines Rückenmarkzerstörers wurden daraufhin verboten (EU, 2000a).

Aufgrund des Fehlens diagnostischer Verfahren am lebenden Tier wurde 1997 beschlossen, spezifiziertes Risikomaterial (SRM) von Rindern, Schafen und Ziegen aus der Nahrungskette auszuschließen (97/534/EG). Die Umsetzung dieser Entscheidung fand jedoch erst im Oktober 2000 (2000/418/EG) statt, da in den meisten europäischen Ländern – aufgrund der „BSE-Freiheit“ - bis dahin keine Notwendigkeit bestand und die entstehenden Kosten im Rahmen der Tierkörperbeseitigung abschreckten. Die Verwendung von bestimmten Innereien, wie z.B. Gehirn, war laut den Leitsätzen für Fleisch und Fleischerzeugnisse des Deutschen Lebensmittelbuches in explizit genannten Wurstspezialitäten, wie z.B. der „Hirnwurst“, erlaubt (ANONYM, 1998). Dies entspricht jedoch nicht mehr der allgemeinen Verbrauchermeinung (GÜLLNER, 2001). Seit Oktober 2001 ist eine Neufassung der Leitsätze gültig, wonach der Einsatz von Hirn, Rückenmark, Bries, Milz - mit Ausnahme von Schweinemilz -, Schweinemicker sowie Speiseröhre verboten wird (ANONYM, 2001a). Nach Berichten über symptomlose BSE-Erkrankungen bei Labortieren (RACE und CHESEBRO, 1998; AGUZZI und WEISSMANN, 1998; HILL et al., 2000) schließen Wissenschaftler das Vorkommen von resistenten Tierarten nicht mehr aus. Hierunter könnten z.B. das Schwein und das Huhn fallen, da diese bislang über die Nahrungsaufnahme nicht mit BSE infizierbar waren (COLLEE und BRADLEY, 1997a). Hierdurch werden die Forderungen nach einem tierartenunabhängigen Verwendungsverbot von Gewebe des zentralen Nervensystems in Lebensmitteln bekräftigt.

Im Hinblick auf die Problematik der BSE war und ist es notwendig, Maßnahmen zum vorbeugenden Verbraucherschutz zu treffen. Das Ziel der vorliegenden Arbeit war es deshalb, Gewebe des zentralen Nervensystems (ZNS) in rohen

sowie hitzebehandelten Fleischerzeugnissen nachzuweisen. Hierzu wurde das integrierte ZNS-Nachweisverfahren (LÜCKER et al., 1999a), das sich auf die Bestimmung des Cholesterolgehaltes sowie den Nachweis zweier nervenspezifischer Proteine – der neuronenspezifischen Enolase (NSE) und dem Sauren Gliafaserprotein (GFAP) - stützt, verwendet. Zum einen wurde die Verwendbarkeit der Cholesterolbestimmung als Screening-Methode für zentralnervöses Gewebe anhand Referenzmaterial sowie Feldproben überprüft. Weiter sollte das bestehende immunchemische Nachweisverfahren überprüft werden, um eine Verbesserung der Sensitivität, d.h. eine Erniedrigung der nachzuweisenden Hirnmenge, zu erreichen. Dies wurde an Referenzmaterial sowie Feldproben getestet. Desweiteren wurde die Stabilität der Proteinmarker, insbesondere der neuronenspezifischen Enolase (NSE), hinsichtlich der Temperatur-Zeit-Wirkung während des Herstellungsverfahrens der Fleischerzeugnisse überprüft.

2 Literaturübersicht

2.1 Allgemeines über transmissible spongiforme Enzephalopathien (TSE)

Bei der spongiformen Enzephalopathie (SE) handelt es sich um eine infektiöse Degenerationskrankheit, die nach einem Jahr bis Jahrzehnte dauernden Inkubationszeit chronisch progressiv und immer tödlich verläuft (SCHICKER, 1998). Verschiedene Formen wurden beim Mensch und Tier beschrieben (SCHICKER, 1998). Kennzeichnend für alle Formen sind histopathologische schwammartige Veränderungen im Gehirn, die der Gruppe der Krankheiten ihren Namen gegeben haben. Symptomatisch für die Krankheit sind Vakuolisierung und Degeneration von Nervenzellen, reaktive Astroglie und Ansammlung von Protease-resistenten Prionproteinen (PrP^{res}) in unterschiedlicher Ausprägung (EHRENSPERGER und VANDEVELDE, 1998). Das klinische Bild ist dementsprechend durch Verhaltensänderungen, Demenz sowie Sensibilitäts- und Bewegungsstörungen gekennzeichnet (SCHICKER, 1998). Dem Begriff der SE gleichgestellt sind die Bezeichnungen transmissible spongiforme Enzephalopathie (TSE) sowie Prionenkrankheit, die sich auf die Übertragbarkeit der Krankheit (BUSCHMANN und GROSCHUP, 1998) bzw. auf ihren vermuteten Erreger (PRUSINER, 1982) beziehen.

2.1.1 Transmissible spongiforme Enzephalopathien beim Tier

Die transmissiblen spongiformen Enzephalopathien (TSE) des Tieres können transplazentar, horizontal oder über das Futter übertragen werden (SCHICKER, 1998). Kennzeichnend für alle Formen ist ihre Übertragbarkeit (BUSCHMANN und GROSCHUP, 1998).

Neben der seit über 200 Jahren bekannten Scrapie der Schafe und Ziegen kommen noch weitere TSE bei Cerviden, Boviden sowie Feliden in Gefangenschaft vor (Tabelle 2-1). Dabei erlangte vor allem die bovine spongiforme Enzephalopathie (BSE) im Jahr 1985 an Bedeutung. Die Übertragung des Agens durch kontaminiertes Futter ist hier am wahrscheinlichsten (WILESMITH et al.,

1988). Ebenfalls über das Futter wurde die transmissible Mink Enzephalopathie (TME), SE bei exotischen Huftieren sowie die feline spongiforme Enzephalopathie (FSE) bei Haus- und Großkatzen übertragen (PRUSINER, 1997).

Tabelle 2-1 Übersicht über die transmissiblen spongiformen Enzephalopathien (PRUSINER, 1995; MACKNIGHT und ROCKWOOD, 1996; BRADLEY, 1996)

Wirt	Krankheit	Zeitpunkt des Auftretens (Literatur)	Beobachtete Verbreitung
Rinder	Bovine spongiforme Enzephalopathie (BSE)	1985 (WELLS et al., 1987)	UK, Irland, Schweiz, Frankreich, Portugal
Schaf / Ziege	Scrapie	1732 (MCGOWAN, 1922)	weit verbreitet, bisher nicht in Australien, Neuseeland sowie einigen Ländern Südamerikas und Europas
Schaf	„BSE“	1993 (FOSTER et al., 1993)	experimentell
Zuchtnerz	Übertragbare Nerz-Enzephalopathie (TME)	1947 (HARTSOUGH und BURGER, 1965)	Nordamerika, Kontinentaleuropa; selten
Maultier-, Wapitihirsch	Chronische Schwundkrankheit (CWD)	1980 (WILLIAMS und YOUNG, 1980 und 1982)	Nordamerika, örtlich
Nyala, arabische Oryxantilope, Kudu	Spongiforme Enzephalopathie der exotischen Huftiere	1988 (JEFFREY und WELLS, 1988; KIRKWOOD et al., 1990)	UK
Katze, Großkatzen	Feline spongiforme Enzephalopathie (FSE)	1990 (WYATT et al., 1990)	UK

2.1.1.1 Bovine spongiforme Enzephalopathie (BSE)

Im Jahr 1986 beschrieben G. WELLS und seine Mitarbeiter die seit 1985 in Großbritannien auftretende bovine spongiforme Enzephalopathie (BSE) erstmals (WELLS et al., 1987). Seitdem (Feb. 2002) sind in Großbritannien über 178.000 Rinder (DEFRA) und in weiteren europäischen Ländern über 2600

Rinder (OIE) erkrankt. Es wird davon ausgegangen, daß bereits 1981/1982 Rinder durch ungenügend erhitztes Fleisch- und Knochenmehl, das mit dem infektiösen Erreger kontaminiert war, infiziert wurden (KIMBERLIN und WILESMITH, 1994). Die experimentelle Übertragung von BSE auf die Maus wurde 1988 nach intracerebraler (FRASER et al., 1988) sowie 1990 nach oraler Inokulation (BARLOW und MIDDLETON, 1990) nachgewiesen.

Nach einer Inkubationszeit, die zwischen 18 Monaten und mehreren Jahren liegen kann (WILESMITH und RYAN, 1992), treten die ersten klinischen Symptome ab einem Alter von 20 Monaten (DEFRA) auf. Diese umfassen Gewichtsverluste, Milchleistungsrückgang, Verhaltens-, Sensibilitäts- und Bewegungsstörungen. Betroffene Tiere sind ängstlich und schreckhaft, wobei sie besonders auf Berührung, Geräusche oder Lichtreize reagieren (BRAUN et al., 1998). Durch einen steifen unsicheren Gang bis hin zum Festliegen wird das Krankheitsbild vervollständigt. Die neurologischen Symptome zeigen einen progressiven Verlauf, so daß die Tiere nach zwei bis drei Monaten verenden oder getötet werden (SCHICKER, 1998). Histopathologisch weist vor allem das Stammhirn charakteristische Veränderungen auf (WELLS et al., 1987; JEFFREY et al., 1995; EHRENSPERGER und VANDEVELDE, 1998) (s. Kap. 2.2.2).

2.1.1.2 Scrapie

Die transmissible spongiforme Enzephalopathie beim Schaf, seltener bei der Ziege, ist in Großbritannien und Deutschland seit 1732 unter verschiedenen Bezeichnungen bekannt (McGOWAN, 1922). Die gebräuchlichste ist Scrapie („to scrape“ = sich kratzen). Daneben existieren die Bezeichnungen Traberkrankheit (von traben), Gnubber- oder Wetzkrankheit (von dem Juckreiz) und „la tremblante“ (von Muskelzittern).

J. CUILLÉ und P. CHELLE zeigten 1936 und 1939 die Übertragbarkeit auf das Schaf und die Ziege (CUILLÉ und CHELLE, 1936 und 1939).

Scrapie kommt weltweit, außer in Australien und Neuseeland, in unterschiedlicher Häufigkeit vor. In Großbritannien erkrankten jährlich 0,5 – 1 % aller Schafe (AGUZZI und WEISSMANN, 1997). Die Ansteckung der Schafe erfolgt meist vertikal vom Muttertier auf das Lamm, wobei die Gefahr der Ansteckung während

der Geburt und kurz danach am größten ist (FOOTE et al., 1993). Die genauen Mechanismen sind noch ungeklärt. Horizontale Übertragungswege über die infizierte Plazenta und das Fruchtwasser sind ebenfalls bekannt (STOCKMANN, 1913; PATTISON et al., 1972). Aufgrund der hohen Stabilität des Erregers gegenüber physikalischen und chemischen Einflüssen bleiben kontaminierte Weiden bis über drei Jahre infektiös (WISNIEWSKI et al., 1996). Ein mögliches Erregerreservoir könnten ferner Grasmilben sein (WISNIEWSKI et al., 1996). Darüber hinaus kann auch eine orale Übertragung durch kontaminiertes Futter nicht ausgeschlossen werden.

Die Ausprägung des Krankheitsbildes ist von genetischen Faktoren des Tieres (Genotyp des Prionproteins) sowie vom infizierenden Stamm des Scrapie-Agens abhängig (DICKINSON et al., 1968; NUSSBAUM et al., 1975). Zur Zeit sind über 20 verschiedene Stämme bekannt, die sich hinsichtlich ihrer Inkubationszeit, Verteilungsmuster der Hirnläsionen sowie in ihren Eigenschaften unterscheiden (SIMON, 1996). Die meisten der infizierten Lämmer erkranken mit zwei bis vier Jahren. Auffällige Symptome (CLARK, 1991; CLARK und MOAR, 1992; CLARK et al., 1994; SCHICKER, 1998) sind hierbei der Gewichtsverlust trotz Futteraufnahme, Ataxien in der Hintergliedmaße und Verhaltensänderungen. Tiere sind übererregt, zittern und zeigen starken Juckreiz, der sich durch Kratzen an Objekten bis zum Verlust der Wolle an Rücken, Flanke und Schenkel äußert. Es ist nicht zwingend, daß alle Symptome gleichzeitig auftreten. Der Tod tritt nach wenigen Wochen bis Monaten ein. Histopathologisch findet man Vakuolen (ZLOTNÍK, 1958; ZLOTNÍK und RENNIE, 1958) und eine vermehrte Gliose im Gehirn (GEORGSSON et al., 1993).

2.1.1.3 „BSE“ bei Schafen

Die erste experimentelle Übertragung von BSE auf Schafe wurde 1993 nach einer intracerebralen sowie oralen Inokulation mit infektiösem Rinderhirnhomogenat nachgewiesen (FOSTER et al., 1993). Die infizierten Tiere zeigten Bewegungsstörungen, Zittern, jedoch keinen Juckreiz, wie dies bei Scrapie der Fall ist (FOSTER et al., 2001). FOSTER et al. (1996) zeigten, daß sich die Infektiosität beim BSE-infizierten Schaf im Gegensatz zum Rind zusätzlich auf die Milz und

andere periphere Gewebe erstreckt. Ob sich „BSE“ beim Schaf wie Scrapie über vertikale und horizontale Übertragung in einmal infizierten Herden halten und verbreiten kann, ist zur Zeit ungewiß (ANONYM, 1994). Das Vorkommen von „BSE“ in Schafen und Ziegen unter natürlichen Bedingungen kann derzeit (Stand: Jan. 2002) nicht ausgeschlossen werden (KAO et al., 2001; SSC, 2001b; FERGUSON et al., 2002), da möglicherweise mit BSE-kontaminiertes Fleisch- und Knochenmehl an Schafe und Ziegen verfüttert wurde (ANONYM, 1994) sowie eine experimentelle Übertragung über das Futter auf bestimmte Schaf-Genotypen (JEFFREY et al., 2001) nachgewiesen wurde.

2.1.2 Transmissible spongiforme Enzephalopathien beim Menschen

Zu den transmissiblen spongiformen Enzephalopathien (TSE) des Menschen gehören verschiedene Krankheiten, die entweder sporadisch, iatrogen bzw. akzidentiell oder hereditär auftreten (SCHICKER, 1998). Alle Formen sind im Tiermodell übertragbar (BUSCHMANN und GROSCHUP, 1998).

Zu den lange bekannten TSE, wie der Creutzfeldt-Jakob-Krankheit (CJD), Kuru und dem Gerstmann-Sträussler-Scheinker-Syndrom (GSS), kamen in den letzten Jahren die Fatale Familiäre Insomnie (FFI) sowie eine Variante der Creutzfeldt-Jakob-Krankheit (vCJD) hinzu (Tabelle 2-2).

Die familiär vererbten TSE-Formen sind auf bestimmte Punktmutationen im Prionprotein codierenden Gen (PRNP-Gen) auf dem Chromosom 20 zurückzuführen und werden autosomal dominant vererbt. Hierzu gehören die familiäre Form der CJD (OWEN et al., 1989; HSIAO et al., 1991; VANDEVELDE et al., 1992), die GSS mit einer Mutation im Codon 102 (HSIAO et al., 1989; GOLDGABER et al., 1989) sowie die FFI mit einer Mutation am Codon 178 und einer Homozygotie für Methionin an Codon 129 des PRNP-Gens (MEDORI et al., 1992).

Die sporadischen sowie die erworbenen spongiformen Enzephalopathien umfassen sowohl die Kuru als auch die klassischen Formen sowie die neue Variante der Creutzfeldt-Jakob-Krankheit.

Tabelle 2-2 Übersicht über die transmissiblen spongiformen Enzephalopathien beim Menschen (PRUSINER, 1995; MACKNIGHT und ROCKWOOD, 1996; BRADLEY, 1996)

Krankheit	Erstbeschreibung	Verbreitung
Creutzfeldt-Jakob-Krankheit (CJD)	CREUTZFELDT, 1920; JAKOB, 1921	weltweit, selten; sporadisch: >90 % familiär: ~ 5 % iatrogen: ~1 %
Neue Variante der CJD (vCJD)	BRITTON et al., 1995	114 Fälle im Vereinigten Königreich sowie 3 Fälle in Frankreich und 1 Fall in Irland (bis 04.02.02)
Kuru	GAJDUSEK und ZIGAS, 1957	Papua-Neuguinea, Anzahl abnehmend; jetzt selten
Gerstmann-Sträussler-Scheinker-Syndrom (GSS)	GERSTMANN, 1928	weltweit, selten
Fatale Familiäre Insomnie (FFI)	LUGARESÍ et al., 1986	selten

2.1.2.1 Creutzfeldt-Jakob-Krankheit (CJD)

Die Creutzfeldt-Jakob-Krankheit (CJD) wurde 1920 und 1921 erstmals von den Neurologen H.G. CREUTZFELDT (1920) und A. JAKOB (1921) beschrieben. Sie tritt hauptsächlich (~90 %) sporadisch mit einer weltweiten Inzidenz von 0,5 – 1 Fall pro Million Einwohner und Jahr auf. Daneben sind iatrogen erworbene Fälle (<1 %) durch Transplantation von Dura mater (NISBET, 1989) und Cornea (DUFFY et al., 1974), ungenügend sterilisierte neurochirurgische Instrumente (WILL und MATTHEWS, 1982) sowie Wachstumshormone aus menschlichen Hypophysen (BROWN, 1988) bekannt. Weitere 5 – 10 % aller Fälle werden autosomal dominant vererbt und beruhen auf verschiedenen Punktmutationen im PRNP-Gen (VANDEVELDE et al., 1992). Der Nachweis der Übertragbarkeit auf Schimpansen gelang 1968 (GIBBS et al., 1968).

Von der sporadischen Form der CJD sind vor allem ältere Menschen mit einem Durchschnittsalter von 65 Jahren betroffen. Die Krankheit verläuft nach ca. 13jähriger Inkubationszeit (BROWN et al., 1992) mit einer progressiven Demenz

und motorischen Dysfunktionen und endet nach etwa 4,5 Monaten tödlich. Die Patienten weisen außerdem eine charakteristische Veränderung des Elektroenzephalogramms (EEG) auf (FEIDEN, 1998; SCHICKER, 1998). Die klassische Diagnostik besteht aus dem postmortalen Nachweis der schwammartigen Hirn-degeneration und der diffusen Ablagerung von PrP^{res} (KRETZSCHMAR et al., 1996a). Neuere Untersuchungen ergaben einen erhöhten Gehalt des 14-3-3-Proteins im Liquor lebender Patienten (ZERR et al., 1995). Ein beeinflussender Faktor für die Ausprägung der sporadischen Creutzfeldt-Jakob-Krankheit scheint die Konstellation der Aminosäuren am Codon 129 des Prionproteingens zu sein (PARCHI et al., 1999). PALMER et al. (1991) wiesen bei 40 von 45 Patienten eine Methionin- bzw. Valin-Homozygotie (Met/Met oder Val/Val) auf, die restlichen Patienten zeigten eine Methionin/Valin-Konstellation (IRONSIDE, 2000).

2.1.2.2 Variante der Creutzfeldt-Jakob-Krankheit (vCJD)

Die ersten Fälle der Variante der Creutzfeldt-Jakob-Krankheit (vCJD) wurden 1995 im Vereinigten Königreich beschrieben (BRITTON et al., 1995; BATEMAN et al., 1995; WILL et al., 1996a). In den folgenden Jahren kamen noch weitere Fälle im Vereinigten Königreich sowie drei in Frankreich (INSTITUT DE VEILLE SANITAIRE) und einer in Irland (DESLYS et al., 1997) hinzu, so daß die Anzahl der vermuteten und bestätigten Fälle auf 118 (bis 04.02.02), einschließlich acht lebender Patienten, angestiegen ist (DEPARTMENT OF HEALTH). In Deutschland sind bislang (Stand: Feb. 2002) keine vCJD-Fälle aufgetreten (SCHULZ-SCHAEFFER, 2001, Uni Göttingen, persönliche Mitteilung).

Daß es sich bei der vCJD um eine neue Variante der bekannten CJD handelt, wurde aufgrund der Unterschiede im Krankheitsbild sowie der neuropathologischen Funde bereits früh vermutet. COLLINGE et al. (1996) haben dies histologisch und biochemisch bestätigt, indem sie das PrP^{res}-Muster im Westernblot analysierten. Dabei ordneten sie den sporadisch und iatrogenen Formen die Mustertypen 1-3 (PARCHI et al., 1996) und der neuen Variante der Creutzfeldt-Jakob-Krankheit den Typ 4 zu (COLLINGE et al., 1996; HILL et al., 1999). Außerdem zeigten sich Konformations- und Glykosylierungsunterschiede (COLLINGE

et al., 1996; HILL et al., 1999). Bei der vCJD fällt klinisch vor allem das jugendliche Alter der Betroffenen (<40. Lebensjahr) sowie der schleichende Verlauf (Ø 14 Monate) der Krankheit (KRETZSCHMAR et al., 1996b) auf (Tabelle 2-3). Die Symptomatik ist geprägt von Verhaltensänderungen, Dysästhesie, Ataxie und später hinzukommender Demenz (FEIDEN, 1998). Ferner fehlen bei der vCJD die – für die klassische CJD charakteristischen – EEG-Veränderungen. Darüber hinaus werden mit Vakuolen umgebene PrP-Plaques („florid plaques“) in der Großhirnrinde gebildet (WILL und ZEIDLER, 1996). Die bisherigen genetischen Untersuchungen (NATIONAL CJD SURVEILLANCE UNIT, 2000) lassen vermuten, daß Patienten mit einer bestimmten Aminosäurekonstellation (Met/Met) am Codon 129 des Prionproteingens eine höhere Wahrscheinlichkeit besitzen an der neuen Variante der Creutzfeldt-Jakob-Krankheit zu erkranken als Personen, die heterozygot (Methionin/Valin) bzw. homozygot für Valin sind (ZEIDLER et al., 1997; DESLYS et al., 1997). Zur Diagnose können die histopathologischen Veränderungen sowie der immunhistologische Nachweis von PrP^{res} in den Tonsillen (HILL et al., 1997b) und im Blinddarm (HILTON et al., 1998) herangezogen werden.

Auf Grund zahlreicher Indizien, wie dem Zeitpunkt des Auftretens, den neuropathologischen sowie biochemischen Übereinstimmungen zwischen vCJD und BSE, bestehen heute kaum noch Zweifel daran, daß vCJD die humane Form der BSE ist (HILL et al., 1997a; BRUCE et al., 1997; ALMOND und PATTISSON, 1997; LASMÉZAS et al., 2001).

Tabelle 2-3 Unterschiede zwischen vCJD und der klassischen Form der CJD (KRETZSCHMAR et al., 1996b; BRUCE et al., 1997; VERDRAGER, 1997; HILL et al., 1999; *LORAINS et al., 2001)

Kriterium	CJD	vCJD (n=118; Feb. 2002)
Alter beim Eintritt des Todes	50 – 70 Jahre (Ø 65 Jahre)	16 – 39 Jahre (74 Jahre*) (Ø 28 Jahre)
Inkubationszeit	~13 Jahre	unbekannt (vermutet: 10 – 30 Jahre)
Krankheitsdauer	~4,5 Monate	6 – 39 Monate (Ø 13 Monate)
EEG-Veränderungen	charakteristisch	nicht nachweisbar
Läsionsmuster im Gehirn	diffuse PrP ^{res} -Ablagerung	Plaques im Cortex und Cerebellum
PrP ^{res} -Muster	Typ 1 – 3	Typ 4
PRNP-Gen-Mutation	teilweise	keine
Aminosäure am Codon 129 des PRNP-Gens	78 % Met/Met; 12 % Met/Val; 10 % Val/Val	Met/Met
Krankheitsbild	progressive Demenz, motorische Dysfunktionen	psychiatrische Auffälligkeit (Depression, Angstzustand), Dysästhesie, Ataxie; später: Demenz, Myoklonien

2.1.2.3 Kuru

1957 wurde Kuru erstmals von D.C. GAJDUSEK und V. ZIGAS (1957) beschrieben. Es handelt sich hierbei um eine seit den 20er Jahren im eingeborenen Fore-Stamm in Papua-Neuguinea auftretende Erkrankung des zentralen Nervensystems. Betroffen sind hauptsächlich Frauen und Kinder, die sich während des kannibalistischen Totenrituals mit infektiösem humanen Hirngewebe oral, nasal oder dermal (Hautverletzungen, Bindegewebe der Augen) infizierten (ALPERS und GAJDUSEK, 1965). Die intracerebrale Übertragbarkeit wurde 1966 im Schimpansenversuch nachgewiesen (GAJDUSEK et al., 1966), später gelang auch die orale Transmission mit infiziertem Hirngewebe (GIBBS et al., 1980). Nach einer Inkubationszeit von 4 – 40 Jahren treten Tremor (gab der Krankheit ihren Namen), progressive zerebelläre Ataxie sowie im Endstadium Demenz

auf (GAJDUSEK und ZIGAS, 1959). Histologisch werden bei 70 % der Patienten amyloide Plaques im Kleinhirn gefunden (BECK und DANIEL, 1979). Außerdem wurde nach VERDRAGER (1997) im Gehirn eine Infektiosität mit einem Titer von über 10^8 infektiöse Einheit/g Hirn nachgewiesen. Die Krankheit endet nach 3 Monaten bis 3 Jahren tödlich.

2.2 Ursachen der BSE

2.2.1 TSE-Erreger

Zur Erregernatur gibt es verschiedene Hypothesen (GAREIS, 1995; RABENAU, 1997). Die heute weitestgehend akzeptierte ist die „Protein-only-Hypothese“, die von Stanley PRUSINER im Jahre 1982 postuliert wurde (PRUSINER, 1982). Danach spielt ein Prionprotein (PrP^{res}), oder kurz Prion (proteinaceous infectious particle) genannt, eine zentrale Rolle (HORN et al., 2001) bei der Krankheitsentstehung. Experimentell wurde dies durch die Krankheitsresistenz sogenannter knockout-Mäuse, die das zelluläre Prionprotein nicht exprimieren, gezeigt (BÜELER et al., 1993). Weiter zerstören äußere Einflüsse, wie UV- oder kurzwellige Strahlung (ALPER et al., 1967), Hitze und herkömmliche Desinfektionsmittel, den TSE-Erreger weit weniger als konventionelle Krankheitserreger, wie Viren und Bakterien (PRUSINER, 1995; ANONYM, 1996a). Dagegen verringern Stoffe mit proteinabbauender Wirkung die Infektiosität (PRUSINER, 1995). Dies spricht dafür, daß es sich bei dem Agens um ein Eiweißpartikel ohne Nukleinsäure handelt. Das Prion vermehrt sich im Körper durch Umwandlung zellulär vorkommender Glycoproteine (PrP^{c}) (SIMON, 1996), womit die fehlende Immunreaktion erklärt wäre. Das zelluläre sowie das pathologische Prion unterscheiden sich nicht in ihrer biochemischen Struktur (BASLER et al., 1986), jedoch in ihrer Konformation (Tabelle 2-4). So weist PrP^{res} im Vergleich zu PrP^{c} eine große Anzahl an β -Faltblattstrukturen sowie einen geringeren Anteil an α -Helixstruktur auf (PAN et al., 1993). Nach Behandlung mit Proteinase K wird das pathologische Prion – im Gegensatz zu PrP^{c} – nicht vollständig abgebaut, sondern es bleibt ein 27-30 kDa schweres Teilstück übrig (MEYER et al., 1986).

Dagegen gehen die „Virus-„ (DIRINGER et al., 1994) sowie die „Virion-Hypothese“ (CZUB et al., 1986) von nukleinsäuretragenden Partikeln aus, die von einer Hülle mit ungewöhnlichen Eigenschaften (ÖTZEL et al., 1994) bzw. von wirtseigenen Proteinen (KIMBERLIN, 1982) umgeben sind. Jedoch konnte bislang keine Nukleinsäure nachgewiesen werden (HORN et al., 2001).

Tabelle 2-4 Unterschied zwischen dem normalen zellulären (PrP^c) und dem krankheitsspezifischen Prionprotein (PrP^{res}) (AGUZZI und WEISSMANN, 1997; RABENAU, 1997; APPEL et al., 1998)

PrP ^c	PrP ^{res}
Oberfläche der Nervenzelle	Zellinnenraum
Glycoprotein (33-35 kDa)	Glycoprotein (33-35 kDa); 254 Aminosäuren
Proteinase K zerstört fast vollständig	Proteinase K-resistentes Stück (27-30 kDa)
40 % α -Helixanteil	30 % α -Helixanteil
< 3 % β -Faltblattstruktur	50 % β -Faltblattstruktur
löslich	unlöslich
-	SAF-Bildung

Gewebeverteilung und Vermehrung

Angriffspunkt des infektiösen Erregers ist das zelluläre Prionprotein (PrP^c), das vor allem in Gehirnnervenzellen gesunder Tiere und Menschen exprimiert wird (COHEN et al., 1994). Das PrP^c wird ribosomal synthetisiert, modifiziert und an der Zelloberfläche verankert (COHEN et al., 1994). Seine Funktion im Körper ist noch nicht vollständig geklärt (LLEDO et al., 1996; KRETZSCHMAR, 1998). Versuche mit Mäusen zeigten, daß das Fehlen des PrP-Gens (PRNP) die normale Entwicklung und das Verhalten nicht beeinflussen (BÜELER et al., 1992; WEISSMANN, 1996). Eventuell hat PrP^c eine Wirkung auf den Tages- und

Schlafrhythmus, die Lernfähigkeit sowie die Ausbildung von Kleinhirn-Purkinje-Zellen (HARRIS, 1999).

Bei der Infektion mit krankmachenden Prionproteinen (PrP^{res}) kommt es an der Zelloberfläche zu einer Zusammenlagerung mit PrP^{c} . Dies führt zu einem Wandel der Sekundärstruktur des zellulären PrP , welches seinerseits andere PrP^{c} umwandeln kann (JACKSON et al., 1999) (Abb. 2-1). Dadurch kommt es zu einem „Schneeballeffekt“, der zur Bildung zahlreicher resistenter PrP führt. Durch Anreicherung in Lysosomen entstehen Plaques (COHEN et al., 1994), die die Nervenzellen so stark schädigen, daß diese absterben und ein schwammartiges Aussehen im Neuropil hinterlassen (PRUSINER, 1995). Die Geschwindigkeit dieser Umwandlungsprozesse ist abhängig von der Speziesbarriere, d.h. von der Ähnlichkeit des Prionproteins von Spender und Empfänger (s. Kap. 2.2.3.1).

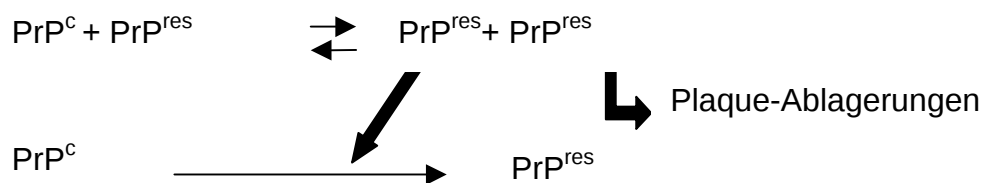


Abb. 2-1 Kaskadenartige Konversion des PrP^{c} in PrP^{res}

Inaktivierung

Es wird derzeit davon ausgegangen, daß unzureichend inaktiviertes infektiöses Material über das Fleisch- und Knochenmehl übertragen wurde (WILESMITH et al., 1988; HORN et al., 2001). Das infektiöse Agens weist eine hohe Widerstandsfähigkeit gegenüber chemischen und physikalischen Einflüssen auf (TAYLOR, 1993; TAYLOR et al., 1994; PRUSINER, 1995). Gängige Desinfektionsmittel, wie Formalin und Alkohol, sowie Sterilisationsverfahren konnten den Erreger ebenso wenig inaktivieren (DUFFY et al., 1974; SIMON, 1996).

Deshalb ist und war es nötig, Verfahren zu entwickeln, die den Erreger der TSE ausreichend zerstören können. Die Wirksamkeit der Methoden wurde im

Mausmodell durch den Nachweis einer Infektiosität des eingesetzten erregerehaltigen Materials überprüft.

Zu den wirksamen chemischen Verfahren gehört zum einen Natriumhypochlorit (NaOCl), wobei der Anteil an frei verfügbaren Chloridionen von Bedeutung ist. Eine vollständige Inaktivierung wird nach TAYLOR et al. (1994) bereits nach 30 Minuten erzielt. Für die Praxis wird eine mindestens einstündige Behandlung mit 2,5 - 5 %iger NaOCl -Lösung bei einer Temperatur von 20 °C empfohlen (SIMON, 1996). Zur Dekontamination chirurgischer Instrumente wird sogar eine Einwirkungszeit von 24 Stunden beschrieben (ANONYM, 1996b). Nachteil der Methode ist die starke Korrosion, insbesondere von verzinkten Oberflächen. Darüber hinaus können auch Gefahren für Mensch und Umwelt entstehen.

Eine Dekontamination mit Natronlauge (NaOH) ist ebenfalls möglich (SIMON, 1996). Untersuchungen (TAYLOR, 1993) zeigten jedoch eine deutlich zeit- und konzentrationsabhängige Reduktion des Erregers. So konnte bei einstündiger Einwirkung bei 20 °C weder mit ein- noch mit zweinormaler NaOH (4 bzw. 8 %) eine vollständige Inaktivierung erreicht werden.

Zur Desinfektion von Instrumenten wird neben Phenolderivaten ein Einsatz von drei- bis sechsmolarer Guanidiniumisothiocyanat für 24 bzw. 15 Stunden, sowie eine Kochung mit 3 %igem SDS (Dodecylhydrogensulfat Natriumsalz) für mindestens 10 Minuten empfohlen (ANONYM, 1996b).

Beim Einsatz von physikalischen Verfahren spielen Temperatur, Druck und die Dauer der Behandlung sowie weitere Parameter, wie die Vorbehandlung des Ausgangsmaterials, eine wichtige Rolle. In der Literatur werden verschiedene Temperatur-Zeit-Verhältnisse beschrieben (SIMON, 1996; ANONYM, 1996b; SCHREUDER et al., 1998a). Die effektivste Methode ist die 20-minütige Erhitzung auf mindestens 133 °C bei einem Druck von 3 bar (TAYLOR et al., 1995a; TAYLOR et al., 1997), die in der Entscheidung 96/449/EG festgelegt ist (EU, 1996a). Studien mit dem BSE-Agens zeigten hierbei eine Reduktion der Infektiosität um 2,2 Zehnerpotenzen (SCHREUDER et al., 1998a).

2.2.2 Diagnostik der BSE

Die Untersuchung des lebenden Tieres läßt lediglich eine Verdachtsdiagnose zu. Grundlage sind charakteristische Verhaltensänderungen im Laufe der Erkrankung, die nach BRAUN durch spezifische Provokationsproben hervorgerufen werden können (BRAUN, 1998; BRAUN et al., 2001). Zur Absicherung dieses Verdachts dienen bislang Gehirnuntersuchungen nach der Tötung des Tieres (Tabelle 2-5). Als Referenzverfahren dient dabei der histopathologische Nachweis charakteristischer Hirngewebsläsionen (WELLS et al., 1987; JEFFREY et al., 1995; EHRENSPERGER und VANDEVELDE, 1998), wie die ausgeprägte spongiformen Veränderungen (LIBERSKI et al., 1992a und 1992b), neuronale Vakuolenbildung (FRANKHAUSER et al., 1972; LIBERSKI et al., 1992a und 1992b; JEFFREY et al., 1995) und die Degeneration (WELLS und WILESMITH, 1995) sowie die astrozytäre Proliferation (ZLOTNÍK, 1958; GEORGSSON et al., 1993). Eine Akkumulation von Protease-resistenten Prionproteinen (PrP^{res}) (KAADEN, 1997) kann elektronenmikroskopisch als sogenannte Scrapie-assoziierte Fibrillen (SAF) festgestellt werden (MERZ et al., 1984; HOPE et al., 1988).

Zu diesen Veränderungen werden in der Immunhistochemie der immunologische Nachweis der resistenten Prionproteine (PrP^{res}) herangezogen (GRABER et al., 1995; GERBERMANN, 2001). Das Prionprotein bildet die Grundlage einiger immunologischer Nachweismethoden, wie z.B. dem OIE-Westernblot, das neben dem Vorhandensein von PrP^{res} die Größenunterschiede des resistenten und des zellulären Prionproteins nach enzymatischem Proteinase K-Verdau darstellt (MEYER et al., 1986; OESCH und MOSER, 1998). Die BSE-Schnelltests beruhen ausschließlich auf dem Nachweis von PrP^{res} in der Obexregion des Hirnstammes, da es hier zu einer Anreicherung der PrP^{res} kommt (WELLS et al., 1989; PICCARDO et al., 1990; VAN KEULEN et al., 1995). Alle bislang kommerziell erhältlichen Tests (Tabelle 2-6) wurden mit Gehirnmaterial nachweislich erkrankter sowie nicht erkrankter Rinder aus Großbritannien evaluiert (MOYNAGH et al., 1999). Untersuchungen an Tieren während der Inkubationszeit wurden bislang nicht durchgeführt, jedoch geht man allgemein davon aus, daß die Tests ca. 3 – 6 Monate vor dem Ausbruch der klinischen Symptomatik (EBERLE, 2001; HOCHBERGER, 2001) ansprechen (Abb. 2-2). Die Sensitivität aller Tests

wird durch die benötigte Prionenmenge zum Zeitpunkt der Untersuchung begrenzt, so daß ein negatives Ergebnis nicht generell den Schluß auf die tatsächliche Erregerfreiheit zuläßt. Um diese Grenze zu erniedrigen bestehen Bestrebungen, geringe vorhandene PrP^{res}-Mengen vor der Untersuchung anzureichern (SABORIO et al., 2001).

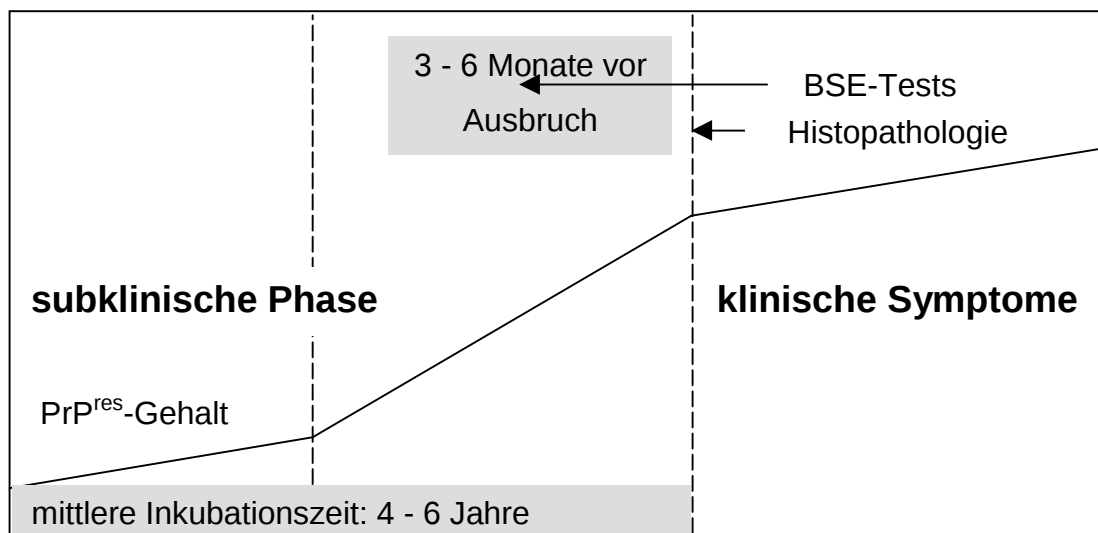
Der Mäuseinokulationstest dient zum Nachweis der Infektiosität in Geweben (FRASER et al., 1992; BUSCHMANN und GROSCHUP, 1998), ist jedoch aufgrund seiner Dauer nicht für die Routinediagnostik der TSE geeignet. Diagnostik am lebenden Tier ist das Ziel derzeitiger Forschungen. So versucht man, für BSE spezifische Surrogat-Markersubstanzen im Harn, Blut oder Liquor zu finden und nachzuweisen (HOCHBERGER, 2001; DEFRA).

Tabelle 2-5 Überblick über Nachweismethoden der TSE (DEFRA)

- | |
|--|
| <ul style="list-style-type: none">• Lebenduntersuchung (Verhaltenstest)• Histopathologie: charakteristische ZNS-Läsionen• Immunhistochemie: ZNS-Läsionen und PrP^{res}-Nachweis• OIE-Immunblot (Western Blot): Größenunterschied nach Proteinase K-Verdau• BSE-Schnelltests (immunologisch): PrP^{res}-Nachweis im Gehirn• Elektronenmikroskopie: SAF-Nachweis• Infektiositätsnachweis (Mäuseinokulationstest)• Immuno Capillary Elektrophorese (ICE): präklinische Scrapie-Diagnostik• Nachweis spezifischer Surrogat-Substanzen im Urin, Blut, Liquor (in der Entwicklung) |
|--|

Tabelle 2-6 Übersicht über angebotene Schnelltests (MOYNAGH et al., 1999)

Firma	Vertrieb	Methodik
Prionics AG (Schweiz)	Roche Diagnostic, Mannheim	- Western Blot - Monoklonaler Antikörper - 7 – 8 Stunden
Enfer Technology Ltd. (Irland)	Abbott GmbH, Wiesba- den	- Chemiluminescent-ELISA - Polyklonaler Antikörper - < 4 Stunden
CEA (Commissariat à l'Energie Atomique) (Frankreich)	BioRad, München	- Sandwich-ELISA - Monoklonaler Antikörper - 7 – 8 Stunden

**Abb. 2-2** Zeitpunkt der PrP^{res}-Nachweisbarkeit nach BSE-Infektion (nach GERBERMANN, 2001)

In diesem Zusammenhang ist die Pathogenese der bovinen spongiformen Enzephalopathie wichtig, um Schutzmaßnahmen zu treffen bzw. Methoden zu entwickeln, die möglichst frühzeitig eine Infektion anzeigen, so daß das Tier bzw. infektiöses Gewebe von der menschlichen Nahrungskette ausgeschlossen werden kann. WELLS et al. (1998) stellten in einer Studie mit Kälbern den Verlauf der Infektiosität nach oraler Aufnahme des BSE-Agens dar. Er zeigte, daß das Agens bereits nach 6 bis 18 Monaten in den Peyer'schen Platten des distalen Ileums zu finden ist, bevor es ins Rückenmark und Gehirn gelangt

(Tabelle 2-7). Der Nachweis des resistenten Prionproteins (PrP^{res}) gelang ca. 3 – 6 Monate vor dem Ausbruch erster klinischer Symptome sowie charakteristischer histopathologischer Veränderungen.

Tabelle 2-7 Zeitlicher Verlauf der BSE-Erkrankung nach oraler Aufnahme (WELLS et al., 1998)

Monate nach Inokulation	Befunde
6 – 18	Infektiosität im distalen Ileum (Peyer`sche Platten)
32	PrP ^{res} -Nachweis im Rückenmark
32 – 40	Infektiosität in cervikalen / thorakalen dorsalen Wurzelganglien
35	frühe klinische Symptome
36 – 38	Infektiosität im Trigeminalganglion
36 – 40	klinische Symptome; histopathologische Veränderungen

2.2.3 Ätiologie, Verbreitung und experimentelle Übertragung

Im April 1985 trat in Großbritannien die futterbedingte bovine spongiforme Enzephalopathie (BSE) bei zwei Kühen auf, die ungewöhnliche neurologische Symptome zeigten (WELLS et al., 1987). In den folgenden Jahren erkrankten allein im Vereinigten Königreich über 178.000 Tiere (DEFRA; Stand: Dez. 01).

Für das Auftreten der BSE wird das gleichzeitige Zusammentreffen mehrerer Faktoren verantwortlich gemacht. Die Änderung in der Herstellung von Fleisch- und Knochenmehlen, die an Wiederkäuer verfüttert wurden, ist hierbei neben der steigenden Schafpopulation sowie dem hohen Verseuchungsgrad mit Scrapie der bedeutsamste Faktor (VANDEVELDE et al., 1992; KIMBERLIN und WILESMITH, 1994; TAN et al., 1999).

Seit den 40er Jahren wird Fleisch- und Knochenmehl, das aus Tierkörperteilen und ganzen Kadavern von Rindern, Schafen, Schweinen und Geflügel hergestellt wird, als proteinreiches Zusatzfutter in der Rinderhaltung verwendet (POHLENZ, 1996; COLLEE und BRADLEY, 1997a). Durch die Umstellung des Herstellungsprozesses in englischen Tierkörperbeseitigungsanstalten (TKBA)

wurden vorhandene Scrapie-Erreger nicht ausreichend abgetötet, so daß kontaminierte Fleisch- und Knochenmehle in die Nahrungskette der Tiere gelangen konnten (WILESMITH et al., 1988). Ende der 70er Jahre begannen die TKBA's die Erhitzungsdauer sowie die Temperatur zu senken (DAHMS, 1997). Ferner wurde aus wirtschaftlichen Gründen auf die Fettgewinnung durch Einwirkung von kohlenwasserstoffhaltigen organischen Lösungsmitteln bei 70 °C und die nachfolgende Behandlung mit heißem Dampf (105 – 120 °C) unter Druck verzichtet (WILESMITH et al., 1991; KIMBERLIN und WILESMITH, 1994; COLLEE und BRADLEY, 1997a). Hinzu kam in den Jahren 1971 bis 1985 die Umstellung vom diskontinuierlichen („batch“) zum kontinuierlichen Verfahren (DENNY und HUESTON, 1997).

Abb. 2-3 gibt eine Übersicht über die Anteile von Fleisch- und Knochenmehl (MBM) an der Gesamtproduktion im Vereinigten Königreich, die mittels kontinuierlichem Verfahren sowie unter Fettextraktion hergestellt wurden. Nachdem 1972 die ersten Tierkörperbeseitigungsanstalten das kontinuierliche System einführten, stieg deren Produktion bis zum Ausbruch der BSE-Epidemie im Jahre 1986 auf 75 %, wogegen die fettarmen Fleisch- und Knochenmehle nur noch 10 % der Gesamtproduktion stellten (WILESMITH et al., 1991).

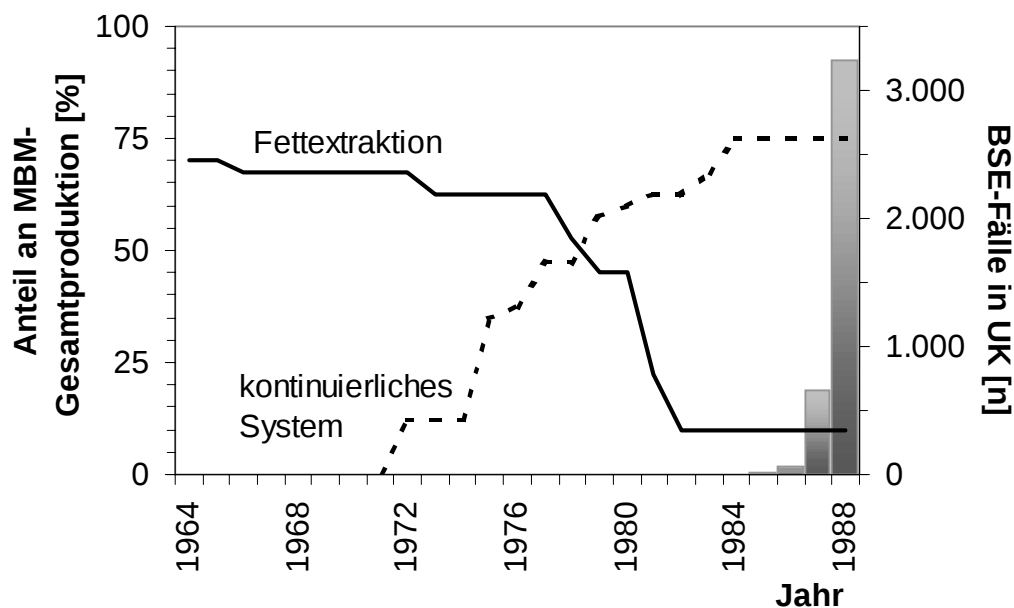


Abb. 2-3 Anteil der produzierten Fleisch- und Knochenmehle (MBM) nach Einführung des kontinuierlichen Systems und Reduzierung der Fettextraktion von 1964 bis zum BSE-Ausbruch 1986 (modifiziert nach WILESMITH et al., 1991)

Durch die Verfahrensumstellung fehlten Inaktivierungsschritte durch Kohlenwasserstoffe (MOULD et al., 1965) sowie durch feuchte Hitze (DICKINSON und TAYLOR, 1978; BROWN et al., 1986; BROWN et al., 1990). Dies begünstigte eine Anreicherung des infektiösen Agens im Fleisch- und Knochenmehl (MBM) bis zu einer für das Rind infektiösen Dosis (WILESMITH et al., 1991).

Die aufgrund epidemiologischer Studien vermutete erste Exposition von Kälbern mit kontaminiertem MBM erfolgte in den Jahren 1981 bis 1982 (BRADLEY und WILESMITH, 1993; DAHMS, 1997). Dies korreliert mit dem Zeitraum der dargestellten Verfahrensänderungen.

Das späte Erkennen der BSE sowie die verzögerte Umsetzung der Maßnahmen führte dazu, daß sich der Erreger in der Rinderpopulation anpassen und ausbreiten konnte und es somit zur weiteren Anreicherung in Fleisch- und

Knochenmehlen über die Verwertung infizierter Rinderkadaver kam (VANDEVELDE et al., 1992; BRADLEY und WILESMITH, 1993) (Abb. 2-4).

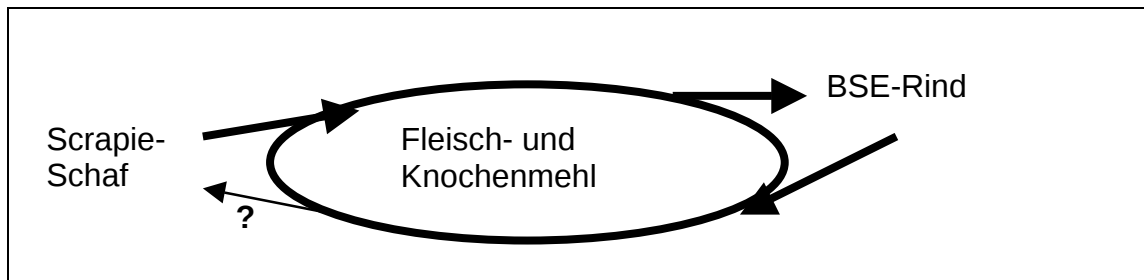


Abb. 2-4 Erregerkreislauf über Fleisch- und Knochenmehl: vom Schaf zum Rind

In der Literatur wurde die Möglichkeit eines bovinen Ursprungs durch einen spontanen Fall von spongiformer Enzephalopathie beim Rind vielfach diskutiert (VANDEVELDE et al., 1992; EDDY, 1995; PHILLIPS et al., 2000), erscheint nach derzeitiger wissenschaftlicher Erkenntnisse jedoch eher spekulativ (HORN et al., 2001). Hirnuntersuchungen von Rindern, die in den Jahren 1980 bis April 1985 geschlachtet wurden, ergaben keine Hinweise auf BSE (BRADLEY und WILESMITH, 1993). Daraus schlußfolgerten BRADLEY und WILESMITH (1993), daß „es eine neue Krankheit sein muß“. Jedoch schlossen sie „das Rind als mögliche Quelle“ trotzdem nicht vollständig aus.

Die hohe BSE-Inzidenz in Milchviehbetrieben (62,9 %) im Gegensatz zu Mastbetrieben (27,3 %) (DEFRA) ist dadurch zu erklären, daß das Kälberfutter dieser Nutzungsrichtung bis zu 5 % aus Fleisch- und Knochenmehlen bestand (KIMBERLIN und WILESMITH, 1994). Männliche Tiere wurden außerdem üblicherweise mit ca. ein bis zwei Jahren, also vor Ausbruch möglicher Krankheitsanzeichen, geschlachtet (COLLEE und BRADLEY, 1997a).

Im Vereinigten Königreich sind bislang (Dez. 2001) 178.644 BSE-Fälle aufgetreten. Im Jahre 1992 erreichte die Häufigkeitskurve mit 36.680 Tieren ihr Maximum (Abb. 2-5). Ein erster Rückgang in der Inzidenz war nach dem Fütterungsverbots im Jahre 1988 zu verzeichnen. Aufgrund mangelnder Kontrolle

der Maßnahme erkrankten jedoch ab dem Jahre 1991 Rinder, die nach diesem Verbot geboren wurden (WILESMITH und RYAN, 1993). Diese sogenannten „Born-after-ban“-Rinder (BAB) machten 1994 fast die Hälfte aller Fälle aus. Als eine weitere Möglichkeit für das Auftreten der BAB-Rinder wurde eine Krankheitsübertragung durch die Mutterkuh vermutet (WILESMITH et al., 1997). Das Ansteckungsrisiko des Kalbes wurde hierbei auf ca. 10 % geschätzt (DONELLY et al., 1997). Dies erscheint aufgrund aktueller Fallzahlen jedoch zu hoch, da bislang (Stand: Jan. 2002) lediglich bei zwei Rindern BSE bestätigt wurde, die nach dem weitreichenden Fütterungsverbot im März 1996 geboren wurden (HORN et al., 2001).

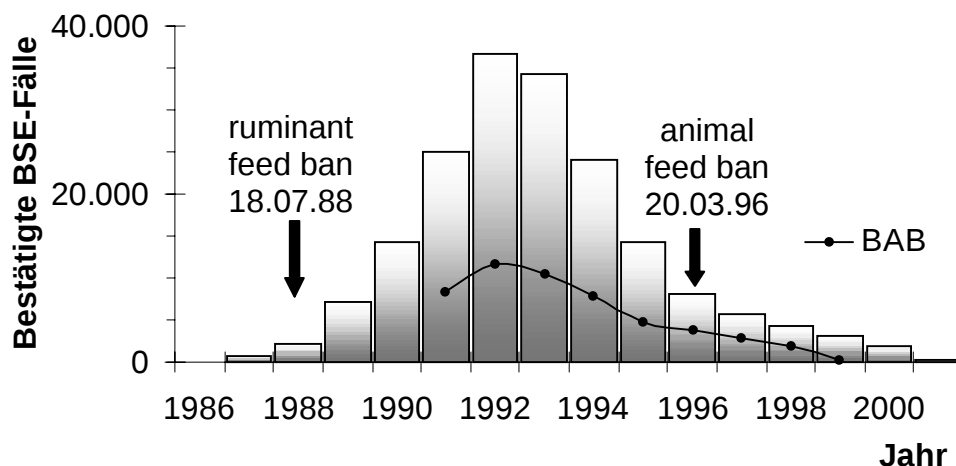


Abb. 2-5 Bestätigte BSE-Fälle im Vereinigten Königreich mit Angabe der Tiere, die nach dem Fütterungsverbot im Jahre 1988 geboren sind (BAB=Born-after-ban)

Die BSE-Krise betrifft jedoch nicht nur das Vereinigte Königreich sondern auch andere Länder. So traten 1990 in der Schweiz (CACHIN et al., 1991) sowie 1991 in Frankreich die ersten BSE-Rinder auf (VANDEVELDE et al., 1992). Im März 2000 wurden in Dänemark zum erstenmal Krankheitsanzeichen an eigenen Rindern entdeckt (ANONYM, 2000a). Bislang (Feb. 2002) erkrankten in Irland 799 Tiere, in Portugal 621 sowie in der Schweiz 403 Rinder. In weiteren 16 Ländern sind bis heute (Feb. 2002) nur wenige BSE-Fälle aufgetreten (Tabelle

2-8). Dies ist durch den Import von lebenden Rindern sowie von Fleisch- und Knochenmehl zu erklären. So exportierte Großbritannien nach 1985 über 50.000 Rinder und bis 1990 über 71 Kilotonnen Fleisch- und Knochenmehl (COLLEE und BRADLEY, 1997a).

Tabelle 2-8 Übersicht über BSE-Fälle in Europa (DEFRA; OIE) Stand: Feb. 2002

Land	BSE-Fälle (1. Ausbruch)
Vereinigtes Königreich	178.644 (1986)
Irland	799 (1989)
Portugal	621 (1994)
Schweiz	403 (1990)
Frankreich	498 (1991)
Deutschland	156 (2000)
Spanien	88 (2000)
Belgien	70 (1997)
Italien	52 (2001)
Niederlande	30 (1997)
Dänemark	7 (2000)
Liechtenstein	2 (1998)
Luxemburg	1 (1997)
Griechenland	1 (2001)
Tschechische Republik	2 (2001)
Japan	3 (2001)
Slowakische Republik	5 (2001)
Österreich	1 (2001)
Finnland	1 (2001)
Slowenien	1 (2001)

Im November 2000 wurde das erste infizierte in Deutschland geborene Tier nachgewiesen (BMVEL). Aufgrund ausgeweiteter Überwachungsmaßnahmen mittels BSE-Schnelltests erhöhte sich die Anzahl der nachgewiesenen infizierten Tiere in Deutschland auf insgesamt 156 (15.02.2002).

In Deutschland gab es vor diesem ersten Fall im November 2000 lediglich sechs Fälle, die ausnahmslos auf importierte Tiere aus dem Vereinigten Königreich und der Schweiz zurückzuführen waren (WIEMER, 1997). Durch Importtiere ausgelöste BSE-Fälle traten ferner in Irland, Italien, Dänemark, Frankreich, Portugal, Kanada sowie auf den Falkland Inseln und im Oman auf (Tabelle 2-9).

Tabelle 2-9 Anzahl importierter BSE-Fälle (DEALLER und LACEY, 1990; OIE)
Stand: Feb. 2002

Land	Importierte BSE-Fälle (1. Fund)
Irland	12 (1989)
Deutschland	6 (1992)
Oman	2 (1989)
Falkland Inseln	1 (1989)
Portugal	7 (1990)
Dänemark	1 (1992)
Kanada	1 (1993)
Italien	2 (1994)
Frankreich	1 (1999)

TSE-Fälle bei anderen Tierarten wurden wahrscheinlich ebenfalls durch kontaminiertes Fleisch- und Knochenmehl ausgelöst (BUSCHMANN und GROSCHUP, 1998). Die ersten erkrankten Katzen wurden 1990 im Vereinigten Königreich beschrieben (WYATT et al., 1990). Bis heute stieg die Anzahl der FSE-Katzen auf 92 (Nov. 2001). Bei in Zoos lebenden Tieren erkrankten bisher 36 an TSE (DEFRA).

2.2.3.1 Speziesbarriere

Infiziert ein an eine Spezies angepaßter Erreger eine andere Tierart, wird wahrscheinlich eine höhere minimale Infektionsdosis benötigt, um die sogenannte Speziesbarriere zu überschreiten (SIMON, 1996). Eine Erstinfektion einer anderen Spezies ist meist mit einer Verlängerung der Inkubationszeit verbunden (PATTISON und JONES, 1968; PRUSINER, 1997; RAEER et al., 1998). Nach mehreren Passagen des Erregers im neuen Wirt kommt es zur Verkürzung der

Inkubationszeit, Verringerung der erforderlichen Dosis sowie eventuell auch zu einer Veränderung des Krankheitsbildes (CARLSON et al., 1989; SIMON, 1996).

Worauf diese Speziesbarriere beruht ist noch unklar, jedoch spielt das Prionprotein (PrP) bei den TSE-Erkrankungen eine wichtige Rolle. So ist die Umfaltung von PrP^c unter dem Einfluß von PrP^{res} um so wahrscheinlicher, je ähnlicher sich die Primärstruktur, d.h. Aminosäuresequenz, des zellulären Prionproteins des Empfängers und des Spenders ist (SIMON, 1996; WEISSMANN, 1996). Dies wurde nachgewiesen, indem man auf nicht infizierbare Mäuse das Prionprotein eines Hamsters übertrug und diese anschließend mit einem Hamster adaptierten Scrapiestamm beimpfte. Die Tiere zeigten nach der Inkubationszeit typische Symptome für Scrapie (SCOTT et al., 1989). Für die Übertragbarkeit von BSE bzw. Scrapie bedeutet dies, daß nahe Verwandte wie z.B. Schaf und Ziege eine sehr viel geringere Speziesbarriere haben als Schaf und Mensch (SIMON, 1996; PRUSINER, 1997). Durch Vergleich der Aminosäuresequenzen des PrP wurde zwischen Rind und Mensch eine 92-93 %ige Übereinstimmung gefunden (PRUSINER, 1997; KRETZSCHMAR, 1998). Dies könnte die Entstehung der neuen Variante der CJD als humane Form der BSE erleichtert haben.

2.2.3.2 Experimentelle Übertragbarkeit

Die Übertragbarkeit von BSE auf eine andere Spezies ist abhängig von der aufgenommenen Erregermenge, dem Applikationsweg, der Höhe der Speziesbarriere und der Häufigkeit des PrP^c im Körper (BUSCHMANN und GROSCHUP, 1998).

Im Mäuseinokulationstest wurden Verdünnungsreihen eines TSE-infektiösen Hirnhomogenats auf ihre Infektiosität getestet. Hierbei wird die minimale Dosis bestimmt, mit der sich 50 % der Versuchstiere infizieren (ID₅₀).

KIMBERLIN und WALKER (1979) stellten beim Vergleich verschiedener Übertragungswege fest, daß die intracerebrale (i.c.) bzw. intraspinale (i.s.) Inokulation am effektivsten ist. So benötigt man im Vergleich zur oralen Aufnahme (p.o.) die 10⁵fach geringere Dosis bei einem angepaßten Erreger (Tabelle 2-10).

Tabelle 2-10 Vergleich der Effektivität verschiedener Übertragungswege (in Anlehnung an SIMON und PAULI, 1998)

Applikationsart		Infektiöse Einheit (IE)
intracerebral	i.c.	1
intravenös	i.v.	10
intraperitoneal	i.p.	10 ²
subcutan	s.c.	10 ⁴
per oral	p.o.	10 ⁵

Die Wahrscheinlichkeit der Übertragung von TSE auf eine artfremde Spezies läßt sich trotz der Speziesbarriere (s. Kap. 2.2.3.1), die bislang noch unbekannt ist, durch Injektion des Agens direkt in das Gehirngewebe erhöhen (BUSCHMANN und GROSCHUP, 1998). Gleiches gilt für die Verwendung transgener Versuchstiere (SCOTT et al., 1989; PRUSINER et al., 1990).

Die Anzahl der PrP^C ist ein weiterer Faktor in der Übertragungseffizienz. So sind Mäuse, denen das Gen zur Expression von zellulären Prionproteinen fehlt, sogenannte knockout-Mäuse, gegen Scrapie während der Beobachtungszeit von über 15 Monaten resistent (BÜELER et al., 1993; MANSON et al., 1994). Neben der Erkrankungsanfälligkeit wird auch die Inkubationszeit infizierter Mäuse durch die Anzahl der PrP^C beeinflusst. So zeigen Tiere mit einer 10fach höheren Genexpression nach einer i.c.-Inokulation des Scrapie-Agens bereits nach 50 bis 60 Tagen die ersten Krankheitssymptome (FISCHER et al., 1996), wogegen Tiere mit normaler PrP^C-Ausprägung erst nach 5-6 Monaten sterben (KINGSBURY et al., 1983; PRUSINER et al., 1993).

Nachdem FRASER et al. 1988 die intracerebrale oder intraperitoneale Übertragbarkeit von BSE auf Mäuse nachwiesen, wurde experimentell eine Vielzahl verschiedener Tierarten infiziert (Tabelle 2-11). So sind Rinder, Schafe, Ziegen, Schweine, Nerze, Pinseläffchen und Makaken ebenfalls intracerebral für das Agens empfänglich. Nach experimenteller Gabe von BSE-infiziertem Rinderhirnhomogenat über das Futter erkrankten Rinder, Schafe, Ziegen, Nerze, Mäuse und Lemuren. Das Schwein zeigte nach oraler Inokulation selbst nach

bis zu 7 Jahren weder klinische noch histopathologische Krankheitsanzeichen. Beim Huhn wurden nach ca. 5 Jahren weder nach parenteraler noch nach peroraler Infektion mit dem BSE-Agens Veränderungen festgestellt.

Tabelle 2-11 Experimentelle Übertragung von BSE

Tierart	Applikationsart		Referenz
	parenteral (i.c., i.p.)	peroral (p.o.)	
Maus	+	+	FRASER et al., 1988; BARLOW und MIDDLETON, 1990
Rind	+	+	DAWSON et al., 1990a
Schaf / Ziege	+	+	FOSTER et al., 1993; FOSTER et al., 1996
Schwein	+	-	DAWSON et al., 1990b; DAWSON et al., 1993; COLLEE und BRADLEY, 1997a
Nerz	+	+	ROBINSON et al., 1994
Pinselfäffchen	+	nb	BAKER et al., 1993
Lemuren	nb	+	BUTLER, 1999
Makaken	+	nb	LASMÉZAS et al., 1996
Hamster	-	nb	COLLEE und BRADLEY, 1997a
Huhn	-	-	BRADLEY, 1996; COLLEE und BRADLEY, 1997a

+: positiv

-: negativ

nb: nicht bekannt

Die untersuchten Affenarten zeigten nach Inokulation mit BSE-infiziertem Hirnhomogenat vergleichbare histopathologische Veränderungen wie sie Patienten mit vCJD aufweisen (LASMÉZAS et al., 1996). Die minimale orale Dosis betrug 0,5 g Hirn. Bezieht man diese Dosis auf einen Menschen mit einem Körpergewicht von 70 kg, müsste er eine Menge von mindestens 500 g infektiöses Gehirn zu sich nehmen (BUTLER, 1999).

Bei experimentellen Übertragungsversuchen mit dem Schaf und der Ziege erkrankten diese nach der Aufnahme von 0,5 g infektiösem Hirnhomogenat über das Futter (COLLEE und BRADLEY, 1997a). Im Vergleich zu BSE-kranken

Rindern verteilt sich die Infektiosität neben dem zentralen Nervensystem (ZNS), auch im peripheren Nervensystem, dem lymphatischen System, wie der Milz, und in anderen Geweben (FOSTER et al., 1996). Klinische und histopathologische Veränderungen sind jedoch nicht von der natürlich vorkommenden Scrapie zu unterscheiden (s. Kap. 2.1.1.3).

Rinder, die im Vergleich zu Mäusen 1000fach empfänglicher für BSE sind (BUSCHMANN und GROSCHUP, 1998), zeigten vier Jahre nach der oralen Aufnahme von 1 g Hirnhomogenat klinische und histopathologische Veränderungen (ANDERSON et al., 1996).

2.2.4 vCJD ist humane BSE

Seit dem Auftreten der Variante der Creutzfeldt-Jakob-Krankheit (vCJD) im Februar 1994 häufen sich die Indizien, die für einen Zusammenhang zwischen der vCJD und der bovinen spongiformen Enzephalopathie (BSE) sprechen.

Einen ersten Hinweis ergab das Auftreten der ersten vCJD-Fälle 10 Jahre nach dem Beginn der BSE-Epidemie in Großbritannien (BRITTON et al., 1995; BATEMAN et al., 1995). Bis heute (Feb. 2002) wurden bei insgesamt 118 Patienten in Europa charakteristische Symptome festgestellt (s. Kap. 2.1.2.2). 96 % davon lebten im Vereinigten Königreich (ALMOND und PATTISSON, 1997; DEPARTMENT OF HEALTH).

Bei Untersuchungen des veränderten Prionproteins (PrP^{res}) entdeckten COLLINGE et al. (1996) die Übereinstimmung des Glycosylierungsmusters bei vCJD- und BSE-Prionproteinen. Dieses sogenannte Typ 4-Muster wurde bei der klassischen Creutzfeldt-Jakob-Erkrankung nicht nachgewiesen. Vergleichbare Ergebnisse wurden nach experimentellen Übertragungsversuchen von BSE-Hirnhomogenat auf Makaken erhalten (COLLINGE et al., 1996). Katzen mit feliner spongiformer Enzephalopathie (FSE), die höchstwahrscheinlich über kontaminiertes Futter übertragen wurde, wiesen ebenfalls das Typ 4-Muster auf (COLLINGE et al., 1996; SIMON, 1996).

Daneben zeigte sich ein histopathologischer Zusammenhang zwischen BSE und vCJD. So wurden bei Transmissionsstudien von BSE auf normale (BRUCE

et al., 1997) sowie transgene Mäuse (HILL et al., 1997a; ALMOND und PATTISSON, 1997) und auf Makaken (LASMÉZAS et al., 1996) für vCJD-typische Veränderungen gefunden. Diese neuropathologischen Funde waren von denen einer klassischen CJD-Infektion verschieden (WILL et al., 1996b).

ALMOND und PATTISSON (1997) faßten diese Indizien in ihrer Schlußfolgerung „in effect, vCJD is human BSE" zusammen.

Im Sinne des Verbraucherschutzes muß deshalb von der BSE-Übertragung auf den Menschen ausgegangen (DORMONT, 1999) und entsprechend gehandelt werden. Eine orale Aufnahme des BSE-Erregers über mit ZNS-kontaminierte menschliche Nahrung wird angenommen, jedoch ist das Ausmaß noch ungeklärt (FEIDEN, 1998). Eine mögliche genetische Prädisposition wird nach Untersuchung der bisherigen vCJD-Patienten nicht ausgeschlossen, ist aber zur Zeit noch unbewiesen. In allen Fällen wurde im Codon 129 des Prionproteingens eine Homozygotie mit Methionin (Met/Met) festgestellt (COLLINGE et al., 1996). Am Codon 129 besteht ein Polymorphismus mit Methionin und Valin, wobei 40 % aller Europäer homozygot Met/Met sind (50 % Val/Met; 10 % Val/Val) (SCHÄTZEL et al., 1997). Der mögliche Anstieg der vCJD-Fälle läßt sich zur Zeit noch nicht abschätzen. Jedoch versuchten GHANI et al. (2000) aufgrund des Verlaufes bis 1998 eine epidemiologische Voraussage. Auf der Grundlage der 42 vCJD-Toten aus den Jahren 1999 und 2000, errechneten sie für die Zukunft eine Ausweitung auf bis zu 497.000 Fälle.

2.2.5 Risikoeinschätzung anhand des infektiösen Eintrags

Nach Schätzungen von ANDERSON et al. (1996) steckten sich im Zeitraum 1974 bis 1995 840.000 bis 1.250.000 Rinder mit der bovinen spongiformen Enzephalopathie an. Hierbei sind wahrscheinlich bis 1995 im Durchschnitt ca. 5.100 Krankheitsfälle auf maternale Übertragung zurückzuführen, was aber auf den Epidemieverlauf keinen größeren Einfluß hat. In die menschliche Nahrungskette gelangten bis Ende 1995 unerkannt zwischen 710.000 und 910.000 infizierte Tiere. Der tatsächliche infektiöse Eintrag ist jedoch von der Verteilung des Agens in den Organen der Rinder und Schafe abhängig. Die Bewertung des

infektiösen Titers in Tabelle 2-12 stützt sich auf experimentelle Übertragungsversuche mit dem Scrapie- sowie dem BSE-Erreger.

Tabelle 2-12 Infektiosität der Gewebe von Schafen und Rindern mit Scrapie bzw. BSE (KIMBERLIN und WILESMITH, 1994; LÜCKER und BÜLTE, 1997a; COLLEE und BRADLEY, 1997a und 1997b)

Infektiosität	Schafe mit Scrapie	Rinder mit BSE
+++	<u>Gehirn, Rückenmark</u>	<u>Gehirn, Rückenmark, Netzhaut</u>
++	Teile des <u>Dünndarms</u> , Lymphknoten, Teile des <u>Dickdarms</u> , <u>Milz</u> , <u>Tonsillen</u>	Teile des <u>Dünndarms</u>
+	Periphere Nerven, Thymus, Lunge, Leber, Pankreas, Knochenmark, Teile des Dickdarmes	
-	Blut, Serum, Niere, Milchdrüse, Kolostrum, Milch, Skelett-, Herzmuskel, Hoden	
		Periphere Nerven, Knochenmark, Leber, Lunge, Thymus, Pankreas, <u>Dickdarm</u> u.a. Gewebe (<u>Milz</u> , <u>Tonsillen</u> , Lymphknoten)

Infektiosität: +++ : hoch ++ : mittel + : gering - : keine nachweisbar
 unterstrichen: spezifiziertes Risikomaterial (SRM) (ANONYM, 2001b und 2001c)

Die höchsten Titer finden sich sowohl bei Scrapie als auch bei der bovinen spongiformen Enzephalopathie (BSE) im Gehirn und Rückenmark. Mit einer bei 50 % der Mäuse letalen Dosis (LD_{50}/g) von 10^4 - $10^5/g$ Hirn (TAYLOR et al., 1996) hat das BSE-Agens im Gehirn gegenüber Scrapie eine 10fach geringere Infektiosität/g ($10^{5,6 \pm 0,2}$ Maus- LD_{50}/g) (KIMBERLIN und WILESMITH, 1994; GROSCHUP und HAAS, 1995). Die Retina beim Rind zeigt ebenfalls eine hohe Erregerkonzentration (FRASER et al., 1992; WELLS et al., 1994). Durch orale Gabe von infiziertem Hirnhomogenat an Kälber wurde die Ausbreitung des BSE-Erregers im Körper untersucht. Dabei wurden vor allem in den Peyer'schen Platten des distalen Ileums bereits sechs Monate nach der Infektion Erreger nachgewiesen (WELLS et al., 1998). Dagegen lösten die sonstigen Gewebe (z.B. Skelettmuskulatur) und Körperflüssigkeiten (z.B. Milch) von

klinisch kranken Rindern weder nach parenteraler noch nach oraler Gabe nachweisbare Veränderungen aus (ANONYM, 1993; MIDDLETON und BARLOW, 1993; GROSCHUP und HAAS, 1995; TAYLOR et al., 1995b und 1996). Eventuell infektiöse Titer liegen dabei unter der Nachweisgrenze von 10^{1-2} Maus-LD₅₀/g (DANNER, 1993; SSC, 1998).

Im Gegensatz dazu vermehrt sich das Scrapie-Agens im Schaf in der Milz, den Lymphknoten und Mandeln (RICKETTS et al., 1997). In letzteren fanden SCHREUDER et al. (1998b) bereits in der frühen Inkubationsphase relativ hohe Infektiositätsraten. Gewebe mit mittleren Infektiositätsgraden ("++") besitzen Titer zwischen $10^{4,2}$ bis $10^{4,7}$ LD₅₀/g (KIMBERLIN und WILESMITH, 1994). Außerdem wiesen GROSCHUP und Mitarbeiter (GROSCHUP et al., 1996) in zahlreichen peripheren Nerven von Schafen Infektiosität nach.

Ein humanes Expositionsrisiko (HER) ist neben der Infektiosität der Gewebe von der Anzahl der infizierten Tiere sowie den durchgeführten Schutzmaßnahmen und dem Verzehr von Rinderprodukten abhängig (GHANI et al., 1998). Neben dem Risiko einer oralen Aufnahme besteht für den Menschen noch ein parenterales über Medikamente oder Kosmetika, die Rindergewebe enthalten, da dieser Weg eine geringere Dosis zur Infektion benötigt (VANDEVELDE et al., 1992). Zur Abschätzung des Expositionsrisikos wird die „erwartete Personenzahl, die dem BSE-Agens eines infizierten Rindes, das in die Nahrungskette gelangt, ausgesetzt ist“ (HER) herangezogen. Dabei geht man von ca. 8.000 CoID₅₀ (Cattle oral infective Dose₅₀) pro klinisch krankem Rind aus. 95 % der gesamten Infektiosität basieren auf dem Gewebe des ZNS (Hirn, Rückenmark, dorsale Wurzelganglien, Trigeminalganglien), wobei der größte Anteil (87,4 % der Gesamtinfektiosität) im Gehirn und Rückenmark zu finden ist (SSC, 1999a und 1999b). Die Infektiosität im Ileum beträgt 260 CoID₅₀/Tier, dagegen ist die Milz des Rindes – im Gegensatz zum Schaf (KIMBERLIN und WILESMITH, 1994) - nach den Aussagen des Scientific Steering Committees nicht bzw. nur gering infektiös (26 CoID₅₀/Tier) (SSC, 1999a und 1999b).

Auf dieser Grundlage spricht sich das Scientific Steering Committee (SSC) dafür aus, daß „jede Exposition verhindert werden sollte“, sollte dies jedoch „nicht vollständig möglich sein, so sollte zumindest die Dosis minimiert werden“ (SSC, 1999a). Eine einfache Möglichkeit dies zu erreichen, war die Entfernung des spezifizierten Risikomaterials (SRM $\hat{=}$ SBO, specified bovine offals), die in der Entscheidung der Kommission 97/534/EG definiert wurden. Vor Oktober 2000 entfernten jedoch nur sieben europäische Länder das spezifizierte Risikomaterial aus der Nahrungsmittelkette (SSC, 2000). In Deutschland wurde die Umsetzung der Entscheidung 97/534/EG fünfmal verschoben, zuletzt auf den 01.10.2000 (ANONYM, 2000b). Zur Begründung wurde angeführt, daß in Deutschland lediglich importierte BSE-Fälle auftraten und somit der Status "BSE-frei" beansprucht werde. Im Mai 2000 erfolgte durch das Scientific Steering Committee (SSC, 2000) eine Einteilung aller Länder in vier geographische BSE-Risikoklassen (GBR). Hierzu wurde unter anderem die BSE-Vergangenheit des Landes, Kontaminationsmöglichkeiten und die eingeleiteten Kontroll- und Schutzmaßnahmen beurteilt. Die GBR beschreibt die Wahrscheinlichkeit, daß ein Tier mit BSE infiziert sein kann. Deutschland wurde in die Klasse III mit einer geringen BSE-Inzidenz eingestuft, da durchgeführte Maßnahmen als nicht ausreichend angesehen wurden. Seit Juli 2001 ist die Feststellung des BSE-Status anhand vorgeschriebener Kriterien und Risikofaktoren EU-weit in der Verordnung 999/2001 geregelt (ANONYM, 2001b). Bislang (Stand: Jan. 2002) wurde jedoch noch kein Land einer der fünf BSE-Statusklassen (Tabelle 2-13) zugeordnet (Anonym, 2001c).

Tabelle 2-13 Definition der Länderklassifizierung (ANONYM, 2001b)

Statusklasse	Bedeutung
1	BSE-freie Länder oder Gebiete
2	vorläufig als BSE-frei eingestufte Länder oder Gebiete, in denen kein einheimischer BSE-Fall gemeldet wurde
3	vorläufig als BSE-frei eingestufte Länder oder Gebiete, in denen mindestens ein einheimischer BSE-Fall gemeldet wurde
4	Länder oder Gebiete mit geringer BSE-Inzidenz
5	Länder oder Gebiete mit hoher BSE-Inzidenz

Neben dem ZNS als Hauptträger der BSE-Infektiosität beurteilt das SSC die Wirbelsäule sowie die Lunge als potentiell hoch infektiös (SSC, 1998 und 2001a). Neben der schlachttechnologisch bedingten Verschleppung von Rückenmarksgewebe auf die Wirbelsäule und umliegendes Gewebe infolge Längsspaltung (HORLACHER et al., 2001) besteht ein mögliches Risiko durch anhaftende dorsale Wurzelganglien, die eine dem Rückenmark vergleichbare Infektiosität aufweisen. Dies ist bedeutsam, da die Verwendung von Separatorenfleisch in Fleischerzeugnissen von Einfachqualität (COLLEE und BRADLEY, 1997b) durchaus vorkommt. Die Rinderlunge, die selbst keine BSE-Infektiosität zeigt, kann ebenfalls durch Kontamination (GARLAND et al., 1996; SCHMIDT et al., 1999a; ANIL et al., 1999 und 2001; HORLACHER et al., 2000 und 2002) gefährdet sein, wenn es zu einem Transfer von Hirn- oder Rückenmarksfragmenten über den Blutstrom kommt (SCHMIDT et al., 1999a). Dies ist möglich, wenn durch die Betäubung des Tieres Hirngewebe sowie -gefäße zerstört werden (SCHMIDT et al., 1999a), so daß ZNS-Material über den venösen Kreislauf in die rechte Herzkammer und die Lunge gelangen kann, wie dies beim Menschen nach schweren Schädeltraumata bekannt ist (MCMILLAN, 1956; HAUCK et al., 1990).

Im folgenden soll die Verwendung dieser Rindergewebe näher betrachtet werden. Dies erfolgt ungeachtet der tatsächlichen Verarbeitung von SRM in Lebensmitteln, da hierüber keine Informationen vorliegen.

2.2.5.1 Hirnzusatz in Fleischerzeugnissen

Gehirn ist ernährungsphysiologisch aufgrund seines hohen Proteinanteils interessant (Souci et al., 1994). Daneben ist es billiges Material, das in relativ großen Mengen zur Verfügung steht (Tabelle 2-14).

Tabelle 2-14 Jährlicher Anfall an Gehirn und Rückenmark bei ausgewählten Schlachttieren (NICKEL et al., 1992; ANONYM, 2002)

Tierart	Schlachtzahlen (2000)	Gewebe	Durchschnittl. Gewicht (g)
Rind	3.865.600	Hirn	450
		Rückenmark	240
Kalb	419.000	Hirn	220
		Rückenmark	120
Schwein	43.234.200	Hirn	120
		Rückenmark	70
Schaf	1.044.000	Hirn	110
		Rückenmark	60

Vor allem bei der industriellen Herstellung von Fleischerzeugnissen wird Gehirn als Bindemittel eingesetzt. So soll es im Vereinigten Königreich üblich gewesen sein, Gehirn in Beefburgern, preisgünstigen Hamburgern und anderen brühwurstartigen Erzeugnissen (sausages, black pudding) zu verwenden (DEALLER und LACEY, 1990; VERDRAGER, 1996 und 1997). Angaben zu Tierart und Menge (10 % oder 2 g Hirn/Beefburger) sind nicht gesichert (VERDRAGER, 1997).

In Deutschland geben die Leitsätze für Fleisch und Fleischerzeugnisse des Deutschen Lebensmittelbuches die allgemeine Verkehrsauffassung wieder (ANONYM, 1998). Es bestand lediglich ein Verbot für die Verwendung von Gehirn in rohen Fleischerzeugnissen (ANONYM, 1998). So war der Einsatz von ZNS bislang auf bestimmte regionale Wurstspezialitäten, wie zum Beispiel „Bregenwurst“ oder „Hirnwurst“, beschränkt (Tabelle 2-15). Bei Kochwürsten der Spitzenqualität war dagegen ein Zusatz von Innereien mit Ausnahme von Leber nicht zulässig. Seit Oktober 2001 sind modifizierte Leitsätze für Fleisch und Fleischerzeugnisse gültig, nach denen der Einsatz von Hirn, Rückenmark,

Bries, Milz - mit Ausnahme von Schweinemilz -, Schweinemicker sowie Speiseröhre nicht mehr zulässig ist (ANONYM, 2001a). Die Verarbeitung von Lunge und Herz entspricht bis zu einer wissenschaftlichen Klärung der TSE-Infektiosität infolge schlachttechnologisch bedingter Kontamination ebenfalls nicht der allgemeinen Verkehrsauffassung (ANONYM, 2001a).

Tabelle 2-15 Ausnahmen nach den Leitsätzen für Fleisch und Fleischerzeugnisse für die Verarbeitung von spezifischen Innereien in deutschen Wurstwaren (ANONYM, 1998) (gültig bis Oktober 2001)

Gruppe	Leitsatz-Nr.	Verkehrsbezeichnung	Innereien (1.5*)
Rohwurst	2.212.2	Bregenwurst	mit oder ohne Hirn
Brühwurst	2.221.10	Lungenwurst, Berliner Dampfwurst, Kümmelwurst	Bindegewebe bis zu 10 % durch Innereien ersetzbar
	2.2313.12	Graupenwurst	Lunge
	2.222.6	Hirnwurst	Hirn
	2.224.7	Milzwurst, Brieswurst	Milz, evtl. Bries
Kochwurst	Spitzenqualität	stets ohne Innereien mit Ausnahme von Leber	
	Mittel- und Einfachqualität	zum Teil auch sonstige Innereien zulässig (soweit in den Leitsätzen aufgeführt)	

* Leber, Herz, Zunge ohne Schleimhaut, Schweinemicker, Speiseröhre ohne Schleimhaut. Für spezielle Fleischerzeugnisse: Lunge, Hirn, Bries, Milz, Nieren, Magen und Vormagen ohne Schleimhaut. Innereien dürfen nur zu Fleischerzeugnissen verarbeitet werden, die hitzebehandelt sind.

Neben Vorschriften in den Leitsätzen gibt es Aufzeichnungen über Rezepte mit Kalbshirn in gedünsteter oder gebackener Form (HOFMANN, 1959). Ob diese Spezialitäten bis heute hergestellt und verzehrt werden, ist nicht bekannt.

2.2.5.2 Separatorenfleisch in Fleischerzeugnissen

Unter Separatorenfleisch versteht man von grob ausgelösten Knochen maschinell abgetrenntes Fleisch (ANONYM, 1998). Verwendung findet es in Brüh- und

Kochwurst an Stelle von sehnereichem Rindfleisch und in einigen streichfähigen Rohwürsten (TROEGER und PRZYTULLA, 1996). In der industriellen Wurstherstellung wird Separatorenfleisch vor allem aus ökonomischen Gründen eingesetzt. Es gibt Rezepturen für Brühwurstzeugnisse mit einem Anteil von bis zu 10 % Rinderseparatorenfleisch (WENTHE et al., 2001). Neben dem Rinderseparatorenfleisch wurde auch Schweine- und Geflügelfleisch maschinell entbeint. Diese besitzen nach Auskunft des Fleischgewerbes höhere Marktanteile als Rinderseparatorenfleisch (HILDEBRANDT et al., 2001). Separatorenfleisch wird vor allem aus den Knochen der Wirbelsäule – einschließlich des Rückenmarks und der Paravertebralganglien - sowie den Rippen, die noch bis zu 30 % Fleischreste aufweisen, gewonnen (WENTHE et al., 2001). Dabei wird anhaftende Skelettmuskulatur zusammen mit Fettgewebe in einem Separator unter Druck durch einen Abpressvorgang bzw. Dekantierung aus dem zerkleinerten Ausgangsmaterial herausgelöst und von den Knochen sowie dem groben Bindegewebe getrennt (ANONYM, 1996c). Seit dem 1. Oktober 2000 dürfen im Hinblick auf die BSE-Problematik und im Sinne eines vorbeugenden Verbraucherschutzes Schädelknochen sowie die Wirbelsäule von Rindern, Schafen und Ziegen nicht mehr zur maschinellen Restfleischgewinnung genutzt werden (EU, 2000a). Darüber hinaus wird gefordert, den Zusatz von Separatorenfleisch in Fleischerzeugnissen für den Verbraucher kenntlich zu machen (HORN, 1997; NURMI und RING, 1999). Dies wurde in den modifizierten Leitsätzen für Fleisch und Fleischerzeugnisse (ANONYM, 2001a) sowie in der Entscheidung 2001/101/EG (EU, 2001a) umgesetzt.

2.2.5.3 Lunge in Fleischerzeugnissen

Es ist bekannt, daß Lunge in bestimmten erhitzten Fleischerzeugnissen verarbeitet wird. In den Leitsätzen für Fleisch und Fleischerzeugnisse des Deutschen Lebensmittelbuches sind hierfür beispielhaft die „Lungenwurst“, „Griebenwurst“ oder „einfache Sülzwurst“ mit einem Lungenanteil von bis zu 10 % angeführt (s. Tabelle 2-16) (SCHEID, 1967; ANONYM, 1998). Daneben wird Kalbs- oder Rinderlunge in regionalen Spezialitätengerichten (z.B. „Lungensuppe“, „Saure Lüngrl“ sowie „Flecke/n“) verarbeitet (HOFMANN, 1959).

Tabelle 2-16 Verarbeitung von Lunge in speziellen Wurstwaren (SCHEID, 1967; ANONYM, 1998)

Gruppe	Leitsatz-Nr.	Verkehrsbezeichnung
Brühwürste	2.221.10	Lungenwurst, Berliner Dampfwurst, Kümmelwurst
Kochwürste	2.2313.12	Graupenwurst Griebenwurst, Münchner Leberwurst
Blutwürste		Frankfurter Blutwurst, Bayerische Blutwürstchen, Norddt. Rotwurst
Sülzwürste		Sülzwurst, einfach
Preßwürste		Berliner Preßwurst

2.3 Verbraucherschutz

2.3.1 Maßnahmen

Im Jahr 1988 - drei Jahre nach dem Auftreten des ersten an BSE erkrankten Tieres in Großbritannien - gelang FRASER und Mitarbeiter (1988) die experimentelle orale Übertragung des BSE-Erregers auf die Maus. Daraufhin wurden zahlreiche Rechtsregularien zum Schutz sowohl der Verbraucher als auch der Tiere erlassen (DEFRA). Nachfolgend werden die wichtigsten Maßnahmen erläutert.

Zunächst führte die britische Regierung eine Meldepflicht für die bovine spongiforme Enzephalopathie ein (BSE-Order SI1988/1039 vom 21.06.1988). EU-weit trat diese Maßnahme im März 1990 (EU, 1990) in Kraft. Die Umsetzung in nationales Recht erfolgte 1991 durch die Aufnahme der „spongiformen Rinderenzephalopathie“ in die Liste der anzeigepflichtigen Tierseuchen (ANONYM, 1991). 1999 wurde diese durch „transmissible spongiforme Enzephalopathien“ ersetzt (ANONYM, 1999).

Nachdem ungenügend erhitztes Fleisch- und Knochenmehl als Übertragungsvektor des BSE-Erregers identifiziert wurde (WILESMITH et al., 1988), verbot die britische Regierung und auch die Europäische Union die Verfütterung von aus Säugern gewonnenen Futtermitteln (Feed-Ban SI1988/1039 vom 18.07.1988

sowie SI1994/2627 vom 02.11.1994; 94/381/EG). Dieses Verbot galt bis 1996 nur für Wiederkäuer, danach wurde es auf alle Nutztiere ausgeweitet (BSE-Order SI1996/962 vom 29.03.1996; 2000/766/EG und 2001/9/EG). Jedoch war bis 1996 die Überwachung und Durchführung des Feed-Bans im Vereinigten Königreich mangelhaft (BRADLEY und WILESMITH, 1993), da der Verstoß hiergegen strafrechtlich nicht geahndet wurde (HAMMER, 2001). So war es möglich, daß Restfuttermittelbestände unbemerkt in den Handel gelangen konnten oder in landwirtschaftlichen Betrieben aufgebraucht wurden (WILESMITH und RYAN, 1993; HOINVILLE et al., 1995). Darüber hinaus bestand bis zur Einführung des Verfütterungsverbotes an alle Nutztiere die Gefahr einer Kreuzkontamination zwischen Fleisch- und Knochenmehlen für Schweine und Geflügel sowie dem Futter für Wiederkäuer (HOINVILLE et al., 1995; COLLEE und BRADLEY, 1997b).

Gleichzeitig mit dem Feed-Ban wurde beschlossen (BSE-Order SI88/2299 vom 30.12.88), daß die Milch von infizierten Rindern nicht für den menschlichen und tierischen Konsum geeignet ist, obwohl bislang keine Beweise für ein mögliches Übertragungsrisiko vorliegen (TAYLOR et al., 1995b; WILESMITH und RYAN, 1997). Ausnahme dieses Verbotes war die Verfütterung an die Kälber der betroffenen Mutterkühe.

Ferner wurden aus Gründen des vorbeugenden Verbraucherschutzes bestimmte Rinderinnereien, bei denen eine Scrapie- bzw. BSE-Infektiosität nachgewiesen werden konnte, von der menschlichen und tierischen Nahrungskette ausgeschlossen (SBO-Ban SI1989/2061 vom 13.11.1989 sowie SI1990/1930 vom 25.09.1990; ersetzt durch SBM-Order SI1996/963 vom 29.03.1996). Auf europäischer Ebene wurde dieses Verbot für spezifiziertes Risikomaterial (SRM) 1997 mit der Entscheidung der Kommission 97/534/EG erlassen (EU, 1997). Das Inkrafttreten der Entscheidung wurde mehrmals verschoben (Anonym, 2000b) und am 29.06.2000 durch die Entscheidung 2000/418/EG, geändert durch 2001/233/EG, ersetzt. Seit dem 1. Oktober 2000 müssen spezifizierte Risikomaterialien (Tabelle 2-17) eingefärbt und unschädlich beseitigt werden (ANONYM, 2001b).

Tabelle 2-17 Spezifiziertes Risikomaterial (SRM) gemäß VO 999/2001, zuletzt geändert durch VO 1326/2001 (gültig seit 01.07.01)

EU-Mitgliedstaaten	
Tierart und Alter	Spezifiziertes Risikomaterial
Rinder >12 Monate	Schädel (inkl. Hirn, Auge), Mandeln, Wirbelsäule (exkl. Schwanzwirbel), Spinalganglien, Rückenmark
Alle Rinder	Darm (Duodenum bis Rektum)
Schafe, Ziegen >12 Monate	Schädel (inkl. Hirn, Auge), Mandeln, Rückenmark
Alle Schafe, Ziegen	Milz
<u>Zusätzlich gilt im Vereinigten Königreich und Portugal (exkl. Azoren)</u>	
Tierart und Alter	Spezifiziertes Risikomaterial
Rinder >6 Monate	Kopf (exkl. Zunge, inkl. Hirn, Augen, Trigeminaleganglien, Tonsillen), Schilddrüse, Milz, Wirbelsäule

Zusätzlich: Zerstörung von zentralem Nervengewebe nach dem Betäuben durch Einführung eines konischen Stahlstabs in die Schädelhöhle unzulässig (seit 01.01.2001)

Im Jahr 1996 führte die britische Regierung das Over-30-Month-Scheme (OMTS) ein (Beef Order SI1996/961 vom 29.03.1996; MEAT AND LIVESTOCK COMMISSION, 2000). Danach darf ausschließlich Fleisch von Rindern, die unter 30 Monate alt waren, in die menschliche Nahrungskette gelangen. Hinzu kamen Vorschriften über die selektive Tötung von BSE-exponierten Tieren der Geburtsjahrgänge 1989 bis 1993 (BSE-Order SI1996/3183 vom 24.01.97; EU, 1996b) und Nachkommen von BSE-infizierten Rindern (BSE Offspring Slaughter Regulations SI1998/3070 vom 04.01.99). Um die Herkunft der Tiere zurückverfolgen zu können, wurde der Rinderpass (Cattle Movement Documents) für alle nach dem 01.07.1996 geborenen Rinder zwingend vorgeschrieben (Cattle Passports Order SI1996/1686). Die Einführung des Date-based Export Scheme (DBES), nach dem nur Fleisch - ohne Knochen - von Tieren, deren Mutter nachweislich 6 Monate nach der Geburt des Schlachttieres nicht

an BSE erkrankte, exportiert werden darf (EU, 1998a), rundete die wichtigsten Maßnahmen im Vereinigten Königreich ab.

Auf europäischer Ebene wurden Regelungen über die epidemiologische Überwachung der TSE (98/272/EG) sowie die seit 01.01.01 gültige Vorschrift zur Durchführung von BSE-Schnelltests bei über 24 Monate alten Rindern (EU, 2000c und 2001d) sowie über 18 Monate alten Schafen und Ziegen (Anonym, 2001d) beschlossen.

2.3.2 Notwendigkeit eines Nachweisverfahrens

Im Zusammenhang mit der BSE-Problematik und dem Auftreten der neuen Variante der Creutzfeldt-Jakob-Krankheit (vCJD) (LASMÉZAS et al., 2001) kam es zu einer Sensibilisierung des Verbrauchers gegenüber der Erzeugung und Herstellung von Fleisch und dessen Produkten. Zum Schutz des Verbrauchers wurden bestimmte Gewebe von Rindern sowie von Schafen und Ziegen eines festgelegten Alters (s. Tabelle 2-17), bei denen im Mausmodell Infektionstiter nachgewiesen wurde, als sogenanntes „spezifiziertes Risikomaterial“ (SRM) definiert (ANONYM, 2001b) sowie deren Verwendung zur Herstellung von Lebens- und Futtermitteln untersagt (EU, 1997; Anonym, 2001b und 2001c). Von den Geweben des spezifizierten Risikomaterials weist das zentrale Nervensystem (ZNS) das größte Gefahrenpotential auf, da es bis zu 95 % der Gesamtinfektiosität eines an BSE erkrankten Rindes trägt (SSC, 1999a).

Der veränderten Verbrauchererwartung (GÜLLNER, 2001) an die Sicherheit der Lebensmittel tierischer Herkunft trägt auch die Änderung der Leitsätze für Fleisch und Fleischerzeugnisse des Deutschen Lebensmittelbuches (ANONYM, 2001a) Rechnung, die bestimmte Gewebe wie z.B. Hirn und Milz (ex. Schweinemilz) zur Herstellung von Wurstwaren untersagen (Tabelle 5-4). Um das Vertrauen der Verbraucher in getroffene Maßnahmen (Kap. 2.3.1) sowie in tierische Lebensmittel zurückzugewinnen, ist eine Kontrolle der vollständigen Umsetzung nötig. Aus diesem Grunde sind geeignete Nachweisverfahren erforderlich, die die Lebensmittelüberwachung in die Lage versetzen, die Ver-

arbeitung von spezifiziertem Risikomaterial zu erkennen. Da bekanntermaßen Gewebe des zentralen Nervensystems als Hauptinfektionsquelle gilt (SSC, 1999a), wurde hierfür ein integriertes Nachweisverfahren für Roh- und Endprodukte entwickelt. Als Marker dienten hierbei der Cholesterolgehalt sowie das Vorkommen nervenspezifischer Proteine, wie die neuronenspezifische Enolase (NSE) und das Saure Gliafaserprotein (GFAP), in der untersuchten Probe.

2.4 Cholesterol

Cholesterol, ein Strukturlipid in der Zellmembran tierischer Gewebe, gehört als Vorstufe für Produkte mit spezifisch biologischer Wirksamkeit zu der Gruppe der Steroide. Sein Gerüst (Abb. 2-6) besteht aus vier kondensierten Kohlenwasserstoffringen (A-D) mit einer β -Hydroxylgruppe am C₃-Atom (LEHNINGER et al., 1994).

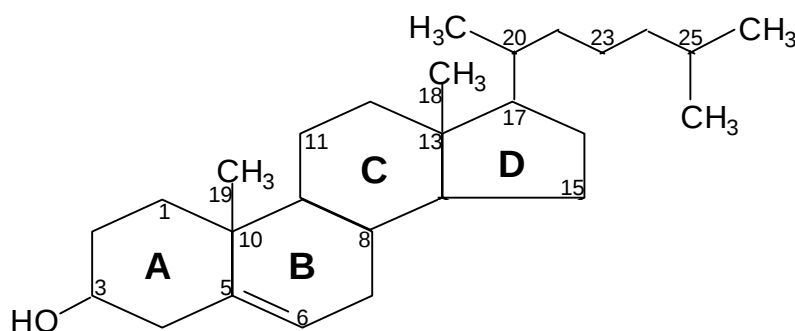


Abb. 2-6 Strukturformel des Cholesterols (LEHNINGER et al., 1994)

In tierischen Geweben liegt Cholesterol sowohl in freier als auch in veresteter Form mit gesättigten sowie ungesättigten Fettsäuren vor (BELITZ und GROSCH, 1992). Die höchsten Cholesterolgehalte finden sich im Gehirn – meist in freier Form – sowie in der Leber und Niere (MORITZ, 1995). Die Gehalte variieren innerhalb einzelner Gewebe sowie zwischen verschiedenen Tierarten (SOUCI et al., 1994; ARNETH und AL-AHMAD, 1995). In Rinderhirn schwankt der Cholesterolgehalt - abhängig von der Hirnregion - in einem Bereich von 6,6 mg/g Frischsubstanz (FS) im frontalen Cortex und 25,1 mg/g FS in der Medulla oblongata (RUNQUIST et al., 1995). Der durchschnittliche Cholesterolgehalt im

Gehirn beträgt nach SOUCI et al. (1994) etwa 2000 mg/100 g FS. Er liegt damit erheblich über den Werten, die andere tierische Gewebe, die üblicherweise für die Herstellung von Fleischerzeugnissen verwendet werden, aufweisen. Muskulatur, intramuskuläres und subkutanes Fettgewebe haben einen mittleren Cholesterolgehalt zwischen 58 mg und 100 mg/100 g FS (SOUCI et al., 1994; HONIKEL und ARNETH, 1996). Der Cholesterolverwert des Gehirns von Rind, Schaf und Schwein ist demgegenüber um das 20 bis 34fache höher als diese mittleren Cholesterolverwerte. Selbst cholesterolreiches Gewebe, wie die Leber und die Niere, besitzen beim Rind einen um den Faktor 7,6 bzw. 5,5 geringeren Cholesterolgehalt (SOUCI et al., 1994). Lediglich der Cholesterolgehalt von Eidotter kommt mit 1260 mg/100 g FS in die Nähe des Gehaltes von Gehirnmaterial (SOUCI et al., 1994). Im Anhang 1 sind die Cholesterolgehalte in Lebensmitteln tierischer Herkunft zusammengestellt.

Cholesterolver kommt neben tierischen Lebensmitteln in geringen Mengen (0,5 – 6,2 mg/kg) auch in Pflanzenölen vor (BELITZ und GROSCH, 1992) (s. Anhang 2). So können cholesterolähnliche Bestandteile wie Campe-, Stigma- und Sitosterin bei der enzymatischen Bestimmung des Gesamtcholesterolverhaltes zu einer Erhöhung der Meßwerte führen, da durch die unspezifischen Reaktionen des Enzyms Cholesterinioxidase alle Sterine mit einer 3- β -Hydroxylgruppe in tierischem und pflanzlichem Material – ausgenommen Lanosterin – umgesetzt und als Gesamtcholesterolver berechnet werden (WORTBERG, 1975; ASUV, 1992).

2.5 Neuronenspezifische Enolase (NSE)

Die neuronenspezifische Enolase (NSE) gehört zu der Gruppe der 2-Phospho-D-glycerat-Hydrolasen (KATO et al., 1982), die an der anaeroben Glycolyse beteiligt sind (SOLER FEDERSPIEL et al., 1987). Es handelt sich hierbei um dimere Isoenzymmoleküle, die aus drei Untereinheiten (α , β und γ) zusammengesetzt sind und in bestimmten Geweben des Körpers vorkommen. Die $\alpha\alpha$ -Form findet sich vor allem in Leber- sowie Gliazellen. In der Skelett- und Herzmuskulatur wurden die Formen $\alpha\beta$ sowie $\beta\beta$ nachgewiesen. Die homodimere $\gamma\gamma$ -Enolase sowie die heterodimere $\alpha\gamma$ -Form befinden sich in Nervenzellen sowie in neuro-

endokrinen Zellen und Tumorzellen (SCHMECHEL et al., 1978; MARANGOS et al., 1979; KIMURA et al., 1986). Die $\gamma\gamma$ -Enolase wird als neuronenspezifische Enolase (NSE) oder auch 14-3-2 Protein bezeichnet (MARANGOS et al., 1979). Sie dient als Marker für den Nachweis von ZNS in Fleischerzeugnissen (LÜCKER et al., 1998) sowie in der klinischen Diagnostik von neuroendokrinen Tumoren (SCHMECHEL et al., 1978; PAHLMAN et al., 1986; KANG et al., 1996). Der Nachweis erfolgt über SDS-Gelelektrophorese und Bindung an spezies-unspezifische monoklonale $\gamma\gamma$ -Antikörper (SUZUKI et al., 1980; KIMURA et al., 1984). Die nachweisbare NSE-Immunbande liegt in einem Bereich zwischen 45 kDa und 50 kDa Molekulargewicht (SUZUKI et al., 1980; HEYDORN et al., 1985).

Im Gehirn wiesen MARANGOS und Mitarbeiter (1979) einen NSE-Gehalt nach, der je nach Hirnregion zwischen 10.000 ng und 17.500 ng/mg löslichem Protein (s.P.) beträgt. Rückenmark enthält 13.000 ng NSE/mg s.P. (KATO et al., 1982). Dagegen sind im Gewebe von Lunge, Herz, Milz, Leber sowie Niere NSE-Konzentrationen festzustellen, die unter 1 % des Hirngehaltes liegen (KATO et al., 1982). Die Nebenniere weist mit 250 ng NSE/mg s.P. die höchste Konzentration außerhalb des Nervengewebes auf (SCHMECHEL et al., 1978). In Nerven des peripheren Systems finden sich Gehalte zwischen 59 ng NSE/mg s.P. im Vagusnerv und 765 ng NSE/mg s.P. im Ischiasnerv (MARANGOS et al., 1979). Der geringste NSE-Gehalt wird in der Skelettmuskulatur mit 5,7 ng/mg s.P. nachgewiesen (KATO et al., 1982). Eine Übersicht über NSE-Gehalte in ausgewählten Geweben findet sich im Anhang 3.

Die neuronenspezifische Enolase ist hitzestabiler als die Isoenzyme, die nicht in Nervenzellen vorkommen (non-neuronal enolase, NNE). Nach 10 minütiger Erhitzung bei 55 °C kommt es bei der $\gamma\gamma$ -Form zu einer Reduktion um 20 % des Ausgangsgehaltes und bei der $\alpha\alpha$ -Form um 60 % (SHIMIZU et al., 1982). Durch den Zusatz von Magnesiumionen kann eine Inaktivierung verhindert werden (SHIMIZU et al., 1983).

2.6 Saures Gliafaserprotein (GFAP)

Das Saure Gliafaserprotein (glial fibrillary acidic protein, GFAP) ist als intermediäres Filament der Klasse III ($\varnothing$ 10 nm) Hauptbestandteil in Astrozyten (ENG et al., 1971; BIGNAMI et al., 1972; DAHL und BIGNAMI, 1983), die im zentralen Nervensystem spezifisch vorkommen. Der Nachweis des Sauren Gliafaserproteins wird zur Diagnostik von Hirntumoren (ENG und BIGBEE, 1978), der Astroglieose sowie zur pränatalen Diagnostik nervaler Schäden (ENG und BIGBEE, 1978; DAHL und BIGNAMI, 1983) und seit kurzem auch als hoch spezifische Bestätigungsreaktion zum Nachweis von ZNS in Fleischerzeugnissen (LÜCKER et al., 1998; SCHMIDT et al., 1999b) angewandt. Die eingesetzten GFAP-Antikörper sind jedoch nicht spezies-spezifisch, so daß es zu Kreuzreaktionen zwischen einzelnen Tierarten kommen kann (BIGNAMI et al., 1972; BIGNAMI und DAHL, 1974). In der SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese weist man in frischem Hirngewebe eine einzelne Immunbande mit einem Molekulargewicht von 50 - 53 kDa nach (DAHL und BIGNAMI, 1983). Infolge postmortaler Zersetzungsprozesse kommt es zur Aufspaltung in bis zu acht Immunbanden im Bereich von 40 - 50 kDa (DAHL und BIGNAMI, 1983; ENG und DEARMOND, 1983).

SCHMIDT et al. (1999b) stellten in Hirngewebe einen GFAP-Gehalt zwischen 9.000 ng und 55.000 ng GFAP/mg löslichem Protein (s.P.) fest (s. Anhang 4). In Rückenmark wurde mit 55.000 ng – 220.000 ng/mg s.P. der höchste GFAP-Gehalt nachgewiesen (ENG und DEARMOND, 1983; SCHMIDT et al., 1999b). Diese Werte liegen um mindestens den Faktor 1000 höher als mit polyklonalen Antikörpern nachgewiesene GFAP-Mengen im *Nervus (N.) ischiadicus* (13,5 ng – 51 ng/mg s.P.). Saures Gliafaserprotein wurde außer in Astrozyten auch in Gliazellen der enterischen Nerven (JESSEN und MIRSKY, 1980, 1983 und 1985) sowie in nicht-myelinisierten Schwann Zellen des peripheren Nervensystems, wie dem *N. ischiadicus* (YEN und FIELDS, 1981) oder den *Nervi olfactorii* (BARBER und LINDSAY, 1982), festgestellt. Der Gehalt des immunchemisch nachweisbaren Sauren Gliafaserproteins liegt im Darmplexus mindestens um das achtfache, im *N. ischiadicus* um das 20fache unterhalb den Werten, die im Gehirn

nachgewiesen wurden (JESSEN et al., 1984). Lediglich ab einem *N. ischiadicus*-Anteil von 50 % in der Probe wurde im ELISA ein falsch positives ZNS-Ergebnis gefunden, wobei die Extinktionswerte um das vierfache unter vergleichbaren Werten eines Fleischerzeugnisses mit 1 % ZNS-Gehalt lagen (SCHMIDT et al., 1999b). ALBRECHTSEN und Mitarbeiter (1984) stellten fest, daß sich die Sauren Gliafaserproteine der meisten peripheren Nervenzellen von denen des ZNS-Gewebes durch das Fehlen einer antigenen Determinanten unterschieden. Durch den Einsatz monoklonaler Antikörper gegen GFAP des zentralen Nervensystems kann eine Kreuzreaktion weitgehend ausgeschlossen werden (JESSEN et al., 1984; JESSEN und MIRSKY, 1985).

Der nachweisbare GFAP-Gehalt nimmt mit der Lagerungsdauer durch Polymerisation und Aggregation mit anderen Gewebeproteinen ab (ENG und DEARMOND, 1983; SCHMIDT et al., 1999b). Material zweier ZNS-Proben verlor bei Lagerung bei 4 °C nach 8 Tagen 50 % seiner GFAP-Ausgangsreaktivität (SCHMIDT et al., 1999b). In Fleischerzeugnissen mit einem ZNS-Anteil von 1 % wurde ein entsprechender Aktivitätsverlust dagegen erst nach 12 Tagen festgestellt.

3 Material und Methoden

3.1 Untersuchungsmaterial

3.1.1 Laborinterne Standards

3.1.1.1 Geräte, Zutaten und Zusatzstoffe

Zur Herstellung des laborinternen Referenzmaterials werden folgende Geräte, Zutaten und Zusatzstoffe benötigt:

Geräte

- Fleischwolf „Elektrowolf 106“ (K & G Wetter GmbH, Biedenkopf-Breitenstein)
- Kutter Schneidmischer 33 (SM33) (K & G Wetter GmbH, Biedenkopf-Breitenstein)
- Diana-Tischkutter (Dianawerk, Kassel)
- Moulinette (Moulinex[®], Köln)
- Dosenverschließmaschine Typ V 10 Automat (Lanico Maschinenbau Otto Niemsch KG, Braunschweig)
- Füllmaschine Typ F20 (Handtmann, Biberach an der Riß)
- Vakuumgerät Autovac (K & G Wetter GmbH, Biedenkopf-Breitenstein)
- Kochkessel Typ ME/3 (Wilhelm Fessmann, Winnenden Brinkmannsweiler)
- Räucherammer Typ ER 3 (Wilhelm Fessmann, Winnenden Brinkmannsweiler)
- Klima-Reife-Kammer (Wilhelm Fessmann, Winnenden Brinkmannsweiler)
- Bizerba-Neigungswaage (August Santer KG, Ebrigen)
- Waage Typ P3 (Mettler GmbH, Gießen)
- Kerntemperaturmeßgerät HI 92704 (Fuchs-Meßtechnik, Gütersloh)

Verbrauchsmaterial

- Naturdarm (Rinderkranzdarm), Kaliber: 40/42 mm
- Kunstdarm aus Polyamiden, Kaliber: 90 mm
- Weißblechkonserven, gezogen; Fassungsinhalt: 150 g und 250 g
- Gefrierbeutel (Melitta Haushaltsprodukte GmbH & Co.KG, Minden)

Zutaten

Alle Ausgangsmaterialien wurden vom Städtischen Schlachthof Gießen bezogen und in Abhängigkeit der jeweiligen Rezeptur in verschiedenen Mengen schlachtwarm verarbeitet. Zur Herstellung der Kochwurststandards wurde das eingesetzte Fleisch sowie das Fettgewebe ca. 1 h bei 80 °C bis zu einer Kerntemperatur von 65 °C vorgebrüht.

- Schweinefleisch
- Schweinebauch
- Speck
- Schweineleber
- Rinderhirn

Zusatzstoffe und Gewürze

- Nitritpökelsalz (Pökelhilfsstoff)
- Kaliumsalpeter und Kochsalz (Pökelhilfsstoff)
- Natriumascorbat (Umrötehilfsmittel)
- Natriumdiphosphat (Kutterhilfsmittel)
- Natriumglutamat (Geschmacksverstärker)
- Mono- und Diglyceride von Speisefettsäuren (Emulgatoren)
- Leberwurst-Gewürze (Raps GmbH & Co.KG, Kulmbach)
- Sahne

3.1.1.2 Rohwurststandard**Standard für das immunchemische Nachweisverfahren**

Als laborinterner Rohwurststandard wurden Rohwürste (Rw) mit 0 %, 0,1 %, 0,5 %, 1 %, 2 % und 10 % Rinderhirn hergestellt. Die Zutaten des Grundbrätes sowie die Zusatzstoffe sind in Tabelle 3-1 aufgeführt.

Tabelle 3-1 Zutaten und Zusatzstoffe des Rohwurstbrätes

Zutaten (roh)	Anteil (kg)
Schweinefleisch, mager	6,0
Schweinebauch	3,5
Speck	2,5
Zusatzstoffe	Anteil (g) pro kg Brät
Kochsalz	264,0
Pfeffer	36,0
Zucker	36,0
Muskat	6,0
Kaliumsalpeter	3,6

Arbeitsablauf:

Das grob zerkleinerte Fleisch wurde mit den Zusatzstoffen vorgemischt und anschließend mit dem Fleischwolf (3 mm-Scheibe) (K & G Wetter GmbH, Biedenkopf-Breitenstein) zerkleinert. Die verschiedenen Mischungen mit dem homogenisierten nativen Rinderhirn wurden in einer handelsüblichen Moulinette (Moulinex®) hergestellt. Hierzu wurde zunächst der Rohwurststandard mit einem Hirnanteil von 10 % gemischt. Dieser Standard wurde anschließend für die Herstellung der niedrigeren Verdünnungsstufen verwendet (Tabelle 3-2).

Tabelle 3-2 Rohwurststandards mit verschiedenen Rinderhirnanteilen

Probe	Zugabe	Brät (kg)
Rw 0 %	-	2,0
Rw 0,1 %	200 g Rw 1 %	1,8
Rw 0,5 %	1000 g Rw 1 %	1,0
Rw 1,0 %	200 g Rw 10 %	1,8
Rw 2,0 %	400 g Rw 10 %	1,6
Rw 10,0 %	200 g Hirn	1,8

Die so hergestellten Rohwurststandards wurden in Naturdärme gefüllt und zur Umrötung und Reifung bei 18 °C und einer relativen Luftfeuchtigkeit von ca. 92-94 % für ungefähr 36 h und danach bei 90-92 % rel. Feuchte in der Klima-Reife-

Kammer (Fessmann, Winnenden) aufgehängt. Anschließend wurden die gereiften Würste im Kaltrauch bei 20-22 °C geräuchert. Die relative Luftfeuchtigkeit wurde dabei täglich um etwa 2 % verringert. Die Nachreifung erfolgte bei 14-16 °C und 75-78 % relativer Luftfeuchtigkeit, bis die Würste die gewünschte Festigkeit erreicht hatten.

3.1.1.3 Brühwurststandard

Erhitzter sowie nativer Standard für das immunchemische Nachweisverfahren sowie nativer Standard für die Untersuchungen zur Reduktion der immunchemischen NSE-Aktivität

Als laborinterne Brühwurststandards wurden Brühwürste (Bw) mit 0 %, 0,1 %, 1 %, 2 %, 4 % und 10 % Rinderhirn hergestellt. Die Zutaten des Grundbrätes sowie die eingesetzten Zusatzstoffe sind in Tabelle 3-3 aufgeführt.

Tabelle 3-3 Zutaten und Zusatzstoffe des Brühwurstbrätes

Zutaten (roh)	Anteil (kg)
Magerfleisch	4,0
Speck	1,6
Eisschnee	1,4
Zusatzstoffe	Anteil (g) pro kg Brät
Nitritpökelsalz	20,0
Natriumdiphosphat	3,0

Arbeitsablauf:

Das gewolfte Fleisch- und Speckmaterial wurde mit Nitritpökelsalz (Pökelhilfsstoff) und Natriumdiphosphat (Kutterhilfsmittel) im Kutter (K & G Wetter GmbH, Biedenkopf-Breitenstein) bei 2400 Messerumdrehungen pro Minute (Upm) vermischt und Eisschnee portionsweise zugegeben. Gegen Ende des Kuttervorgangs wurde mit geringerer Geschwindigkeit (1200 Upm) gekuttert, um das Brät zu entlüften. Die Mischung mit dem homogenisierten Rinderhirn erfolgte gemäß Tabelle 3-4 in einer handelsüblichen Moulinette (Moulinex®).

Tabelle 3-4 Brühwurststandards mit verschiedenen Rinderhirnantteilen

Probe	Hirn (g)	Brät (g)
Bw 0 %	0,00	500,00
Bw 0,1 %	0,50	499,50
Bw 1,0 %	5,00	495,00
Bw 2,0 %	10,00	490,00
Bw 4,0 %	20,00	480,00
Bw 10,0 %	50,00	450,00

Die so hergestellten Brühwurststandards wurden in Konservendosen à 150 g abgefüllt. Vor der Lagerung im Tiefkühlhaus bei –18 °C wurde die Hälfte der Dosen jeder Mischung 1 h bei 100 °C im Kochkessel (Fessmann, Winnenden) erhitzt.

Nativer Standard für die Untersuchungen zur Reduktion der immunchemischen NSE-Aktivität sowie erhitzter Standard für die Optimierung des Extraktionsmittels

Als Referenzmaterial wurde ein Brühwurststandard gemäß Tabelle 3-5 mit einem Rinderhirnanteil von 5 % hergestellt.

Tabelle 3-5 Zutaten und Zusatzstoffe des Brühwurststandards mit 5 % Hirnanteil

Zutaten (roh)	Anteil (kg)
Magerfleisch	4,75
Speck	2,85
Eisschnee	1,9
Rinderhirn	0,5
Zusatzstoffe	Anteil (g) pro kg Brät
Nitritpökelsalz	20,0
Natriumdiphosphat	3,0

Arbeitsablauf:

Das Grundbrät wurde nach der bereits beschriebenen Technologie (S. 51) hergestellt. Die Mischung mit dem homogenisierten Rinderhirn erfolgte in einer handelsüblichen Moulinette (Moulinex®). Danach wurde der native Brühwurststandard in Konservendosen à 250 g abgefüllt. 1/3 der Dosen wurde sofort im Tiefkühlhaus bei –18 °C gelagert. Die restlichen Konservendosen wurden je zur Hälfte 1 h bei 80 °C bzw. bei 100 °C im Kochkessel (Fessmann, Winnenden) erhitzt.

3.1.1.4 Kochwurststandard

Erhitzter Standard für die Cholesterolverbestimmung

Als Standardreferenzmaterial diente eine streichfähige Leberwurst (Lw) mit einem Leberanteil von 15 %, die nach den Leitsätzen für Fleisch und Fleischzeugnisse, Leitsatznummer 2.2312.5 (ANONYM, 1998), hergestellt wurde. Die Zutaten sowie Zusatzstoffe und Gewürze für den „Cholesterolverstandard“ sind in Tabelle 3-6 aufgeführt.

Der „Cholesterolverstandard“ wurde für jeden Meßzyklus der enzymatischen Cholesterolverbestimmung (Kap. 3.2), der zwischen 5 und 10 Proben umfaßte, mitbestimmt.

Tabelle 3-6 Zutaten und Zusatzstoffe für den „Cholesterolstandard“

Zutaten (vorgebrüht)	Anteil (kg)
Fetter Schweinebauch (S5* + S10*)	6,0
Sehnenfreies Schweinefleisch mit geringfügigem Fettanteil (S2*)	1,0
Schweineleber	1,5
Heiße Kesselbrühe	1,5
Zusatzstoffe und Gewürze	Anteil (g) pro kg Brät
Nitritpökelsalz	18,0
Natriumascorbat	1,0
Natriumglutamat	1,0
Gewürze	4,0
Mono- und Diglyceride von Speisefettsäuren	3,0
Sahne	50,0

* Gemäß GEHA-Fleischvermarktungssystem von KOCH et al. (1992)

Arbeitsablauf:

Die gewolfte Schweineleber (1,5 mm Scheibe) wurde zuerst im Kutter (K & G Wetter GmbH, Biedenkopf-Breitenstein) mit einer Messergeschwindigkeit von 2400 Umdrehungen pro Minute (Upm) und einer Schüsselumdrehung von 22 Upm gekuttert bis die Masse Blasen schlug. Anschließend wurde das Schweinefleisch zusammen mit dem Schweinefett durch die feinste Scheibe (1 mm) des Fleischwolfes (K & G Wetter GmbH, Biedenkopf-Breitenstein) gedreht und anschließend im Kutter (K & G Wetter GmbH, Biedenkopf-Breitenstein) mit 2400 Upm so lange zerkleinert bis die Masse eine sahnige Konsistenz erreicht hatte. Die Lebermasse wurde unter Zugabe von Nitritpökelsalz und Natriumascorbat mit der homogenen Masse des Fleisch- und Fettmaterials vermischt. Die restlichen Zusatzstoffe und Gewürze (s. Tabelle 3-6) sowie die heiße Kesselbrühe wurden langsam eingearbeitet und solange weitergekuttert bis eine sahneartige Konsistenz sichtbar wurde.

Das Leberwurstbrät wurde in Kunstdärme (Ø 90 mm) gefüllt und ca. 2 ¼ h bei einer Wassertemperatur von 80 °C bis zu einer Kerntemperatur von 72 °C im Kochkessel (Fessmann, Winnenden) erhitzt. Nach dem Abkühlen im Wasser-

bad (20 °C, 10 min) wurde der „Cholesterolstandard“ bei –18 °C im Tiefkühlhaus gelagert.

Erhitzter Standard für das immunchemische Nachweisverfahren

Als laborinterne Kochwurststandards wurden Leberwürste (Lw) mit 16 % sowie 32 % Schweineleber und mit 0 %, 0,25 %, 0,5 %, 1 %, 2 % und 4 % Rinderhirn hergestellt. Die Zutaten sowie die Zusatzstoffe, die dabei verwendet wurden, sind in Tabelle 3-7 aufgeführt.

Tabelle 3-7 Zutaten und Zusatzstoffe für das Grundbrät der Kochwurststandards

Zutaten (vorgebrüht) und Zusatzstoffe	Anteil (kg) für LW_{16%}	Anteil (kg) für LW_{32%}
Schweinebauch ohne Schwarte (S4*) und Schweinebacken ohne Schwarte (S6*)	6,9	5,3
Schweineleber (nativ)	1,6	3,2
Heißes Trinkwasser	1,5	1,5
Nitritpökelsalz	0,2	0,2

* Gemäß GEHA-Fleischvermarktungssystem von KOCH et al. (1992)

Arbeitsablauf:

Das vorgebrühte und zerkleinerte Schweinefleisch und -fett, die native Schweineleber sowie das native Rinderhirn wurden getrennt voneinander im Tischkutter (Dianawerk, Kassel) bei 3000 Upm homogenisiert. Anschließend wurde das Grundbrät gemäß dem bereits beschriebenen Ablauf (S. 54) hergestellt. Die Zugabe und Vermischung mit dem Hirnmaterial erfolgte anschließend in einer handelsüblichen Moulinette (Moulinex®) nach folgendem Schema (Tabelle 3-8).

Tabelle 3-8 Kochwurststandards mit verschiedenen Rinderhirnantteilen

Probe	Hirn (g)	Brät (g)
Lw 0 %	0,00	500,00
Lw 0,25 %	1,25	498,75
Lw 0,5 %	2,50	497,50
Lw 1,0 %	5,00	495,00
Lw 2,0 %	10,00	490,00
Lw 4,0 %	20,00	480,00

Die so hergestellten Kochwurststandards wurden in Konservendosen à 150 g abgefüllt und 1 h bei 80 °C im Kochkessel erhitzt. Die abgekühlten Dosen wurden bei –18 °C im Tiefkühlhaus gelagert.

Nativer Standard für die Untersuchung zur Reduktion der immunochemischen NSE-Aktivität

Als Referenzmaterial wurde ein Leberwurstbrät gemäß Tabelle 3-9 mit einem Anteil von 20 % Schweineleber und 10 % Rinderhirn hergestellt.

Tabelle 3-9 Zutaten und Zusatzstoffe des nativen Kochwurststandards

Zutaten (vorgebrüht) und Zusatzstoffe	Anteil (g)	Prozent (%)
Schweinefleisch, mager	700	35
Fettgewebe	700	35
Schweineleber	400	20
Rinderhirn (nativ)	200	10
Heiße Kesselbrühe	320	
Nitritpökelsalz	20	
Leberwurst-Gewürz	5	

Arbeitsablauf:

Das Leberwurstbrät wurde nach der bereits beschriebenen Technologie (S. 54) hergestellt. Danach wurde es in Portionen à 500 g in handelsübliche Plastikbeutel abgefüllt, luftdicht verschweißt und im Tiefkühlhaus bei –18 °C gelagert.

3.1.2 Externe Standards**3.1.2.1 Schweizer Referenzmaterial**

Als externes Referenzmaterial wurde eine feinzerkleinerte Brühwurst („Cervelas“) mit verschiedenen Anteilen an Kalbshirn zur Verfügung gestellt. Neun Würste, als G1 bis G9 gekennzeichnet, wurden im Rahmen eines Blindversuchs im Auftrag des Bundesamtes für Veterinärwesen Bern in einer Metzgerschule hergestellt. Die Angaben über Rezeptur und Hirnanteil wurden nach Abschluß der Untersuchung bekanntgegeben. Die Zutaten und Zusatzstoffe sind in Tabelle 3-10 dargestellt.

Tabelle 3-10 Zutaten und Zusatzstoffe des Schweizer Referenzmaterials

Zutaten (roh)	Anteil (kg)
Rindfleisch (R3)	1,12
Sehnenfreies Schweinefleisch mit geringfügigem Fettanteil (S2)	0,36
Wurstspeck (S6)	0,56
Halsspeck (S5)	0,40
Schwartenblock	0,48
Eis/Wasser	1,08
Zusatzstoffe und Gewürze	Anteil (g) pro kg Brät
Nitritpökelsalz	18,0
Cervelas-Gewürz	3,0
Phosphat E452	3,0
Ascorbinsäure E300	2,0
Flüssigknoblauch	1,0
Trockenzwiebeln	1,0

Die Herstellung der mit G1 bis G9 bezeichneten Würste erfolgte durch Zugabe von Kalbshirn zu dem Grundbrät – je nach gewünschtem Hirnanteil (Tabelle 3-11) auf 10 kg Brät bezogen (Dr. JEMMI, Bundesamt für Veterinärwesen Bern, persönliche Mitteilung).

Tabelle 3-11 Schweizer Referenzmaterial mit verschiedenen Kalbshirnanteilen

Probe	Hirnanteil (%)	Hirn (g)	Brät (kg)
G6	0,00	0,0	10,0
G9	0,01	0,001	9,999
G4 / G7	0,05	0,005	9,995
G3 / G8	0,10	0,01	9,99
G1 / G2	0,50	0,05	9,95
G5	1,00	0,1	9,9

Das Cervelasbrät wurde in Naturdärme ($\varnothing$ 34 mm) à 250 g abgefüllt, im Heißrauch bei 50-80 °C geräuchert, 20-25 min abgebrüht (75 °C) und abgekühlt. Anschließend wurde das Referenzmaterial bei -18 °C gelagert.

3.1.2.2 Frankfurter Referenzmaterial

Drei Gelbwürste - mit S0, S1 und S2 bezeichnet - wurden vom Staatlichen Medizinal-, Lebensmittel- und Veterinäruntersuchungsamt Südhessen, Außenstelle Frankfurt am Main (Dr. SEEGER) für die Untersuchung auf Zusatz von Hirn zur Verfügung gestellt. Nach Vorlage des Ergebnisses wurde der tatsächliche Hirngehalt mitgeteilt: die Probe S1 enthielt kein Hirn, die Probe S0 enthielt 3,3 % Schweinehirn und die Probe S2 einen Hirnanteil von 7,4 %. Angaben über die Rezeptur sowie das Herstellungsverfahren sind nicht bekannt.

3.1.3 Feldproben

3.1.3.1 Roh-, Brüh-, Kochwurst und andere Erzeugnisse

Die Feldproben wurden in Supermarktketten, Metzgereien, Direktvermarktern, Schnellrestaurants und Imbißstuben in den Landkreisen Gießen, Hochtaunus-

kreis und Wetteraukreis gezogen. Desweiteren wurden uns Proben vom Staatlichen Medizinal-, Lebensmittel- und Veterinäruntersuchungsamt Mittelhessen, Gießen und dem Staatlichen Medizinal-, Lebensmittel- und Veterinäruntersuchungsamt Südhessen, Frankfurt sowie vom Veterinäramt der Stadt Karlsruhe und vom Bundesamt für Veterinärwesen Bern zur Verfügung gestellt.

Es handelte sich hierbei um 23 schnittfeste Rohwürste der Spitzen- und Mittelqualität (Leitsatz 2.211), 164 Brühwürste (i.d.R. mittlere Qualität) (Leitsatz 2.22) sowie in der Gruppe Kochwurst um 131 Leberwürste (Probenkollektiv B: 58 Proben der Spitzenqualität und 73 Proben der mittleren Qualität) (Leitsatz 2.2312), 81 Kochmettwürste der mittleren Qualität (Leitsatz 2.2313), 46 Blutwürste (23 Proben der Spitzenqualität; 23 Proben der mittleren Qualität) (Leitsatz 2.232) und 44 Sülzwürste der mittleren Qualität (Leitsatz 2.233) sowie 33 Erzeugnisse aus gewolfem oder ähnlich zerkleinertem Fleisch (Hackfleisch-erzeugnisse, roh oder durcherhitzt, aus Schweine-, Rind- und Geflügelfleisch, Leitsatz 2.507) und Fisch (Fischerzeugnisse, roh und paniert) und 13 Erzeugnisse aus anderen zerkleinerten Lebensmitteln (Markklößchen). Die Feldproben innerhalb einer Gruppe wiesen unterschiedliche Technologie und Qualität auf (Tabelle 3-12).

Tabelle 3-12 Stichprobenumfang nach Leitsatznummern aufgegliedert (ohne Probenkollektiv A)

Bezeichnung		Leitsatznummer (Anzahl der Proben)
Rohwurst	schnittfest	2.211.04 (3); .05 (19); .08 (1)
Brühwurst	Würstchen	2.221.01 (2); .03 (27); .05 (1); .09 (1); .11 (17); .12 (2)
	fein zerkleinert	2.222.1 (21); .2 (32); .6 (55)
	grob	2.223.1 (1); .2 (4)
	mit Einlage	2.224.3 (1)
Leberwurst		2.2312.1 (39); .3 (19); .5 (66); .6 (7)
Kochmettwurst		2.2313.2 (66); .4 (8); .5(2); .7 (5)
Blutwurst		2.232.1 (5); .2 (18); .6 (3); .7 (1); .9 (18); .10 (1)
Sülzwurst	Sülzen	2.2331.10 (1)
	Preßwurst	2.2333.1 (3); .2 (1); .5 (39)
andere Erzeugnisse		2.507.2 (13); .3 (11); 2.511.21 (1) sowie 8 Formfleischprodukte und 13 Markklößchen

Darüber hinaus wurden 126 Leberwurstproben (Leitsatz 2.2312.1) randomisiert aus dem gesamten Raum Deutschlands während einer Prämierung der Deutschen Landwirtschaftsgesellschaft (DLG) gezogen (Probenkollektiv A). Diese Proben zeichneten sich durch eine relativ einheitliche Qualität aus (feinzerkleinerte Leberwürste im Darm der Spitzenqualität).

Die gesamte Studie umfaßte 661 Proben, davon wurden 601 enzymatisch auf ihren Cholesterolgehalt untersucht. 402 Proben wurden zusätzlich immunchemisch auf zentralnervöses Gewebe untersucht (Tabelle 3-13).

Tabelle 3-13 Stichprobenumfang nach Art der Fleischerzeugnisse getrennt

Art	Bezeichnung	Anzahl [n]		
		Total	Cholesterol	NSE
Rohwurst	Salamiart	23	23	20
Brühwurst	Gelbwurst, Fleischkäse u.a.	164	130	79
Kochwurst	Leberwurst	257	239	210
	Kochmettwurst	81	77	43
	Blutwurst	46	46	5
	Sülzen und Preßwurst	44	44	12
Sonstige	Hackfleisch, Klopse, Markklößchen u.a.	46	42	33
Gesamt		661	601	402

3.1.3.2 Organe

Verschiedene Gewebe und Organe vom Rind (Anhang 15) wurden vom Städtischen Schlachthof Gießen bezogen. Der Probenumfang umfaßte insgesamt 21 Gewebe, die auf ihren Cholesterolgehalt sowie auf ihre immunchemische NSE-Aktivität untersucht wurden.

Bis zur Untersuchung wurden sie bei -18°C gelagert.

3.2 Enzymatische Gesamtcholesterolbestimmung

3.2.1 Materialien

Zur enzymatischen Bestimmung des Gesamtcholesterolgehaltes werden neben herkömmlichem Labormaterial zusätzlich folgende Geräte, Verbrauchsmaterialien und Chemikalien benötigt:

3.2.1.1 Geräte

- Rückflußkühler mit Schliff
- Heizrührgeräte (Janke & Kunkel GmbH & Co.KG, IKA® Labortechnik, Staufen)

- Reagenzglasschüttler (Janke & Kunkel GmbH & Co.KG, IKA®Labortechnik, Staufen)
- Wasserbad (Memmert GmbH, Gießen)
- Analysenwaage ME 30 (Mettler GmbH, Gießen)
- Spektralphotometer Hitachi, Modell U-2000 (Colora Meßtechnik GmbH, Lorch/Württemberg)

3.2.1.2 Material

- Rundfilter Nr. 595, Ø 110 mm (Schleicher & Schuell, Dassel)
- Rundkolben mit Schliff, 50 bzw. 100 ml
- Magnetstäbchen
- Meßkolben mit Stopfen, 25, 50 u.100 ml
- Trichter, Ø 5,5 cm
- Reagenzgläser mit Schliff und passende Stopfen
- Glasvollpipetten
- Eppendorf®-Pipetten mit passenden Spitzen (10, 200, 1250 µl)
- Seesand, reinst (Merck®, Darmstadt)

3.2.1.3 Chemikalien

Die Testkombination der Firma r-biopharm, Darmstadt (Best. Nr. 0139 050) „zur Bestimmung von Cholesterol in Lebensmitteln und anderen Probenmaterialien“ enthält folgende Lösungen, die bei +4 °C lichtgeschützt gelagert werden (ANONYM, 1995a):

Testlösung 1: Ammoniumphosphatpuffer (pH 7,0); Methanol (c=2,6 mol/l); Katalase (ca. 220.000 U); Stabilisatoren

Testlösung 2: Acetylaceton (c=0.05 mol/l); Methanol (c=0,3 mol/l); Stabilisatoren

Testlösung 3: Cholesterinoxidase (ca. 12 U)

Testlösung 4: Cholesterolstandardlösung zur Testkontrolle

Die für den Bestimmungsansatz benötigte Cholesterol-Reagenz-Mischung wird durch Mischen der Testlösungen 1 und 2 im Verhältnis 3:2 hergestellt. Vor Ge-

brauch läßt man das Gemisch ca. 1 h bei Raumtemperatur (20-25 °C) stehen, so daß sich bei Testbeginn mögliche Ausflockungen gelöst haben. Die Mischung ist in einer lichtundurchlässigen Flasche ca. 3 Monate bei +4 °C haltbar.

Zur Anwendung kommen nur analysenreine Chemikalien (p.a.) und destilliertes Wasser:

- Kaliumhydroxid-Plätzchen (Merck® KGaA, Darmstadt)
- Methanol (Merck®, Darmstadt)
- 2-Propanol (Roth® GmbH & Co, Karlsruhe)

Die benötigte methanolische Kalilauge wird vor jedem Testbeginn frisch hergestellt. Hierzu verdünnt man eine 10 molare wäßrige Kalilauge mit dem neunfachen Volumen Methanol. Dadurch verhindert man eine inhibitorische Wirkung auf die Cholesterinoxidase durch Stabilisatoren, die in den meisten handelsüblichen Kalilaugen enthalten sind (BEUTLER und MICHAL, 1976).

3.2.2 Methode

Das Analyseverfahren beruht auf der Vorschrift L 05.00-17 der Amtlichen Sammlung nach § 35 Lebensmittel- und Bedarfsgegenstände-Gesetz (LMBG) zur „Bestimmung des Cholesterolgehaltes in Eiern und Eiprodukten - Enzymatisches Verfahren“ (ASUV, 1992). Eine Modifizierung der Vorschrift erfolgte im Abschnitt Probenvorbereitung, die entsprechend der Untersuchungsmatrix verändert wurde (Vorschrift für Leberwurst n. ANONYM, 1995a).

Bestimmt wird der Gesamtgehalt an freiem Cholesterol und anderen Sterinen, die eine 3- β -Hydroxylgruppe besitzen. Der photometrisch ermittelte Wert wird mittels einer Formel (Gleichung 3-4) umgerechnet und das Ergebnis als mg Cholesterol/100 g Frischsubstanz (FS) angegeben (ANONYM, 1995a).

3.2.2.1 Prinzip

Das Testprinzip zur Bestimmung des Gesamtcholesterolgehaltes beruht auf der Überführung der Cholesterinester (Cholesterin + Fettsäuren) in freies Choleste-

rin, indem es durch Kochen mit methanolischer Kalilauge verseift wird (a) (Abb. 3-1). Gleichzeitig erfolgt die Extraktion des freien Cholesterins mit 2-Propanol (ACKER und GREVE, 1963; LITTMANN-NIENSTEDT, 1993). Durch die sich anschließende Oxidation der 3- β -Hydroxylgruppe des freien Cholesterins durch die Cholesterinoxidase entsteht Δ^4 -Cholesten-3-on und Wasserstoffperoxid (b). Letzteres oxidiert Methanol in Gegenwart von Katalase zu Formaldehyd (c). Im letzten Reaktionsschritt bildet Formaldehyd mit Acetylaceton in Anwesenheit von NH_4^+ -Ionen den gelben Lutidinfarbstoff 3,5-Diacetyl-1,4-dihydrolutidin (d) (WORTBERG, 1975; ANONYM, 1995a).

Aufgrund seiner Absorption im sichtbaren Bereich kann nun die Konzentration des Lutidinfarbstoffes spektralphotometrisch bei 405 nm gegen Luft bestimmt werden.

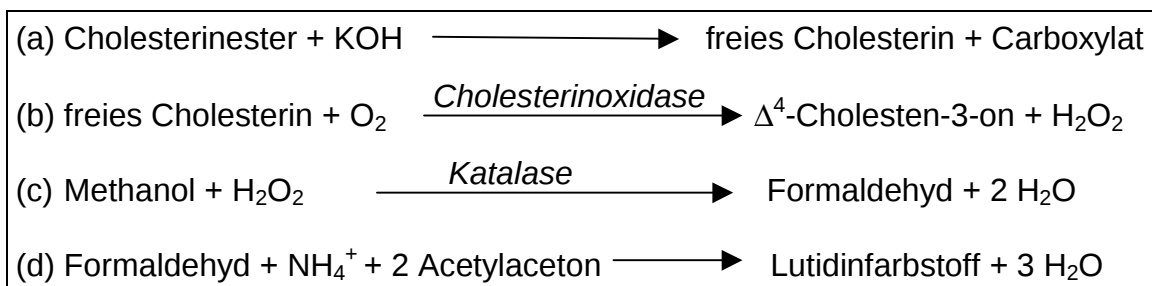


Abb. 3-1 Reaktionsschemata der enzymatischen Gesamtcholesterolbestimmung (n. SCHRÖTER et al., 1994; ANONYM, 1995a)

3.2.2.2 Probenvorbereitung

Das Untersuchungsmaterial wurde mindestens 12 Stunden vor Versuchsbeginn aufgetaut. Auf diese Weise wurden Gewichtsverfälschungen durch Eiskristalle vermieden.

Grobes Material muß zunächst in einer Moulinette zerkleinert werden, da nur feinzerkleinerte, homogene Probenmatrix für die Gesamtcholesterolbestimmung verwendet werden sollte.

Um eine Vergleichbarkeit der Einzelergebnisse zu erhalten und um tagesbedingte Schwankungen der Gesamtcholesterolwerte zu erkennen, wurde pro Meßzyklus, der 5 bis 10 Wurstproben umfaßte, der Cholesterolgehalt eines laborinternen „Cholesterolstandards“ (Kap. 3.1.1.4) mitbestimmt.

3.2.2.3 Herstellung der Probenlösung

Aus der zu untersuchenden Probe wurden mehrere Teilmengen aus unterschiedlichen Bereichen bis zu einer Gesamtmenge von 2,5 g entnommen und auf einer Analysenwaage in einen 50 ml Rundkolben auf 1 mg genau eingewogen. Nach Zugabe von 1 g Seesand und 10 ml frisch hergestellter methanolischer Kalilauge (1 mol/l) wurde die Probe am Rückflußkühler 25 min auf dem Magnetrührer erhitzt. Der Überstand wurde mit einer Glaspipette in einen 25 ml Meßkolben überführt. Der Rückstand im Kolben wurde anschließend zweimal mit je 6 ml 2-Propanol am Rückflußkühler 5 min erhitzt und dann ebenfalls in dem 25 ml Meßkolben gesammelt. Nach Abkühlung der so erhaltenen Lösung auf Zimmertemperatur wurde mit 2-Propanol bis zur Eichmarke aufgefüllt und der Inhalt gut gemischt. Die trübe Lösung wird durch einen Faltenfilter vollständig filtriert, so daß man eine klare Probenlösung für den Bestimmungsansatz erhielt.

3.2.2.4 Herstellung des Bestimmungsansatzes für die Spektralphotometrie

Der Probenleerwert und die Probenmeßlösung wurden gemäß Pipettierschema aus Tabelle 3-14 hergestellt. Die Angaben entsprechen dem halben Reaktionsansatz der Pipettiervorschrift von r-biopharm, Darmstadt (ANONYM, 1995a).

Tabelle 3-14 Pipettierschema für den Bestimmungsansatz (modifiziert n. ANONYM, 1995a)

In Reagenzglas mit Schliff pipettieren	Probenleerwert	Probenmeßlösung
Cholesterol-Reagenz-Mischung	2,500 ml	-
Probenlösung*	0,200 ml	-
Inhalt des Reagenzglases gut mischen		
Aus dem Reagenzglas des Probenleerwertes abpipettieren	-	1,250 ml
Testlösung 3	-	0,010 ml
Inhalte des Reagenzglases gut mischen und mit Stopfen fest verschließen		

* Vor der Dosierung des Filtrats muß die Pipettenspitze der Eppendorf-Pipette mit dem Filtrat vorgespült werden.

Nach dem Mischen der Meßlösungen und Verschluß der Reagenzgläser wurde der Bestimmungsansatz im Wasserbad bei einer Temperatur von 37 – 40 °C zur vollständigen Farbentwicklung 1 h inkubiert.

Nach dem Abkühlen auf Zimmertemperatur wurden die Extinktionen des Probenleerwertes und der Probenmeßlösung nacheinander in derselben Glasküvette bei 405 nm gegen Luft gemessen (ANONYM, 1995a).

3.2.2.5 Berechnung des Gesamtcholesterolwertes

Grundlage für die Berechnung ist die bestehende Proportionalität zwischen der Konzentration des Lutidinfarbstoffes und somit der Extinktionsdifferenz $\Delta\gamma$ der Lösungen und dem Gesamtcholesterolgehalt.

Die Extinktionsdifferenz berechnet sich durch Subtraktion der Extinktion des Probenleerwertes von der Extinktion der Probenmeßlösung (Gleichung 3-1).

$$\Delta E = E_{\text{Probenmeßlösung}} - E_{\text{Probenleerwert}}$$

Gleichung 3-1 Berechnung der Extinktionsdifferenz ΔE (n. ASUV, 1992)

Nach der adsorptionsphotometrischen Messung läßt sich die unbekannte Konzentration des Gesamtcholesterols mittels des Lambert-Beer'schen Gesetzes ($E = \varepsilon \cdot c \cdot d$) errechnen. Da die zu messende Substanz durch den Reaktionsansatz verdünnt wurde, gilt folgende Gleichung (ANONYM, 1995a):

$$c[\text{g/l Probelösung}] = \frac{V \cdot MG}{\varepsilon \cdot d \cdot v \cdot 1000} \cdot \Delta E$$

Gleichung 3-2 Allgemeine Berechnungsformel für die Bestimmung der Konzentration in verdünnten Lösungen (n. ANONYM, 1995a)

Dabei sind:

- c Substanzkonzentration in Probenlösung [g/l Probenlösung]
- V Gesamtvolumen des Probenleerwertes [ml]
- MG Molekulargewicht der zu bestimmenden Substanz [g/mol];
Cholesterol = 386,64 g/mol

ε	Extinktionskoeffizient des Lutidinfarbstoffs bei 405 nm [= 7,4l · mmol ⁻¹ · cm ⁻¹]
d	Schichtdicke der Glasküvette [= 1,0 cm]
V	Volumen der in den Test eingesetzten Probenlösung [ml]
ΔE	Extinktionsdifferenz

Hieraus ergibt sich unter Berücksichtigung der im Bestimmungsansatz vorgenommenen Verdünnung mit dem Verdünnungsfaktor F_1 für den Steringehalt (= $V_{\text{Probenmeßlösung}} : V_{\text{eingesetzter Leerwert}} = 1,26/1,25 = 1,008$), berechnet als Gesamtcholesterolgehalt, der in Gleichung 3-3 dargestellte Zusammenhang.

Wurde bei der Probenvorbereitung eine weitere Verdünnung vorgenommen, muß das Ergebnis mit einem zweiten Verdünnungsfaktor (F_2) multipliziert werden (ANONYM, 1995a).

$$c_{\text{Cholesterol}} = \frac{2,7 \cdot 386,64 \cdot 1,008}{7,4 \cdot 1,0 \cdot 0,2 \cdot 1000} \cdot \Delta E = 0,711 \cdot \Delta E \cdot F_2$$

Gleichung 3-3 Berechnung der Gesamtcholesterolkonzentration in g/l Probelösung (n. ANONYM, 1995a)

Um den Gesamtcholesterolgehalt in g/100 g Frischsubstanz (FS) zu erhalten, wird das Analysenergebnis aus Gleichung 3-3 auf die Einwaage bezogen (s. Gleichung 3-4) (ANONYM, 1995a).

$$Cholesterin_{\text{gesamt}} = \frac{c_{\text{Chol}} [g / l \text{ Probelösung}]}{Einwaage_{\text{Probe}} [g / l \text{ Probelösung}]} \cdot 100$$

Gleichung 3-4 Berechnung des Gesamtcholesterolgehaltes in g/100 g FS (n. ANONYM, 1995a)

Unter Berücksichtigung der Einwaage von 2,5 g Probe in 25 ml Probenlösung ergibt sich eine Probeneinwaage von 100 g/l Probenlösung. Außerdem ist das Ergebnis mit dem Faktor 1000 zu multiplizieren, um den Cholesterolgehalt in mg/100 g FS zu erhalten.

$$\text{Cholesterin}_{\text{gesamt}} = \frac{(\Delta E \cdot 0,711) \text{ g / l Probelösung}}{100 \text{ g / l Probelösung}} \cdot 100 \cdot 1000$$

$$\text{Cholesterin}_{\text{gesamt}} = \Delta E \cdot 0,711 \cdot 1000$$

Gleichung 3-5 Berechnung des Gesamtcholesterolgehaltes in mg/100 g FS
(n. ANONYM, 1995a)

3.2.2.6 Auswertung

3.2.2.6.1 Statistik

Die Auswertung der Ergebnisse der Cholesterolbestimmung erfolgte entsprechend der Zugehörigkeit zu unterschiedlichen Wurstgruppen sowie der Einteilung in verschiedene Standardgruppen. Mit Hilfe computergestützter statistischer Berechnungsfunktionen (Microsoft, Excel 97) wurden verschiedene Parameter, wie arithmetischer Mittelwert ($\bar{X}$), Minimum, Maximum, Median sowie Standardabweichung (sd) ausgewertet.

Einzelne Werte wurden graphisch mit Hilfe des Graphikfunktionsassistenten dargestellt und gegebenenfalls Trendlinien berechnet.

Zur Erstellung der Häufigkeitsverteilung und der kumulierten Häufigkeitskurve kam ebenfalls ein Funktionsanalyseprogramm von Excel 97 zur Anwendung. Zur Festlegung der Klassenbreite wurde die Faustregel von STURGES (1926) herangezogen, welche auf der Spannweite R und dem Stichprobenumfang n basiert (SACHS, 1992).

3.2.2.6.2 Berechnung des Gesamtcholesterolgehaltes

Die Gesamtcholesterolgehalte für Brühwurststandards mit Rinderhirn sowie Kochwurststandards mit Rinderhirn- und Schweineleberzusatz wurden nach der Gleichung 3-6 (LÜCKER und BÜLTE, 1997b) berechnet und mit den analytisch ermittelten Daten verglichen. Als Grundlagen für die verwendeten Cholesterolgehalte in Rinderhirn, Muskulatur sowie Schweineleber dienten die Literaturangaben nach SOUCI et al. (1994).

$$\text{Cholesterol}[\text{mg}/100\text{g}] = \frac{(g \cdot G) + (b \cdot B) + (l \cdot L)}{100}$$

Gleichung 3-6 Berechnung des Gesamtcholesterolgehaltes in Würsten mit Rinderhirnzusatz (LÜCKER und BÜLTE, 1997b)

Dabei sind:

- g, b, l prozentualer Anteil der Zutat (%)
- G Gesamtcholesterolgehalt in der Zutat Hirn (=2000 mg/100 g)
- B Gesamtcholesterolgehalt im Brät (=60 mg/100 g)
- L Gesamtcholesterolgehalt in der Zutat Leber (=261 mg/100 g)

3.2.2.6.3 Cutoff-Point für den Nachweis von zentralnervösem Gewebe

Der Cutoff-Point (CP) ist als die untere Grenze desjenigen Gesamtcholesterolgehalts definiert, bei dem der Zusatz von Hirn mit einer vorgegebenen statistischen Sicherheit *f* (wie z.B. 95 % bzw. 99,9 %) nachgewiesen werden kann (LÜCKER und BÜLTE, 1997b). Der Cutoff-Point wird gemäß der Gleichung 3-7 berechnet. Hierbei können unterschiedliche Fett- und Muskelgewebszusätze der Proben vernachlässigt werden, da diese den Gesamtcholesterolgehalt kaum beeinflussen (LANGHORST, 1998).

Grundlage der Berechnung sind mittlere Cholesterolgehalte und Standardabweichungen nach dem Ausschluß von immunchemisch positiven ZNS-Proben. Der Sicherheitsfaktor *f* wurde der Tabelle über die Irrtumswahrscheinlichkeit für den einseitigen Test entnommen (SACHS, 1992).

$$\text{CP} = \bar{X} + (f \cdot \text{sd})$$

Gleichung 3-7 Berechnung des Cutoff-Points (n. LÜCKER und BÜLTE, 1997b)

Dabei sind:

- CP Cutoff-Point [mg Cholesterol/100 g Frischsubstanz]
- $\bar{X}$ mittlerer Cholesterolgehalt der Stichprobe (= Gesamtstichprobe - ZNS-positive Proben)
- f* Sicherheitsfaktor (einseitig; z.B. $f_{95\%} = 1,645$ oder $f_{75\%} = 0,675$)
- sd Standardabweichung der Cholesterolgehalte der Stichprobe (= Gesamtstichprobe - ZNS-positive Proben)

3.3 Immunchemisches ZNS-Nachweisverfahren

3.3.1 Materialien

Für das immunchemische Nachweisverfahren werden neben herkömmlichem Labormaterial zusätzlich folgende Geräte, Verbrauchsmaterialien und Chemikalien benötigt:

3.3.1.1 Geräte

- BioRad® Protean II-Elektrophoresekammer (BioRad®, München)
- BioRad® Power Supply, Model 500/200 (BioRad®, München)
- Trans-Blot® SD Semi Dry Transfer Cell (BioRad®, München)
- Power Pac 200 (BioRad®, München)
- Eppendorf® Centrifuge 5415C (Merck®, Darmstadt)
- Mettler® PL1200-Waage (Mettler GmbH, Gießen)
- Sartorius®-Basic-Waage (Sartorius AG, Göttingen)
- Heidolph®-Pottergerät mit 15 ml Potterglas und Teflonstab (novodirekt®, Kehl)
- Heizrührgerät (IKA® Labortechnik, Staufen)
- Reagenzglasschüttler (IKA® Labortechnik, Staufen)
- Wasserbad (Memmert GmbH, Gießen)
- Schüttelgerät (GFL mbH, Hannover)

3.3.1.2 Material

- Rundfilter Nr. 595, Ø 90 mm (Schleicher & Schuell, Dassel)
- Filterpapiere 20 x 20 cm Nr.25243 (Camag®, Berlin)
- Glasvollpipetten
- Eppendorf®-Pipetten mit passenden Spitzen (10, 200, 1250 µl)
- Hamilton-Pipette, 250 µl
- Roti®-PVDF Transfermembran (Roth®, Karlsruhe)
- Reaktionsgefäße ohne Sicherheitsverschluß, 1,5 ml (Brand MBH & Co, Wertheim)

- Reaktionsgefäße mit Sicherheitsverschluß, 1,6 ml (Biozym Diagnostik GmbH, Hess. Oldendorf)
- Glasschale (Merck[®], Darmstadt)
- Parafilm (Merck[®], Darmstadt)

Für die Entfettung der Proben wird zusätzlich folgendes benötigt:

- Extraktionsapparat nach Soxhlet: Rückflußkühler; Schliffkolben, 250 ml; Heizplatte
- Siedesteine
- Extraktionshülsen aus Filterpapier Nr. 603, 33 x 100 mm (Schleicher & Schuell, Dassel)
- Entfettete Zellstoffwatte
- Faltenfilter Nr. 595 ½, Ø 185 mm (Schleicher & Schuell, Dassel)

3.3.1.3 Chemikalien

Zur Anwendung kommen nur Chemikalien in Analysenqualität (p.a.) und destilliertes Wasser (Aqua dest.):

- Petroleumbenzin, reinst (Merck KGaA, Darmstadt)
- Tris(hydroxymethyl)-aminomethan (Merck[®], Darmstadt)
- Harnstoff für biochemische Zwecke (Merck[®], Darmstadt)
- Salzsäure, 25 % (Merck[®], Darmstadt)
- 2-Mercaptoethanol (Carl Roth GmbH & Co, Karlsruhe)
- SDS, Dodecylhydrogensulfat Natriumsalz, C₁₂H₂₅NaO₄S (Merck[®], Darmstadt)
- Bromphenolblau (Merck[®], Darmstadt)
- Acrylamidstammlösung Rotiphorese Gel 30 (Roth[®], Karlsruhe)
- Ammoniumpersulfat für Elektrophorese (BioRad[®], München)
- Rinderserumalbumin Fraktion V (Merck[®], Darmstadt)
- Tween 20, Polyoxyethylensorbitanmonolaurat für die Molekularbiologie (Merck[®], Darmstadt)

- DAB, 3,3'-Diaminobenzidin-tetrahydrochloriddihydrat (Aldrich Chemical Company, Milwaukee, USA)
- Glycin (Merck[®], Darmstadt)
- Glycerin (Merck[®], Darmstadt)
- Methanol (Merck[®], Darmstadt)
- Natriumchlorid (Merck[®], Darmstadt)
- di-Natriumhydrogenphosphat-Dihydrat, $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 2 \text{H}_2\text{O}$ (Merck[®], Darmstadt)
- Kaliumdihydrogenphosphat, KH_2PO_4 (Merck[®], Darmstadt)
- TEMED, N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin unter Stickstoff für die Elektrophorese (Roth[®], Karlsruhe)
- Wasserstoffperoxid (Merck[®], Darmstadt)
- DTT, 1,4-Dithio-D,L-threitol (Merck[®], Darmstadt)

Zur Immundetektion werden folgende Antikörper und Marker benötigt:

- Marker: Prestained SDS-PAGE Standard Solution (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim)
- NSE-Antigen: Neuronenspezifische Enolase, Rind (Centro-Biochemicals[®], San Diego)
- NSE-Antikörper: monoclonal Mouse Anti-Human Neuron-specific Enolase (NSE), Klon BBS/NC/VI-H14 (Dako Diagnostik GmbH, Hamburg)
- GFAP-Antikörper: monoclonal Mouse Anti-Glial Fibrillary Acidic Protein (GFAP), Klon G-A-5 (Chemicon, Hofheim)
- 2. Antikörper: Biotin-Goat Anti-Mouse IgG (Zymed[®] Laboratories Inc., Berlin)
- Streptavidin Horseradish (HRP) Peroxidase Conjugate (Zymed[®] Laboratories Inc., Berlin)

3.3.1.3.1 Zusammensetzung der Stammlösungen

Im folgenden sind die Mischungsrezepte für alle benötigten Puffer und Lösungen nach ihrem Einsatzgebiet aufgeführt:

SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese

- Trenngel:

8 ml	Trenngelpuffer
10 ml	Acrylamidstammlösung
14 ml	Aqua dest.
120 µl	Ammoniumpersulfat (AP)
30 µl	TEMED

- Sammelgel:

1,65 ml	Sammelgelpuffer
1,238 ml	Acrylamidstammlösung
3,3 ml	AP
413 µl	Aqua dest.
11 µl	TEMED

- Trenngelpuffer:

1,5 M	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan (= 18,17 g)
0,4 %	SDS (= 4 ml 10 %ige SDS-Lösung)
mit Aqua dest. auf 100 ml auffüllen; pH 8,8	

- Sammelgelpuffer:

0,5 M	Tris (= 6,07 g)
0,4 %	SDS (= 4 ml 10 %ige SDS-Lösung)
mit Aqua dest. auf 100 ml auffüllen; pH 6,8	

- Probenpuffer:

200 µl	Mercaptoethanol
200 mg	SDS
200 µl	Glycerin
500 µl	Sammelgelpuffer
1,1 ml	Aqua dest.
einige Körner Bromphenolblau	

- SDS-Laufpuffer:

192 mM	Glycin (= 72 g)
25 mM	Tris (= 15 g)
1 % w/v	SDS (= 5 g = 50 ml 10 %iges)
mit Aqua dest. auf 5 l auffüllen	

Westernblotting und Immundetektion

- Blot-Puffer:

192 mM	Glycin (= 14,4 g)
25 mM	Tris (= 3 g)
in 800 ml Aqua dest. und 200 ml Methanol lösen	

- PBS⁺⁺-Puffer: 0,65 g Rinderserumalbumin
65 ml PBS
65 µl Tween 20
- PBS-Puffer: 123,2 mM NaCl (= 7,2 g); 1 M=58,44 g
15,6 mM di-Natriumhydrogenphosphat-2-hydrat
(= 1,84 g)
3,2 mM Kaliumdihydrogenphosphat (= 0,43 g)
mit Aqua dest. auf 1 l auffüllen; pH 7,4
- DAB-Färbelösung: 3 mg DAB
10 ml PBS
3 µl Wasserstoffperoxid 30 %ig (nach Filtration hinzugeben)

Extraktionsmittel

- Tris-Harnstoff-Puffer: 20 mM Tris (= 0,2422 g/100 ml); 1 M=121,14 g/l
8 M Harnstoff (= 48,048 g/100 ml);
1 M=60,06 g/l
mit Aqua dest. auf 100 ml auffüllen; pH 7,6
- Tris-NaCl-Puffer: 20 mM Tris (= 0,2422 g/100 ml)
4 % NaCl (= 4 g/100 ml)
mit Aqua dest. auf 100 ml auffüllen; pH 7,6
- 5 % 2-Mercaptoethanol + 5 mM DTT (1,4-Dithio-D,L-threitol; 1 M=154,25 g/l)
in Tris-Harnstoff-Puffer ansetzen

3.3.2 Methode

Zum qualitativen Nachweis von zentralem Nervengewebe in Fleischerzeugnissen diente das von LÜCKER und Mitarbeiter (1998) beschriebene immunchemische Verfahren. Der Nachweis erfolgte mittels monoklonaler Antikörper nach SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese und Westernblot. Dabei dienten die neuronenspezifische Enolase (NSE, $\gamma\gamma$ -Enolase, 14-3-2 Protein) und das Saure Gliafaserprotein (glial fibrillary acidic protein, GFAP) als ZNS-spezifische Marker (SCHMECHEL et al., 1978; HEWICKER-TRAUTWEIN et al., 1994).

3.3.2.1 Prinzip

Die neuronenspezifischen Proteine wurden aus dem Probenmaterial mittels eines Extraktionsmittels unter Eiskühlung im Potter nach Elvehjem extrahiert. Nach Filtration und einer weiteren Verdünnung mit Tris-Harnstoff-Puffer und

Probenpuffer (Tabelle 3-16) wurden die Extrakte 2 min im Wasserbad gekocht (LÜCKER et al., 1998). Die elektrophoretische Proteinauftrennung erfolgte anschließend in einer vertikalen Elektrophoresekammer im SDS-Polyacrylamidgel (sodium dodecyl sulfate-Polyacrylamidgel) (LÄMMLI, 1970). Die getrennten Proteinbanden wurden nach dem Prinzip des Westernblottings auf die Oberfläche einer immobilisierenden Polyvinyliden-Membran (PVDF-Membran) transferiert (TOWBIN et al., 1979). Hierzu wurde die Membran und das Gel im Sandwichverfahren (semi-dry) zwischen zwei horizontal angeordneten Elektroden gelegt und eine vorgeschriebene Stromstärke angelegt (WESTERMEIER et al., 1990). Nach dem Abblocken der unbesetzten Bindungsstellen auf der PVDF-Membran mit Rinderserumalbumin-Puffer (PBS++) erfolgte die spezifische Nachweisreaktion mittels monoklonaler Antikörper gegen NSE oder GFAP. Zur Darstellung der immunologischen Bindung diente das Biotin-Streptavidin-System, das gleichzeitig eine Signalverstärkung bewirkte. Abb. 3-2 zeigt den primären Antikörper in Reaktion mit dem biotinylierten sekundären polyvalenten Antikörper (Biotin-Goat-Anti-Maus IgG) in Verbindung mit Streptavidin-Peroxidase (TOWBIN et al., 1979; LÜCKER et al., 1998). Das Protein Streptavidin besteht aus vier Untereinheiten, von denen jede ein Biotinmolekül nicht-kovalent binden kann. Biotin seinerseits hat eine hohe Affinität zu Streptavidin und kann an verschiedene Proteine, wie z.B. Antikörper, gekoppelt werden ohne daß dessen Bindungsfähigkeit beeinträchtigt wird.

Die Anfärbung der neuronenspezifischen Bande erfolgte mit frisch hergestellter Lösung aus DAB (3,3'-Diaminobenzidin-tetrahydrochloriddihydrat) und Wasserstoffperoxid.

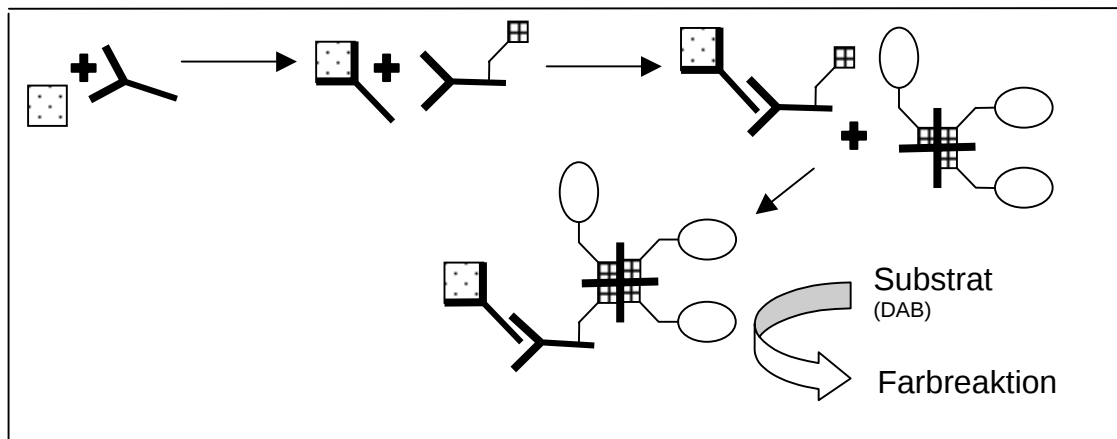


Abb. 3-2 Prinzip der Signalverstärkung durch das Biotin-Streptavidin-System

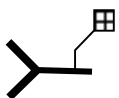
Dabei sind:



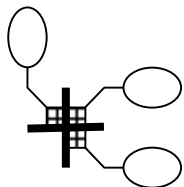
neuronenspezifische Proteine in der Probe



primärer monoklonaler NSE-/ GFAP-Antikörper (Maus)



biotinylierter sekundärer Maus-Antikörper (Zymed®)



Streptavidin-Peroxidase (Zymed®; in enzymkonjugiertem Puffer)

3.3.2.2 Probenvorbereitung

Die Feldproben sowie laborinterne Standards für das immunchemische ZNS-Nachweisverfahren (Kapitel 3.1) wurden entsprechend den Vorschriften für Gesamtcholesterolbestimmung vorbereitet (3.2.2.2).

3.3.2.3 Herstellung der Probenlösung

3.3.2.3.1 Rohwurst

Aus der zu untersuchenden homogenen Probe wurden mehrere Teilmengen aus unterschiedlichen Bereichen bis zu einer Gesamtmenge von 1 g entnommen und in ein 15 ml Potterglas auf 1 mg genau eingewogen. Nach Zugabe von 9 ml eines Extraktionsmittels gemäß Tabelle 3-15 (1:10-Verdünnung) wurde der Ansatz unter Eiskühlung gepottert. Mit dem dazugehörigen Teflonstab wurde die Probe vollständig zerrieben, bis die Flüssigkeit homogen erschien. Die so erhaltene Lösung wurde in Eppendorfgefäße überführt und 10 min bei 14.000 Umdrehungen pro Minute zentrifugiert. Der Überstand wurde durch einen Rundfilter filtriert, so daß man eine klare Probenlösung für den Probenansatz erhielt.

Tabelle 3-15 Extraktionsmittel in Abhängigkeit von der zu untersuchenden Probe (verwendeter Puffer mit X markiert)

Probenmaterial	Tris-NaCl-Puffer	Tris-Harnstoff-Puffer	5 % Mercaptoethanol + 5 mM DTT
Nativ z.B. Rw, native Bw, Organe	X	X	
Erhitzt z.B. Bw, Kw, sonstige Erzeugnisse		X	X

Rw : Rohwurst

Bw : Brühwurst

Kw : Kochwurst

3.3.2.3.2 Brühwurst

Das Vorgehen bei Brühwurstproben entsprach dem beschriebenen Verfahren bei Rohwurst (3.3.2.3.1).

3.3.2.3.3 Kochwurst

Die Herstellung der Probenlösung bei Kochwurstproben, wie Leber-, Blut- und Mettwurst, entsprach dem bereits beschriebenen Verfahren (s. 3.3.2.3.1). Bei Untersuchung sehr fettreicher Fleischerzeugnisse wurde jedoch ein Fettextrak-

tionsverfahren nach Soxhlet vorgeschaltet, um einen möglichen negativen Einfluß des Fettgehaltes auszuschließen.

Fettextraktion

Die Reduktion des Fettgehaltes beruht auf der Vorschrift L 06.00-6 der Amtlichen Sammlung nach § 35 LMBG zur „Bestimmung des Gesamtfettgehaltes in Fleisch und Fleischerzeugnissen“ (ASUV, 1980). Sie wurde lediglich gemäß den Anforderungen an die Probenmatrix abgeändert. Es wurden 10 g des zu untersuchenden fein zerkleinerten Materials in einen Faltenfilter (Ø 185 mm) eingewogen. Der Filter wurde in eine Extraktionshülse aus Filterpapier gegeben und mit Watte verschlossen. In einen 250 ml Schliffkolben wurden einige Siedesteinchen gegeben; die Hülse wurde in den Extraktionsapparat nach Soxhlet eingesetzt und mit ca. 200 ml reinem Petroleumbenzin übergossen. Anschließend wurde die Probe zur Fettextraktion auf der Heizplatte unter Rückflußkühlung 6 h erhitzt. Danach wurde das Extraktionsmittel abdestilliert und die entfettete Probe im Filter bei Zimmertemperatur getrocknet. Das fein zerkleinerte Untersuchungsmaterial wurde zur Herstellung der Probenlösung (s. 3.3.2.3) eingesetzt.

3.3.2.3.4 Sonstige Erzeugnisse und Organe

Das Vorgehen bei Erzeugnissen aus zerkleinertem Fleisch und andere Lebensmittel sowie bei Organmaterial entsprach dem beschriebenen Verfahren bei Rohwurst (3.3.2.3.1).

3.3.2.4 Herstellung des Probenansatzes

Die erhaltenen Probenextrakte wurden gemäß Pipettierschema aus Tabelle 3-16 verdünnt. Dabei wurde die mit Tris-Harnstoff-Puffer 1:10 verdünnte Lösung mit Probenpuffer (Tris-SDS-Mercaptoethanol-Harnstoffpuffer) im Verhältnis 4:1 gemischt.

Tabelle 3-16 Pipettierschema für den Probenansatz

In Reaktionsgefäß mit Sicherheitsverschluß pipettieren	Menge	Verdünnung
klarer Proteinextrakt	15 µl	1:10
Tris-Harnstoff-Puffer	135 µl	
Probenpuffer	50 µl	4:1
Inhalt des Reaktionsgefäßes gut mischen		

Der Probenansatz wurde im Wasserbad 2 min erhitzt. Die Verdünnung sollte in Eppendorf-Reaktionsgefäßen mit Sicherheitsverschluß angesetzt werden, um ein Öffnen des Deckels während des Kochvorgangs zu vermeiden.

3.3.2.5 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)

Das frisch angesetzte Trenngel wurde in die vorher zusammengebaute Gießvorrichtung luftblasenfrei eingegossen und mit destilliertem Wasser überschichtet, um ein Austrocknen zu verhindern. Nach ca. 30 min war das Gel vollständig polymerisiert. Nach vorsichtigem Entfernen des Wassers mit einer Hamilton-Pipette wurde der Probenkamm (20 bzw. 24 Geltaschen) in die Gießvorrichtung eingesetzt und das frisch hergestellte Sammelgel luftblasenfrei dazugegeben. Nach Auspolymerisation (ca. 10 min) wurde der Kamm sowie überschüssiges Gel und Flüssigkeitsrückstände aus den Geltaschen entfernt. Anschließend wurde die Gießvorrichtung in die obere Elektrophoresekammer (Bio-rad®) eingebaut und die Geltaschen mit SDS-Laufpuffer aufgefüllt. Je nach Dicke des Gels und Kammgröße wurde der vorbereitete Probenansatz mit einer Hamilton-Pipette in die Geltaschen pipettiert. Bei einem 20er Probenkamm und einer Geldicke von 1,5 mm entspricht dies 100 µl Probenansatz. Vor dem Auftragen wurde der Ansatz mit der Pipette kurz durchmischt.

Zur Kontrolle des Ergebnisses liefen pro Gel Proteinmarker (20 µl), NSE-Antigen (10 µl der 1:200-Verdünnungsstufe), Rinderhirn 100 % (10 µl) oder laborinterne Wurststandards mit bekanntem Hirnanteil (i.d.R. 1 %) mit.

Die obere Elektrophoresekammer wurde in die untere eingesetzt, mit ca. 1,8 l SDS-Laufpuffer aufgefüllt, verschlossen und an das Netzgerät angeschlossen (Abb. 3-3) Die Proteinauftrennung dauert mindestens 12 - 14 h bei einer Stromstärke von 9,5 mA/Gel. Am Ende des Laufes sollte die blau gefärbte Laufmittelfront am unteren Ende des Gels zu erkennen sein.



Abb. 3-3 BioRad® Protean II-Elektrophoresekammer mit Power Supply

3.3.2.6 Westernblot

Die nachzuweisenden NSE- bzw. GFAP-Proteinbanden lagen erfahrungsgemäß in der Mitte des Trenngels, so daß hier ein Teilstück mit einer Größe von 16 cm x 6,5 cm für die Weiterverarbeitung im Westernblotverfahren herausgeschnitten wurde. Außerdem wurden 6 - 8 Blotfilterpapiere sowie die Immobilon-Membran (Roth®, Karlsruhe) entsprechend der Gelgröße zugeschnitten. Die Membran wurde vorab ca. 5 min in reinem Methanol und anschließend mit den Filterpapieren und dem Gel im Blotpuffer (Tris-Glycerin-Puffer) 15 min in einer Glasschale benetzt. Das Blot-Sandwich, bestehend aus 3 - 4 Filterpapieren, Immobilon-Membran, SDS-Polyacrylamidgel und abschließenden 3 - 4 Filterpapieren, wurde luftblasenfrei und paßgenau auf die untere, mit Blotpuffer angefeuchtete, Platinelektrode des Blotgerätes gelegt. Nach Schließen der Blot-

kammer (Abb. 3-4) wurde eine Stromstärke von $1,25 \text{ mA/cm}^2$ pro Stunde eingestellt.

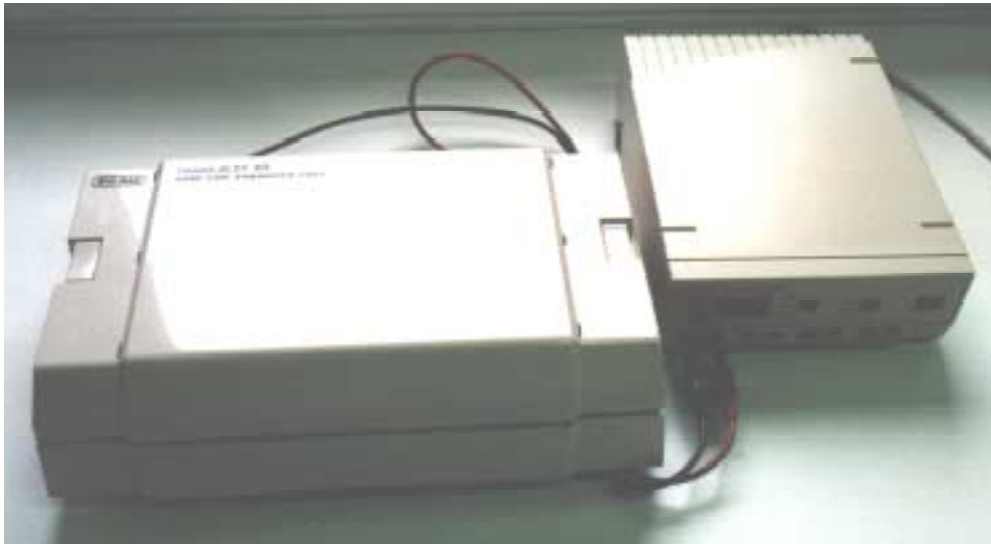


Abb. 3-4 Trans-Blot[®] SD Semi Dry Transfer Cell mit Power Pac 200

3.3.2.7 Immunreaktion

In einer Glasschale mit 20 ml PBS⁺⁺-Puffer (Serumalbuminpuffer) wurde die 16 cm x 6,5 cm große Immobilon-Membran 1 h geschwenkt, um die unbesetzten Bindungsstellen auf der Membran abzublocken. Dabei ist darauf zu achten, daß die Membran vollständig mit Flüssigkeit bedeckt ist und die anhaftenden Proteinbanden nach oben zeigen, um ein Abrieb während des Schwenkvorganges zu verhindern. Anschließend wurde monoklonaler Antikörper gegen NSE (DAKO[®]) bzw. GFAP (Chemicon[®]) im Verhältnis 1:2000 (also 10 µl) hinzugegeben und die mit Parafilm abgedeckte Schale mind. 12 h bzw. über Nacht geschwenkt. Danach wurde die Membran dreimal mit PBS-Puffer für jeweils 15 min unter Schwenken gewaschen und mit dem sekundären Biotin-Goat-Anti-Maus IgG (Zymed[®]) in PBS⁺⁺ im Verhältnis 1:2000 für 1 h überschichtet. Nach Wiederholung des Waschvorganges wurde enzymkonjugierte Streptavidin-Peroxidase (Zymed[®]; 1:2000 in PBS⁺⁺) hinzugegeben. Nach einer weiteren Inkubationszeit von 60 min wurde nochmals dreimal gewaschen, bevor die frisch angesetzte DAB-Färbelösung über die Membran gegeben und die Proteinbanden unter Sichtkontrolle 5 – 10 min braun angefärbt wurden.

Abschließend wurde die Membran mit reichlich destilliertem Wasser gewaschen.

3.3.2.8 Auswertung

Die Auswertung der NSE- sowie der GFAP-Immunbanden erfolgte rein optisch. Hierzu wurden die zwischen Zellstofftüchern getrockneten Westernblots zunächst auf das Vorhandensein von Immunbanden beurteilt. Als positiv für den Nachweis von ZNS wurden die Proben eingestuft, deren Immunbanden auf der gleichen Höhe wie die mitgeführten Standards lagen. Anschließend wurde die Ausprägung (Farbe, Größe) dieser Banden qualitativ vier verschiedenen Intensitätsabstufungen zugeordnet: schwach, gut sichtbar und stark bis sehr stark. Als Vergleich diente der 1 %ige native Brühwurststandard auf demselben Immunblot – mit „+“ („gut sichtbar“) beurteilt – sowie natives Rinderhirn, dessen Reaktion als „++++“ eingestuft wurde. Immunbanden, die eine mit dem 1 %igen Referenzmaterial vergleichbare Reaktion zeigten, wurden mit „+“ beurteilt. Dagegen wiesen „schwache“ Reaktionen – mit „(+“ beurteilt – eine im Originalblot geringere bzw. eine gerade noch erkennbare Bande auf. Diese schwachen Banden sind in den dargestellten Immunblots dieser Arbeit meist nicht zu erkennen. Proben, die im Westernblot eine dunklere und/oder etwas größer erscheinende Immunbande zeigten, wurden je nach Ausprägung mit „stark“ („++“) oder „sehr stark“ („+++“) beurteilt.

Neben der visuellen Beurteilung der Immunblots wurde die Densitometrie zur Quantifizierung der Bandenintensitäten herangezogen. Hierzu wurden die gefärbten Blots digitalisiert (Microtek, Scanmaker II, 300dpi) und mittels eines Computerprogramms (Scion Image, Release Beta 3b, Scion Corp., Maryland) densitometrisch ausgewertet.

Von jeder Einzelbande wurden zwischen vier und sechs Messungen erfaßt, die mittels statistischer Funktionen ausgewertet wurden (Microsoft, Excel 97). Neben arithmetischen Mittelwerten wurden Standardabweichungen ermittelt. Um Schwankungen zwischen verschiedenen Westernblots auszugleichen, wurden

die derart integrierten Flächenwerte auf die betreffenden Flächenwerte eines Standards bezogen.

Zur Bestimmung der Nachweisgrenze des immunchemischen ZNS-Nachweisverfahrens wurden die laborintern sowie extern hergestellten Standards herangezogen. Als Grenze diente die kleinste Hirnmenge in einer Fleischerzeugnisgruppe, die im Westernblot eine reproduzierbare, schwach erkennbare Immunreaktion zeigte.

3.3.3 Maximierung der immunchemischen Aktivität

Zur Erhöhung der Sensitivität des NSE- sowie des GFAP-Nachweises wurde zum einen das Extraktionsmittel optimiert, um eine Steigerung der Extraktionsrate zu erzielen. Zum anderen wurde eine Konzentrierung des Extraktes mittels Mikrokonzentratoren angestrebt.

3.3.3.1 Optimierung des Extraktionsmittels

Es wurden verschiedene Chemikalien als Zusätze zur konventionellen Tris-Harnstoff-Extraktion überprüft. Hierbei handelte es sich um CHAPS (1 M), Acetat (0,2 M; pH 3,4 bzw. 8,2), L-Ascorbinsäure (5 mM), DTT (1,4-Dithio-D,L-threitol; 1, 2 und 5 mM), NaCl (4 %) sowie 2-Mercaptoethanol (1-10 %ig, v/v). Weiter wurden Versuche mit 2-Mercaptoethanol in Verbindung mit L-Ascorbinsäure (5 mM) bzw. DTT (1, 2, 5 mM) und Formamid (1 %, 2 %) durchgeführt.

3.3.3.2 Konzentrierung der Extrakte

3.3.3.2.1 Materialien

Zur Extraktkonzentrierung wurden neben herkömmlichem Labormaterial zusätzlich folgende Verbrauchsmaterialien verwendet:

- Microcon-Mikrokonzentrator; Trenngrenze 50, 30 und 10 kDa (amicon GmbH, Witten)

3.3.3.2.2 Prinzip

Mit Hilfe von Mikrokonzentratoren können Proteinproben aufkonzentriert werden. Hierzu wurde die Probenflüssigkeit mittels Zentrifugalkraft durch eine niedrigadsorbierende Membran gedrückt. Gelöste Substanzen, deren Molekulargewicht größer als die nominelle Trenngrenze der Ultrafiltrationsmembran war, wurden zurückgehalten. Hingegen konnten kleinere Moleküle ungehindert die Membran passieren. Die Trenngrenze der Membran sollte deshalb etwa dem halben Molekulargewicht des aufzukonzentrierenden Proteins entsprechen (ANONYM, 1995b). Die gesuchten Proteine können dann als Retentat gewonnen werden.

3.3.3.2.3 Durchführung der Mikrokonzentration

Insgesamt wurden 38 Proteinextrakte von Standard- sowie Feldproben aufkonzentriert und anschließend immunchemisch untersucht. Hierzu wurde das Probenreservoir mit 0,5 ml des filtrierte Extraktes gefüllt und in ein Eppendorfgefäß eingesetzt. Anschließend wurde dieses System bei 13.000 Umdrehungen pro Minute 30 min in einer Eppendorfsentrifuge zentrifugiert. Die Trenngrenzen der Filtermembranen wurden mit 50, 30 und 10 kDa gewählt, da das Molekulargewicht einer γ -Untereinheit der NSE mit ca. 46 kDa angegeben wird (SHIMIZU et al., 1983). Die untersuchten Probenextrakte teilten sich folgendermaßen auf die Trenngrenzen auf: eine Probe wurde durch die Membran mit 50 kDa Porengröße filtrierte; 10 Proben durch die 30 kDa-Filtermembran und 27 Probenextrakte durch das Microcon-System mit einer Trenngrenze von 10 kDa. Das Retentat, das sich oberhalb der Membran im Probenreservoir sammelte, wurde durch kurzes Zentrifugieren des umgedrehten Probenreservoirs in ein neues Eppendorfgefäß gewonnen (ANONYM, 1995b) und entsprechend Kapitel 3.3 immunchemisch untersucht.

3.3.3.2.4 Auswertung

Die Menge des erhaltenen Retentates sowie des Filtrates, das im Anschluß verworfen wurde, wurde bestimmt. Das Verhältnis der Retentatmenge bezogen auf die eingesetzte Probenmenge, die bei 0,5 ml lag, beschreibt die Konzentrierung der Proteine im Extrakt.

3.4 Reduktion der immunchemischen NSE-Aktivität durch Erhitzen

Um den Einfluß der Temperatur und der Erhitzungsdauer auf die immunchemische Reaktion der neuronenspezifischen Enolase (NSE) während der Wurstherstellung festzustellen, wurden laborinterne native Brüh- und Kochwurststandards im Wasserbad in definierten Zeitabständen sowie definierter Temperatur erhitzt. Anschließend wurden diese Proben immunchemisch auf NSE-Banden untersucht.

3.4.1 Materialien

Für den Erhitzungsversuch werden neben herkömmlichem Labormaterial zusätzlich folgende Geräte und Verbrauchsmaterialien benötigt:

3.4.1.1 Geräte

- Wasserbad (Memmert GmbH, Gießen)
- Waage (Mettler GmbH, Gießen)
- Vakuum-Verschweißgerät (Petra electric)
- Elektronisches Thermometer (pH 320; WTW GmbH, Weilheim)

3.4.1.2 Material

- Handelsübliche Gefrierbeutel (Melitta Haushaltsprodukte GmbH & Co.KG, Minden)
- Native Brühwurststandards mit 1 %, 5 % sowie 10 % Rinderhirn (Kap. 3.1.1.3)
- Native Kochwurststandards mit 10 % Rinderhirn (Kap. 3.1.1.4)

3.4.2 Methode

3.4.2.1 Probenvorbereitung

Wurstbrät mit einem Rinderhirnanteil von 1 %, 5 % und 10 % wurde in kleinen Portionen (1,1 – 2 g) in handelsübliche Gefrierbeutel wasserdicht eingeschweißt. Pro Zeitabschnitt und Temperatur wurden jeweils zwei Probenpäckchen vorbereitet. Die Dicke der gefüllten Beutel lag zwischen 0,6 mm und

1,7 mm. In Abb. 3-5 ist die Häufigkeitsverteilung der Beuteldicke zu erkennen. Die mediane Beuteldicke des Kochwurststandards (Kw 10 %) lag bei 1,2 mm ebenso wie bei den 1 %igen Brühwurstproben. Die Brühwurststandards mit einem Hirnanteil von 10 % (Bw 10 %) wiesen eine Verteilungshäufigkeit bei 1,0 mm Beuteldicke auf. Die Probenpäckchen der Brühwurstproben mit 5 % Rinderhirn hatten eine mediane Dicke von 1,3 mm. Die Standardabweichung zwischen den Referenzmaterialien lag bei 0,1 mm. Innerhalb einzelner Referenzmaterialgruppen wies die Beuteldicke eine Standardabweichung von 0,1 bis 0,2 mm auf.

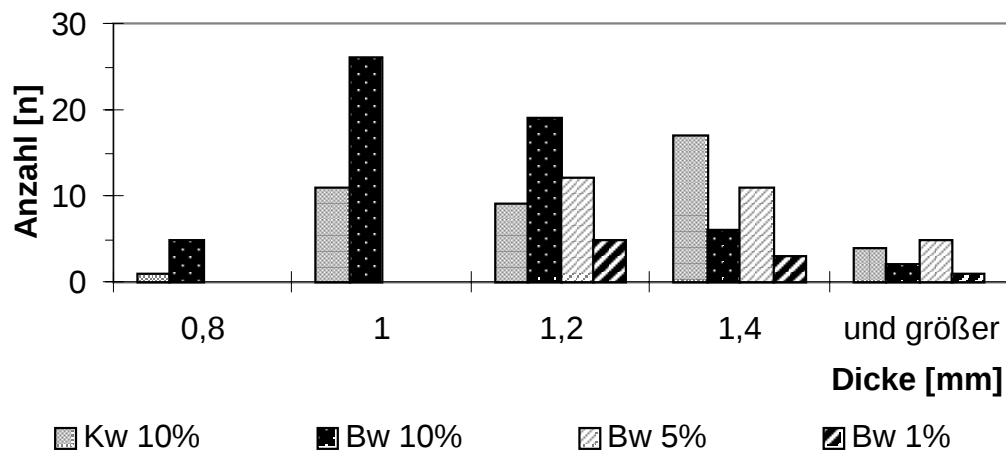


Abb. 3-5 Häufigkeitsverteilung der Dicke der gefüllten Beutel

3.4.2.2 Erhitzung

Das Wasserbad wurde auf 80 °C, 95 °C bzw. 100 °C erhitzt. Anschließend wurden die Beutel mit Brät so unter Wasser gebracht, daß sie allseitig umspült wurden. Die Erhitzungsdauer wurde mittels Stoppuhr überprüft und die einzelnen Beutel nach einer definierten Zeitspanne herausgenommen und sofort mit kaltem Wasser abgekühlt.

Die so erhitzten Proben wurden gemäß der Herstellung der Probenlösung für das immunchemische Nachweisverfahren (3.3.2.3) weiterverarbeitet und untersucht.

3.4.2.2.1 Bestimmung der Kerntemperatur

Zur Bestimmung der Kerntemperatur im Brät in Abhängigkeit der Erhitzungsdauer wurde die Sondenspitze eines geeichten elektronischen Thermometers in einen mit Brät gefüllten Beutel verpackt. Das System wurde so präpariert, daß die Thermometerspitze allseitig von ca. 0,5 - 1 mm Brät umgeben war und der Beutel nach oben luftdicht abschloß.

Nach Erreichen der Wassertemperatur von 80 °C wurde die Kerntemperatur des Brätes mit Hilfe des Thermometer-Beutel-Systems in Abständen von 1 min abgelesen. Abb. 3-6 zeigt den Verlauf der Kerntemperatur innerhalb einer Spanne von 10 min bei einer Wassertemperatur von 80 °C. Bereits nach 1 min nahm das Brät mit einer maximalen Dicke von 1 mm die Wassertemperatur an.

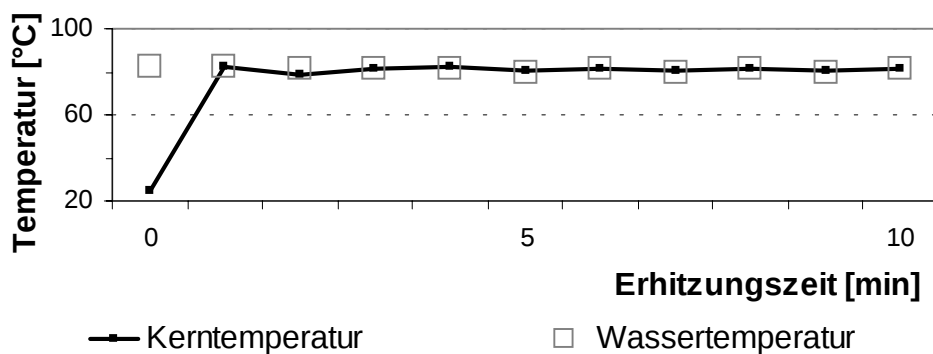


Abb. 3-6 Messung der Kerntemperatur im Brät bei 80 °C Wassertemperatur

4 Ergebnisse

4.1 Enzymatische Gesamtcholesterolbestimmung

In diesem Abschnitt werden die Ergebnisse der enzymatischen Gesamtcholesterolbestimmung dargestellt. Zur Veranschaulichung wurden die Daten ergänzend in Tabellen und Diagrammen verarbeitet. Die Berechnung der Gesamtcholesterolgehalte, angegeben in mg pro 100g Frischsubstanz (mg/100 g FS), und die statistische Auswertung mit Bestimmung des Cutoff-Points erfolgten entsprechend den Kapiteln 3.2.2.5 und 3.2.2.6.

4.1.1 Laborinterne Standards

Statistisch ausgewertet wurden verschiedene Wurstarten, die als laborinterne Standards für die Cholesterolbestimmung und für das immunchemische ZNS-Nachweisverfahren dienten.

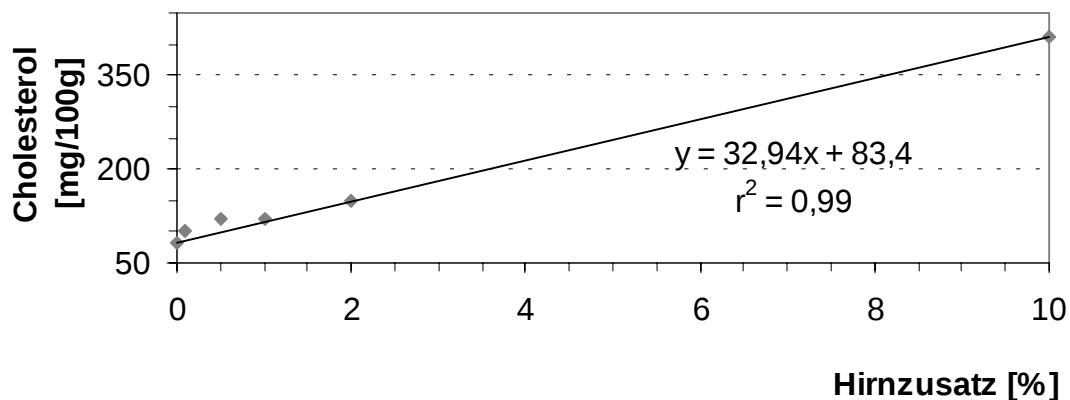
4.1.1.1 Rohwurststandard

Der Cholesterolgehalt von Rohwurst mit einem Hirnanteil von 0 % bis 10 % wurde gemessen und ausgewertet. Der Mittelwert des Cholesterolgehaltes der Probe ohne Hirnzusatz lag bei 83,4 mg/100 g FS mit einer Standardabweichung von 8,3 mg/100 g FS. Bereits bei einem Hirnanteil von 0,1 % Hirn in der Probe erhöhte sich der Gehalt um ca. 20 mg Cholesterol/100 g FS. Zwischen den mittleren Cholesterolgehalten bei 0,5 % und 1 % Hirnanteil war nur eine geringe Zunahme von 119 mg auf 121 mg/100 g FS festzustellen. Bei einem Hirngehalt von 10 % in der Rohwurst wurde der Ausgangswert um das fünffache auf 411 mg Chol./100 g FS erhöht. In Tabelle 4-1 sind die Werte detailliert aufgeführt.

Tabelle 4-1 Gesamtcholesterolgehalte des Rohwurststandards (Rw)

Probe	Gesamtcholesterol [mg/100 g FS]			Statistische Parameter	
	n1	n2	n3	$\bar{x}$	sd
Rw 0,0 %	86,62	73,97	89,58	83,4	8,3
Rw 0,1 %	88,88	100,96	118,03	102,6	14,7
Rw 0,5 %	133,67	101,67	122,29	119,2	16,2
Rw 1,0 %	116,60	124,43	123,06	121,4	4,2
Rw 2,0 %	151,44	136,46	163,53	150,5	13,6
Rw 10,0 %	403,14	413,09	416,65	411,0	7,0

Die graphische Darstellung (Abb. 4-1) stellt den linearen Zusammenhang zwischen der Zunahme des Hirngehaltes in der Probe und der Erhöhung des Cholesterolgehaltes dar. Die lineare Regressionsgerade zeigt, bei einem Bestimmtheitsmaß von $r^2=0,99$, daß der Cholesterolgehalt der Probe pro 1 % Hirngehalt um ca. 33 mg/100 g FS ansteigt.

**Abb. 4-1** Graphische Darstellung der Mittelwerte sowie der linearen Regressionsgeraden des laborinternen Rohwurststandards

4.1.1.2 Brühwurststandard

Im folgenden sind die ermittelten Gesamtcholesterolgehalte des nativen sowie des erhitzten Brühwurststandards mit definierten Hirnmengen dargestellt (Tabelle 4-2 und Tabelle 4-3).

Nativer Standard

Die mittleren Cholesterolgehalte des nativen Brühwurststandards lagen in einem Bereich von 64 mg/100 g FS (ohne Hirnzusatz) bis 750 mg/100 g FS bei einem Gehalt von 32 % Hirn in der Probe (Tabelle 4-2). Allerdings lagen die Cholesterolgehalte der Standards mit 0,1 % sowie 0,25 % Hirn mit 61 mg bzw. 63 mg Cholesterol/100 g FS unter dem berechneten Mittelwert des Nullstandards. Die Mittelwerte zeigten, daß mit Zunahme des Hirngehaltes der Gesamtcholesterolgehalt anstieg. So war bei einem Referenzmaterial mit Zusatz von 2 % Hirn eine Zunahme um mehr als 50 % des Cholesterolgehaltes des Nullstandards festzustellen. Bei einem Hirnanteil von 8 % in der Probe erhöhte sich der Wert des Nullstandards um den Faktor 4 auf 270 mg/100 g FS.

Tabelle 4-2 Gesamtcholesterolgehalte des nativen Brühwurststandards (Bw)

Probe	Gesamtcholesterol [mg/100 g FS]				Statistische Parameter	
	n1	n2	n3	n4	$\bar{x}$	sd
Bw 0,0 %	52,00	75,80			63,9	16,8
Bw 0,1 %	61,15				61,5	-
Bw 0,25 %	68,97	57,59			63,3	8,0
Bw 0,5 %	85,32	81,05			83,2	3,0
Bw 1,0 %	70,00	83,90	91,72		81,9	11,0
Bw 2,0 %	108,00	101,67	111,63		107,1	5,0
Bw 4,0 %	143,00	151,80	140,07	155,71	147,6	7,3
Bw 8,0 %	261,00	279,10			270,1	12,8
Bw 16,0 %	452,00	430,90			441,5	14,9
Bw 32,0 %	750,00	749,00			749,8	0,4

Erhitzter Standard

In Tabelle 4-3 sind die analytisch ermittelten Cholesterolwerte des erhitzten Brühwurststandards den berechneten Werten gegenübergestellt. Die ermittelten Gehalte lagen bei den Proben mit einem Hirnanteil von 0,2 % bis 32 % in einem Bereich von 76 mg bis 737 mg Chol./100 g FS. Diese Werte waren mit den

zuvor dargestellten Werten des nicht erhitzten Standards vergleichbar. So wies der erhitzte Standard mit 1 % Hirnanteil einen Cholesterolgehalt von 85 mg auf, der entsprechende native Standard lag mit 82 mg Chol./100 g FS etwas niedriger. Erhitztes Referenzmaterial mit einem Hirnanteil von 4 % zeigte einen Cholesterolgehalt von 151 mg/100 g FS, dagegen wies der native Standard mit demselben Hirngehalt einen mittleren Cholesterolwert von 148 mg/100 g FS auf.

Die analytisch gemessenen Gesamtcholesterolgehalte wichen außerdem leicht von den nach der Gleichung 3-6 (Kap. 3.2.2.6.2) berechneten Cholesterolgehalten des erhitzten Brühwurststandards ab (Tabelle 4-3). Dabei lagen die ermittelten Cholesterolgehalte meist über den berechneten Ergebnissen. Eine Ausnahme bildete jedoch die Probe mit einem Hirnanteil von 2 %. Diese wies einen Wert von 90 mg Chol./100 g auf und lag somit um ca. 9 mg Cholesterol unter dem berechneten Gehalt.

Tabelle 4-3 Analytisch ermittelte und berechnete Gesamtcholesterolgehalte des erhitzten Brühwurststandards

Probe	n	Ermitteltes Cholesterol [mg/100 g FS]	Errechnetes Cholesterol [mg/100 g FS]
Bw 0,2 %	1	76,1	63,9
Bw 1,0 %	1	85,3	79,4
Bw 2,0 %	1	90,3	98,8
Bw 4,0 %	1	150,7	137,6
Bw 8,0 %	1	265,9	215,2
Bw 16,0 %	1	380,4	370,4
Bw 32,0 %	1	737,3	680,8

Graphische Darstellung des nativen sowie des erhitzten Standards

Der Vergleich der enzymatisch bestimmten Cholesterolwerte des erhitzten bzw. nicht erhitzten Brühwurststandards wird in Abb. 4-2 dargestellt. Hierbei zeigte sich, daß sich die mittleren Cholesterolwerte der Standards mit Zusatz von 1 %, 4 % und 8 % Hirn überschneiden. Die Übereinstimmung der Werte war auch

beim Vergleich der linearen Regressionsgeraden festzustellen. Graphisch dargestellt wurde die Gerade für den nativen Standard ($y = 22,04x + 63,9$; $r^2 = 0,996$). Die Geradengleichung der erhitzten Brühwurst-Werte unterschied sich im Nullpunkt, der bei 66,9 mg/100 g lag, sowie in einer etwas geringeren Steigung und lautet: $y = 20,9x + 66,9$ bei einem Bestimmtheitsmaß von $r^2 = 0,995$. Unter Berücksichtigung beider Gleichungen steigt der Gesamtcholesterolgehalt des Brühwurststandards somit um etwa 21 mg/100 g FS pro 1 % Hirngehalt in der Probe an.

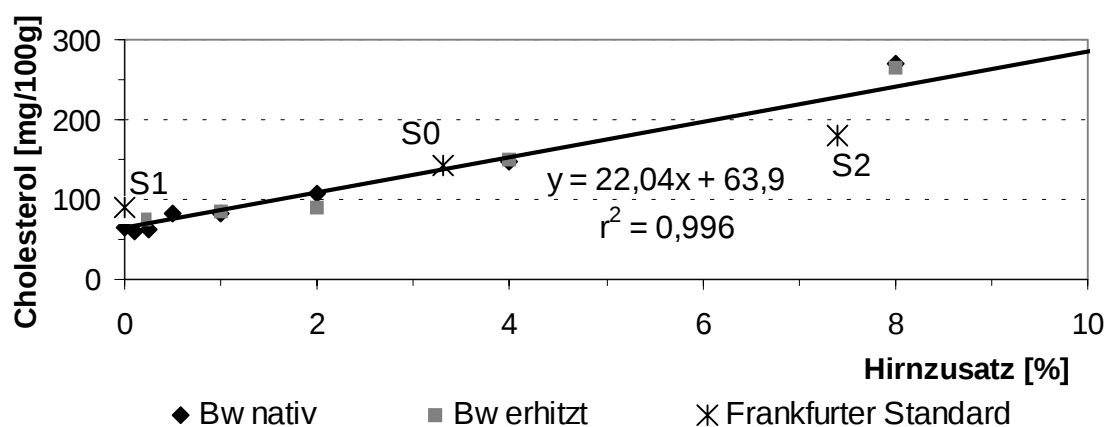


Abb. 4-2 Graphische Darstellung der mittleren Cholesterolgehalte des nativen und des erhitzten Brühwurstsstandards (Bw) und des Frankfurter Referenzmaterials (S0, S1 und S2) sowie der linearen Regressionsgeraden des nativen Standards

Die Cholesterolwerte der externen Frankfurter Brühwurstproben S0 bis S2 (s. Kap. 4.1.2.2) sind ebenfalls in Abb. 4-2 graphisch dargestellt.

4.1.1.3 Kochwurststandard

Erhitzter Standard für die Cholesterolbestimmung

Der Gesamtcholesterolgehalt des Kochwurststandards mit 15 % Leberanteil wurde an 44 Meßtagen enzymatisch mitbestimmt. Die Einzelwerte lagen hierbei zwischen 80,3 mg bis 119,5 mg Cholesterol/100 g FS. Der arithmetische Mittelwert aller 44 Messungen wurde mit 96,8 mg Cholesterol/100 g FS berechnet.

Der dazugehörige Median befand sich mit 95,6 mg dicht daneben. Die relative Standardabweichung betrug 9,2 % und deutet somit nicht auf große Abweichungen der Werte hin.

Aus der graphischen Darstellung (Abb. 4-3) sind sowohl die Einzelwerte von 44 Messungen als auch der Verlauf der Mittelwerte erkennbar. 32 der 44 Cholesterolverechnungen lagen um den Gesamtmittelwert $\pm$ Standardabweichung ($96,8 \text{ mg} \pm 8,9 \text{ mg Chol./100 g FS}$). Dies ist auch anhand der eingezeichneten Mittelwerte erkennbar, die in einem Bereich zwischen $94,3 \text{ mg}$ und $102,4 \text{ mg Chol./100 g FS}$ schwankten. Dagegen wiesen sieben sowie fünf Meßwerte Cholesterolgehalte auf, die kleiner bzw. größer als der Gesamtmittelwert mit $98,8 \pm 8,9 \text{ mg/100 g}$ waren. Diese Abweichungen lassen sich durch tagesbedingte Meßschwankungen erklären.

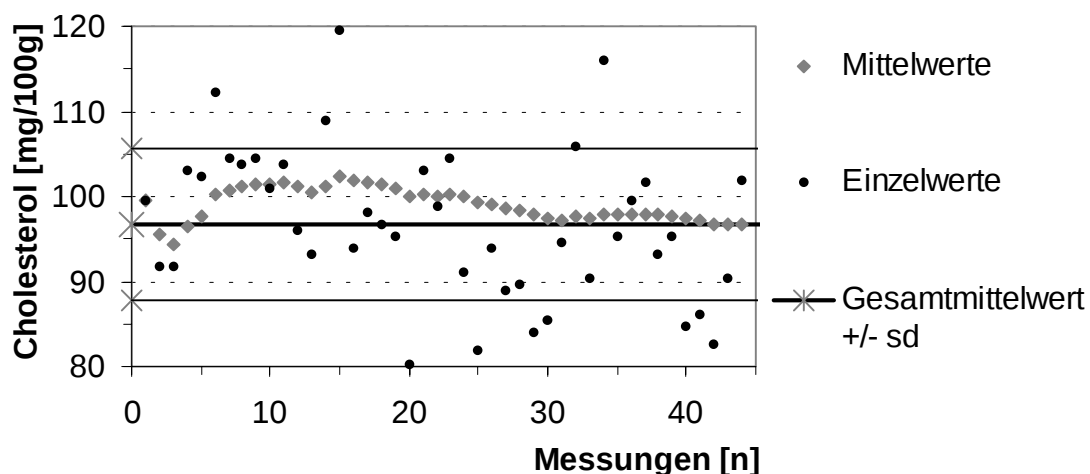


Abb. 4-3 Graphische Darstellung der Einzelwerte sowie des Gesamtmittelwertes mit Standardabweichung des „Cholesterols“

Erhitzter Standard für das immunchemische Nachweisverfahren

Es wurden die Gesamtcholesterolgehalte zweier Kochwurststandards mit einem Leberanteil von 16 % bzw. 32 % und Hirngehalten zwischen 0 % und 16 % enzymatisch bestimmt und ausgewertet.

Kochwurststandard mit 16 % Leberanteil

In Tabelle 4-4 sind die ermittelten Werte für die Kochwurst mit 16 % Leber im Vergleich zu den berechneten Cholesterolverten dargestellt. Die gemessenen Gehalte lagen im Bereich von 98 mg (ohne Hirnzusatz) und 487 mg/100 g FS (Kw mit 16 % Hirn). Mit Zunahme des Hirngehaltes im Standard stieg der Cholesterolgehalt an. Ausnahmen waren jedoch die Werte der Proben, die mit 0,25 % und 0,5 % Hirn hergestellt wurden, da sie bis zu 50 mg unter dem Wert des Nullstandards lagen. Der Zusatz von 4 % Hirn im Kochwurststandard hatte eine Erhöhung um den Faktor 2 auf 175 mg/100 g zur Folge. Eine weitere Zunahme des Hirngehaltes um 4 % steigerte den Cholesterolgehalt nochmals um 106 mg/100 g FS.

Die gemessenen Cholesterolverte lagen ab dem Referenzmaterial mit 2 % Hirnanteil über den mit der Gleichung 3-6 (Kap. 3.2.2.6.2) berechneten Cholesterolgehalten. Bei dem Kochwurststandard mit 2 % Hirn bedeutete das einen um 8 mg Cholesterol höheren Wert als im Vergleich zum berechneten Wert von 131 mg/100 g FS.

Tabelle 4-4 Analytisch ermittelte und berechnete Gesamtcholesterolgehalte des Kochwurststandards (Kw) mit 16 % Leberanteil

Probe	n	Ermitteltes Cholesterol [mg/100 g FS]	Errechnetes Cholesterol [mg/100 g FS]
Kw 0,0 %	2	98,6	92,2
Kw 0,25 %	1	35,6	97,0
Kw 0,5 %	1	52,6	101,9
Kw 1,0 %	1	101,7	111,6
Kw 2,0 %	1	137,9	131,0
Kw 4,0 %	2	175,1	169,8
Kw 8,0 %	1	281,6	247,4
Kw 16,0 %	1	487,0	402,6

Kochwurststandard mit 32 % Leberanteil

Die Gesamtcholesterolgehalte des Kochwurststandards mit 32 % Leberanteil (Tabelle 4-5) lagen bereits mit ihrem Ausgangswert ohne Hirnzusatz mit 146 mg/100 g um 47 mg höher als der Nullwert bei den Proben mit 16 % Lebergehalt (Tabelle 4-4). Bei Zunahme des Hirngehaltes im Referenzmaterial war hier ebenfalls eine Erhöhung des Cholesterolgehaltes zu erkennen. So stieg bei einer Probe mit 4 % Hirnanteil der Ausgangsgehalt um 50 % auf 223 mg Chol./100 g FS an. Auffallend ist, daß der ermittelte Cholesterolgehalt für den Kochwurststandard mit 1 % Hirnzusatz um 5 mg Cholesterol unterhalb dem Cholesterolgehalt des Nullstandards lag. Das Referenzmaterial mit einem Zusatz von 0,25 % Hirn wies mit 166 mg/100 g einen Cholesterolgehalt auf, der etwas über dem Gehalt des Standards mit 0,5 % Hirn lag.

Im Vergleich mit den berechneten Cholesterolgehalten lagen die enzymatisch ermittelten Werte des Kochwurststandards mit einem Leberanteil von 32 % höher. So wies die Probe mit einem Hirngehalt von 4 % einen Cholesterolgehalt auf, der um 20 mg höher als der errechnete von 202 mg/100 g FS lag.

Die graphische Darstellung der Meßergebnisse in Abb. 4-4 zeigte, daß die Regressionsgeraden beider Kochwurststandards nahezu parallel verlaufen. Die Geraden wurden durch folgende Gleichungen dargestellt: $y = 23,52x + 98,6$ und einem Bestimmtheitsmaß von $r^2 = 0,94$ bei einem Leberanteil von 16 % im Referenzmaterial; sowie $y = 20,84x + 145,8$ mit $r^2 = 0,99$ für Proben mit 32 % Lebergehalt. Das bedeutet, daß die Gerade für das Referenzmaterial mit 16 % Leber pro Prozent zugesetztem Hirn um ca. 2,7 mg Cholesterol schneller anstieg als bei dem Standard mit 32 % Leberanteil. Außerdem erkennt man, daß der Cholesterolgehalt deutlicher auf den Hirngehalt im Kochwurststandard reagierte als auf den Lebergehalt. So wirkte sich eine Erhöhung des Leberanteils von 16 % auf 32 % durch einen Anstieg des Cholesterolgehaltes um 47 mg/100 g FS auf 145,8 mg/100 g FS aus. Dagegen wiesen die Standards, die mit 16 % Hirnzusatz hergestellt wurden, einen Cholesterolgehalt auf, der bei

480 mg/100 g FS (bei Kw mit 32 % Leber) bzw. bei 475 mg/100 g FS (bei Kw mit 16 % Leber) lag.

Tabelle 4-5 Analytisch ermittelte und berechnete Gesamtcholesterolgehalte des Kochwurststandards mit 32 % Leberanteil

Probe	n	Ermitteltes Cholesterol [mg/100 g FS]	Errechnetes Cholesterol [mg/100 g FS]
Kw 0,0 %	1	145,8	124,3
Kw 0,25 %	1	166,4	129,2
Kw 0,5 %	1	163,5	134,0
Kw 1,0 %	1	140,8	143,7
Kw 2,0 %	1	179,9	163,1
Kw 4,0 %	1	222,5	201,9
Kw 8,0 %	1	306,4	279,5
Kw 16,0 %	1	487,0	434,7

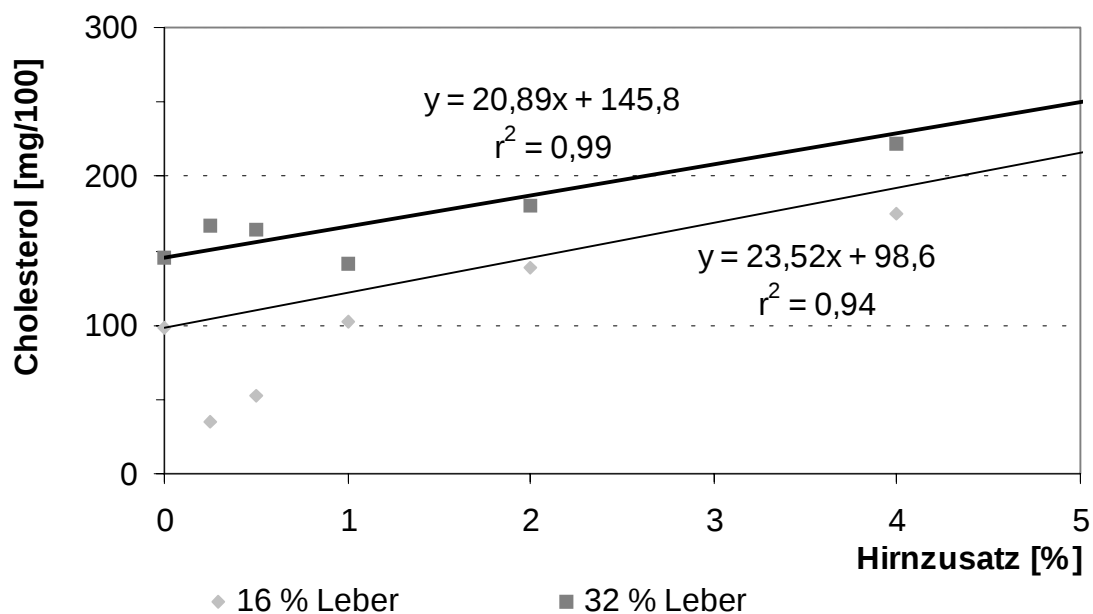


Abb. 4-4 Graphische Darstellung der Mittelwerte sowie der linearen Regressionsgeraden des Kochwurststandards mit 16 % bzw. 32 % Leberanteil

4.1.2 Externe Standards

Zu den externen Standards zählten Würste, die zur Validierung des immunchemischen ZNS-Nachweisverfahrens dienten. Hierzu gehörten sowohl die Referenzwürste, die vom schweizer Institut für Veterinärwesen zur Verfügung gestellt wurden, als auch drei Gelbwürste (S0, S1 und S2) vom Staatlichen Medizinal-, Lebensmittel- und Veterinäruntersuchungsamt Südhessen, Außenstelle Frankfurt am Main.

4.1.2.1 Schweizer Referenzmaterial

Der Gesamtcholesterolgehalt der neun Brühwürste, die zur Validierung des immunchemischen Verfahrens dienten, wurde an zwei Meßtagen bestimmt. Die daraus ermittelten Mittelwerte lagen zwischen 25 mg und 52 mg Chol./100 g mit einer Standardabweichung von bis zu 15,6 mg/100 g FS (s. Tabelle 4-6). In Abb. 4-5 wurden diese Ergebnisse graphisch dargestellt.

Tabelle 4-6 Gesamtcholesterolgehalte des Schweizer Referenzmaterials

Hirn [%]	Probe	Cholesterol [mg/100 g]		Statistische Parameter		
		n1	n2	$\bar{x}$	sd	Rang
1,00	G5	16,2	42,0	51,6	13,6	2
0,50	G1	48,4	53,3	50,8	3,5	3
0,50	G2	50,5	53,3	51,9	2,0	1
0,10	G3	47,6	39,1	43,4	6,0	4
0,10	G8	49,1	37,0	43,0	8,6	5
0,05	G4	20,0	42,0	30,9	15,6	8
0,05	G7	37,7	44,1	40,9	4,5	6
0,01	G9	28,4	35,6	32,0	5,0	7
0,00	G6	14,1	36,3	25,2	15,7	9

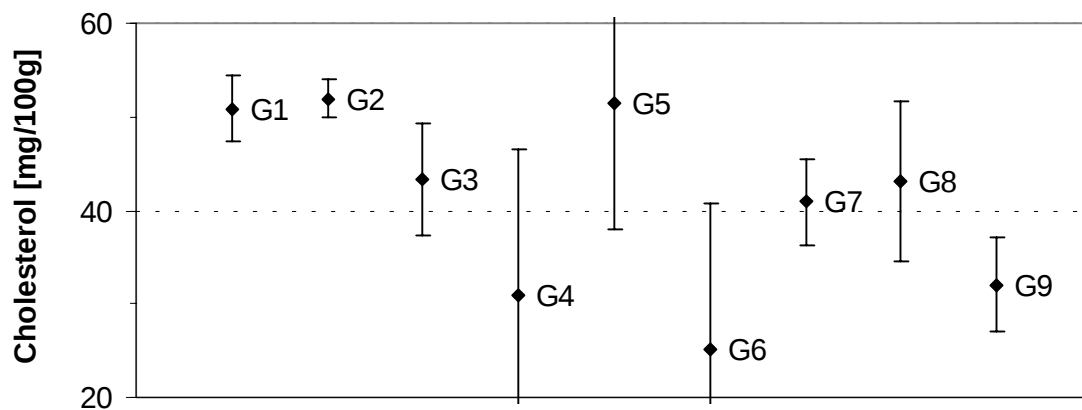


Abb. 4-5 Graphische Darstellung der mittleren Gesamtcholesterolgehalte sowie der Standardabweichungen des Schweizer Referenzmaterials (nach Nummern geordnet)

Die in Tabelle 4-6 angegebenen Rangordnungszahlen geben einen Überblick über die Abstufung im Hinblick auf einen möglichen Hirnzusatz. Danach besaßen die Proben G1, G2 und G5 wahrscheinlich einen höheren Hirnanteil als die anderen Proben. Die Probe G6 hatte mit einem Cholesterolgehalt von 25 mg/100 g FS den geringsten Hirngehalt.

Im Vergleich mit den tatsächlich hinzugefügten Hirngehalten konnten annähernd alle Proben richtig abgestuft werden. Bei näherer Betrachtung wurde die Probe G2 etwas zu hoch, G4 zu niedrig und G9 im Verhältnis zu hoch eingestuft.

Im folgenden wurden die ermittelten mittleren Cholesterolwerte mit den Cholesterolgehalten des erhitzten laborinternen Brühwurststandards (Tabelle 4-3) verglichen. In Abb. 4-6 wurden die mittleren Cholesterolwerte des Schweizer Referenzmaterials sowie die Regressionsgerade des laborinternen Brühwurststandards dargestellt. Die eingezeichnete Regressionsgerade hatte ihren Nullpunkt bei 66,9 mg Cholesterol/100 g FS und ein Bestimmtheitsmaß von 0,99. Die Schweizer Referenzmaterialien wiesen im Vergleich zum laborinternen Standard Cholesterolwerte auf, die mindestens 30 % unter dem errechneten Wert des laborinternen Nullstandards lagen.

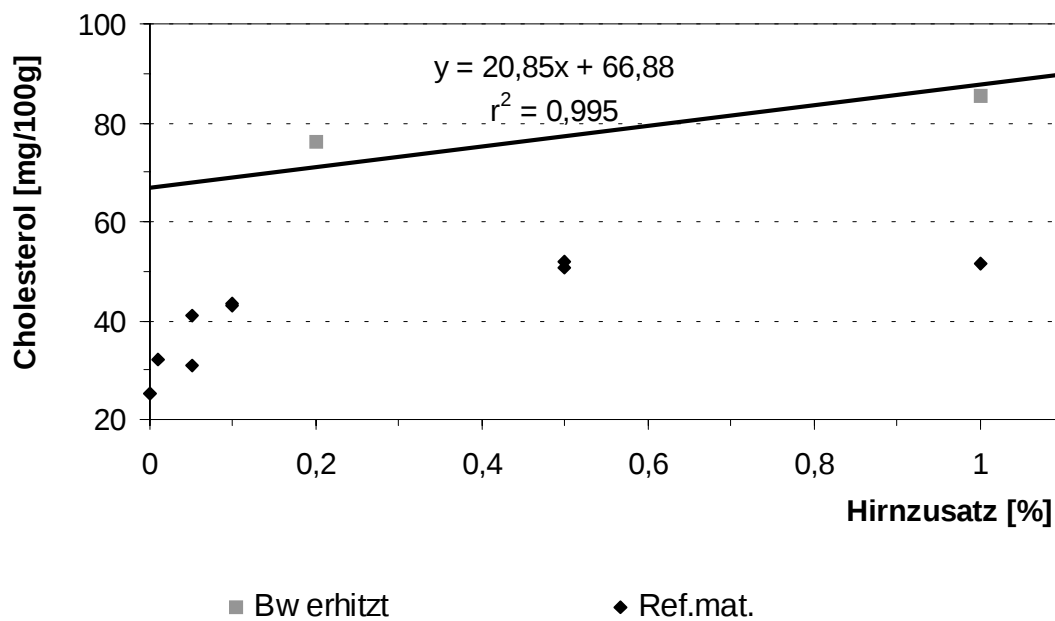


Abb. 4-6 Vergleich der Gesamtcholesterolgehalte des erhitzten labor-internen Brühwurststandards (Bw) (lineare Trendlinie) und des Schweizer Referenzmaterials (Ref.mat.)

4.1.2.2 Frankfurter Referenzmaterial

Die Gesamtcholesterolgehalte der drei Brühwürste, die zur Validierung des immunochemischen Verfahrens dienten, wurden an zwei Meßtagen bestimmt. Der berechnete Mittelwert der Probe S1 lag dabei bei 90 mg Cholesterol/100 g mit einer Standardabweichung von 9,8 mg/100 g FS. Dagegen lag Probe S0 mit 143 mg/100 g FS um 50 mg höher als Probe S1 (s. Tabelle 4-7). Die Probe S2 wies einen mittleren Cholesterolgehalt von 180 mg/100 g auf.

Tabelle 4-7 Gesamtcholesterolgehalte der Proben S0 bis S2

Hirn [%]	Probe	Cholesterol [mg/100 g]		Statistische Parameter
		n1	n2	
0,0	S1	83,19	97,00	90,1
3,3	S0	135,10	150,40	142,8
7,4	S2	177,04	183,50	180,3

Die Mittelwerte wurden zusammen mit den laborinternen Brühwurststandards in Abb. 4-2 (Kap. 4.1.1.2) graphisch dargestellt. Hierbei erkennt man, daß S1 einen etwas höheren Cholesterolgehalt im Vergleich zu dem laborinternen Standard hatte. Der mittlere Cholesterolgehalt der Probe S0 lag dagegen lediglich um 2 mg Cholesterol/100 g FS höher als die berechnete Regressionsgerade des Brühwurststandards. Die Frankfurter Referenzprobe S2 lag um 49 mg/100 g FS niedriger als der mittels der Regressionsgleichung berechnete Cholesterolwert.

4.1.3 Feldproben

Die Meßergebnisse der Fleischerzeugnisse wurden in Abhängigkeit ihrer Gruppenzugehörigkeit statistisch ausgewertet. Die Bestimmung des Cutoff-Wertes normaler Cholesterolgehalte (Cutoff-Point) erfolgte gemäß der Gleichung 3-7 in Kapitel 3.2.2.6.3 nach Ausschluß der Proben, die im immunchemischen ZNS-Nachweisverfahren positiv waren.

In der Erzeugnisgruppe Leberwurst wurden zwei Probenkollektive (A und B) getrennt voneinander statistisch analysiert und anschließend miteinander verglichen.

4.1.3.1 Rohwurst

Insgesamt wurden 23 Rohwurstproben auf ihren Cholesterolgehalt untersucht. Die Meßergebnisse lagen dabei in einem Bereich zwischen 19,2 mg und 87,8 mg Cholesterol/100 g FS. Ihr Median lag mit 63,5 mg/100 g FS nahe beim arithmetischen Mittelwert von 59,6 mg/100 g FS. Die Standardabweichung lag für diesen Probenumfang bei 16,1 mg/100 g FS (vgl. Tabelle 4-8).

Tabelle 4-8 Statistische Parameter für die Gesamtcholesterolgehalte bei Rohwurst

Anzahl n	23	Mittelwert $\bar{X}$	59,6
Minimum	19,2	Median	63,5
Maximum	87,8	Standardabweichung sd	16,1
Modalwert	49,8	Relative sd [%]	26,9

Die Auswertung der Häufigkeitsverteilung der Werte zeigte, daß 11 Proben (48 %) einen Cholesterolgehalt zwischen 61 mg und 74 mg/100 g FS aufwiesen. In Tabelle 4-9 sind die absoluten sowie die kumulierten Häufigkeiten dargestellt. Bei Betrachtung der absoluten Häufigkeitszahlen wurde ein linksschiefer Verteilungstyp deutlich (Diagramm nicht dargestellt).

Tabelle 4-9 Häufigkeitsverteilung für Rohwurst

Klassengrenzen [mg Chol./100 g FS]	Absolute Häufigkeit [n]	Kumulierte Häufigkeit [%]
$19 \leq x < 33$	2	8,70
$33 \leq x < 47$	1	13,04
$47 \leq x < 61$	7	43,48
$61 \leq x < 75$	11	91,30
und größer	2	100,00

Zur Berechnung des Cutoff-Points für den Nachweis von zentralem Nervengewebe in Rohwurst wurde eine immunchemisch ZNS-positive Probe ausgeschlossen (s. Kap. 3.2.2.6.3 und 4.2.4.1). Unter Verwendung von 22 Meßergebnissen wurde ein Mittelwert von 58,8 mg/100 g FS sowie eine Standardabweichung von 15,6 mg/100 g FS ermittelt. Bei einer statistischen Sicherheit von 95 % ($f=1,645$) und 90 % ($f=1,282$) betrugen die Cutoff-Points 84,6 mg Chol./100 g FS bzw. 78,8 mg Chol./100 g FS. Die ZNS-positive Rohwurstprobe würde hiermit jedoch nicht erkannt werden, da sie mit 77,5 mg Chol./100 g FS unter den berechneten Cutoff-Points lag.

4.1.3.2 Brühwurst

Der Stichprobenumfang für die Cholesterolbestimmung umfaßte 130 brühwurstartige Erzeugnisse. Die Meßergebnisse lagen in einem Bereich zwischen 49,1 mg und 180,3 mg Cholesterol/100 g FS (vgl. Tabelle 4-10). Median und arithmetischer Mittelwert wurden bei 88,5 mg bzw. 90,1 mg/100 g ermittelt. Die Standardabweichung betrug 22,6 mg/100 g FS.

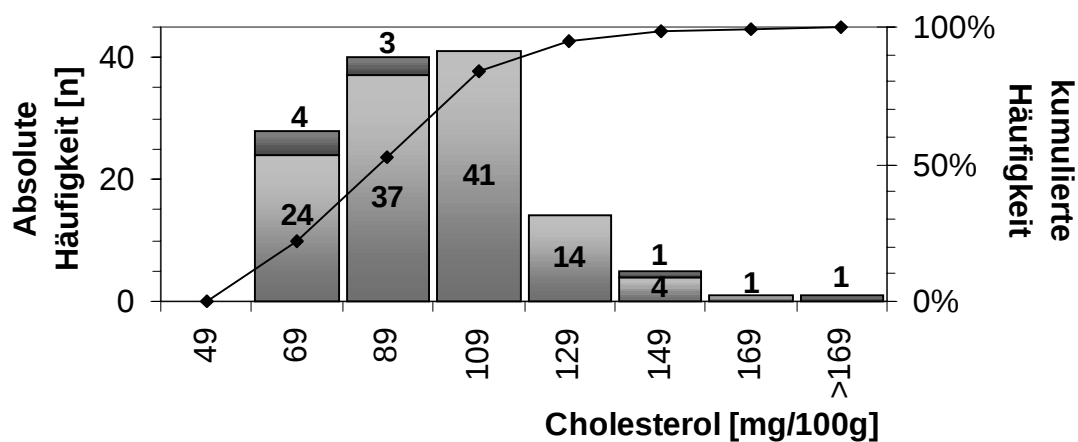
Tabelle 4-10 Statistische Parameter für die Gesamtcholesterolgehalte bei Brühwurst

Anzahl n	130	Mittelwert $\bar{X}$	90,1
Minimum	49,1	Median	88,5
Maximum	180,3	Standardabweichung sd	22,6
Modalwert	107,0	Relative sd [%]	25,1

Die Auswertung des Verteilungsmusters zeigte eine Häufung der Meßwerte im Bereich zwischen 89 mg und 108 mg/100 g (Tabelle 4-11). In dieser Klasse befanden sich 41 der untersuchten Proben (n=130). Der Modalwert lag mit 107 mg Cholesterol an der oberen Grenze dieser Klasse. Mit lediglich einer Probe weniger war die Klasse 69 mg bis 88 mg/100 g die zweithäufigste. In den ersten drei Klassen bis zu einer Grenze von 108 mg/100 g befanden sich somit über 80 % der Probenergebnisse. Aus diesen Daten (Tabelle 4-11) sowie aus Abb. 4-7 wurde eine rechtsschiefe Verteilung erkennbar. Darüber hinaus wurden die Cholesterolgehalte danach unterteilt, ob die Proben im immunchemischen ZNS-Nachweis negativ oder positiv reagierten (s. Kap.4.2.4.2). In Abb. 4-7 wurden die ZNS-positiven Proben als dunkle Flächen dargestellt. Dabei erkennt man, daß bei über 70 % der positiven Proben ein Cholesterolgehalt im Bereich zwischen 49 mg und 88 mg/100 g FS ermittelt wurde. Bei diesen Proben handelte es sich um drei Geflügelwürste sowie vier Mortadella-Erzeugnisse aus italienischer Herstellung.

Tabelle 4-11 Häufigkeitsverteilung für ZNS-negative und -positive Brühwurst

Klassengrenzen [mg Chol./100 g FS]	Absolute Häufigkeit [n]		Kumulierte Häufigkeit [%]
	negativ	positiv	
$49 \leq x < 69$	24	4	21,54
$69 \leq x < 89$	37	3	52,31
$89 \leq x < 109$	41	0	83,85
$109 \leq x < 129$	14	0	94,62
$129 \leq x < 149$	4	1	98,46
$149 \leq x < 169$	1	0	99,23
und größer	0	1	100,00

**Abb. 4-7** Häufigkeitsverteilung der Gesamtcholesterolgehalte in Brühwurst (dunkel dargestellte Werte: immunchemisch ZNS-positiv)

Für die Bestimmung des Cutoff-Points (3.2.2.6.3) wurden die neun ZNS-positiven Proben (Kap. 4.2.4.2) von der Berechnung ausgeschlossen. Somit ergab sich aus den restlichen 121 Meßwerten ein Mittelwert von 90,4 mg/100 g mit einer Standardabweichung von 20,6 mg/100 g. Mit diesen Werten errechnete sich eine Grenze des normalen Cholesterolgehaltes für Brühwürste mit einer statistischen Sicherheit von 90 % ($f=1,282$) bzw. 75 % ($f=0,675$) bei 116,9 mg bzw. 104,3 mg/100 g. Über diesen Cutoff-Points lagen insgesamt 17 bzw. 30 Cholesterolgehalte der untersuchten Brühwurst-Stichprobe.

Mit diesen Cutoff-Points ließen sich jedoch im Cholesterol-Screening nur zwei der untersuchten ZNS-positiven Proben (n=9) als Verdachtsproben erfassen. Die über den Cholesterolgehalt nicht erkannten ZNS-positiven Feldproben haben einen Cholesterolgehalt zwischen 51,9 mg und 90 mg/100 g FS. Es handelte sich hierbei hauptsächlich um Geflügelwürste. Um alle immunchemisch positiven Proben herauszufinden, müßte der Grenzwert auf 51 mg Chol./100 g festgelegt werden. Als „verdächtige“ Proben fielen somit 129 beim Cholesterol-Screening heraus.

4.1.3.3 Kochwurst

Die Feldprobengruppe Kochwurst umfaßte neben Leberwurst unterschiedlicher Qualität auch Kochmettwürste, Blutwürste sowie Sülzen und Preßwürste. Die Meßergebnisse jeder Untergruppe wurde gesondert analysiert und tabellarisch bzw. graphisch dargestellt.

4.1.3.3.1 Leberwurst

Insgesamt wurden 239 Feldproben in der Gruppe der Leberwürste enzymatisch auf ihren Cholesterolgehalt untersucht. Diese Gruppe setzte sich aus zwei Probenkollektiven zusammen. Probenkollektiv A umfaßte 126 feine Leberwürste im Darm der Spitzenqualität. Bei Probenkollektiv B handelte es sich um 113 Würste unterschiedlicher Technologie und Qualität (Kap. 3.1.3.1). Die Daten beider Gruppen wurden getrennt voneinander ausgewertet (S. 107 und S. 109) und miteinander verglichen.

Im folgenden wurden die Meßergebnisse beider Kollektive zusammen statistisch ausgewertet und dargestellt. Die Cholesterolwerte streuten in einem Bereich zwischen 59,0 mg und 340,6 mg Cholesterol/100 g FS (vgl. Tabelle 4-12). Der Median lag mit 133,7 mg/100 g FS um 5 mg etwas unter dem berechneten arithmetischen Mittelwert von 138,7 mg/100 g FS.

Tabelle 4-12 Statistische Parameter für die Gesamtcholesterolgehalte aller Leberwurstproben

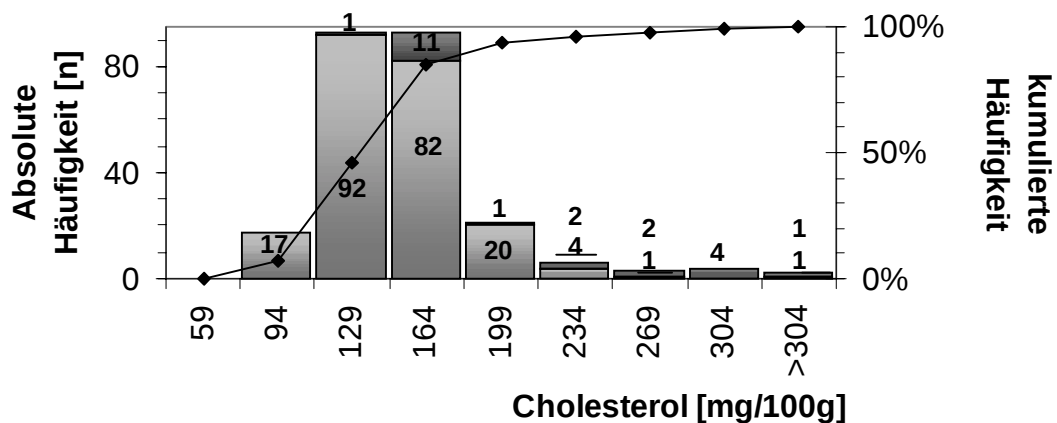
Anzahl n	239	Mittelwert $\bar{X}$	138,7
Minimum	59,0	Median	133,3
Maximum	340,6	Standardabweichung sd	41,6
Modalwert	125,9	Relative sd [%]	30,0

Aufgrund der relativen Standardabweichung von 30 % wurde eine Normalverteilung der Häufigkeiten erwartet. Bei Betrachtung aller Werte in Tabelle 4-13 wurde dies nicht bestätigt, da 36 Meßdaten einen Cholesterolgehalt zwischen 164 mg und 340 mg/100 g aufwiesen. Somit lagen sie rechts von den modalen Klassen mit den Grenzen 94 mg bis 128 mg/100 g bzw. 129 mg bis 163 mg Chol./100 g. Der Modalwert von 125,9 mg Cholesterol lag an der oberen Grenze der kleineren Klasse.

Abb. 4-8 zeigt das Verteilungsmuster der ZNS-negativen sowie der -positiven (dunkel dargestellt) Leberwürste (s. Kap. 4.2.4.3.1). Hierbei erkennt man, daß der rechtsschiefe Kurventyp hauptsächlich durch ZNS-positive Feldproben verursacht wurde. Unter Ausschluß aller positiven Proben würde eine annähernd normalverteilte Häufigkeitsverteilung sichtbar werden.

Tabelle 4-13 Häufigkeitsverteilung für alle ZNS-negativen und -positiven Leberwurstproben

Klassengrenzen [mg Chol./100 g FS]	Absolute Häufigkeit [n]		Kumulierte Häufigkeit [%]
	negativ	positiv	
$59 \leq x < 94$	17	0	7,14
$94 \leq x < 129$	92	1	46,22
$129 \leq x < 164$	82	11	84,94
$164 \leq x < 199$	20	1	93,70
$199 \leq x < 234$	4	2	96,22
$234 \leq x < 269$	1	2	97,48
$269 \leq x < 304$	0	4	99,16
und größer	1	1	100,00

**Abb. 4-8** Häufigkeitsverteilung der Gesamtcholesterolgehalte in Leberwurst (dunkel dargestellte Werte: immunchemisch ZNS-positiv)

Zur Bestimmung des Grenzwertes für den maximalen normalen Cholesterolgehalt (Cutoff-Point, CP) wurden 22 Meßergebnisse ZNS-positiver Feldproben von der Berechnung ausgeschlossen (s. Kap. 3.2.2.6.3). Aus 217 Daten wurde ein Mittelwert bei 131,7 mg/100 g und eine Standardabweichung bei 31,3 mg/100 g ermittelt. Mit der vorgegebenen Gleichung $CP = \bar{X} + (f \cdot sd)$ wurde der Cutoff für Leberwurst errechnet (Gleichung 3-7). Mit einer statisti-

schen Sicherheit von 90 % ($f=1,282$) und einem Grenzwert von 171,8 mg Cholesterol/100 g FS können 45 % der getesteten ZNS-positiven Feldproben erfaßt werden. Bei Anwendung des Cutoff_{75%} ($f=0,675$) mit 152,8 mg Chol./100 g wurden in dieser Studie zusätzlich 23 % der positiven Proben herausgefunden, jedoch müßten hierbei 59 Proben immunchemisch untersucht werden. Nicht erfaßt wurden sieben Proben mit einem Cholesterolgehalt zwischen 123 mg und 147 mg/100 g FS. Um alle ZNS-positiven Proben beim Screening herauszufiltern, müßte der Cutoff-Point kleiner als der niedrigste Cholesterolgehalt einer positiven Probe - hier 123 mg/100 g FS - sein. Allerdings lagen 146 Proben mit ihrem Cholesterolwert über 123 mg/100 g FS.

Probenkollektiv A

Das Probenkollektiv A bestand aus 126 feinzerkleinerten Leberwurstproben der Spitzenqualität, die randomisiert aus ganz Deutschland bezogen wurden (Kap. 3.1.3.1).

In Tabelle 4-14 sind die Meßwerte statistisch ausgewertet. Die Ergebnisse der Cholesterolgehalte lagen in einem Bereich zwischen 59,0 mg und 285,8 mg Chol./100 g FS. Im Mittel wurde ein Wert von 121,1 mg/100 g und eine Standardabweichung von 28,1 mg/100 g errechnet. Der Medianwert lag mit 119,5 mg Chol./100 g dicht neben dem arithmetischen Mittelwert. Dies spricht dafür, daß nur sehr wenig Ausreißerwerte im Stichprobenumfang enthalten sind.

Tabelle 4-14 Statistische Parameter für die Gesamtcholesterolgehalte des Probenkollektives A

Anzahl n	126	Mittelwert $\bar{X}$	121,1
Minimum	59,0	Median	119,5
Maximum	285,8	Standardabweichung sd	28,1
Modalwert	125,9	Relative sd [%]	23,2

Die Häufigkeitsverteilung in Tabelle 4-15 stellt die Anzahl der ZNS-negativen sowie der -positiven Proben (s. Kap. 4.2.4.3.1) gegenüber. Dabei wurde zunächst eine Häufung der Meßergebnisse in der Klasse zwischen 115 mg und 134 mg Chol./100 g FS erkennbar. Der ermittelte Modalwert 125,9 mg/100 g lag in der Mitte dieses Klassenbereichs. Die ZNS-positiven Proben häuften sich mit 83 % in einem Bereich zwischen 129 mg und 164 mg Cholesterol/100 g FS. In Abb. 4-9 wurde die Häufigkeitsverteilung sowie die Unterscheidung in ZNS-negativ und -positiv (dunkel gefärbt) dargestellt. Hierbei läßt sich feststellen, daß der Verteilungstyp annähernd normal verteilt ist. Ferner fielen zwei Proben auf, die einen Cholesterolgehalt über 215 mg/100 g FS aufwiesen.

Tabelle 4-15 Häufigkeitsverteilung für ZNS-negative und -positive Proben im Kollektiv A

Klassengrenzen [mg Chol./100 g FS]	Absolute Häufigkeit [n]		Kumulierte Häufigkeit [%]
	negativ	positiv	
$55 \leq x < 75$	5	0	3,97
$75 \leq x < 95$	12	0	13,49
$95 \leq x < 115$	33	0	39,68
$115 \leq x < 135$	40	1	72,22
$135 \leq x < 155$	24	5	95,24
$155 \leq x < 175$	0	4	98,41
$175 \leq x < 195$	0	0	98,41
$195 \leq x < 215$	0	0	98,41
$215 \leq x < 235$	0	1	99,21
und größer	0	1	100,00

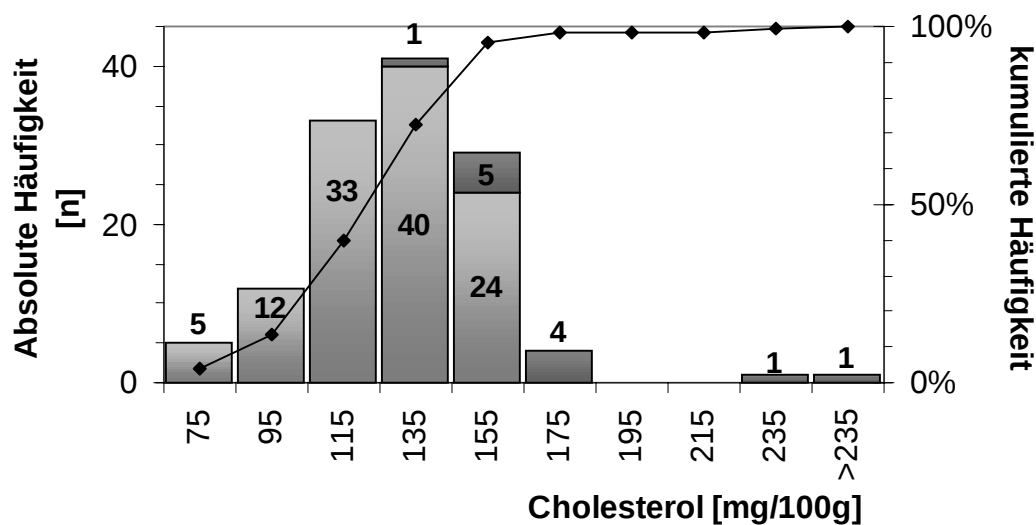


Abb. 4-9 Häufigkeitsverteilung der Gesamtcholesterolgehalte im Probenkollektiv A (dunkel dargestellte Werte: immunchemisch ZNS-positiv)

Für die Berechnung des Cutoff-Points für den Nachweis von zentralem Nervengewebe im Probenkollektiv A wurden 12 immunchemisch ZNS-positive Proben ausgeschlossen (s. Kap. 3.2.2.6.3 und Kap. 4.2.4.3.1). Danach ergab sich ein neuer Mittelwert von 116,3 mg/100 g FS mit einer Standardabweichung von 20,8 mg/100 g FS. Bei einer statistischen Sicherheit von 95 % ($f=1,645$) betrug der Cutoff-Point 150,5 mg/100 g FS. Acht der ZNS-positiven Feldproben sowie lediglich eine negative Feldprobe lagen mit ihrem Cholesterolgehalt über dieser Grenze. Mit einem Cutoff von 130,3 mg/100 g FS ($p=75\%$) wurden bis auf eine (129,4 mg Cholesterol/100 g FS) alle ZNS-positiven Proben erkannt. Insgesamt lagen 42 Proben über einem Cholesterolgehalt von 129 mg/100 g FS.

Probenkollektiv B

Das Probenkollektiv B bestand aus 113 Leberwürsten, deren Cholesterolgehalt enzymatisch ermittelt wurde. Diese Würste zeichneten sich dadurch aus, daß sie von unterschiedlicher Herkunft, Technologie und Qualität waren.

Eine Übersicht über die statistischen Parameter der Gesamtcholesterolbestimmung wurde in Tabelle 4-16 dargestellt. Hierbei erkennt man, daß die Chole-

sterolgehalte in einem Bereich zwischen 92,0 mg und 340,6 mg/100 g FS streuten. Der Median lag mit 150 mg/100 g FS etwas unter dem arithmetischen Mittelwert von 158,2 mg/100 g FS. Die relative Standardabweichung lag bei 28,6 %.

Tabelle 4-16 Statistische Parameter für die Gesamtcholesterolgehalte im Probenkollektiv B

Anzahl n	113	Mittelwert $\bar{X}$	158,2
Minimum	92,0	Median	150,0
Maximum	340,6	Standardabweichung sd	45,3
Modalwert	151,0	Relative sd [%]	28,6

Aus der Häufigkeitsverteilung (Tabelle 4-17) ist erkennbar, daß 33 Feldproben einen Gehalt von 135 mg bis 154 mg Cholesterol/100 g FS aufwiesen. Der Modalwert des Kollektives B lag mit 151 mg/100 g FS an der oberen Klassengrenze. Immunchemisch ZNS-positive Proben (s. Kap. 4.2.4.3.1) häuften sich dagegen bei einem Cholesterolgehalt von über 235 mg/100 g FS. Ihre Meßergebnisse waren dabei bis zu einem Wert von 337 mg/100 g FS gleichmäßig verteilt (Daten nicht dargestellt).

Tabelle 4-17 Häufigkeitsverteilung für ZNS-negative und –positive Proben im Kollektiv B

Klassengrenzen [mg Chol./100 g FS]	Absolute Häufigkeit [n]		Kumulierte Häufigkeit [%]
	negativ	positiv	
$55 \leq x < 75$	0	0	0,00
$75 \leq x < 95$	1	0	0,88
$95 \leq x < 115$	10	0	9,73
$115 \leq x < 135$	21	1	29,20
$135 \leq x < 155$	32	1	58,41
$155 \leq x < 175$	20	0	76,11
$175 \leq x < 195$	13	1	88,50
$195 \leq x < 215$	3	1	92,04
$215 \leq x < 235$	1	0	92,92
und größer	2	6	100,00

Unter Ausschluß der 6 höchsten Werte ergab sich eine Normalverteilung, wie in Abb. 4-10 zu erkennen ist. Außerdem wird deutlich, daß lediglich einzelne positive Proben (dunkel gefärbt) unter einem Gehalt von 214 mg Chol./100 g FS lagen.

Zur Bestimmung des Cutoff-Points (Kap. 3.2.2.6.3) in dieser Gruppe wurde unter Ausschluß von insgesamt 10 ZNS-positiven Proben ein Mittelwert von 148,8 mg/100 g und eine Standardabweichung von 32,1 mg/100 g ermittelt. Damit errechnete sich ein Cutoff von 201,6 mg/100 g mit 95 %iger Sicherheit ($f=1,645$) bzw. 170,5 mg Cholesterol/100 g mit einer Sicherheit von 75 % ($f=0,675$). In dieser Studie wurden somit sieben bzw. acht positive Proben sowie 6 bzw. 19 negative Proben erfaßt. Um alle 10 immunchemisch positiven Leberwurstproben im Cholesterol-Screening herauszufiltern, müßte der Cutoff-Point auf 123 mg Chol./100 g FS gelegt werden. Dadurch würden jedoch zusätzlich 82 negative Proben über dem Cutoff-Point liegen.

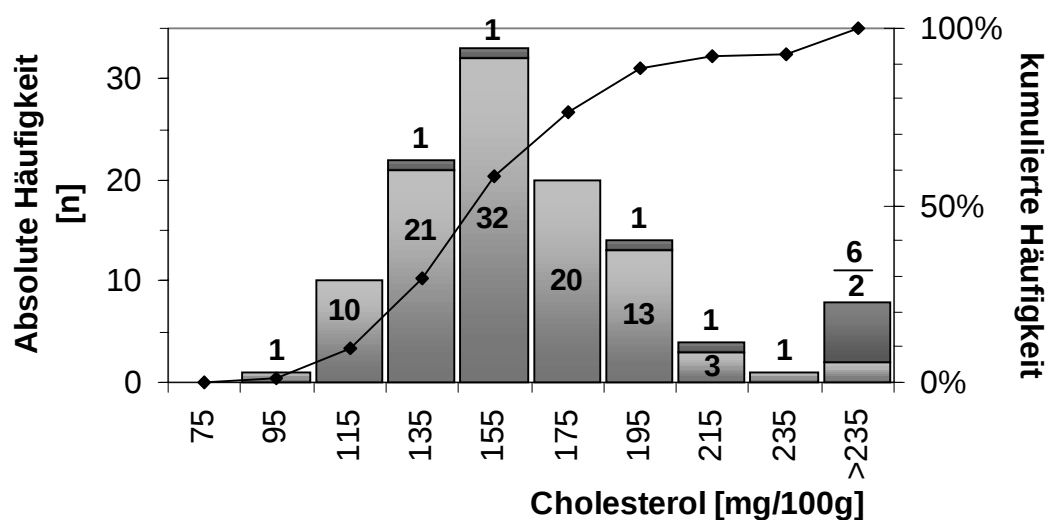


Abb. 4-10 Häufigkeitsverteilung der Gesamtcholesterolgehalte im Probenkollektiv B (dunkel dargestellte Werte: immunchemisch ZNS-positiv)

4.1.3.3.2 Kochmettwurst

Der Cholesterolgehalt von 77 Kochmettwürsten wurde enzymatisch ermittelt und statistisch ausgewertet. Die Meßergebnisse streuten in einem Bereich zwischen 47,6 mg und 455,8 mg/100 g FS (Tabelle 4-18). Der Mittelwert der Feldproben lag mit 148,5 mg Cholesterol deutlich über dem Median mit 115,0 mg/100 g FS, was für eine hohe Streubreite spricht. Die Standardabweichung von 94,5 mg/100 g FS wies ebenfalls darauf hin.

Tabelle 4-18 Statistische Parameter für die Gesamtcholesterolgehalte bei Kochmettwurst

Anzahl n	77	Mittelwert $\bar{X}$	148,5
Minimum	47,6	Median	115,0
Maximum	455,8	Standardabweichung sd	94,5
Modalwert	132,0	Relative sd [%]	63,6

Die Häufigkeitsverteilung (Tabelle 4-19) zeigt, daß sich 42 Werte in der Klasse zwischen 93 mg und 138 mg/100 g häuften. Dies wurde auch durch den Modalwert von 132 mg/100 g erkennbar, der im oberen Bereich der Klasse lag. Sehr deutlich ist auch, daß mit Ausnahme von zwei ZNS-positiven Feldproben (65 mg und 81 mg Chol./100 g) alle positiven Mettwürste einen Cholesterolgehalt von über 231 mg/100 g FS aufwiesen. 43 % der Werte befinden sich im Bereich zwischen 323 mg und 368 mg Chol./100 g. Infolge der hohen Cholesterolgehalte der ZNS-positiven Feldproben entsteht ein stark rechtsschiefer Verteilungstyp. Dies ist auch in Abb. 4-11 deutlich zu erkennen.

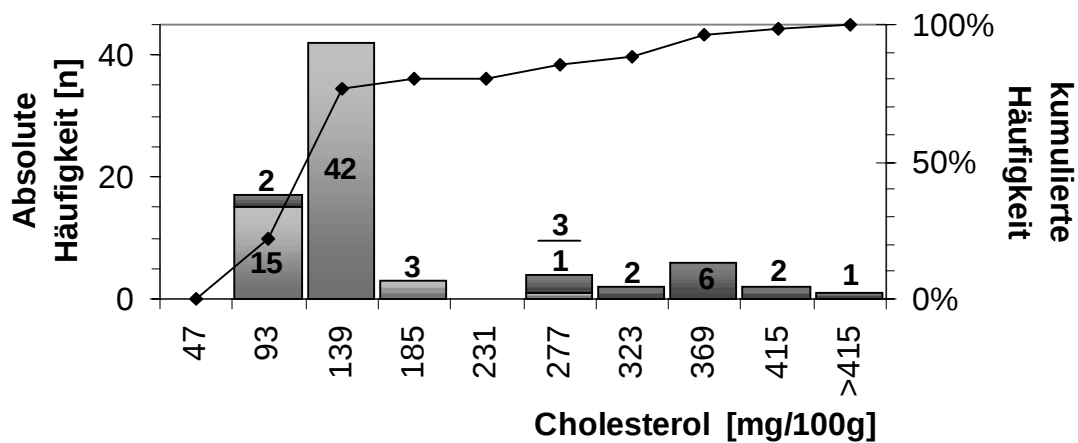


Abb. 4-11 Häufigkeitsverteilung der Gesamtcholesterolgehalte in Kochmettwurst (dunkel dargestellte Werte: immunochemisch ZNS-positiv)

Tabelle 4-19 Häufigkeitsverteilung für ZNS-negative und -positive Kochmettwurst

Klassengrenzen [mg Chol./100 g FS]	Absolute Häufigkeit [n]		Kumulierte Häufigkeit [%]
	negativ	positiv	
$47 \leq x < 93$	15	2	22,08
$93 \leq x < 139$	42	0	76,62
$139 \leq x < 185$	3	0	80,52
$185 \leq x < 231$	0	0	80,52
$231 \leq x < 277$	1	3	85,71
$277 \leq x < 323$	0	2	88,31
$323 \leq x < 369$	0	6	96,10
$369 \leq x < 415$	0	2	98,70
und größer	0	1	100,00

In die Berechnung des Cutoff-Points für Mettwürste gingen 61 Meßdaten ein, die immunchemisch keine Reaktion zeigten (s. Kap. 3.2.2.6.3 und Kap. 4.2.4.3.2). Daraus wurde der Mittelwert mit 83,25 mg Cholesterol und eine Standardabweichung von 32,9 mg/100 g berechnet. Der Cutoff lag dementsprechend bei 185,2 mg bzw. 137,6 mg/100 g mit einer Sicherheit von 99,9 % ($f=3,09$) und 95 % ($f=1,645$). Beide Grenzwerte erfaßten 14 der tatsächlich ZNS-positiven Feldproben ($n=16$) ebenso wie eine bzw. fünf negative Proben, was auch in der Abb. 4-11 ersichtlich wird. Legt man den Cutoff-Point bei 65 mg/100 g FS fest, so würden alle 16 ZNS-positiven Feldproben erfaßt, jedoch auch zusätzlich 57 negative Proben, die in der Immunchemie überprüft werden müßten.

4.1.3.3.3 Blutwurst

Die enzymatisch ermittelten Cholesterolgehalte der 46 Blutwurstproben streuten in einem Bereich zwischen 32,4 mg und 132,3 mg/100 g FS (Tabelle 4-20). Der Mittelwert sowie der Median lagen mit 81,3 mg bzw. 78,4 mg/100 g dicht beieinander. Die relative Standardabweichung von 29,1 % legt die Vermutung nahe, daß die Werte annähernd normalverteilt sind.

Tabelle 4-20 Statistische Parameter für die Gesamtcholesterolgehalte bei Blutwurst

Anzahl n	46	Mittelwert $\bar{X}$	81,3
Minimum	32,4	Median	78,4
Maximum	132,3	Standardabweichung sd	23,7
Modalwert	91,7	Relative sd [%]	29,1

Aus der Häufigkeitsverteilung (Tabelle 4-21) ist erkennbar, daß 13 Proben einen Cholesterolgehalt zwischen 62 mg und 76 mg/100 g aufwiesen. Mit 11 Proben war die Klasse zwischen 77 mg und 91 mg Chol./100 g die zweithäufigste. Der Modalwert lag dabei mit 91 mg Cholesterol/100 g FS an der oberen Grenze. Das Verteilungsverhältnis entspricht ungefähr einer Normalverteilung (Diagramm nicht dargestellt).

Tabelle 4-21 Häufigkeitsverteilung für Blutwurst

Klassengrenzen [mg Chol./100 g FS]	Absolute Häufigkeit [n]	Kumulierte Häufigkeit [%]
$32 \leq x < 47$	4	8,70
$47 \leq x < 62$	5	19,57
$62 \leq x < 77$	13	47,83
$77 \leq x < 92$	11	71,74
$92 \leq x < 107$	6	84,78
$107 \leq x < 122$	4	93,48
und größer	3	100,00

Zur Berechnung des Cutoff-Points für Blutwurst wurden alle untersuchten Proben eingesetzt, da keine der untersuchten Proben eine immunochemische Reaktion aufwies (s. Kap. 3.2.2.6.3 und Kap. 4.2.4.3.3). Unter Verwendung des Mittelwertes sowie der Standardabweichung (Tabelle 4-20) wurde der Cutoff mit 119,9 mg/100 g bei einer statistischen Sicherheit von 95 % ($f=1,645$) und 116,9 mg/100 g mit 90 %iger Sicherheit ($f=1,282$) ermittelt.

4.1.3.3.4 Sülzwurst

Insgesamt wurden 44 Feldproben in der Gruppe der Sülzen und Preßwürste auf ihren Cholesterolgehalt untersucht. Ihre Werte lagen in einem Bereich zwischen 10 mg/100 g und 145,8 mg Cholesterol/100 g FS. Der Median lag mit 87,8 mg Cholesterol nahe beim arithmetischen Mittelwert von 90,5 mg/100 g FS. Die Standardabweichung wurde bei 30,5 mg/100 g ermittelt (vgl. Tabelle 4-22).

Tabelle 4-22 Statistische Parameter für die Gesamtcholesterolgehalte bei Sülzwurst

Anzahl n	44	Mittelwert $\bar{X}$	90,5
Minimum	10,0	Median	87,8
Maximum	145,8	Standardabweichung sd	30,5
Modalwert	77,5	Relative sd [%]	33,7

Die Eingruppierung der Meßwerte in Klassen ergibt eine Häufung zwischen 50 mg und 89 mg/100 g (Tabelle 4-23). Der ermittelte Modalwert der Stichprobe lag mit 77,5 mg/100 g ungefähr in der Klassenmitte. Die Häufigkeitsverteilung hatte in der Klasse 110 mg bis 129 mg/100 g mit 11 Proben einen zweiten Gipfel. Somit ergibt sich ein linksschiefer Verteilungstyp mit zwei Gipfeln (Abb. 4-12).

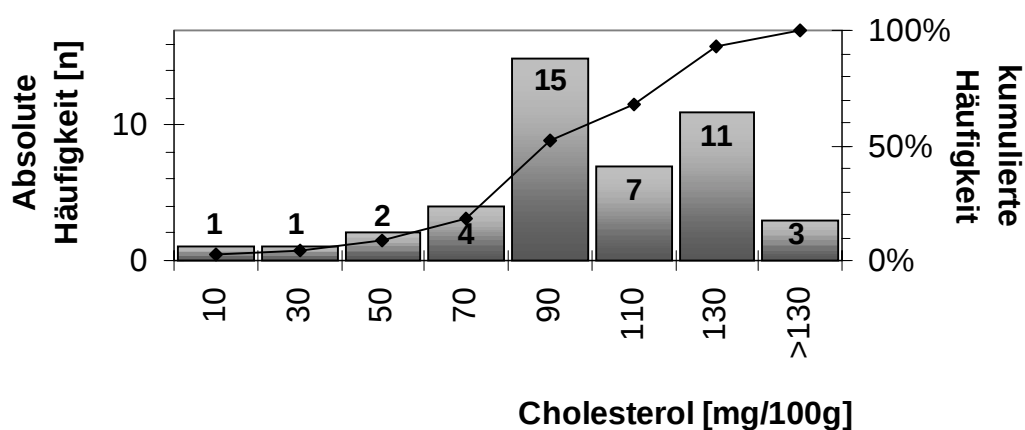


Abb. 4-12 Häufigkeitsverteilung der Gesamtcholesterolgehalte in Sülzwurst

Tabelle 4-23 Häufigkeitsverteilung für Sülzwurst

Klassengrenzen [mg Chol./100 g FS]	Absolute Häufigkeit [n]	Kumulierte Häufigkeit [%]
$x < 10$	1	2,27
$10 \leq x < 30$	1	4,55
$30 \leq x < 50$	2	9,09
$50 \leq x < 70$	4	18,18
$70 \leq x < 90$	15	52,27
$90 \leq x < 110$	7	68,18
$110 \leq x < 130$	11	93,18
und größer	3	100,00

Zur Berechnung des Cutoff-Points normaler Cholesterolgehalte für Sülzen und Preßwurst wurde der Mittelwert sowie die Standardabweichung der immunchemisch ZNS-negativen Proben, in diesem Falle also die gesamte Stichprobe, herangezogen (Tabelle 4-22) (s. Kap. 3.2.2.6.3 und Kap. 4.2.4.3.4). Mit einer statistischen Sicherheit von 95 % ($f=1,645$) bzw. 90 % ($f=1,282$) ergab sich ein Cutoff von 140 mg/100 g bzw. 128,8 mg Cholesterol/100 g FS.

4.1.3.4 Erzeugnisse aus zerkleinertem Fleisch und andere Lebensmittel

In der Gruppe der sonstigen Erzeugnisse wurden 42 Proben (Kap. 3.1.3.1) enzymatisch auf ihren Cholesterolgehalt untersucht.

Die Meßergebnisse lagen in einem Bereich zwischen 14,9 mg und 179,9 mg Chol./100 g FS (vgl. Tabelle 4-24). Der Mittelwert sowie der Median lagen mit 83,5 mg bzw. 84,3 mg/100 g dicht beieinander. Die relative Standardabweichung wurde mit 39,5 % ermittelt.

Tabelle 4-24 Statistische Parameter für die Gesamtcholesterolgehalte bei sonstigen Erzeugnissen

Anzahl n	42	Mittelwert $\bar{X}$	83,5
Minimum	14,9	Median	84,3
Maximum	179,9	Standardabweichung sd	32,9
Modalwert	82,5	Relative sd [%]	39,5

Die Häufigkeitsverteilung in Tabelle 4-25 zeigt, daß 55 % der Werte einen Cholesterolgehalt bis zu 85 mg/100 g aufwiesen. Die modale Klasse zwischen 62 mg und 85 mg/100 g FS beinhaltete 13 Meßergebnisse. Der Modalwert lag mit 82,5 mg Cholesterol/100 g FS im oberen Bereich dieser Klasse. Die Verteilungstyp (Diagramm nicht dargestellt) entspricht einer Normalverteilung.

Tabelle 4-25 Häufigkeitsverteilung für sonstige Erzeugnisse

Klassengrenzen [mg Chol./100 g FS]	Absolute Häufigkeit [n]	Kumulierte Häufigkeit [%]
$14 \leq x < 38$	4	9,52
$38 \leq x < 62$	6	23,81
$62 \leq x < 86$	13	54,76
$86 \leq x < 110$	11	80,95
$110 \leq x < 134$	6	95,24
$134 \leq x < 158$	1	97,62
und größer	1	100,00

Die Berechnung des Cutoff-Points (CP) für diese Gruppe der Fleischerzeugnisse erfolgte unter Einbeziehung aller untersuchten Proben, da keine immunchemisch weder eine NSE- noch eine GFAP-Reaktion nachgewiesen wurde (Kap. 4.2.4.4). Gemäß der Gleichung $CP = \bar{X} + (f \cdot sd)$ (vgl. 3.2.2.6.3) wurde ein Cutoff mit einer 95 % ($f=1,645$) bzw. 90 %iger ($f=1,282$) Sicherheit von 137,8 mg/100 g sowie 125,7 mg/100 g FS ermittelt.

4.1.3.5 Organe

Insgesamt wurden 21 verschiedene Gewebe und Organe vom Rind auf ihren Cholesterolgehalt untersucht (s. Anhang 15).

Dabei wurde festgestellt, daß alle untersuchten Gewebe - mit Ausnahme von Gehirn, Rückenmark und dorsalen Wurzelganglien - einen Cholesterolgehalt unter 500 mg/100 g FS aufwiesen (Tabelle 4-26). Die Werte der untersuchten Milz, peripheren Nerven, Lunge, Niere sowie der Nebenniere lagen in einem Bereich zwischen 330 mg und 430 mg Cholesterol/100 g FS mit einem Median bei 365 mg Chol./100 g FS. In der Klasse zwischen 125 mg und 250 mg Chol./100 g FS befanden sich die Leber, Lymphknoten, Magen-Darm-Trakt sowie vier weitere Organe mit Cholesterolgehalten zwischen 134 mg und 214 mg/100 g. Die Skelett- und Zwerchfellmuskulatur besaß mit 60 mg bzw. 49 mg/100 g FS den geringsten Cholesterolwert. Dagegen lagen die Werte von Gehirn, Rückenmark und dorsalen Wurzelganglien um mindestens den Faktor 22 höher als die der Muskulatur. Rindergehirn wies einen Mittelwert von 1334 mg/100 g FS mit einer relativen Standardabweichung von 14 % auf. Die gemessenen Cholesterolgehalte des Rückenmarks sowie der dorsalen Wurzelganglien lagen bei 1524 mg/100 g FS mit einer Standardabweichung von 249 mg Cholesterol/100 g FS bzw. 1748 mg/100 g FS.

Tabelle 4-26 Cholesterolgehalte von Rindergewebe (Minimum, Maximum und Median innerhalb bestimmter Klassengrenzen)

Klassengrenzen [mg Chol./100 g FS]	Proben	Cholesterol [mg/100 g FS]		
		Minimum	Maximum	Median
$x > 500$	Hirn, Rückenmark (RM), dorsale Wurzelganglien	1078,94	1747,64	1219,75
$250 > x \leq 500$	Niere, Nebenniere, Milz, periphere Nerven, Lunge	329,90	433,33	365,50
$125 > x \leq 250$	Leber, Tonsillen, Lymphknoten, Magen-Darm-Trakt, Pankreas, Netzhaut, <i>N. opticus</i> , Knochenmark	134,38	214,01	170,10
$x \leq 125$	Skelettmuskulatur, Zwerchfell, Fett, RM-Hüllen, Gallenblase-Schleimhaut	49,05	100,96	83,90

4.2 Immunchemisches ZNS-Nachweisverfahren

In diesem Abschnitt wurden die Ergebnisse des immunchemischen NSE- und GFAP-Nachweises dargestellt. Die visuelle bzw. densitometrische Auswertung der Immunblots (s. Kap. 3.3.2.8) wurde in Tabellen und Diagrammen zusammengefaßt. Daneben wurden beispielhaft einzelne Westernblots wiedergegeben.

4.2.1 Maximierung der immunchemischen Aktivität

Im folgenden wurden die Ergebnisse zur Steigerung der Empfindlichkeit des immunchemischen ZNS-Nachweisverfahrens durch die Optimierung des Extraktionsmittels sowie Konzentrierung des Probenextraktes dargestellt.

4.2.1.1 Optimierung des Extraktionsmittels

Die Zusätze CHAPS (1 M), Acetat (0,2 M; pH 3,4 bzw. 8,2), L-Ascorbinsäure (5 mM) sowie DTT (1,4-Dithio-D,L-threitol; 1, 2 und 5 mM) zur konventionellen

Tris-Harnstoff-Extraktion erbrachten keine Verbesserung der Immunintensität. Die Verwendung einer 4 %igen NaCl-Tris-Harnstofflösung erbrachte bei nicht erhitzten Proben die besten Ergebnisse.

Die Bandenintensität nach der Extraktion mit einem Zusatz von 2-Mercaptoethanol (1-10 %ig, v/v) war bei nativem Probenmaterial mit derjenigen nach einem konventionellem Proteinaufschluß vergleichbar. Dagegen stellte man vor allem bei stärker erhitzten Fleischerzeugnissen eine Verbesserung der Intensität fest. Zur Ermittlung der optimalen Zusammensetzung des Extraktionsmittels wurden die relativen NSE-Immunreaktionen eines laborinternen erhitzten Brühwurststandards mit 5 % Hirnanteil (S. 52) nach Extraktion mit Zusatz von 0 % bis 12 % 2-Mercaptoethanol zum Tris-Harnstoff-Puffer densitometrisch ermittelt (s. Anhang 30-31) und ausgewertet. In Abb. 4-13 ist dies dargestellt.

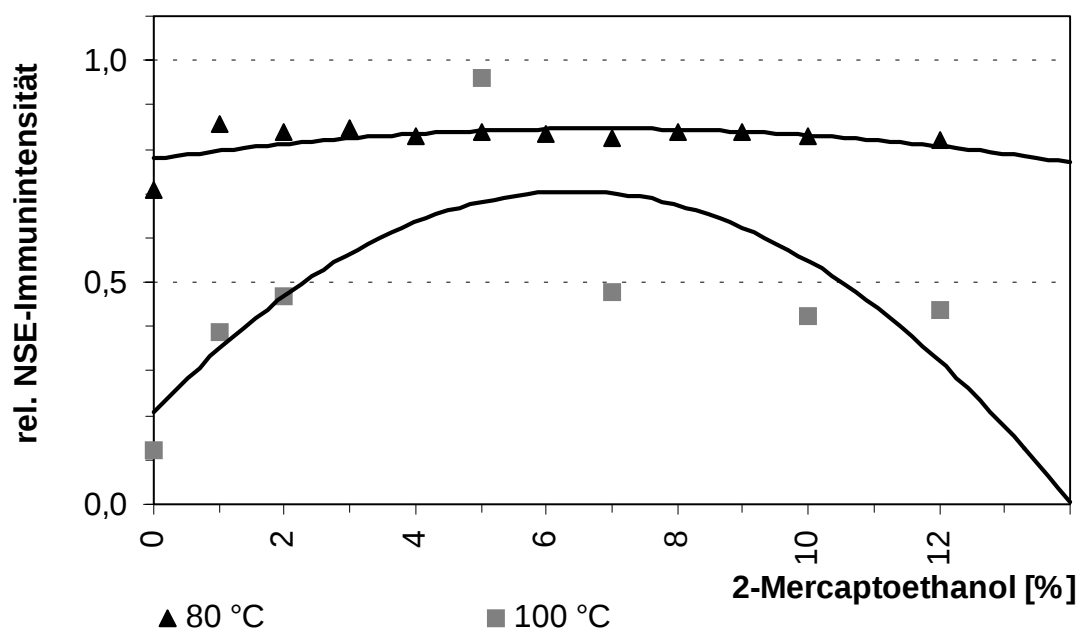


Abb. 4-13 Relative NSE-Immunintensität in Abhängigkeit der Konzentration von 2-Mercaptoethanol im Tris-Harnstoff-Extraktionspuffer

Mit Zunahme der Mercaptoethanolkonzentration zeigte sich zunächst ein Anstieg der Immunreaktivität. Die Kurve der bei 100 °C erhitzten Brühwurst hatte ihren Scheitelpunkt bei einem Zusatz von 6,9 % 2-Mercaptoethanol. Nach einer weiteren Erhöhung des 2-Mercaptoethanolanteils verringerte sich die erreichte Intensitätszunahme.

Die Steigerungskurven unterschiedlicher Temperaturen verliefen nicht gleichmäßig. So erzielt man bei einer 100 °C-erhitzten Probe eine mittlere Steigerung um das 6,5fache der Ausgangsintensität. Im Vergleich hierzu ist die Maximierung der immunchemischen Aktivität bei geringerer Erhitzung (80 °C) nicht so deutlich ausgeprägt.

Der Zusatz von 5 % 2-Mercaptoethanol in Verbindung mit L-Ascorbinsäure (5 mM) bzw. Formamid (1 %, 2 %) erbrachte keine zusätzliche Verbesserung. Die Verbindung mit DTT (1, 2, 5 mM) konnte die Intensität noch optimieren. Dabei war jedoch kein Unterschied zwischen den verschiedenen DTT-Konzentrationen festzustellen. Für weitere Untersuchungen wurde der Zusatz von 5 mM DTT zur 2-Mercaptoethanol-Extraktion (5 M/D) verwendet. In Abb. 4-14 ist der densitometrische Vergleich konventioneller Tris-Harnstoff-Extraktion mit und ohne Zusatz von 2-Mercaptoethanol (5 %, v/v) und DTT (5 mM) dargestellt (s. Anhang 32). Am Beispiel der bei 100 °C erhitzten Probe stellt man eine Maximierung der immunchemischen Aktivität um das neunfache bei Zusatz von 2-Mercaptoethanol $\pm$ DTT zur Tris-Harnstoff-Extraktion fest. Bei der 80 °C erhitzten Probe wurde die Immunintensität der NSE-Reaktion bei Zusatz von 5 mM DTT im Vergleich zum ausschließlichen Zusatz von 2-Mercaptoethanol zum konventionellen Extraktionsmittel ebenfalls gesteigert.

In Abb. 4-15 ist das dazugehörige Westernblot dargestellt.

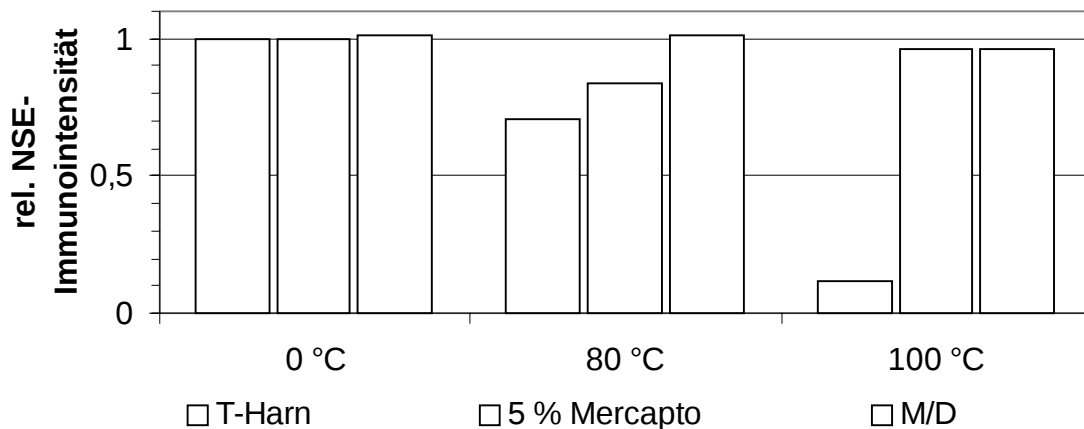


Abb. 4-14 Relative NSE-Immunitäten in Abhängigkeit des Extraktionsmittels und der Erhitzungstemperatur

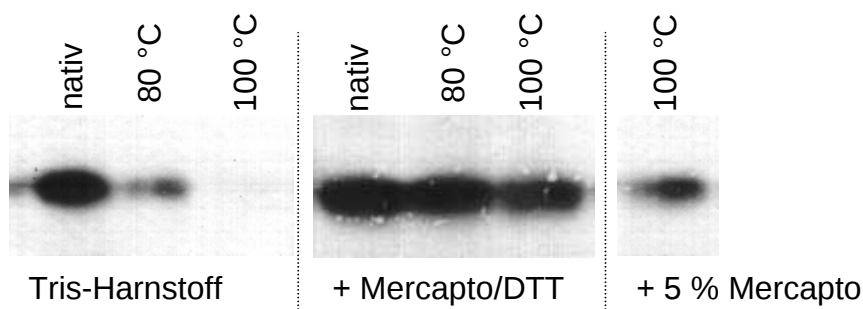


Abb. 4-15 Reaktivierung der NSE-Immunität von Brühwurst mit 5 % Hirn durch Zusatz von 5 % Mercaptoethanol $\pm$ DTT zur Tris-Harnstoff-Extraktion

In der folgenden Tabelle 4-27 ist der Vergleich der Extraktionsmittel nach Erhitzung bei 100 °C am Beispiel der Brühwurststandards mit definiertem Hirngehalt dargestellt. Die Steigerungen der Immunintensitäten wurden im Vergleich zum nativen Brühwurststandard mit 1 % Hirnanteil visuell abgeschätzt (vgl. Kap. 3.3.2.8). Bei allen dargestellten Hirnanteilen konnte eine Steigerung der wahrnehmbaren Reaktivität erzielt werden. Bei 0,1 % Hirngehalt war eine Steigerung um das dreifache festzustellen.

Tabelle 4-27 Semiquantitativer Vergleich der Immunintensitäten abhängig vom Extraktionsmittel am Beispiel der erhitzten Brühwurststandards (1 h bei 100°C)

Hirngehalt [%]	Tris-Harnstoff	Mercapto/DTT
2,0	++	+++
1,0	+	+++
0,2	+	+(+)
0,1	(+)	+(+)
0,0	-	-

Qualitative Reaktionsabstufung:

-	keine	+	gut sichtbar	+++	sehr stark
(+)	schwach	++	stark		

In Abb. 4-16 sind die NSE-Immunreaktionen des erhitzten Brühwurststandards mit einem Hirnanteil von 0 % bis 2 % dargestellt. So ist beispielsweise bei 2 % Hirnzusatz nach dem Zusatz von Mercaptoethanol/DTT gegenüber dem herkömmlichen Extraktionsmittel (T-Harn) eine deutliche Steigerung der immunchemischen Intensität erkennbar.

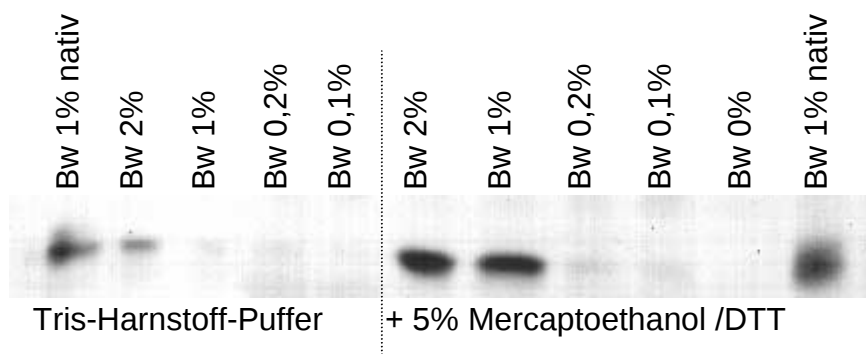


Abb. 4-16 NSE-Immunreaktion des erhitzten Brühwurststandards nach unterschiedlicher Extraktion

4.2.1.2 Konzentrierung der Extrakte

Microcon mit einer Trenngrenze von 50 kDa wurde lediglich an einem Extrakt des 1 %igen nativen Brühwurststandards getestet. Die erzielte Aufkonzentrierung lag dabei bei 14 % der eingesetzten Probenmenge. Aufgrund der geringen Untersuchungsanzahl war jedoch keine weitere Auswertung möglich.

Bei den 10 Proben, die in das Microcon-System mit einer Trenngrenze von 30 kDa überführt wurden, lag die Aufkonzentrierung zwischen 10 % und 76 % der vorher eingesetzten Probenmenge (0,5 ml). Der Median lag bei 24 %.

Weitere 27 Extrakte wurden mit Microcon 10 kDa getrennt. Die Extraktkonzentrierung belief sich hierbei zwischen 10 % und 88 % der Ausgangsmenge. Der Median lag bei 56 %. Tabelle 4-28 sowie die Abb. 4-17 stellen die Häufigkeitsverteilung der Konzentrierung nach Anwendung der Trenngrenze von 10 kDa dar. Hierbei ist erkennbar, daß bei 16 Proben die Proteine um mindestens die Hälfte ihrer Ausgangsmenge reduziert wurden. Die restlichen 11 Proben ließen sich durch die Ultrafiltration nur in geringem Maße aufkonzentrieren. Hierzu gehörte zum Beispiel ein Extrakt aus frischem Rinderhirn, das sich nur auf 88 % der eingesetzten Extraktmenge reduzieren ließ. Bei den eingesetzten Brüh- und Kochwurststandards konnte kein Zusammenhang zwischen der Aufkonzentrierung und dem Hirngehalt in der Probe festgestellt werden.

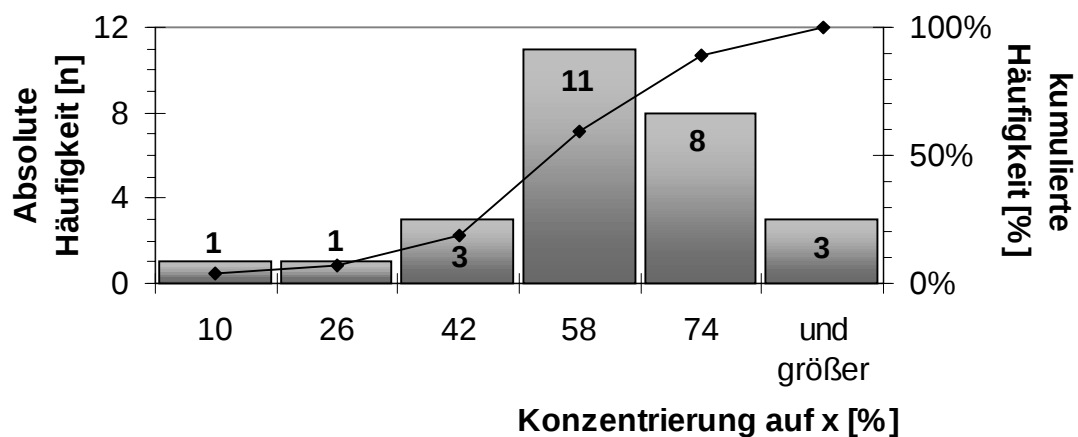
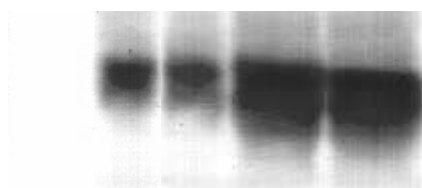


Abb. 4-17 Häufigkeitsverteilung und kumulierte Häufigkeitskurve der Konzentrierung des Probenextraktes mit Microcon 10 kDa

Tabelle 4-28 Häufigkeitsverteilung der erzielten Konzentrierung mit Microcon 10 kDa

Konzentrierung auf x der Ausgangsmenge [%]	Absolute Häufigkeit [n]	Kumulierte Häufigkeit [%]
$x < 10$	1	3,70
$10 \leq x < 26$	1	7,41
$26 \leq x < 42$	3	18,52
$42 \leq x < 58$	11	59,26
$58 \leq x < 74$	8	88,89
und größer	3	100,00

Die folgenden NSE-Immunblots zeigen anhand repräsentativer Beispiele die erzielte Steigerung der immunchemischen Reaktivität. In Abb. 4-18 wurde der Einfluß der Aufkonzentrierung anhand eines Kochwurststandards mit 1 % Hirnanteil dargestellt. Bei herkömmlicher Tris-Harnstoff-Extraktion war lediglich im Originalblot eine schwach positive NSE-Reaktion feststellbar. Durch Zusatz von Mercaptoethanol und DTT wurde diese als gut sichtbare Bande sichtbar. Dabei ist auffällig, daß sich die Immunbande des 1 %igen Kochwurststandards nach ausschließlicher Zugabe von 5 % Mercaptoethanol visuell nicht von derjenigen nach Zugabe von Mercaptoethanol und DTT unterscheidet. Durch zusätzliche Aufkonzentrierung dieses Probenextraktes konnte eine starke Reaktion nachgewiesen werden.



+	+	+	+	+	Tris-Harnstoff-Extraktion
-	+	+	+	+	+ 5 % Mercaptoethanol
-	-	+	+	+	+ 5 mM DTT
-	-	-	+	+	+ Konzentration, Trenngrenze 10 kDa

Abb. 4-18 Reaktivierung der NSE-Immunreaktion des Kochwurststandards mit 1 % Hirnanteil

Als weiteres Beispiel für die Maximierung der immunchemischen Aktivität werden im folgenden die Ergebnisse einer Kochmettwurst Konserve dargestellt (Abb. 4-19). Während die herkömmliche Tris-Harnstoff-Extraktion bei dieser im Cholesterol-Screening positiven Probe (274 mg Chol./100 g FS) ausschließlich negative NSE-Reaktionen lieferte, wurde nach der Extraktion mit Mercaptoethanol/DTT eine stark ausgeprägte Immunreaktivität erkennbar. Eine weitere Steigerung wurde nach der Aufkonzentrierung des Proteinextraktes erreicht. Dagegen zeigte Referenzmaterial ohne Zusatz von zentralnervösem Gewebe nach gleicher Probenextraktion weder eine NSE- noch eine GFAP-Reaktion.

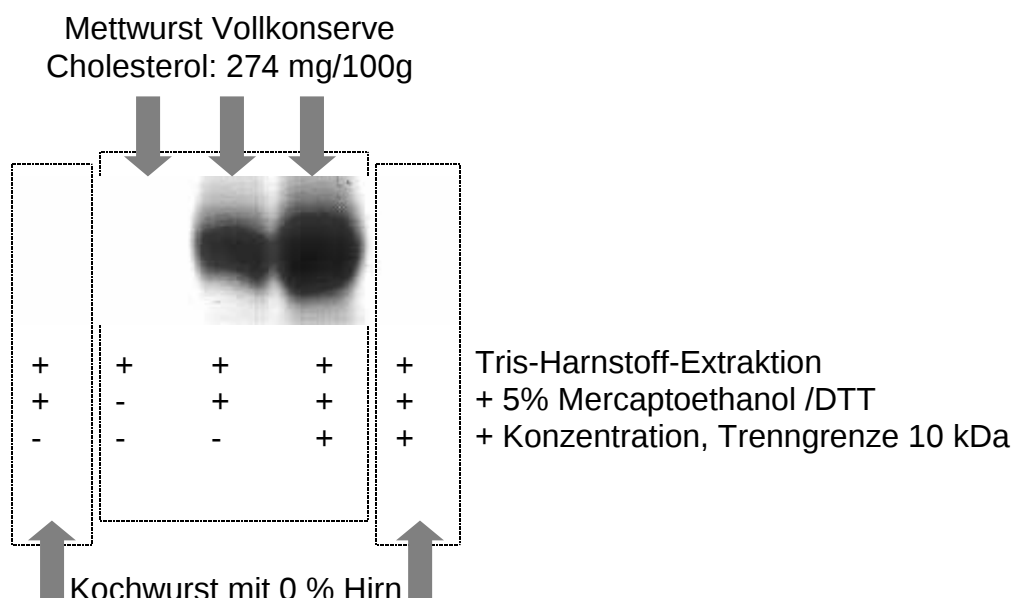


Abb. 4-19 Reaktivierung der NSE-Immunreaktion in einer Kochmettwurst Konserve

4.2.2 Laborinterne Standards

Zu der Gruppe der laborinternen Standards gehörten Würste, denen definierte Mengen an Hirn zugesetzt wurden. Sie wurden immunchemisch untersucht, um den niedrigsten noch nachweisbaren Hirnzusatz in Fleischerzeugnissen zu ermitteln. Desweiteren dienten sie als Vergleichsmaterial für die Feldproben sowie als interne Qualitätskontrolle zur Überprüfung der korrekten Durchführung der Methodik.

Im folgenden wurden die einzelnen Fleischerzeugnisgruppen getrennt voneinander dargestellt.

4.2.2.1 Rohwurststandard

Gereifte Rohwurst mit verschiedenen Hirnanteilen wurde immunchemisch nach Tris-Harnstoff-Extraktion getestet. Anhand des Immunblots (Abb. 4-20) läßt sich zeigen, daß die Intensität der Banden mit Zunahme des Hirnanteils anstieg. Der niedrigste noch nachweisbare Rohwurststandard hatte einen Hirngehalt von 0,1 %. Im Originalblot erkannte man hier eine schwach positive NSE-Reaktivität, die mit GFAP bestätigt wurde.

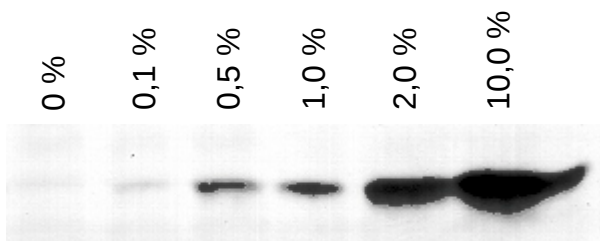


Abb. 4-20 NSE-Immunreaktivitäten des Rohwurststandards

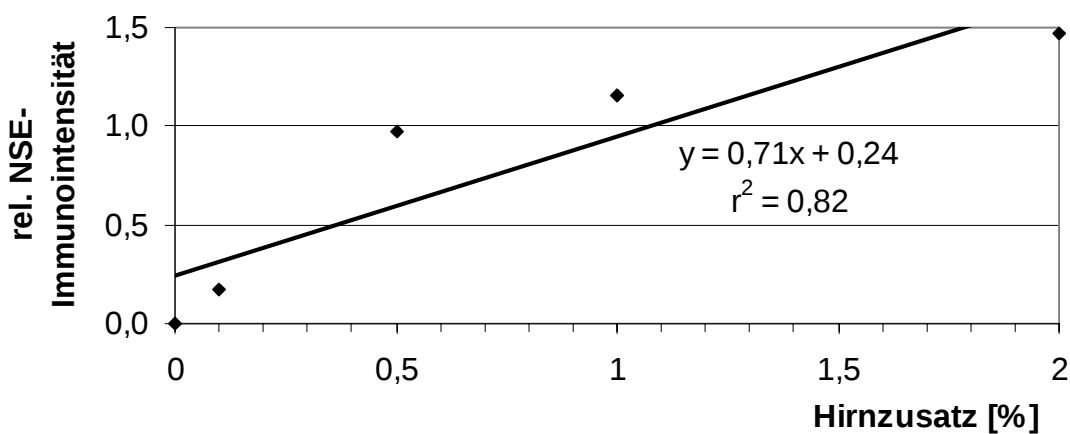


Abb. 4-21 Relative NSE-Immunintensität des Rohwurststandards

Die densitometrisch ermittelten relativen NSE-Immunintensitäten der Rohwurststandards wurden in Abb. 4-21 graphisch dargestellt (vgl. Anhang 5). Die

lineare Regressionsgerade mit der Gleichung $y = 0,71x + 0,24$ und einem Bestimmtheitsmaß von 0,82 wurde ebenfalls eingezeichnet. Hierbei bestätigte sich der visuelle Eindruck einer Intensitätszunahme der Reaktionen bei ansteigendem Hirngehalt in der Wurstprobe.

4.2.2.2 Brühwurststandard

Nativer Standard

Native Brühwurst mit verschiedenen Hirnanteilen wurde auf ihre NSE- sowie GFAP-Immunreaktion untersucht. Extrahiert wurde mit Tris-Harnstoff-Puffer. In der Regel wurden 100 μl für die SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese aufgetragen. Die folgende Abbildung (Abb. 4-22) zeigt die Immunaktivitäten der Brühwurststandards mit 0,1 % bzw. 1 % Hirnanteil nach unterschiedlicher Auftragsmenge. Eine Reduktion der eingesetzten Probenlösung (bezogen auf 100 μl) ist mit einer Verdünnung der Ausgangsprobe vergleichbar. Demzufolge ist die Reaktion des Standards mit 0,1 % Hirnzusatz bei Auftragung von 50 μl Probenlösung mit einem Standard mit einem Hirnanteil von 0,05 % annähernd vergleichbar. Die dargestellten NSE-Reaktionen des 1 %igen Hirnstandards war gut sichtbar ("++"). Dagegen waren die Reaktionen des nativen Standards mit 0,1 % Hirn schwächer, jedoch waren die Banden dieser Proben bis zu einer Auftragsmenge von 12,5 μl im Originalblot noch zu erkennen.

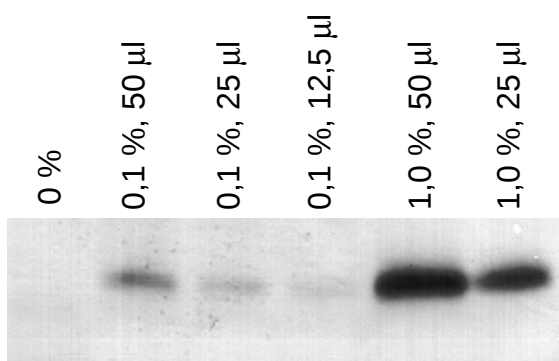


Abb. 4-22 NSE-Immunaktivitäten des nativen Brühwurststandards

Erhitzter Standard

Bei 100 °C erhitzte Brühwurstproben zeigten eine etwas geringere NSE-Immunreaktivität (Abb. 4-23) als die nativen Brühwurststandards nach Proteinextraktion mit Tris-Harnstoff-Puffer. Jedoch ist der Standard mit Zusatz von 1 % Hirn gut zu erkennen. Standards, die mit 0,2 % Hirn sowie 0,1 % Hirnanteil hergestellt wurden, wiesen im Originalblot lediglich eine schwache NSE-Bande auf, die mit GFAP bestätigt wurden. Nach Optimierung des Extraktionsmittels durch den Zusatz von Mercaptoethanol/DTT wurde die Immunaktivität bei allen erhitzten Brühwurststandards verbessert.

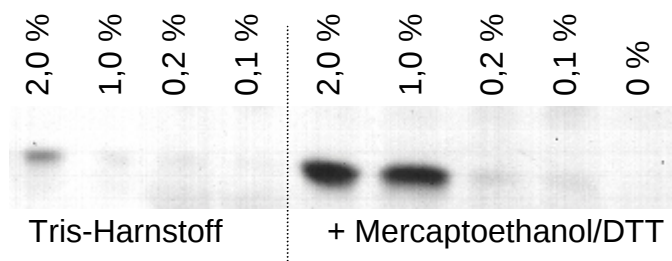


Abb. 4-23 NSE-Immunaktivitäten des erhitzten Brühwurststandards

Die relativen NSE-Immunintensitäten des erhitzten Brühwurststandards wurden in Abb. 4-27 (Kapitel 4.2.3.1) dargestellt. Die lineare Regression mit der Gleichung $y = 0,77x + 0,03$ bei einem Bestimmtheitsmaß von 0,97 beschreibt die Beziehung zwischen der relativen Immunintensität und dem Hirnzusatz in der Probe. Die Standardabweichungen der Werte lagen zwischen 0,07 und 0,48 relative Intensität.

4.2.2.3 Kochwurststandard

Als Referenzmaterial für die Gruppe Kochwurst diente eine erhitzte Leberwurst mit verschiedenen Anteilen an Rinderhirn. Bei herkömmlicher Tris-Harnstoff-Extraktion wies der Standard mit einem Hirnanteil von 0,5 % die schwächste noch erkennbare NSE-Immunaktivität auf (Westernblot nicht dargestellt). Durch Optimierung des Extraktionsmittels (s. Kap. 4.2.1) konnte noch ein Kochwurst-

standard mit 0,25 % Hirnzusatz im Westernblot als schwache Immunreaktion festgestellt werden (Abb. 4-24).

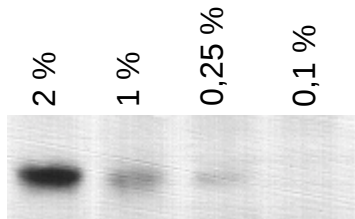


Abb. 4-24 NSE-Immunaktivitäten des Kochwurststandards nach Extraktion mit Mercaptoethanol/DTT

4.2.3 Externe Standards

Die vom Institut für Veterinärwesen in Bern sowie vom Staatlichen Medizinal-, Lebensmittel- und Veterinäruntersuchungsamt Südhessen, Außenstelle Frankfurt am Main zur Verfügung gestellten Brühwurstproben, wurden mit dem immunchemischen Nachweisverfahren auf ihre NSE- sowie GFAP-Reaktion getestet.

4.2.3.1 Schweizer Referenzmaterial

Die immunchemischen Untersuchungen der Proben ergaben bei fast allen eine NSE-Immunintensität, die mit der GFAP-Reaktion bestätigt werden konnte. Abb. 4-25 zeigt die NSE- sowie die GFAP-Reaktionen im Vergleich. Hierbei stellten sich die Proben G5, G1 und G2 als deutlich sichtbare Banden in beiden Immunblots dar. G3, G4, G7 und G8 waren im NSE-Blot schwächer zu erkennen. Dagegen zeigten sie in der Bestätigungsreaktion mit dem Sauren Gliafaserprotein (GFAP) eine deutliche Immunreaktion. Bei den Proben G6 und G9 konnte mit bloßem Auge in beiden Immunblots keine Bande festgestellt werden. Zum Vergleich wurden die Reaktionen laborinterner Standards wie natives Rinderhirn, Brühwurststandard mit einem Hirnanteil von 0 % und 1 % sowie der Kochwurststandard mit Zusatz von 1 % Hirn, die sich auf dem gleichen Immunblot befanden, herangezogen. Soweit nichts anderes vermerkt ist, wurden die Proben mit Tris-Harnstoff-Puffer extrahiert.

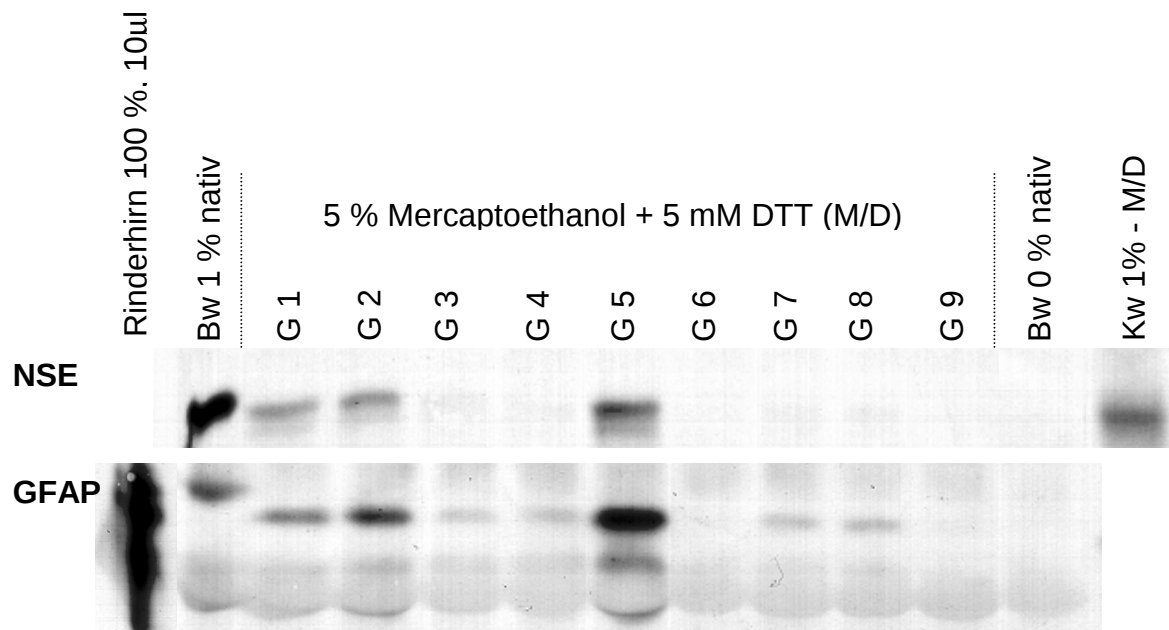


Abb. 4-25 Vergleich der immunchemischen Reaktion von NSE und GFAP

Um die NSE-Gehalte qualitativ besser abzustufen, wurde densitometrisch die relative NSE-Immunität herangezogen (s. Kap. 3.3.2.8). Die Ergebnisse wurden in Abb. 4-26 graphisch dargestellt. Dabei wurden die Wurstproben nach ihrer Nummer von links nach rechts aufgetragen. Die Standardabweichungen der Werte lagen zwischen 0,01 und 0,17. Aufgrund der relativen NSE-Immunitäten wurde deutlich, daß die Proben G1, G2 und G5 einen höheren Hirngehalt besitzen müssen als die restlichen Proben, da sie Werte von über 0,5 aufwiesen. G5 lag mit 0,97 relativer Intensität in der Nähe des laborinternen Brühwurststandards mit 1 % Hirnzusatz, der eine relative NSE-Immunität von 1,0 hatte. Dagegen zeigten die Proben G3, G4 sowie G6 bis G9 Werte zwischen 0,04 und 0,12.

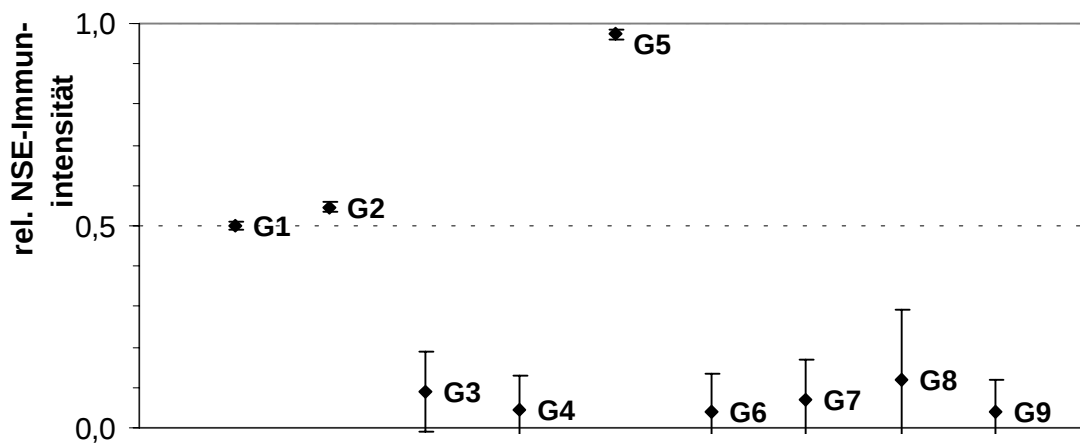


Abb. 4-26 Graphische Darstellung der relativen NSE-Immunintensität sowie der Standardabweichung

Zur qualitativen Einteilung der Proben wurden die Rangordnungszahlen in Bezug auf die relative NSE-Immunintensität bestimmt (Tabelle 4-29). Im Vergleich mit der tatsächlich zugesetzten Hirnmenge wurden fast alle Proben richtig erkannt und klassifiziert. Lediglich die Probe G9 mit einem Hirnanteil von 0,01 % wurde falsch bewertet.

Tabelle 4-29 Relative NSE-Immunintensität des Schweizer Referenzmaterials

Hirn [%]	Probe	Relative NSE-Immunintensität	Statistische Parameter	
			sd	Rang
1,00	G5	0,97	0,01	1
0,50	G1	0,50	0,01	3
0,50	G2	0,55	0,01	2
0,10	G3	0,09	0,10	5
0,10	G8	0,12	0,17	4
0,05	G4	0,05	0,08	7
0,05	G7	0,07	0,10	6
0,01	G9	0,04	0,08	8,5
0,00	G6	0,04	0,09	8,5

Im folgenden wurden die densitometrischen Werte des Schweizer Referenzmaterials mit den relativen NSE-Intensitäten des laborinternen erhitzten Brühwurststandard verglichen.

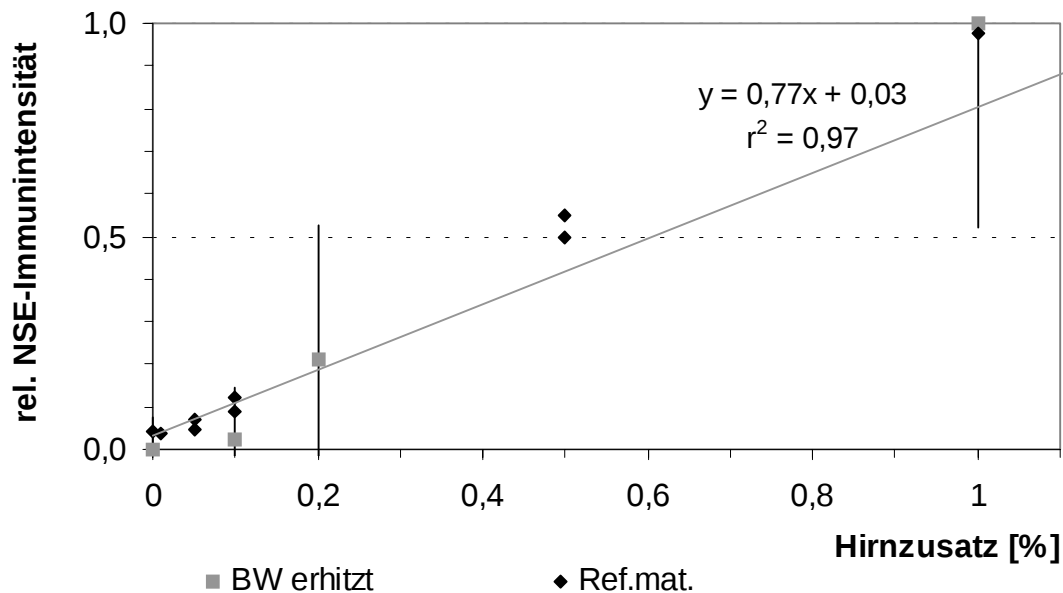


Abb. 4-27 Vergleich der relativen NSE-Immunintensitäten des Schweizer Referenzmaterials (Ref.mat.) und des erhitzten laborinternen Brühwurststandards (Bw) (lineare Trendlinie)

In Abb. 4-27 wurde neben den relativen NSE-Immunintensitäten des Schweizer Referenzmaterials der lineare Zusammenhang zwischen der relativen NSE-Immunintensität und dem Hirnzusatz des erhitzten laborinternen Brühwurststandards (Kap. 4.2.2.2) dargestellt. Die eingezeichnete Regressionsgerade wies ein Bestimmtheitsmaß von 0,97 auf. Mittels dieser Geraden konnten die externen Schweizer Proben einem Hirngehalt zugeordnet werden. Während die Proben G6, G4, G7, G3 und G8 (Hirngehalte zwischen 0 % und 0,1 %) dicht an der Regressionsgeraden lagen, befanden sich die restlichen Schweizer Referenzproben G1, G2 sowie G5 oberhalb der Geraden. Berechnet man den Hirnzusatz der Proben G1 und G2 mittels der Regressionsgleichung, erhält man einen vermuteten Hirngehalt von 0,64 %. Nach der gleichen Berechnung müßte

die Probe G5 einen Hirnzusatz von 1,2 % enthalten. Diese Gehalte stimmen jedoch nicht genau mit den tatsächlichen Hirnanteilen in den Proben überein. Allerdings lag die relative Immunintensität der Probe G5 mit 0,97 dicht bei dem Wert des laborinternen Brühwurststandards, wie in der Abb. 4-27 erkennbar wird.

4.2.3.2 Frankfurter Referenzmaterial

Die unbekannten Proben S0 bis S2 wurden mittels NSE- sowie GFAP-Antikörper auf den Zusatz von ZNS untersucht. Die Probe S1 zeigte dabei keine Immunreaktion. Bei Probe S2 und S0 wurden nach herkömmlicher Tris-Harnstoff-Extraktion gut sichtbare NSE-Reaktionen nachgewiesen, die mit GFAP bestätigt wurden. Durch Zusatz von Mercaptoethanol/DTT (M/D) zum Extraktionsmittel konnte eine deutliche Verstärkung der Immunreaktionen erreicht werden (Abb. 4-28 und 4-29). Als Vergleich diente ein laborinterner Brühwurststandard mit 1 % Hirnanteil, eine Bregenwurst mit einem Hirngehalt von 15 % sowie natives Rinderhirn.

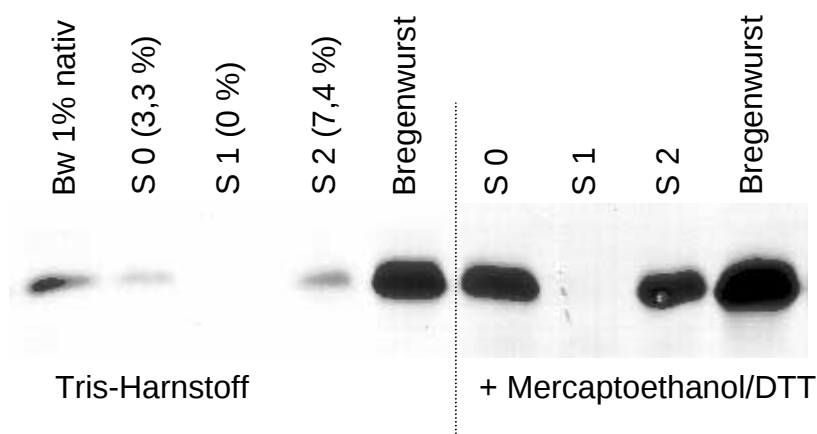


Abb. 4-28 NSE-Immunreaktion des Frankfurter Referenzmaterials S0 bis S2 bei herkömmlicher und optimierter Extraktion

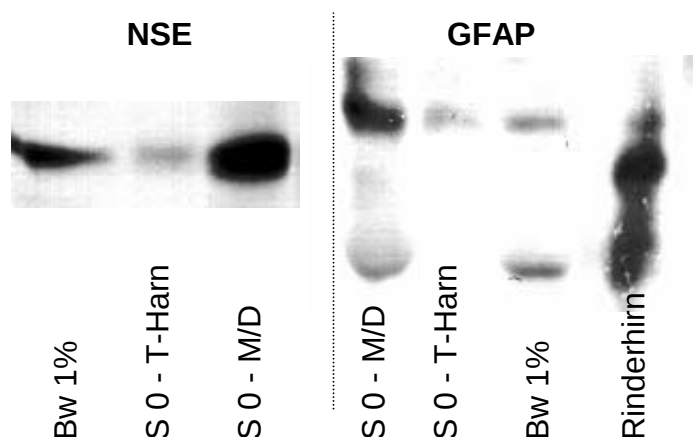


Abb. 4-29 Vergleich der NSE- und GFAP-Immunintensität der Probe S0 (3,3 % Hirnanteil) nach herkömmlicher (T-Harn) sowie optimierter Extraktion (M/D)

4.2.4 Feldproben

Insgesamt wurden 402 Feldproben immunchemisch auf das Vorhandensein von zentralnervösem Gewebe untersucht. Die Auswertung der Ergebnisse erfolgte getrennt nach Erzeugnisgruppen.

4.2.4.1 Rohwurst

Insgesamt wurden 20 Rohwurstproben immunchemisch auf zentralnervöses Gewebe untersucht. Dabei zeigte eine Probe eine schwach positive („(+)“) NSE-Reaktion (s. Kap. 3.3.2.8), die mit GFAP bestätigt werden konnte.

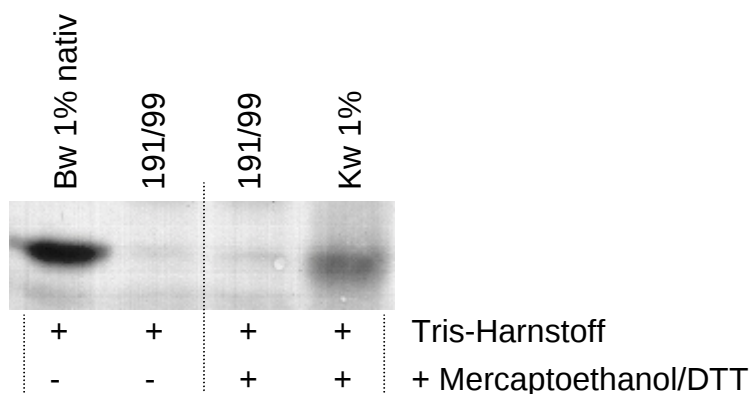


Abb. 4-30 NSE-Immunintensität einer Salami (191/99) nach Tris-Harnstoff- sowie Mercaptoethanol-DTT-Extraktion

Abb. 4-30 zeigt das NSE-Immunblot dieser Probe. Es handelte sich hierbei um eine Salami (191/99) aus der Schweiz. Nach dem Zusatz von Mercaptoethanol/DTT zum herkömmlichen Tris-Harnstoff-Extraktionsmittel stellte sich die Immunintensität etwas deutlicher dar.

4.2.4.2 Brühwurst

Nach immunchemischer Untersuchung von 79 Brühwürsten konnte in 16 Proben der Zusatz von ZNS mit NSE- sowie GFAP-Antikörperreaktionen nachgewiesen werden. Bezogen auf die gesamte Stichprobe von 164 sind dies 9,8 %. Dabei zeigten 50 % von diesen 16 positiven Brühwürsten eine schwache Immunreaktion (vgl. Abb. 4-31) (Kap. 3.3.2.8). Sieben NSE-Intensitäten entsprachen der Immunreaktion des Referenzmaterials mit Zusatz von 1 % Rinderhirn und wurden deshalb mit „+“ bewertet. Eine Immunbande wies nach qualitativ-visueller Beurteilung eine stärkere NSE-Reaktion als das Referenzmaterial auf („++“).

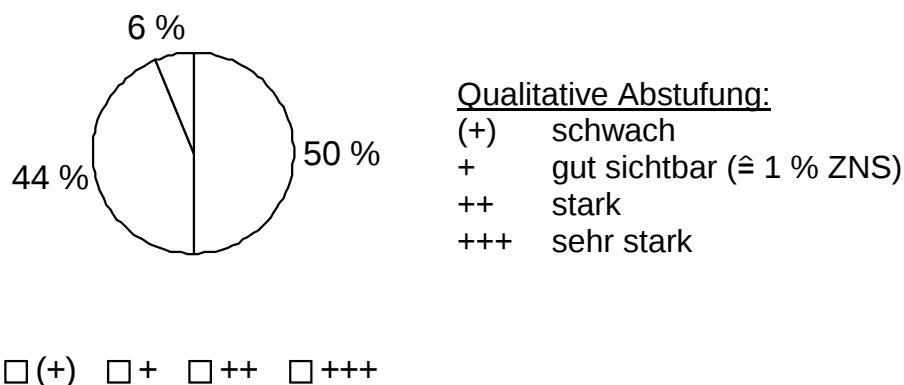


Abb. 4-31 Vorkommen definierter qualitativer NSE-Immunintensitätsgrade 16 positiver Brühwürste

Abb. 4-32 und 4-33 zeigen beispielhaft NSE-Immunreaktionen einiger Feldproben. Neben einer positiven Mettwurst (140/99) (s. Kap. 4.2.4.3.2) und einer negativen Leberwurst (141/99) (s. Kap. 4.2.4.3.1) wiesen drei Mortadella-Würste (147/99 bis 149/99) im Originalblot schwach positive NSE-Immunintensi-

täten auf. Dagegen wurde bei den Brühwürsten 150/99 und 151/99 keine NSE-Reaktion nach Mercaptoethanol-DTT-Extraktion nachgewiesen.

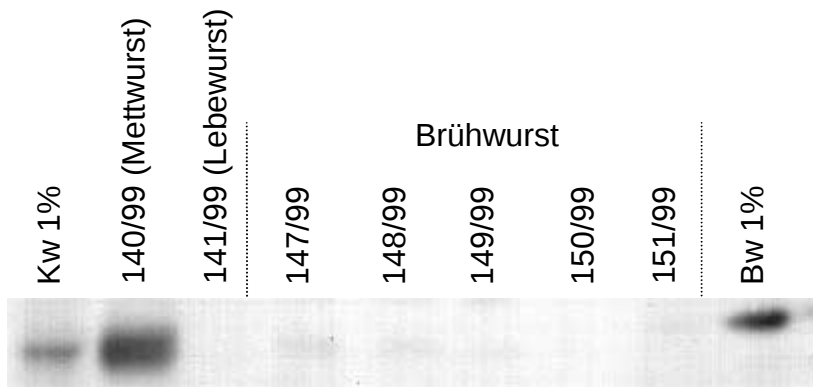


Abb. 4-32 NSE-Immunitäten schwach positiver Brühwurst-Feldproben (147/99 bis 149/99) nach Mercaptoethanol-DTT-Extraktion

In Abb. 4-33 ist ein Auszug des NSE-Immunblots mit sechs Brühwurstproben dargestellt. Nr. 6 sowie Nr. 9 ließen nach optimierter Proteinextraktion eine schwache Immunreaktion („(+)“) erkennen. Hingegen zeigten die restlichen vier Proben keine Immunbande.

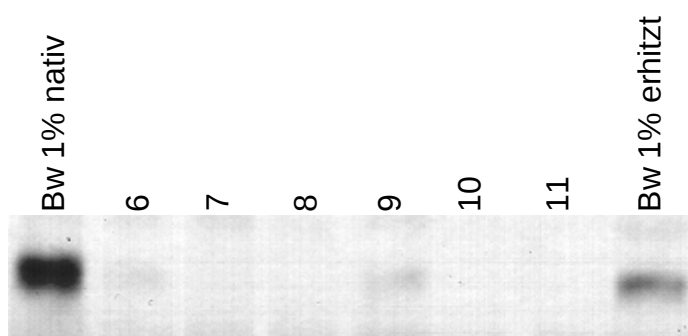


Abb. 4-33 NSE-Immunreaktionen schwach positiver Brühwurstproben (Nr. 6 und 9) nach Mercaptoethanol-DTT-Extraktion

4.2.4.3 Kochwurst

Hierunter fallen Leberwürste, Kochmettwürste, Blutwürste sowie Sülzen und Preßwürste. Im folgenden wurde jede Erzeugnisgruppe auf spezifische Proteine des ZNS untersucht. Die Auswertung erfolgte ungeachtet der unterschiedlichen Erhitzungsverfahren der Proben.

4.2.4.3.1 Leberwurst

Von einer Gesamtmenge von 257 untersuchten Leberwürsten unterschiedlicher Technologie und Qualität zeigten 9,7 % eine positive NSE-Reaktion, die mit GFAP bestätigt wurde. Nach rein-visueller Qualitätsabstufung der NSE-Immunitäten (s. Kap. 3.3.2.8) lagen zehn Feldproben unter der Intensität des Referenzmaterials mit einem Zusatz von 1 % Rinderhirn und wurden deshalb mit „(+)“ bewertet (Abb. 4-34). 60 % der 25 positiven Leberwürste wiesen eine gut bis sehr stark sichtbare NSE-Bande auf, wobei sechs Feldproben dem Vergleichsstandard mit 1 % Hirnanteil in seiner Intensität entsprachen („+“). Die restlichen neun für den Zusatz von ZNS-positiven Leberwürste wiesen eine stärkere NSE-Reaktion als der 1 %ige Standard auf, wobei drei mit „++“ und sechs mit „+++“ beurteilt wurden.

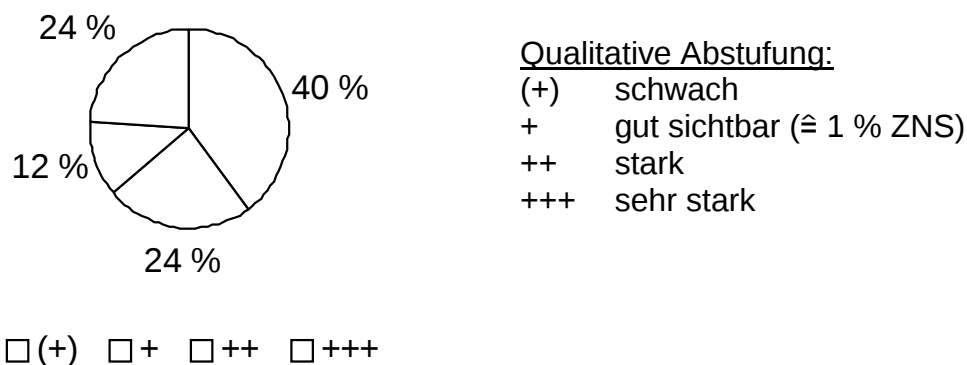


Abb. 4-34 Vorkommen definierter qualitativer NSE-Immunitätsgrade 25 positiver Leberwürste

Probenkollektiv A

Im Probenkollektiv A mit 126 feinen Leberwürsten der Spitzenqualität zeigten 12 Proben eine immunchemische Reaktion, wobei die Reaktion teilweise visuell schwach und teilweise sehr deutlich zu erkennen waren. In Tabelle 4-30 sind die einzelnen Ergebnisse des immunchemischen ZNS-Nachweises sowie ihr Gesamtcholesterolgehalt aufgelistet. Außerdem wurden die Immunblot-Ergebnisse verschiedener Extraktionsmittel mit und ohne vorheriger Entfettung der Probe miteinander verglichen. Dabei wurde festgestellt, daß bei 5 Proben (4 %) unter Verwendung der herkömmlichen Tris-Harnstoff-Extraktion (T-Harn) ZNS-Proteine nachgewiesen werden konnten. Die vorherige Entfettung der Leberwürste (Kap. 3.3.2.3.3) erbrachte lediglich eine Steigerung um 20 % bei gleicher Extraktionsmethode. Nach Optimierung des Extraktionsmittels durch Zusatz von 5 % Mercaptoethanol und 5 mM DTT konnte die Zahl der ursprünglich als ZNS-positiv nachgewiesene Proben verdoppelt werden. So war eine schwach positive Immunreaktion bei Proben zu beobachten, die bei herkömmlicher Extraktionsmethode als negativ beurteilt wurden. Durch die zusätzliche Entfettung der Proben konnte der Anteil, in denen der Zusatz von ZNS nachgewiesen wurde, von 4 % auf 9,5 % (12) erhöht werden.

Werden die immunchemischen Ergebnisse im Hinblick auf den Cutoff-Point normaler Cholesterolgehalte ausgewertet, so ist folgendes festzustellen: Durch den Zusatz von Mercaptoethanol und DTT zum herkömmlichen Extraktionsmittel wurden zusätzlich drei Proben als positiv erkannt, die zwar über dem Grenzwert 150 mg/100 g lagen, jedoch nach Tris-Harnstoff-Extraktion nicht erfaßt wurden. Bei Erniedrigung des Cutoffs auf 130 mg/100 g ist dieser Unterschied noch deutlicher ausgeprägt. Hier erreichte man eine Steigerung um 50 % auf 10 von 12 positiven Proben. Durch die zusätzliche Entfettung wurden insgesamt 11 Proben erkannt, die über diesem Cutoff-Point lagen.

Durch den Einsatz des schwefelhaltigen Extraktionsmittels (M/D) war eine Verstärkung der Immunaktivität zu erreichen. So zeigte sich bei Probe 21 eine starke Immunreaktion („+++“) im Gegensatz zu „+“ bei der herkömmlichen

Extraktionsmethode (Abb. 4-35 und 4-36). Damit läßt sich auch erklären, daß Proben mit einem Cholesterolgehalt unter 152 mg/100 g FS, die bei der herkömmlichen Tris-Harnstoff-Extraktion keine immunchemische Aktivität zeigten, durch Zusatz von Mercaptoethanol/DTT eine schwache NSE-Reaktion aufwiesen.

Tabelle 4-30 NSE- sowie GFAP-Immunaktivität sowie Gesamtcholesterolgehalte der ZNS-positiven Proben

Probe	Cholesterol [mg/100 g]	NSE				GFAP		Marker
		T-Harn		M/D		M/D		Extraktion
		-	+	-	+	-	+	Entfettung
51	285,8	++	+++	+++	+++	++		
21	227,1	+	+	+++	+++	++		
92	160,2	+	+	++	+++	++		
71	156,4	-	+	(+)	+		+	
36	156,2	(+)	(+)	+	++	++		
2	155,7	-	-	(+)	(+)	+		
46	152,2	+	-	+	++	++		
32	151,4	-	-	(+)	(+)	+		
63	149,6	-	-	(+)	(+)	+		
88	141,7	-	-	(+)	+		+	
119	140,1	-	(+)	-	(+)		(+)	
64	129,4	-	-	-	(+)		(+)	
		5	6	10	12	8	4	Gesamt [n]

T-Harn: Tris-Harnstoff-Extraktion

M/D: 5 % Mercaptoethanol + 5 mM DTT

Qualitative Reaktionsabstufung:

-	keine	+	gut sichtbar	+++	sehr stark
(+)	schwach	++	stark		

Abb. 4-35 gibt eine Übersicht über die relativen NSE-Immunintensitäten einiger positiver sowie negativer Feldproben. Durch den Zusatz von Mercaptoethanol/DTT (M/D) wurde bei fast allen Proben eine deutliche Steigerung um bis zu 1,1 erreicht. So zeigten fünf Proben bei herkömmlicher Tris-Harnstoff-Extraktion

(T-Harn) eine qualitativ schwache NSE-Immunreaktion mit einem relativen Wert von unter 0,2. Durch die zusätzliche Entfettung (entf) der Proben wurde keine sichtbare Steigerung erzielt. Durch die Mercaptoethanol-DTT-Extraktion wurde die qualitative Immunintensität in den Bereich „+“ bis „++/+++“ angehoben. Bei Probe 51 war diese Steigerung geringer ausgeprägt. Die relativen NSE-Immunreaktivitäten lagen hierbei in einem Bereich zwischen 0,93 und 1,19. Negative Feldproben (5, 68 sowie 124) zeigten weder bei herkömmlicher bzw. optimierter Extraktion noch nach vorheriger Entfettung eine NSE- oder GFAP-Reaktion.

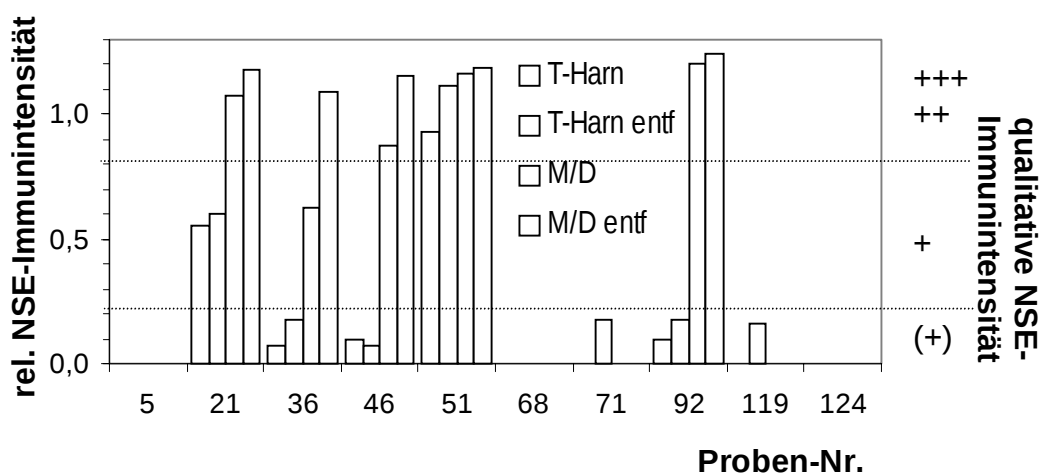


Abb. 4-35 Relative sowie qualitative NSE-Immunintensitäten ausgewählter Leberwurstproben nach Entfettung (entf) und Anwendung Tris-Harnstoff-Extraktion (T-Harn) sowie Zusatz von Mercaptoethanol/DTT (M/D)

In den folgenden Abbildungen sind die Immunbanden positiver sowie negativer Proben im Vergleich zu laborinternen Standards dargestellt.

In den Abb. 4-36 und 4-37 wird die Wirkung der Entfettung sowie der optimierten Extraktion sichtbar. Während die Probe 36 bei der herkömmlichen Tris-Harnstoff-Extraktion nur eine schwache Reaktion zeigte, war nach dem Zusatz von Mercaptoethanol/DTT eine deutlich positive NSE-Immunbande erkennbar. Durch die zusätzliche Entfettung dieser Probe erzielte man eine weitere Steigerung der Reaktion. Bei den Proben 21 und 51 war nach der optimierten Extraktion ebenfalls eine Verstärkung der Immunreaktion feststellbar. Das Aus-

bleiben einer Reaktion bei der negativen Kontrolle (Probe 5) zeigte, daß keine falsch positiven Reaktionen zu erwarten sind.

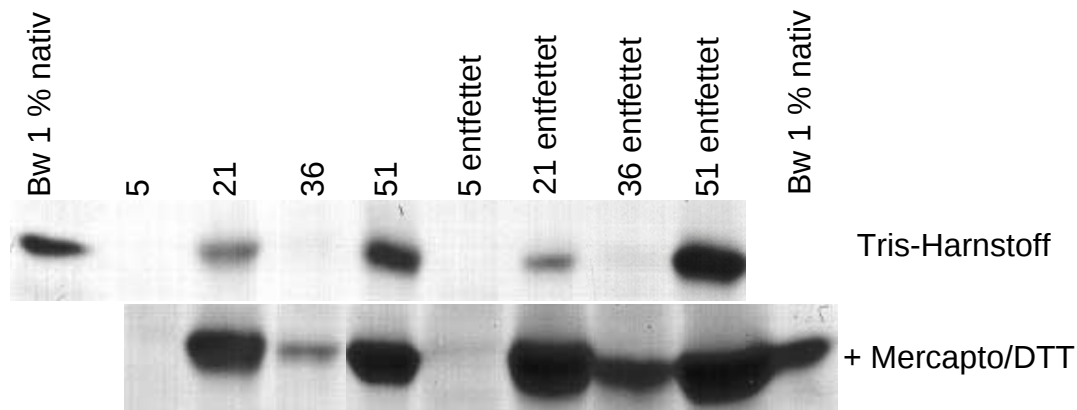


Abb. 4-36 NSE-Immunbanden mit und ohne Entfettung positiver und negativer (Nr. 5) Proben bei herkömmlicher Tris-Harnstoff-Extraktion und nach Zusatz von Mercaptoethanol/DTT

Eine deutliche Steigerung der NSE-Intensität wurde ebenfalls bei den Proben 46 und 92 nach Anwendung der Mercaptoethanol/DTT-Extraktion erreicht (Abb. 4-37). Die Proben 68 und 69 dienten als Negativkontrollen.

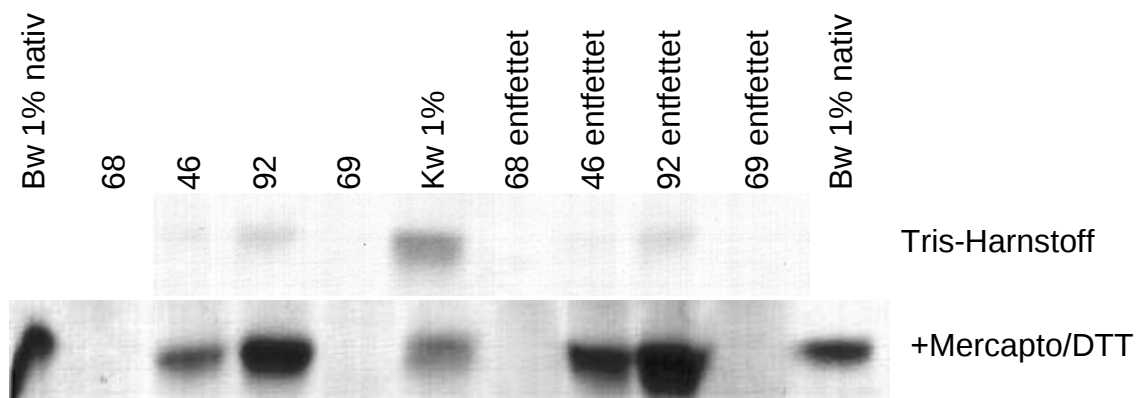


Abb. 4-37 NSE-Immunbanden mit und ohne Entfettung positiver und negativer (Nr. 68, 69) Proben bei herkömmlicher Tris-Harnstoff-Extraktion und nach Zusatz von Mercaptoethanol/DTT

Die NSE-Immunreaktionen der positiven Proben dieses Probenkollektives wurden durch Reaktion mit einem zweiten Marker, dem Sauren Gliafaserprotein (GFAP), bestätigt. Bei Auswertung des Westernblots sind die oberen zwei Banden im Vergleich mit dem Referenzmaterial Rinderhirn ausschlaggebend. Abb. 4-38 stellt die immunchemischen GFAP-Reaktionen einiger ausgewählter Proben, die eine gut sichtbare NSE-Reaktion zeigten, dar. Negative Kontrollen zeigten lediglich eine schwache unspezifische Reaktion. Auf die Darstellung der schwach positiven GFAP-Reaktionen weiterer positiver Feldproben wurde an dieser Stelle verzichtet.

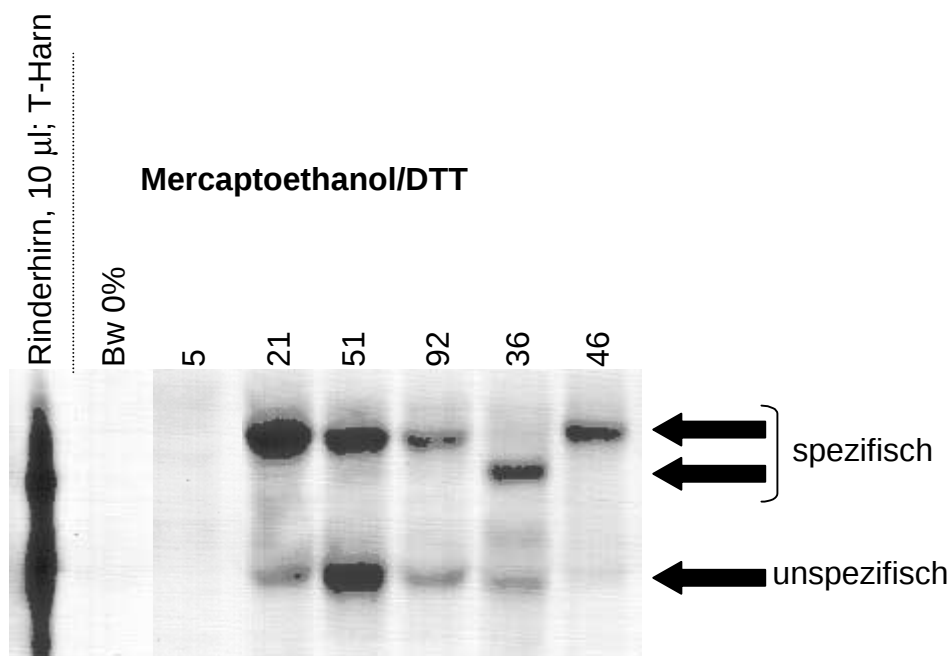


Abb. 4-38 GFAP-Immunblot mit spezifischen und unspezifischen Immunbanden positiver und negativer (Nr. 5) Proben

Als Beispiel für eine schwach positive NSE-Immunintensität wurden in Abb. 4-39 die Proben 71 und 119 nach Entfettung bei herkömmlicher Extraktion dargestellt. Dagegen waren bei den Proben 69 und 91 keine Reaktionen zu erkennen.

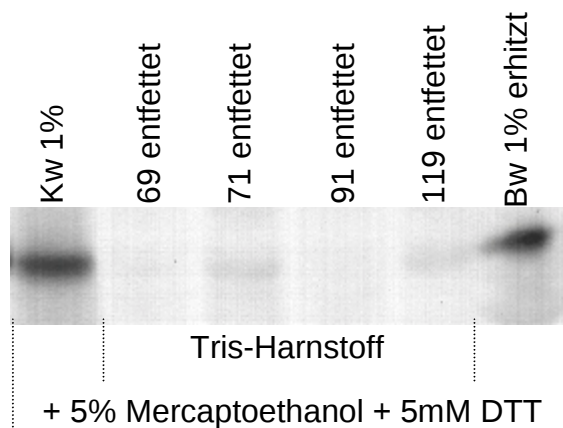


Abb. 4-39 NSE-Immunblot der schwach positiven Proben 71 und 119 sowie negativer Proben 69 und 91

Probenkollektiv B

Im Probenkollektiv B mit 113 untersuchten Leberwürsten zeigten 13 Proben eine NSE-Immunreaktivität, die mit GFAP bestätigt wurde.

Schwach positive NSE-Reaktionen zweier Leberwurst-Feldproben (BCB-003 sowie -016) werden in Abb. 4-45 (S. 149) gezeigt. Beide Proben wurden mit Mercaptoethanol/DTT extrahiert. In früheren Untersuchungen mit herkömmlicher Tris-Harnstoff-Extraktion zeigten beide Proben keine Immunaktivität (Daten nicht dargestellt). Bei Probe BCB-003 erfolgte vor der Extraktion zusätzlich eine Entfettung der Probe, um so eine Reaktivierung der Immunintensität zu erzielen.

In einer feinen Leberwurst mit der internen Bezeichnung BCB-012 (Charge 1998) wurde eine deutliche NSE-Reaktion festgestellt, die mit GFAP bestätigt werden konnte (Abb. 4-40). In Folgeuntersuchungen zweier weiterer Chargen der gleichen Leberwurst aus dem Jahre 1998 (BCB-030a/b) wurde ebenfalls zentralnervöses Gewebe nachgewiesen. Gemäß den Angaben des Herstellers wurde die untersuchte Delikateßleberwurst schon immer mit einem Zusatz von 4,6 % Schweinehirn hergestellt. Aufgrund unserer immunchemischen Ergeb-

nisse wurde diese Rezeptur nach 1998 umgestellt, so daß in einer vierten Leberwurstprobe der gleichen Art mit der internen Bezeichnung 98/00 (Charge 2000) kein ZNS mehr nachweisbar war.

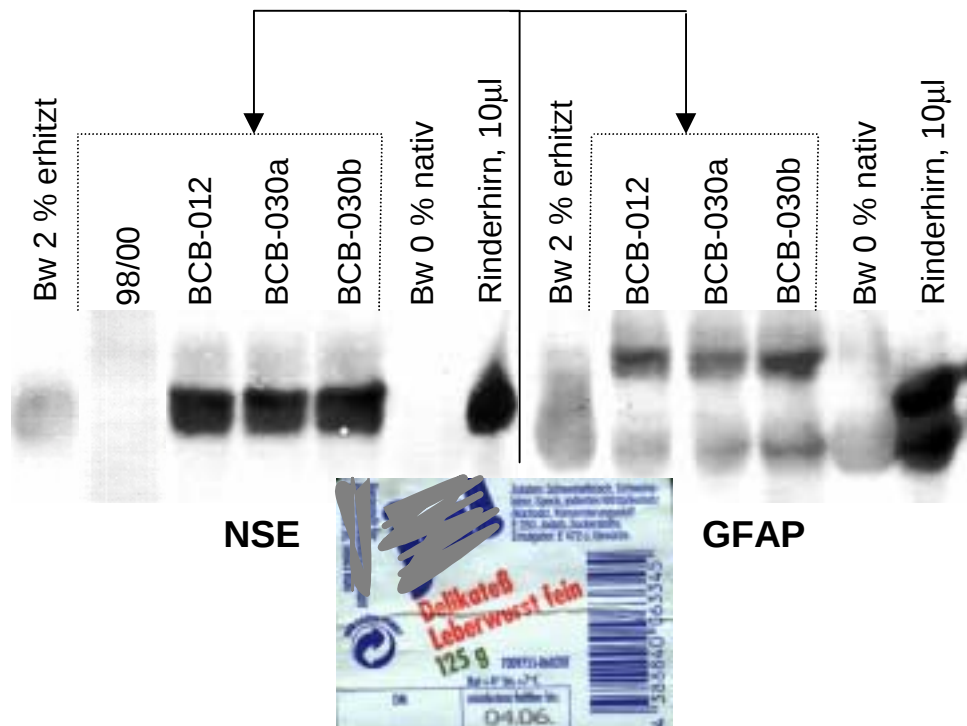


Abb. 4-40 Vergleich von NSE- und GFAP-Immunreaktivitäten einer feinen Leberwurst (verschiedene Chargen) nach Mercaptoethanol-DTT-Extraktion

4.2.4.3.2 Kochmettwurst

In der Gruppe der Kochmettwürste konnte in 21 % (17 von 81) der Stichprobe der Zusatz von ZNS nachgewiesen werden. Die NSE-Immunreaktionen, die mit GFAP bestätigt werden konnten, wurden visuell definierten Ausprägungsgraden (s. Kap. 3.3.2.8) zugeordnet (Abb. 4-41). Hierbei wiesen zwei der positiven Proben eine schwach erkennbare Immunbande („(+)“) auf. 11 (64,7 %) Kochmettwürste entsprachen in ihrer Intensität qualitativ dem Brühwurststandard mit 1 % ZNS-Anteil und wurden mit „+“ bewertet. Die restlichen vier positiven Feldproben zeigten „stark“ ausgeprägte NSE-Immunbanden, wobei eine Bande sogar mit „+++“ bewertet wurde.

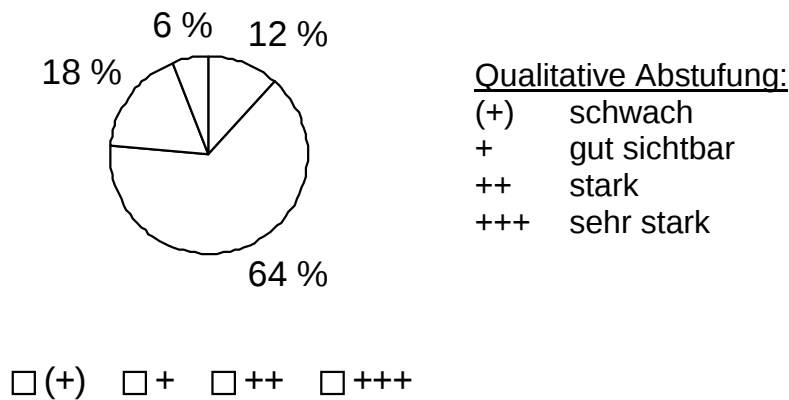


Abb. 4-41 Vorkommen definierter qualitativer NSE-Immunitätsgrade 17 positiver Mettwürste

Im folgenden werden einige ausgewählte Immunblots dargestellt und ausgewertet. Abb. 4-42 stellt NSE-Immunitäten von Mettwurstproben im Vergleich zu laborinternen Koch- (Kw) und Brühwurst- (Bw) Standards mit einem Zusatz von 1 % Rinderhirn dar. Deutlich erkennbare Reaktionen wurden bei den Proben 161/99 und 162/99 festgestellt. Daneben war im Originalblot eine schwach positive Reaktion bei der Probe 160/99 nach Mercaptoethanol-DTT-Extraktion zu erkennen. Die Proben 159/99 und 165/99 wiesen dagegen keine Immunbanden auf.

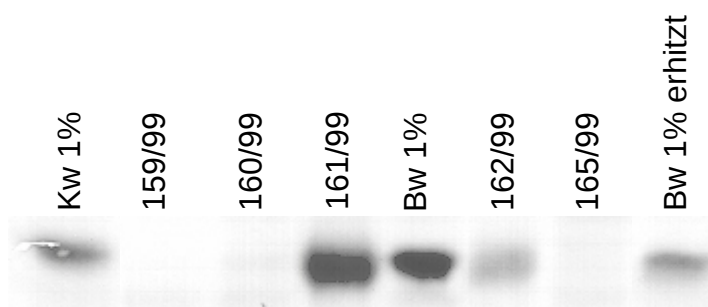


Abb. 4-42 NSE-Immunblot mit positiven und negativen (159/99, 165/99) Mettwurstproben nach Mercaptoethanol-DTT-Extraktion

In Abb. 4-43 sind schwach positive („(+)“) NSE-Immunitäten (181/99, 182/99) sowie gut sichtbare („(+)“) Immunbanden (183/99, 184/99) nach Mercaptoethanol-DTT-Extraktion zu erkennen. Die Proben 187/99 und 188/99 zeigten keine Reaktion.



Abb. 4-43 NSE-Immunblot mit positiven und negativen (187/99, 188/99) Mettwurstproben nach Mercaptoethanol-DTT-Extraktion

Als weiteres Beispiel zeigt Abb. 4-44 ein NSE-Blot mit drei positiven Kochmettwürsten BCB-015, -017 und -031, die im enzymatischen Cholesterol-Screening durch einen hohen Wert auffielen, nach Mercaptoethanol-DTT-Extraktion. Bei herkömmlicher Tris-Harnstoff-Extraktion konnte jedoch bei diesen Proben keine Reaktion festgestellt werden. Als negative Feldprobe diente eine Kochmettwurst (M-013) sowie eine Feldprobe aus der Gruppe der Markklößchen (BCL-010) (s. Kap. 4.2.4.4).

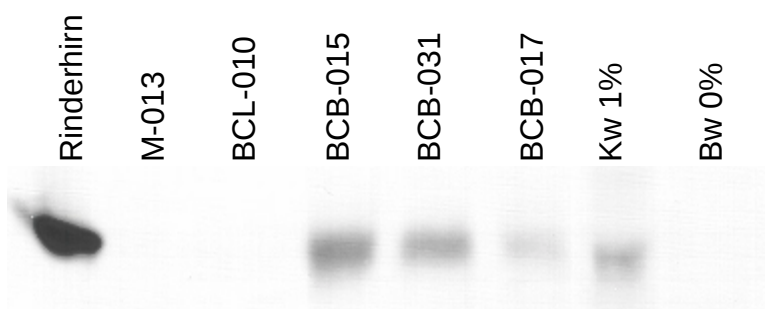


Abb. 4-44 NSE-Immunblot mit positiven und negativen (M-013, BCL-010) Feldproben nach Mercaptoethanol-DTT-Extraktion

In Abb. 4-45 werden positive NSE-Immunreaktionen einiger Feldproben der Gruppe Kochmettwurst nach i.d.R. Mercaptoethanol-DTT-Extraktion gezeigt. Bei den dargestellten Proben 219/98, 241/98 sowie 242/98 handelte es sich um stark erhitzte Vollkonserven im Glas mit einem F_c -Wert über 4. Eine Steigerung der Immunintensitäten wurde nach vorheriger Entfettung der Proben erzielt. Dies lässt sich anhand der Probe 219/98 zeigen. Jedoch reagierten nicht alle Proben in dieser Weise auf die Entfettung. So lässt der laborinterne Kochwurststandard mit 1 % Hirnanteil (Kw 1 %) keinen sichtbaren Unterschied erkennen. Die Reaktivierung der Immunintensität lässt sich neben der Entfettung der Proben auch durch den Zusatz von Mercaptoethanol/DTT zum herkömmlichen Extraktionsmittel erreichen. Dies erkennt man deutlich am Beispiel der Probe 242/98. Während sie nach herkömmlicher Tris-Harnstoff-Extraktion (T-Harn) keine Reaktion zeigte, war nach Mercaptoethanol-DTT-Zusatz eine starke NSE-Reaktion nachweisbar. Die laborinterne Nullkontrolle (Kw 0 %) zeigte dagegen keine Reaktion. Die Proben BCB-003 sowie -016 gehörten zu der Gruppe der Leberwürste (Kap. 4.1.3.3.1). In beiden Proben wurde eine schwache NSE-Immunreaktion („(+)“) nachgewiesen.

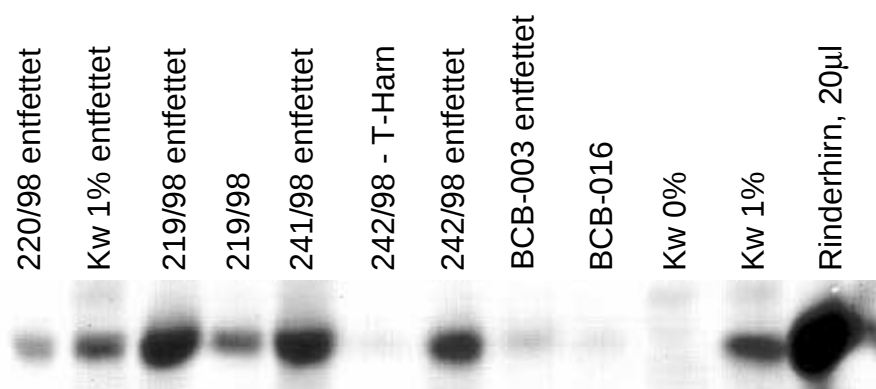


Abb. 4-45 NSE-Immunblot mit Mettwürsten sowie Leberwürsten (BCB-003, -016) nach i.d.R. Mercaptoethanol-DTT-Extraktion sowie teilweiser Entfettung

4.2.4.3.3 Blutwurst

Von insgesamt 46 untersuchten Feldproben dieser Gruppe wurden fünf für den immunchemischen ZNS-Nachweis ausgewählt. Sie zeichneten sich – vergli-

chen mit den übrigen Würsten dieser Gruppe - durch einen etwas höheren Cholesterolgehalt aus. Jedoch zeigten sie weder eine NSE- noch eine GFAP-Reaktion.

4.2.4.3.4 Sülzwurst

Von 44 untersuchten Sülzen und Preßwürsten wurden 12 Proben immunchemisch auf zentralnervöses Gewebe untersucht. Die ausgewählten Würste wiesen im Cholesterol-Screening Werte über 111 mg/100 g auf. Sie zeigten jedoch im Immunblot weder eine NSE- noch eine GFAP-Reaktion.

4.2.4.4 Erzeugnisse aus zerkleinertem Fleisch und andere Lebensmittel

In dieser Fleischerzeugnisgruppe wurde eine Stichprobe von insgesamt 33 Proben (72 %) – unabhängig ihres Cholesterolgehaltes - immunchemisch auf den Zusatz von ZNS untersucht. Darunter befanden sich 58 % rohe bzw. zubereitete Hackfleischprodukte wie z.B. Klopse. Außerdem wurden 14 Markklößchen immunchemisch untersucht. Jedoch zeigte keine der Stichprobe eine NSE-Reaktion. Als Beispiel einer negativen Immunbande diente die Probe BCL-010 (Markklößchen), die in Abb. 4-44 (S. 148) dargestellt ist.

4.2.4.5 Organe

Zur Absicherung der Nachweisgrenze des immunchemischen Verfahrens wurden Untersuchungen mit unterschiedlichen Hirnkonzentrationen durchgeführt. Hierzu wurde Hirngewebe sowohl mit dem laborinternen Referenzmaterial für die Cholesterolbestimmung (3.1.1.4) als auch mit Rinderblut vermischt. Die Ergebnisse des NSE- sowie GFAP-Nachweises waren in beiden Fällen vergleichbar, so daß im weiteren hierauf nicht näher eingegangen wird. In Abb. 4-46 sind NSE- und GFAP-Immunintensitäten aus diesen Einmischversuchen dargestellt. Deutlich sichtbare Immunbanden ergaben sich bei 5 % und 1 % Hirnanteil. Bei Zusatz von 0,5 % Hirnmaterial zum „Cholesterolstandard“ zeigte sich eine schwächere Reaktion. Gleiches gilt auch bei einem Hirnanteil von 0,1 % bei Betrachtung des Originalblots. Um unspezifische Reaktionen mit dem zugemischtem Wurst- bzw. Blutgewebe auszuschließen, wurde dieses ebenfalls

untersucht. Wie in der Abb. 4-46 erkennbar, zeigte weder Rinderblut noch der Wurststandard ohne Hirnzusatz (0 %) eine NSE- bzw. GFAP-Immunreaktion.

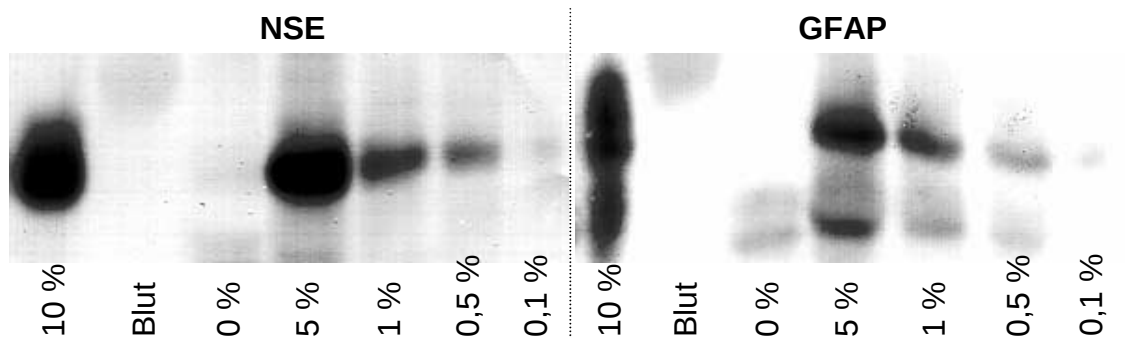


Abb. 4-46 Vergleich von NSE- sowie GFAP-Immunbanden definierter Rinderhirnkonzentrationen

Neben Rinderhirn wurden weitere Rinderorgane auf ihre NSE- sowie GFAP-Reaktion untersucht (s. Anhang 15). Ähnliche Immunintensitäten wie beim Rinderhirn ergaben sich bei Rückenmarksproben bei einer Auftragungsmenge von 100 μ l und 10 μ l (Abb. 4-47). Dagegen zeigten die Rückenmarkshüllen (RM-Hüllen) eine schwächere NSE- sowie GFAP-Immunbande. Bei einer 10fach geringeren Auftragungsmenge der Probe nahm die Immunintensität nochmals ab. Eine GFAP-Reaktion konnte nicht mehr festgestellt werden (Blot nicht dargestellt). Gewebe des Pankreas zeigte dagegen keine nervenspezifische Reaktion (Abb. 4-47).

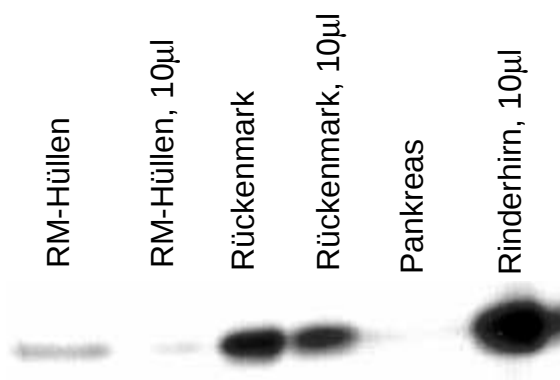


Abb. 4-47 NSE-Immunblot einiger Rinderorgane

Neben dem Rückenmark zeigten dorsale Wurzelganglien ebenfalls eine deutlich sichtbare NSE- sowie GFAP-Immunreaktion (vgl. Abb. 4-48). Schwächere NSE-Immunintensitäten waren dagegen bei 100 % Milzgewebe festzustellen, wobei bei 10 % Gewebeanteil keine Reaktion mehr nachweisbar war. 100 % Tonsillenmaterial, Lymphknoten sowie Lebergewebe vom Rind waren im NSE-Nachweisverfahren ebenfalls schwach positiv (Abb. 4-48). Jedoch zeigten diese Gewebe keine Immunreaktion mit GFAP.

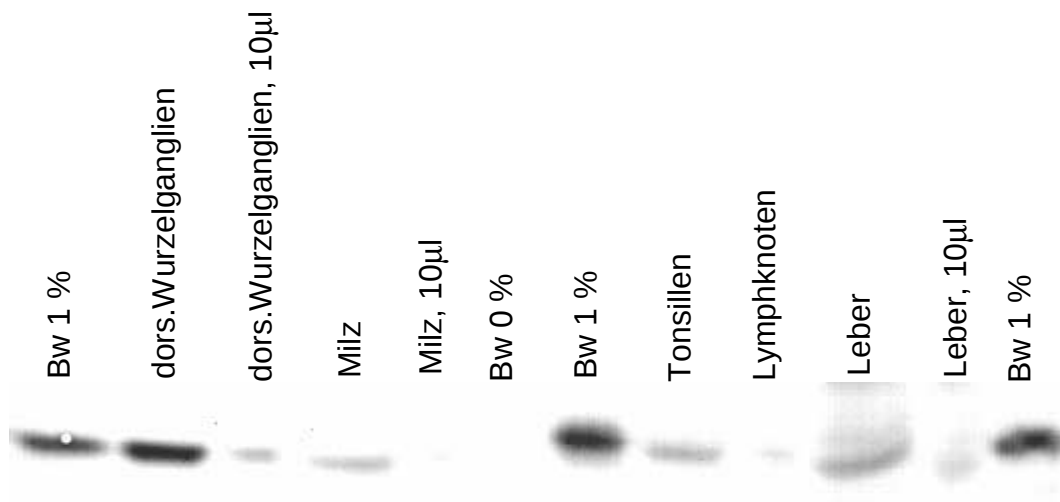


Abb. 4-48 NSE-Immunoblot verschiedener Rindergewebe /-organe

Neben den aufgezählten Rindergeweben wurde Lungengewebe vom Rind und Schwein auf ihre NSE- und GFAP-Reaktion getestet. Hierbei wurde nach Auftragung von 100 % Lungengewebe (Lobus caudalis dexter, Lobus cranialis sinister) eine schwache NSE-Immunreaktion nachgewiesen (Abb. 4-49), die jedoch mit GFAP nicht bestätigt werden konnte. Nach der Untersuchung unterschiedlicher Lungenkonzentrationen konnte bereits bei einer Konzentration von 80 % Lunge in der Probe keine Reaktion mit NSE-Antikörpern festgestellt werden.

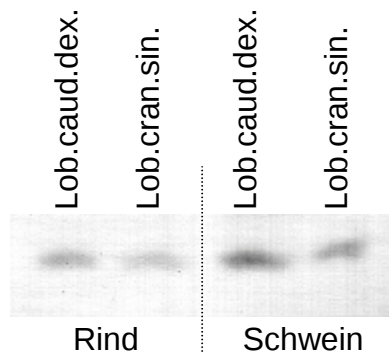


Abb. 4-49 NSE-Immunreaktionen von Rinder- und Schweinelunge

Untersuchungen von peripheren Nerven wie z.B. *Nervus ischiadicus* sowie verschiedene Hinterbeinnerven (*Nervus femoralis*, *Nervus tibialis*) erbrachten eine NSE-Immunreaktion bei Auftragung von 100 % des Gewebes. Nach Mischung mit dem laborinternen Nullstandard konnte bis zu einem Nervenanteil von 50 % eine schwache NSE-Intensität nachgewiesen werden. Geringere Nervenkonzentrationen in der Probe konnten nicht festgestellt werden. Die Auswertung des zweiten Markers, GFAP, erbrachte ausschließlich bei einem Nervenanteil von 100 % eine schwache Reaktion (Daten nicht dargestellt).

Bestandteile des Auges, wie die Netzhaut sowie der Sehnerv (*N. opticus*), wiesen eine starke NSE-Immunreaktion auf, die mit GFAP bestätigt werden konnte (Daten s. Anhang 15). Dagegen wurden in der Linse keine nervenspezifischen Reaktionen festgestellt.

Bei der Niere sowie der Nebenniere war im NSE-Blot eine gut sichtbare Bande zu erkennen, wogegen bei der Bestätigung mit GFAP eine im Vergleich zum 1 %igen Brühwurststandard geringgradig schwächere Immunintensität festzustellen war.

Dagegen wiesen Proben aus der Skelett- und Zwerchfellmuskulatur sowie Gewebe des Magen-Darm-Traktes keinen in der Immunchemie nachweisbaren

NSE-Gehalt auf. Ebenfalls negativ reagierte das Rinderfett und die Schleimhaut der Gallenblase.

4.3 Reduktion der immunchemischen NSE-Aktivität durch Erhitzen

Im folgenden wurde die Reduktion der NSE-Immunintensität bei 80 °C und 100 °C untersucht. Hierzu wurden die immunchemischen Aktivitäten verschiedener Wurststandards (Brühwurst sowie Kochwurst) mit einem Hirnanteil von 1 %, 5 % sowie 10 % nach Extraktion mit Tris-Harnstoff-Puffer mit einer optimierten Extraktionsmethode (M/D) verglichen.

4.3.1 Brühwurststandard mit 10 % Hirnanteil

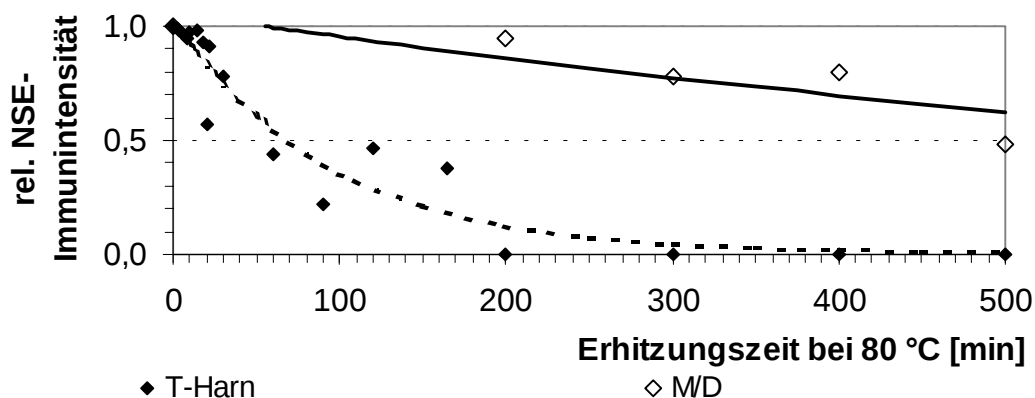


Abb. 4-50 Reduktion der NSE-Immunaktivität in Brühwurst mit 10 % Hirnanteil durch Erhitzung bei 80 °C nach Extraktion mit Tris-Harnstoff (T-Harn) bzw. 5 % Mercaptoethanol/DTT (M/D)

Bei einer Erhitzungstemperatur von 80 °C (Abb. 4-50) wurde nach herkömmlicher Extraktion bereits nach 40 min eine Reduktion um 50 % und nach 200 min eine vollständige Reduktion ermittelt. Im Vergleich hierzu zeigte die Immunreaktion der Brühwurst mit 10 % Hirnanteil nach Anwendung der Mercaptoethanol-DTT-Extraktion nur einen geringen Rückgang. So konnte noch nach 500 min eine deutlich sichtbare NSE-Reaktion nachgewiesen werden.

Bei 100 °C zeigte die Mercaptoethanol-DTT-Extraktion nach 400 min eine Reduktion um 100 %. Im Vergleich hierzu war bei herkömmlicher Extraktion mit

Tris-Harnstoff-Puffer bereits nach 160 min keine NSE-Reaktivität mehr feststellbar. Eine relative Immunintensität – nach Mercaptoethanol-DTT-Extraktion – von 0,5 wurde bei 100 °C nach 120 min festgestellt (Abb. 4-51), wogegen dies bei geringerer Temperatur (80 °C) erst nach 500 min eintrat.

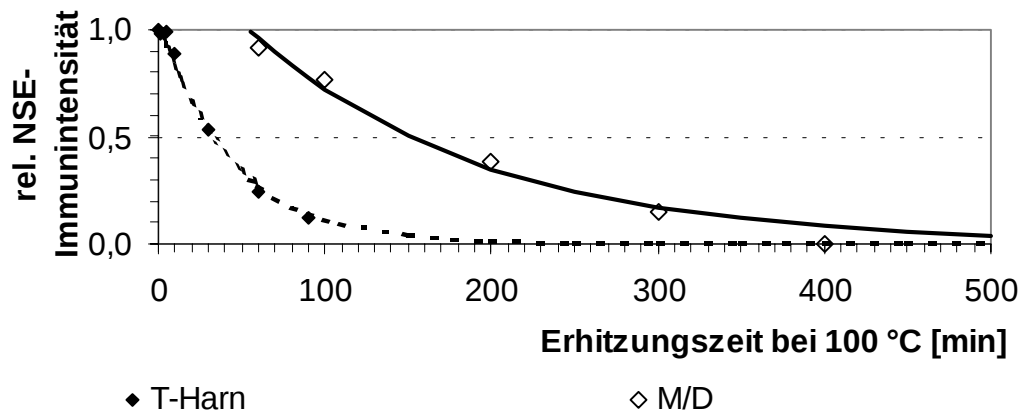


Abb. 4-51 Reduktion der NSE-Immunaktivität in Brühwurst mit 10 % Hirnanteil durch Erhitzung bei 100 °C nach Extraktion mit Tris-Harnstoff (T-Harn) bzw. 5 % Mercaptoethanol/DTT (M/D)

In Abb. 4-52 sind diese Ergebnisse anhand ausgewählter Westernblots dargestellt.

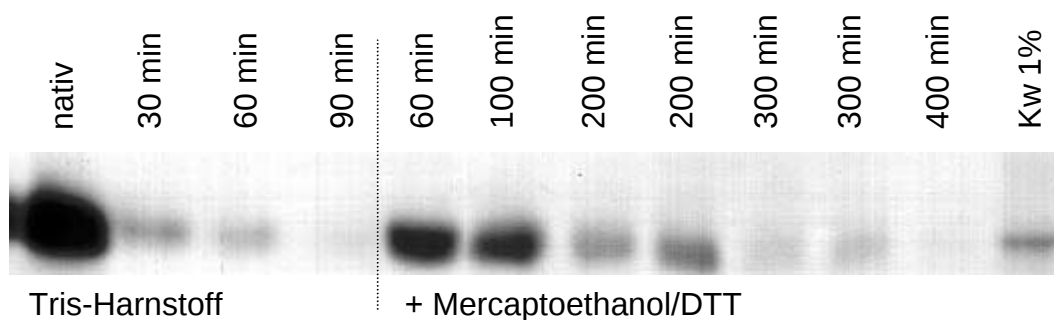


Abb. 4-52 Reduktion sowie Reaktivierung der NSE-Immunreaktion in Brühwurst mit 10 % Hirnanteil durch Erhitzung bei 100 °C

Alle experimentell erhaltenen relativen NSE-Immunitäten sind in Abb. 4-53 vergleichend dargestellt (Daten s. Anhang 16-19). Dabei sind die exponentiellen Reduktionskurven nach Tris-Harnstoff-Extraktion als gestrichelte und bei M/D-Extraktion als durchgezogene Linien dargestellt. Ausgefüllte Punkte stellen die Messungen bei 80 °C und umrandete Punkte die bei 100 °C dar. Hierbei ist deutlich zu erkennen, daß selbst nach langer Erhitzungsdauer bei hohen Temperaturen (100 °C) durch eine Mercaptoethanol-DTT-Extraktion noch immunchemische NSE-Aktivitäten feststellbar waren. So wurde bei der Tris-Harnstoff-Extraktion bereits nach 30 min im 100 °C Wasserbad eine Reduktion um 50 % nachgewiesen, während dies bei der optimierten Extraktion erst nach 140 min der Fall war. Bei geringerer Temperatur (80 °C) ist der Unterschied in der Erhitzungszeit noch deutlicher ausgeprägt.

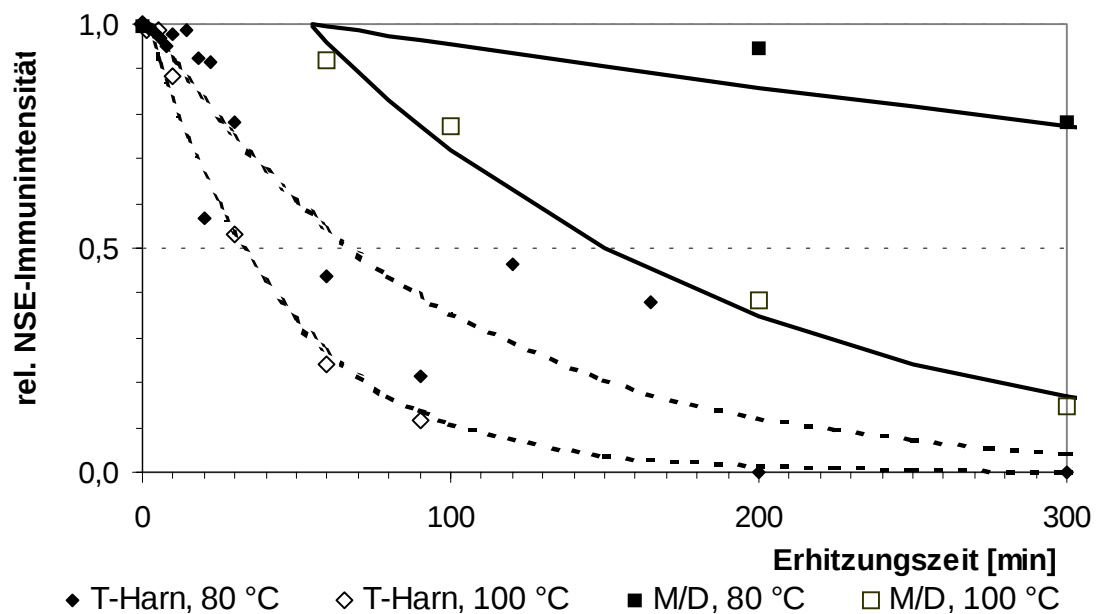


Abb. 4-53 Reduktion der NSE-Immunaktivität in Brühwurst mit 10 % Hirnanteil bei 80 °C und 100 °C nach Extraktion mit Tris-Harnstoff (T-Harn) bzw. 5 % Mercaptoethanol- und DTT-Zusatz (M/D)

Tabelle 4-31 Gleichung sowie Bestimmtheitsmaß r^2 der exponentiellen Reduktionskurven bei 80 °C und 100 °C sowie verschiedener Extraktionsmittel in Brühwurst 10 %

	80 °C		100 °C	
T-Harn	$y=1,03e^{-0,011x}$	$r^2=0,92$	$y=1,04e^{-0,023x}$	$r^2=0,98$
M/D	$y=1,06e^{-0,001x}$	$r^2=0,64$	$y=1,48e^{-0,007x}$	$r^2=0,97$

In Tabelle 4-31 sind die Gleichungen der exponentiellen Reduktionskurven für Brühwurst mit 10 % Hirnanteil dargestellt. Nach Verwendung der herkömmlichen Tris-Harnstoff-Extraktion wurden negative Geradensteigungen von $-0,011$ bei 80 °C und $-0,023$ bei 100 °C festgestellt. Im Vergleich mit den Kurven nach Mercaptoethanol-DTT-Extraktion wiesen sie bereits nach einer geringen Erhitzungsdauer stark reduzierte NSE-Immunitäten auf. Bei geringerer Temperatur (80 °C) unterschieden sich die Steigungen um eine Zehnerpotenz. Das Bestimmtheitsmaß r^2 lag zwischen 0,64 und 0,98.

4.3.2 Brühwurststandard mit 5 % Hirnanteil

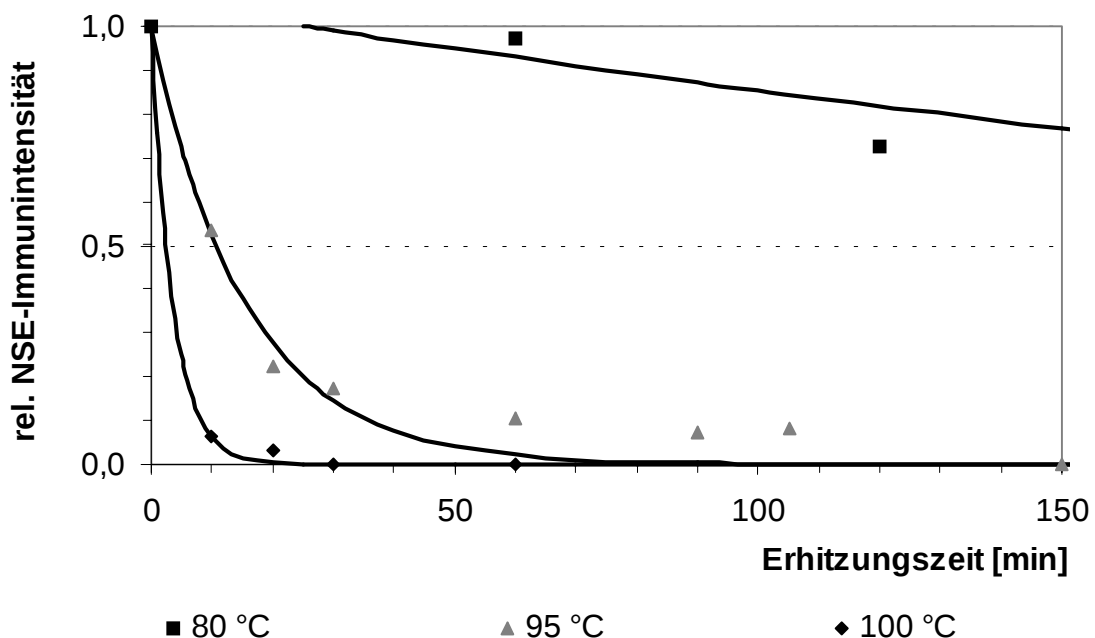


Abb. 4-54 Reduktion der NSE-Immunoaktivität in Brühwurst mit 5 % Hirnanteil bei 80 °C, 95 °C und 100 °C nach Extraktion mit 5 % Mercaptoethanol/DTT (M/D)

In Abb. 4-54 sind exponentielle Reduktionskurven der relativen NSE-Immunintensitäten von Brühwurst mit einem Hirnanteil von 5 % dargestellt (Daten s. Anhang 20-22). Bei Erhitzung auf 80 °C sowie Extraktion mit Mercaptoethanol/DTT wurde noch nach 500 min eine NSE-Reaktion nachgewiesen (Abb. 4-55). Eine Reduktion um 50 % wurde nach 350 min ermittelt. Im Vergleich dazu wurde bereits nach 20 min mit der Tris-Harnstoff-Extraktion eine Reduktion um 100 % festgestellt (Daten nicht dargestellt).

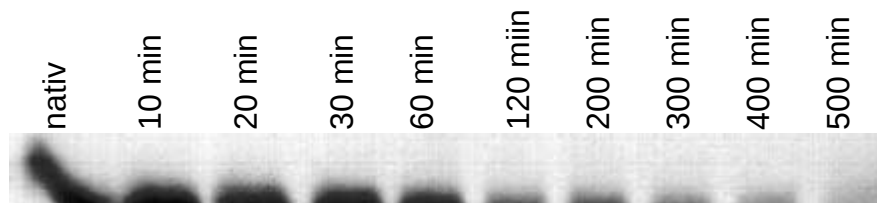


Abb. 4-55 Reduktion der NSE-Immunreaktion in Brühwurst mit 5 % Hirnanteil durch Erhitzung auf 80 °C nach Mercaptoethanol-DTT-Extraktion

Bei herkömmlicher Tris-Harnstoff-Extraktion wurde weder bei einer Erhitzung auf 95 °C noch auf 100 °C eine NSE-Immunreaktivität nachgewiesen. Nach dem Zusatz von Mercaptoethanol/DTT konnte eine Reaktivierung der Reaktion erreicht werden. So war bei 95 °C bis zu einer Erhitzungszeit von 105 min noch eine schwache NSE-Bande erkennbar (Abb. 4-56). Bei 100 °C konnten jedoch lediglich bis zu einer Erhitzungsdauer von 30 min nervenspezifische Proteine nachgewiesen werden (Westernblot nicht dargestellt).

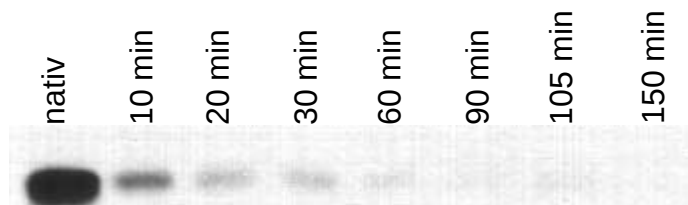


Abb. 4-56 Reduktion der NSE-Immunreaktion in Brühwurst mit 5 % Hirnanteil durch Erhitzung auf 95 °C nach Mercaptoethanol-DTT-Extraktion

Tabelle 4-32 Gleichung und Bestimmtheitsmaß r^2 der exponentiellen Reduktionskurven bei Brühwurst 5 % nach Anwendung der Mercaptoethanol-DTT-Extraktion bei verschiedenen Temperaturen

80 °C	$y=1,06e^{-0,002x}$	$r^2=0,97$
95 °C	$y=1,00e^{-0,064x}$	$r^2=0,97$
100 °C	$y=1,00e^{-0,276x}$	$r^2=0,99$

In Tabelle 4-32 sind die Gleichungen der exponentiellen Reduktionskurven für Brühwurst mit 5 % Hirnanteil dargestellt. Vergleicht man die negativen Steigungsparameter der exponentiellen Kurven, so stellt man fest, daß die Reduktion der NSE-Aktivität in Abhängigkeit der Erhitzungstemperatur stetig zunahm. So verlief die Kurve bei 95 °C um das 32fache steiler als bei 80 °C mit einer Steigung von -0,002. Bei einer Temperatur von 100 °C fiel die Reduktionskurve mit dem Faktor -0,276. Das Bestimmtheitsmaß r^2 lag bei allen drei Kurven zwischen 0,97 und 0,99.

4.3.3 Brühwurststandard mit 1 % Hirnanteil

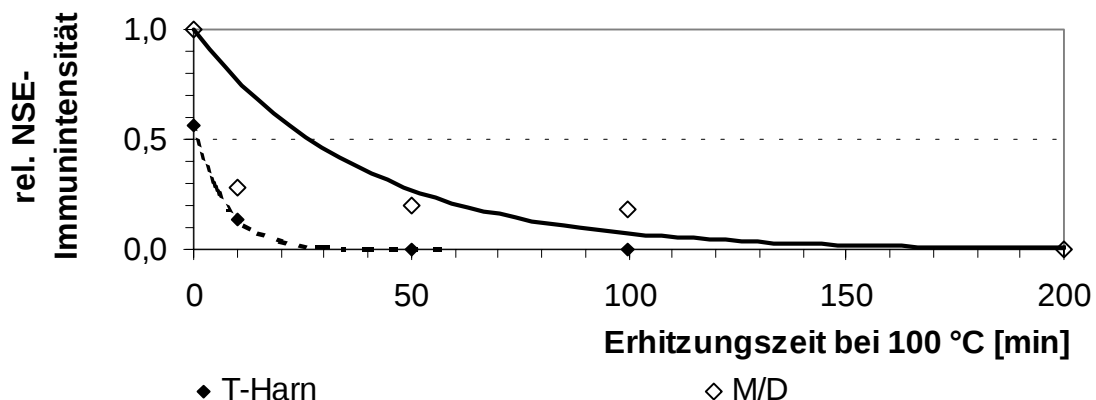


Abb. 4-57 Reduktion der NSE-Immunaktivität in Brühwurst mit 1 % Hirnanteil bei 100 °C nach Extraktion mit Tris-Harnstoff (T-Harn) bzw. 5 % Mercaptoethanol/DTT (M/D)

In Abb. 4-57 sind experimentell ermittelte exponentielle Reduktionskurven der NSE-Immunintensität bei 100 °C sowohl nach Tris-Harnstoff- als auch nach Mercaptoethanol-DTT-Extraktion dargestellt. Bei herkömmlicher Extraktion wurde bereits nach 40 min eine Reduktion um 100 % festgestellt (vgl. Anhang

23-24). Im Vergleich hierzu war nach Anwendung der Mercaptoethanol-DTT-Extraktion noch nach 100 min eine NSE-Reaktion nachzuweisen.

Tabelle 4-33 Gleichung und Bestimmtheitsmaß r^2 der exponentiellen Reduktionskurven bei 100 °C sowie verschiedener Extraktionsmittel in Brühwurst 1 %

T-Harn	$y=0,56e^{-0,139x}$	$r^2=0,99$
M/D	$y=1,00e^{-0,026x}$	$r^2=0,88$

Die Gleichungen der exponentiellen Reduktionskurven für Brühwurst mit 1 % Hirnanteil sind in Tabelle 4-33 dargestellt. Die Kurve der Mercaptoethanol-DTT-Extraktion fiel langsamer als die Tris-Harnstoff-Kurve. Die Steigungen der Kurven unterschieden sich hierbei um den Faktor 3. Das Bestimmtheitsmaß r^2 lag zwischen 0,88 und 0,99.

4.3.4 Kochwurststandard mit 10 % Hirnanteil

Bei einer Temperatur von 80 °C (Abb. 4-58) lagen die ermittelten relativen NSE-Immunintensitäten nach Extraktion mit Tris-Harnstoff bzw. Mercaptoethanol/DTT nahe beieinander (vgl. Anhang 25-29). So trat bei herkömmlicher Extraktion nach 10 min eine Reduktion um 50 % ein. Eine vollständige Reduktion wurde nach einer Erhitzungszeit von 60 min festgestellt. Bei gleicher Erhitzungsdauer bestand nach dem Zusatz von Mercaptoethanol/DTT eine NSE-Immunintensität, die noch 23 % der Ausgangsintensität betrug.

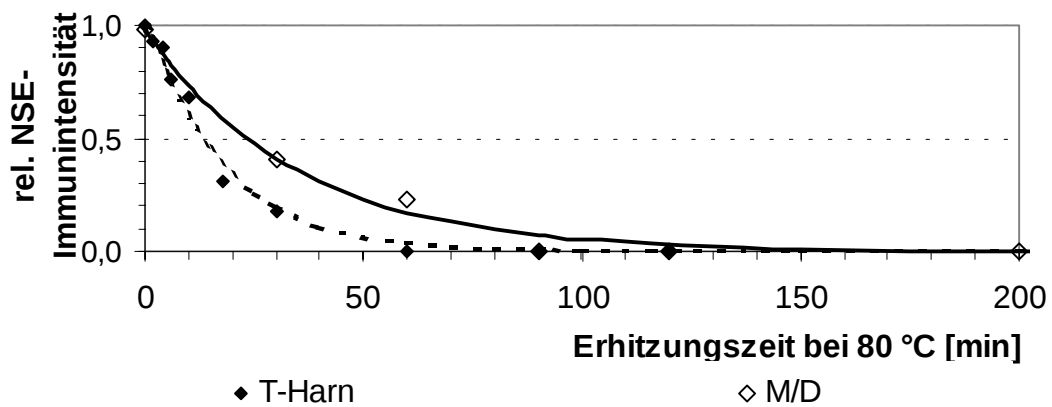


Abb. 4-58 Reduktion der NSE-Immunaktivität in Kochwurst mit 10 % Hirnanteil bei 80 °C nach Extraktion mit Tris-Harnstoff (T-Harn) bzw. 5 % Mercaptoethanol/DTT (M/D)

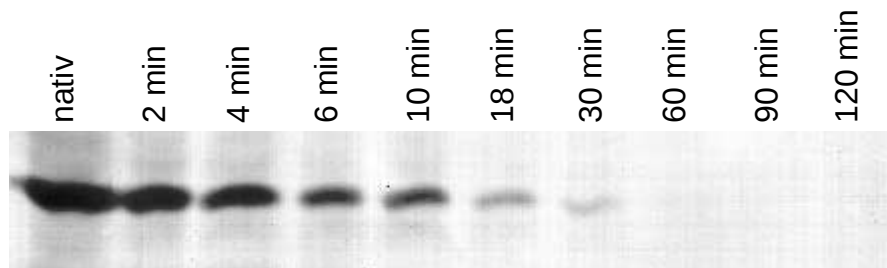


Abb. 4-59 Reduktion der NSE-Immunreaktion in Kochwurst mit 10 % Hirnanteil durch Erhitzung bei 80 °C nach Tris-Harnstoff-Extraktion

In Abb. 4-59 ist die Reduktion der NSE-Immunaktivität durch Erhitzung bei 80 °C und herkömmlicher Tris-Harnstoff-Extraktion dargestellt.

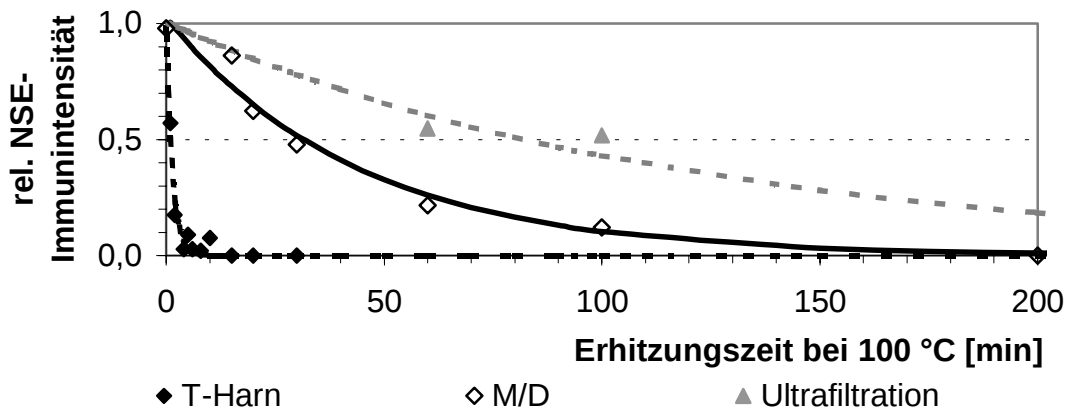


Abb. 4-60 Reduktion der NSE-Immunaktivität in Kochwurst mit 10 % Hirnanteil bei 100 °C nach Extraktion mit Tris-Harnstoff (T-Harn) bzw. 5 % Mercaptoethanol/DTT (M/D) sowie Extraktkonzentrierung durch Ultrafiltration

Bei höheren Temperaturen waren die Extraktionsunterschiede deutlich zu erkennen. Während nach Tris-Harnstoff-Extraktion bereits nach 15 min keine NSE-Immunreaktion feststellbar war, ermittelte man bei einer Erhitzung auf 100 °C nach 30 min eine Reduktion um 50 %. Eine Reduktion von 100 % wurde erst nach ca. 180 min festgestellt (Abb. 4-60). Die dazugehörigen Immunblots sind in Abb. 4-61 dargestellt. Eine weitere Reaktivierung der immunchemischen NSE-Intensität ließ sich durch Konzentrierung der Extrakte mittels Microcon-Ultrafiltration erreichen. So wurde nach einer Erhitzungszeit von 100 min noch eine starke Reaktion festgestellt (Abb. 4-61).

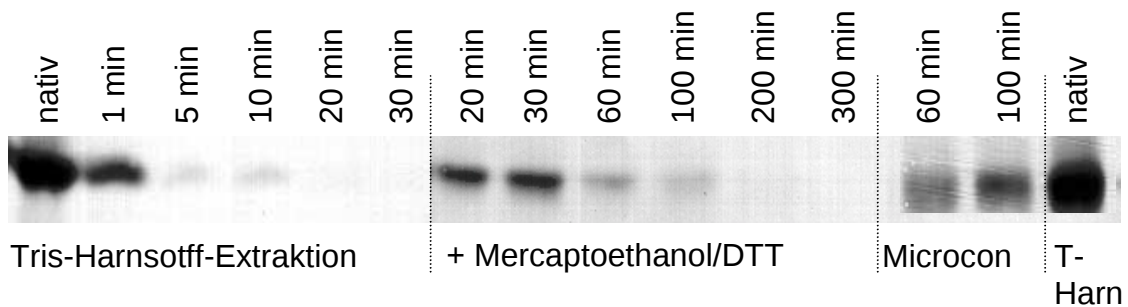


Abb. 4-61 Reduktion der NSE-Immunreaktion in Kochwurst mit 10 % Hirnanteil durch Erhitzung bei 100 °C nach Tris-Harnstoff-Extraktion sowie Reaktivierung durch Zusatz von Mercaptoethanol/DTT und Microcon-Ultrafiltration

In Abb. 4-62 sind alle experimentell ermittelten Reduktionskurven für den Kochwurststandard mit 10 % Hirnanteil dargestellt.

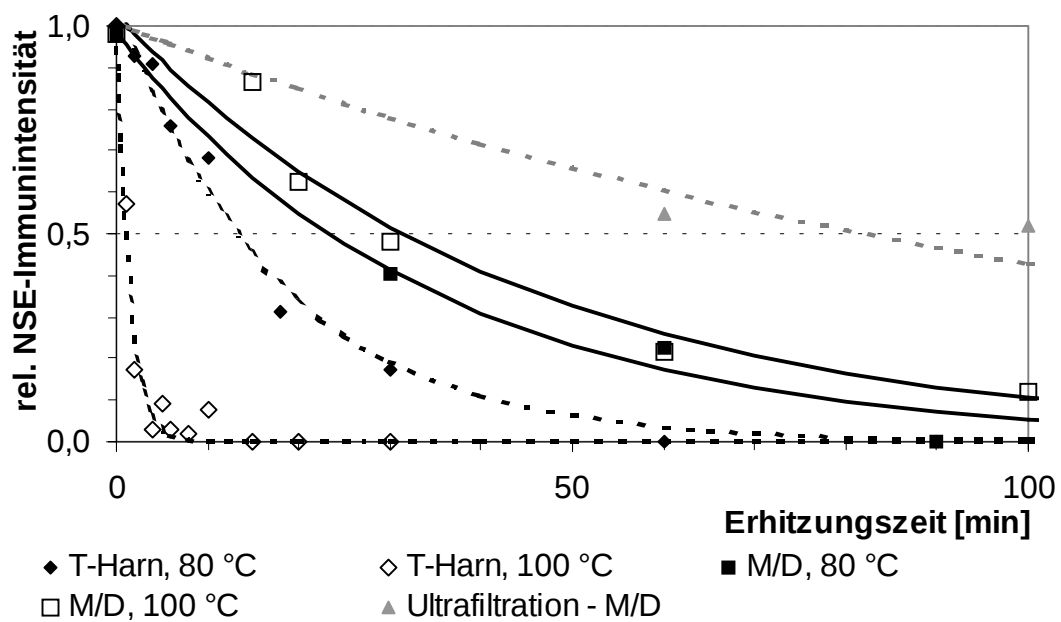


Abb. 4-62 Reduktion der NSE-Immunaktivität in Kochwurst mit 10 % Hirnanteil bei 80 °C und 100 °C nach Extraktion mit Tris-Harnstoff (T-Harn) bzw. 5 % Mercaptoethanol- und DTT-Zusatz (M/D) sowie Ultrafiltration

Die exponentielle Reduktion der relativen NSE-Immunaktivitäten nach Tris-Harnstoff-Extraktion (gestrichelte Kurve) verlief steiler als nach Anwendung der optimierten Extraktion (durchgezogene Linie). Die NSE-Banden waren somit bei herkömmlicher Extraktion bereits nach einer kürzeren Erhitzungsdauer (15 min) nicht mehr nachweisbar. Bei Anwendung der optimierten Proteinextraktion wies die relative NSE-Immunintensität noch nach 30 min ca. 50 % des Ausgangswertes auf.

Tabelle 4-34 Gleichung und Bestimmtheitsmaß r^2 der exponentiellen Reduktionskurven bei 80 °C und 100 °C sowie verschiedener Extraktionsmittel und Ultrafiltration in Kochwurst 10 %

	80 °C		100 °C	
T-Harn	$y=1,06e^{-0,057x}$	$r^2=0,98$	$y=1,02e^{-0,705x}$	$r^2=0,98$
M/D	$y=0,98e^{-0,029x}$	$r^2=0,98$	$y=1,03e^{-0,023x}$	$r^2=0,97$
Ultrafiltration (M/D)			$y=1,01e^{-0,009x}$	$r^2=0,91$

In Tabelle 4-34 sind die Gleichungen der Reduktionskurven für den Kochwurststandard mit 10 % Hirnanteil dargestellt. Ebenso wie bei den untersuchten Brühwurststandards fielen die Kurven der Mercaptoethanol-DTT-Extraktion deutlich langsamer ab als die Tris-Harnstoff-Kurven. Bei Vergleich der Tris-Harnstoff-Kurven fiel die Steigung bei 100 °C mit -0,705 deutlich steiler ab als bei 80 °C (-0,06). Im Vergleich dazu wiesen die exponentiellen Reduktionskurven nach Mercaptoethanol-DTT-Extraktion beider Erhitzungstemperaturen einen um den Faktor 35 flacheren Verlauf auf. Auffällig ist hierbei, daß die M/D-Kurve nach Erhitzung bei 80 °C mit -0,029 eine um 0,006 größere negative Steigung als nach Erhitzung auf 100 °C besitzt. Nach zusätzlicher Ultrafiltration der Extrakte wurde eine weitere Reaktivierung der NSE-Immunintensität erreicht. Die ermittelten Werte wurden zu 91 % durch eine langsam abfallende exponentielle Regressionskurve beschrieben. Ihre negative Steigung (-0,009) lag um das 2,5fache niedriger als nach Optimierung mit Mercaptoethanol-DTT-Extraktion. Alle beschriebenen exponentiellen Reduktionskurven wiesen ein relativ hohes Bestimmtheitsmaß r^2 zwischen 0,91 und 0,98 auf.

5 Diskussion

5.1 Enzymatische Gesamtcholesterolbestimmung

Die Cholesterolgehalte von Gehirn übersteigen die Gehalte von sonstigen tierischen Geweben, die üblicherweise zur Herstellung von Fleischerzeugnissen verwendet werden, um mindestens den Faktor 20 (Souci et al., 1994). Lediglich Eidotter weist mit 1200 mg Cholesterol/100 g FS (Souci et al., 1994) einen Wert, der dem im Gehirn nahe kommt, auf. Im Rahmen der enzymatischen Gesamtcholesterolbestimmung ist jedoch infolge der unspezifischen Reaktionen der Cholesterinoxidase gegenüber 3- β -Hydroxylgruppen der C₂₇–C₂₉-Sterine eine eindeutige Differenzierung des tierischen Cholesterols von Phytosterinen nicht möglich (WORTBERG, 1975). Neben dem Zusatz von pflanzlichen Ölen zum Fleischerzeugnis kann der Zusatz von Eigelb sowie ein erhöhter Leberanteil den ermittelten Gesamtcholesterolgehalt verfälschen (LÜCKER und BÜLTE, 1997b). Der Zusatz von Eidotter kann serologisch ausgeschlossen werden (LÜCKER et al., 2001).

5.1.1 Laborinterne Standards

44 Wiederholungsmessungen des Kochwurststandards für die Cholesterolbestimmung ergaben Werte zwischen 80,3 mg und 119,5 mg Cholesterol/100 g FS. Davon lagen 32 Ergebnisse um den Gesamtmittelwert von 96,8 mg Cholesterol $\pm$ einer Standardabweichung von 8,9 mg Cholesterol/100 g FS. Ähnliche Schwankungen der Cholesterolmeßergebnisse zeigten sich bei den laborinternen Roh-, Brüh- und Kochwurststandards. Die Standardabweichungen wiesen hier Werte bis zu 17 mg Cholesterol/100 g FS auf. Derartige Schwankungen der Cholesterolergebnisse wurden auch von NITSCH und WACHSAMNN (2001) beschrieben. Aufgrund der auftretenden Abweichungen der Cholesterolmeßergebnisse sollten bei der Bestimmung des Cholesterolgehaltes mehrere Messungen pro Untersuchungsmaterial durchgeführt werden, um so einen repräsentativen Mittelwert zu erhalten.

Eine Abschätzung des zugesetzten Gehaltes an zentralnervösem Gewebe kann jedoch nur innerhalb derselben Wurstmatrix mit bekanntem Cholesterolgehalt des Nullstandards getroffen werden. So lagen in dieser Studie die mittleren Cholesterolgehalte des Nullstandards zwischen 64 mg Chol./100 g FS bei Brühwurst, 83 mg Chol./100 g bei Rohwurst und 99 mg bzw. 146 mg Chol./100 g FS beim Kochwurststandard mit 16 % bzw. 32 % Leberanteil.

Das hitzeabhängige Konservierungsverfahren hatte auf die gemessenen Cholesterolgehalte der Referenzproben keinen größeren Einfluß, wie im Vergleich zwischen nativem und erhitztem Brühwurststandard festgestellt werden konnte. So wies die lineare Regressionsgerade des erhitzten Standards lediglich eine um 1,5 mg Cholesterol geringere Steigungsrate pro 1 % Hirnanteil in der Probe auf als die des nicht erhitzten Brühwurststandards.

Der Grenzwert für den maximalen normalen Cholesterolgehalt (Cutoff-Point) wurde bei Fleischerzeugnissen ohne Leberzusatz mit 108 mg/100 g ($p=0,25$) berechnet. Dies entspricht einem Hirnzusatz von 0,7 % im laborinternen Rohwurststandard und 2 % Hirnzusatz in nativen sowie erhitzten Brühwurststandards. Der Cutoff-Point für Leberwürste entspricht mit 152 mg Chol./100 g FS ($p=0,25$) einem Hirngehalt von 2,3 %. Dies zeigt die geringe Empfindlichkeit des Cholesterol-Screeningverfahrens. Um Hirngehalte unter 2 % nachzuweisen, müßte der Grenzwert des maximalen normalen Cholesterolgehaltes erniedrigt werden. Dies würde durch die Wahl einer geringeren Sicherheitswahrscheinlichkeit (s. Gleichung 3-7) erreicht werden. Allerdings müßte gleichzeitig eine höhere Anzahl falsch positiver Feldproben in Kauf genommen werden, die im immunchemischen ZNS-Nachweisverfahren überprüft werden müßten.

5.1.2 Externe Standards

5.1.2.1 Schweizer Referenzmaterial

Die Untersuchungen des Schweizer Referenzmaterials, die nachweislich mit Anteilen von bis zu 1 % Kalbshirn hergestellt wurden, zeigten, daß der Chol-

esterolgehalt nicht in jedem Falle auf den Zusatz von ZNS hinweist. Im Vergleich mit dem berechneten Cutoff-Point von 108 mg Cholesterol/100 g FS sowie den Cholesterolwerten der laborinternen Brühwurststandards konnte bei den Schweizer Referenzproben kein Verdacht auf das Vorhandensein von zentralnervösem Gewebe ausgesprochen werden. Die ermittelten mittleren Cholesterolgehalte des Schweizer Referenzmaterials - zwischen 25 mg und 52 mg Chol./100 g FS mit einer Standardabweichung von bis zu 15,7 mg Cholesterol/100 g FS - lagen mindestens 15 mg Cholesterol unterhalb des Nullwertes des internen Brühwurststandards mit 67 mg Cholesterol/100 g FS. Mit Hilfe der Gleichung 3-6 (Kap. 3.2.2.6.2) zur Berechnung des Gesamtcholesterolgehaltes (LÜCKER und BÜLTE, 1997b) wurde anhand der gemessenen Cholesterolwerte und der dazugehörigen Hirnanteile ein Gehalt zwischen 25 mg und 31 mg/100 g im Ausgangsbrät berechnet, was mit den gemessenen Werten von $25 \pm 15,7$ mg Chol./100 g in der Probe G6 (0 % Hirnanteil) übereinstimmte. Geringe Cholesterolgehalte in den Grundzutaten des Fleischerzeugnisses könnten somit einen Zusatz von ZNS im Cholesterol-Screening verschleiern.

5.1.2.2 Frankfurter Referenzmaterial

Der Cholesterolgehalt der Probe S1, die kein Hirnzusatz enthielt, lag mit 90 mg Chol./100 g FS unterhalb den ermittelten Grenzwerten für Brühwurst mit 117 mg Chol./100 g FS (90 % Sicherheit) sowie unterhalb dem berechneten Gesamtcutoff-Point mit 108 mg Cholesterol/100 g FS ($p=0,25$). Dagegen wies die Probe S0 (3,3 % Hirnanteil) sowie die Probe S2 mit 7,4 % Hirnanteil Cholesterolgehalte von 143 mg/100 g bzw. 180 mg/100 g auf. Im Vergleich zu dem zugrundeliegenden Cutoff-Point (108 mg Chol./100 g FS; $p=0,25$) läßt sich ein Verdacht auf ZNS-Zusatz aussprechen. Der aufgrund dieser Werte mittels der linearen Regressionsgeraden des laborinternen Brühwurststandards (Kap. 4.1.1.2) berechnete ZNS-Gehalt betrug bei Probe S0 3,6 % Hirn, was dem tatsächlichen Gehalt von 3,3 % nahe kommt. Der ZNS-Gehalt der Probe S2 (7,4 % Hirnanteil) wurde aufgrund der Cholesterolmessung mit 5,4 % Hirn zu niedrig berechnet. Dies macht deutlich, daß eine genaue Abschätzung des

ZNS-Gehaltes aufgrund der Cholesterolbestimmung schwierig sein kann. Fehlerquellen können neben den unterschiedlichen Cholesterolgehalten der Ausgangsmaterialien von Referenz- und Feldprobe sowie großen Meßschwankungen auch eine nicht auszuschließende inhomogene Verteilung des Hirnmaterials während der Herstellung sein.

5.1.3 Feldproben

5.1.3.1 Rohwurst

Von 23 Rohwürsten zeigte lediglich eine Probe eine schwache immunchemische Reaktion, die auf den Zusatz von ZNS hindeutet. Diese Probe lag mit einem Cholesterolgehalt von 77 mg/100 g FS über dem Median von 63,5 mg/100 g FS. Mit dem ermittelten Grenzwert von 108 mg/100 g FS ($p=0,25$) für alle Würste wurde diese Probe jedoch nicht erfaßt. Gleiches gilt für den ermittelten Cutoff-Point für die 23 untersuchten Rohwürste, der bei 79 mg Cholesterol/100 g FS mit einer statistischen Sicherheit von 90 % lag. Die untersuchte Probenanzahl ist für eine aussagekräftige Berechnung des Cutoffs allerdings zu gering.

5.1.3.2 Brühwurst

Bei den untersuchten Brühwürsten wurden durch den berechneten Cutoff-Wert von 108 mg/100 g FS ($p=0,25$) insgesamt 22 Proben als „verdächtig“ bewertet. Mit dem aus der Literatur bekannten Cutoff von 120 mg/100 g (LÜCKER et al., 1999b) wären in dieser Studie nur 12 Proben als „verdächtig“ eingestuft worden. Mit beiden Cutoff-Points ließen sich jedoch nur zwei der im Cholesterol-Screening untersuchten neun immunchemisch ZNS-positiven Proben ermitteln. Die sieben nicht erkannten Fleischerzeugnisse hatten Cholesterolgehalte in einem Bereich zwischen 51,9 mg und 90 mg Chol./100 g FS. Bei drei dieser Proben handelte es sich um Geflügelwürste.

Um alle positiven Würste in dieser Stichprobe mittels Cholesterol-Screening nachzuweisen, müßte der Cutoff-Point deutlich herabgesetzt werden. Dies ginge mit einem deutlichen Verlust der statistischen Sicherheit einher. Außer-

dem müßten bei einem Cutoff-Point von z.B. 51 mg/100 g FS 129 Proben zusätzlich im immunchemischen Verfahren untersucht werden, um neun ZNS-positive Proben nachzuweisen. Um dieses Mißverhältnis zu umgehen, ist es nötig einen neuen Grenzwert normaler Cholesterolgehalte in Brühwürsten zu ermitteln. Hierzu ist die Untersuchung einer größeren Stichprobenzahl von Brühwürsten unterschiedlicher Zusammensetzung und Herstellungsverfahren erforderlich.

5.1.3.3 Kochwurst

5.1.3.3.1 Leberwurst

Insgesamt wurden 257 Leberwürste auf den Zusatz von ZNS untersucht. Davon zeigten 9,7 % eine immunchemische Reaktion. Mit dem berechneten Cutoff von 152 mg Cholesterol/100 g FS wurden 59 der Proben aufgrund der Cholesterol-Schnellmethode als „verdächtig“ eingestuft. 22 der ZNS-positiven Proben wurden ebenfalls auf ihren Cholesterolgehalt untersucht. Dabei wurde festgestellt, daß 15 dieser Leberwürste über dem Cutoff-Point lagen, wobei neun Proben sogar über einem Wert von 200 mg Cholesterol/100 g FS lagen. Die sieben im Screeningverfahren nicht erkannten Proben hatten Cholesterolwerte zwischen 123 mg und 147 mg/100 g FS. Mit dem aus der Literatur bekannten Cutoff-Point von 140 mg/100 g FS (LÜCKER et al., 1999b) wurden zusätzlich fünf positive Feldproben erfaßt. Jedoch müssen hierbei zusätzlich 30 Verdachtsproben in Kauf genommen werden. Um alle 22 ZNS-positiven Proben, die enzymatisch auf ihren Cholesterolgehalt untersucht wurden, im Screeningverfahren herauszufiltern, müßte der Grenzwert auf mind. 123 mg/100 g FS erniedrigt werden. Damit wäre jedoch ein erhöhter Anteil an falsch positiven Verdachtsproben (n=146) verbunden. Dies steht allerdings in keiner Relation zu den in dieser Studie vereinzelt vorkommenden positiven Proben mit einem Cholesterolgehalt unter 152 mg/100 g FS (n=7).

Die Ergebnisse der gesonderten Auswertung der Probenkollektive A und B zeigten, daß es eine nicht zu unterschätzende Varianz innerhalb der Leberwürste gab. So lag der Mittelwert des Probenkollektives B im Vergleich zum Pro-

benkollektiv A mit 148 mg Cholesterol/100 g FS ca. 30 mg/100 g FS höher. Dies kann teilweise auf einen unterschiedlichen Zusatz von Leber zurückgeführt werden. Jedoch sind auch technologische Faktoren, wie z.B. Fettreduktion und vermehrter Zusatz an Brühe (HILDEBRANDT und KLEER, 1998), zu berücksichtigen.

Diese Unterschiede schlagen sich ebenfalls in der Bestimmung des Cutoff-Points nieder. So wurden im **Probenkollektiv A** neun Verdachtsproben mit einem Cutoff-Point_{95%} bei 150 mg Chol./100 g FS festgestellt, von denen acht im immunchemischen Nachweisverfahren als ZNS-positiv bestätigt wurden. Um möglichst alle 12 ZNS-positiven Erzeugnisse dieser Stichprobe im Screeningverfahren nachzuweisen, muß die statistische Sicherheit auf 75 % gesenkt werden. Hierdurch konnten elf ZNS-positive Leberwürste gefunden werden, die über dem Cutoff_{75%} von 130 mg Chol./100 g FS lagen. Jedoch mußten hierbei gleichzeitig 30 falsch positiv erkannte Proben im Westernblotverfahren ausgeschlossen werden. Dieser Nachteil relativiert sich jedoch im Hinblick auf den - unter Beachtung der Nachweisgrenze - sicheren immunchemischen Ausschluß ZNS-negativer Proben. Legt man dem Probenkollektiv A den Gesamtcutoff-Point für Leberwürste mit 152 mg Chol./100 g ($p=0,25$) zu Grunde, würden sieben der 12 ZNS-positiven Proben im Cholesterol-Screening nachgewiesen.

Im **Probenkollektiv B** wurden mit dem für diese Stichprobe berechneten Cutoff-Point_{95%} von 201 mg/100 g sieben der insgesamt zehn ZNS-positiven Proben herausgefunden, wobei lediglich sechs im Screeningverfahren falsch positive Leberwürste im immunchemischen Nachweisverfahren ausgeschlossen werden mußten. Um in dieser Stichprobe alle ZNS-positiven Proben mittels Cholesterolbestimmung nachzuweisen, müßte der Cutoff auf 123 mg/100 g erniedrigt werden, wobei die statistische Sicherheit auf unter 75 % sinken würde. Mit einem derartigen Grenzwert ist jedoch eine Erhöhung der Verdachtsproben auf 92 verbunden. Dagegen wurden mit dem Gesamtcutoff-Point_{75%} für Leberwürste (152 mg/100 g) 80 % der positiven Proben dieses Kollektives zusammen mit 43 ZNS-negativen Proben ermittelt.

5.1.3.3.2 Kochmettwurst

Im Falle der Kochmettwurst wurden 45 (56 %) Proben der Gesamtstichprobe aufgrund des Cutoff-Points von 108 mg Cholesterol/100 g FS als „verdächtig“ für den Zusatz von ZNS angesehen. In der anschließenden immunchemischen Überprüfung konnte dies in 14 Proben bestätigt werden. Eine ZNS-positive Probe wurde nicht auf ihren Cholesterolgehalt untersucht. Zwei weitere ZNS-positive Proben mit Cholesterolgehalten unter 82 mg/100 g FS wurden im Screeningverfahren nicht erkannt. Alle 14 im Cholesterol-Screening richtig erkannten Proben zeigten Werte über 231 mg Cholesterol/100 g FS. Lediglich eine negative Feldprobe wies ebenfalls einen Cholesterolgehalt über 231 mg/100 g auf. Die Abschätzung des möglichen Hirngehaltes (s. Gleichung 3-6) unter Beachtung der Cholesterolwerte für Skelettmuskulatur (60 mg/100 g FS) (Souci et al., 1994), deutet darauf hin, daß hier zentralnervöses Material in Konzentrationen von mindestens 8 % eingesetzt wurde. Dies überrascht nicht, da uns diese Feldproben in der Regel als amtliche ZNS-Verdachtsproben zur Verfügung gestellt wurden.

5.1.3.3.3 Blutwurst, Sülzwürste sowie sonstige Erzeugnisse

In insgesamt 46 Blutwürsten, 44 Sülzen und Preßwürsten sowie 46 sonstigen Fleischerzeugnissen wurde kein zentralnervöses Material nachgewiesen. Jedoch wiesen bei den Blutwürsten sieben Proben, bei den Sülzen und Preßwürsten 17 Proben sowie bei den sonstigen Fleischerzeugnissen neun Proben einen Cholesterolgehalt auf, der über dem Grenzwert von 108 mg/100 g FS. Diese als ZNS-„verdächtig“ eingestuften Proben konnten jedoch im anschließenden immunchemischen Nachweisverfahren nicht bestätigt werden. Mit einem Cutoff-Point_{95%} von 120 mg Cholesterol/100 g FS (LÜCKER et al., 1999b) waren dagegen zwischen 43 % und 67 % weniger Verdachtsproben festzustellen. Aufgrund des relativ geringen Stichprobenumfanges kann hier lediglich eine tendenzielle Abschätzung der maximalen normalen Cholesterolgehalte der einzelnen Fleischerzeugnisgruppen getroffen werden.

5.1.3.4 Organe

Die ermittelten Cholesterolgehalte ausgewählter Rinderorgane zeigten deutlich, daß Gewebe des zentralen Nervensystems gegenüber sonstigen Geweben einen deutlich höheren Wert aufweisen (Abb. 5-1). So lagen die Meßwerte des Rinderhirns, des Rückenmarks sowie der dorsalen Wurzelganglien mit Werten über 1334 mg Cholesterol/100 g Frischsubstanz (FS) um mindestens das 22fache höher als die der Muskulatur (60 mg/100 g FS). Die Einzelwerte des ZNS-Gewebes schwankten in einem Bereich zwischen 1053 mg und 1641 mg Chol./100 g FS. Souci et al. (1994) gaben für Rinderhirn einen Cholesterolgehalt von ca. 2000 mg/100 g FS an. Dieser Wert lag ca. 30 % über den in dieser Arbeit ermittelten Cholesterolwerten. RUNQUIST et al. (1995) gaben für Rückenmark einen Cholesterolwert von 2420 ± 310 mg/100 g FS an. Diese Werte lagen um mindestens 600 mg Chol./100 g FS höher als der gemessene Wert. Die Gewebe des ZNS wiesen desweiteren mindestens 7 bzw. 3,7fach höhere Cholesterolgehalte als die cholesterolreiche Leber und Niere auf. Lediglich Eidotter kam mit einem Cholesterolgehalt von 1200 mg/100 g FS (Souci et al., 1994) in die Nähe der Werte für Rinderhirn.

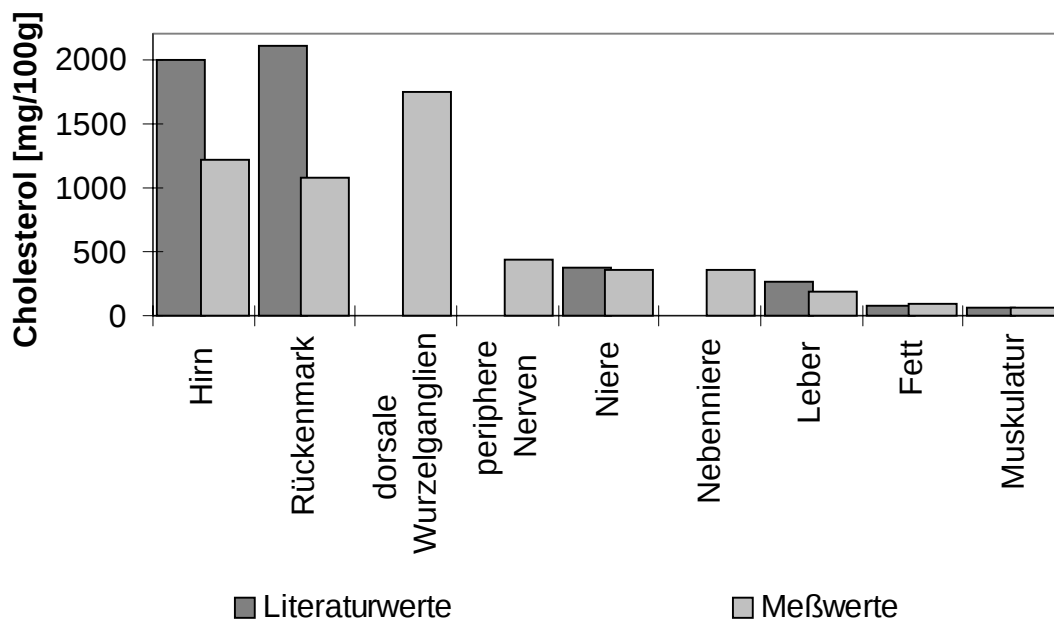


Abb. 5-1 Gemessene Cholesterolgehalte einiger Rindergewebe im Vergleich zu Angaben aus der Literatur (Souci et al., 1994; RUNQUIST et al., 1995)

Aufgrund der großen Unterschiede der Cholesterolgehalte von zentralnervösem Gewebe und in Fleischerzeugnissen üblicherweise vorkommenden Geweben, wie Muskulatur und Fett, wurde die enzymatische Bestimmungsmethode als Screeningverfahren für den ZNS-Nachweis gewählt. Jedoch muß bei der Auswertung der Meßergebnisse die relativ hohe Schwankungsbreite der Einzelmessungen berücksichtigt werden (NITSCH und WACHSAMNN, 2001), dies kann an tagesbedingten Schwankungen oder an einer inhomogenen Verteilung des Cholesterols in der Probe liegen.

5.1.4 Festlegung der Cutoff-Points

Die Bewertung der ermittelten mittleren Gesamtcholesterolgehalte erfolgte anhand sogenannter Cutoff-Points. In Tabelle 5-1 sind die Grenzwerte für den maximalen normalen Cholesterolgehalt (Cutoff-Point) einzelner Fleischerzeugnisgruppen dieser Studie zusammengefaßt. In die Berechnung gingen alle Proben ein, die immunchemisch keine Reaktion zeigten (Kap. 3.3.2.8). Durch den Einsatz verschiedener Sicherheitsfaktoren für den einseitigen Test wurden

Werte ermittelt, die teilweise stark voneinander abwichen, wie z.B. bei Kochmettwurst bis zu 60 mg/100 g FS zwischen den Werten mit 90 % und 99,9 % statistischer Sicherheit.

Die Cutoff-Points zwischen einzelnen Erzeugnisgruppen schwankten in einem Bereich zwischen 84 mg und 184 mg/100 g bei einer statistischen Sicherheit von 95 %. Dies läßt sich durch die hohe Variabilität in der Technologie und der Zusammensetzung der einzelnen Produkte erklären. Deshalb sollte für jede Gruppe ein eigener Grenzwert zu Grunde gelegt werden. Wird jedoch ein Gesamtwert angestrebt, so sollte im Hinblick auf den vorbeugenden Verbraucherschutz die Erfassungswahrscheinlichkeit erhöht werden, indem die statistische Sicherheit erniedrigt wird. In dieser Studie wurde deshalb teilweise auf eine Sicherheit von 75 % zurückgegriffen, um möglichst viele der positiven Feldproben zu erfassen. Im Gegensatz zu den ersten Arbeiten von LÜCKER und BÜLTE (1997b), die eine Nachweisgrenze für alle Fleischerzeugnisse außer Leberwurst von 140 mg Chol./100 g FS ($p=0,001$) sowie einen Cutoff-Point_{LW} von 220 mg Cholesterol/100 g FS ermittelten, wurde der Grenzwert für den maximalen normalen Cholesterolgehalt im Laufe der Zeit mit Zunahme des Untersuchungsumfanges verändert. Die 1999 berechneten Cutoff-Points (LÜCKER et al., 1999b) wurden in der vorliegenden Studie von 120 mg/100 g ($p=0,05$) auf 108 mg/100 g ($p=0,25$) – gültig für alle Fleischerzeugnisse ohne Zusatz von Leber – herabgesetzt. Bei Leberwürsten änderte sich der bisherige Grenzwert von 140 mg/100 g FS ($p=0,10$) (LÜCKER et al., 1999b) auf 152 mg Cholesterol/100 g FS ($p=0,25$). Diese Anpassung der Cholesterolgrenzwerte war nötig, um eine möglichst große Anzahl immunchemisch ZNS-positiver Proben mittels der enzymatischen Cholesterolbestimmung nachzuweisen.

Durch die Festlegung niedrigerer Grenzwerte für den maximalen normalen Cholesterolgehalt (Cutoff-Point) bei geringer Sicherheitswahrscheinlichkeit erhöht sich jedoch der Anteil der im enzymatischen Screeningverfahren falsch positiv erkannten Proben. Die Folge davon ist, daß eine im Vergleich zu den tatsächlich positiven Proben hohe Zahl zusätzlich immunchemisch überprüft wer-

den muß. Die ZNS-negativen Proben können durch den immunchemischen Nachweis zweier neuronenspezifischer Proteine sicher ausgeschlossen werden, da – unter Berücksichtigung der Nachweisgrenze (0,1 % ZNS) - keine falsch negativen Reaktionen auftreten.

Tabelle 5-1 Übersicht über ermittelte Cutoff-Werte normaler Cholesterolgehalte mit unterschiedlicher statistischer Sicherheit

Art	Bezeichnung	Anzahl (n)	Cutoff-Point [mg Chol./100 g FS]		
			99,9 %	95,0 %	90,0 %
Rohwurst	Salamiart	22	107,0	84,6	78,8
Brühwurst	Gelbwurst, Fleischkäse u.a.	148	154,1	124,4	116,9
Kochwurst	Leberwurst	232	228,3	183,3	171,8
	Kochmettwurst	64	185,2	137,6	125,5
	Blutwurst	46	153,6	119,9	111,3
	Sülz- und Preßwurst	44	183,9	140,0	128,8
Sonstige	Hackfleisch, Klopse, Markklößchen u.a.	46	185,2	137,8	125,7
Gesamt		602			

5.1.5 ZNS verdächtige und positive Proben

Die folgende Tabelle 5-2 gibt einen Überblick über die Anzahl der untersuchten Proben sowie deren Ergebnisse. Dabei sind unter der Bezeichnung „Verdächtig“ diejenigen Proben zu verstehen, die im enzymatischen Schnellverfahren einen Cholesterolgehalt aufwiesen, der über dem Cutoff-Point lag.

Von 661 Feldproben wurden 159 Würste – unter Berücksichtigung des Cutoff-Points von 152 mg Cholesterol/100 g FS bei Leberwürsten sowie von 108 mg/100 g FS bei den restlichen Wursterzeugnissen mit einer statistischen Sicherheit von 75 % - als für den Zusatz von zentralnervösem Material „verdächtig“ eingestuft (Tabelle 5-2). Lediglich 31 der 159 Proben (19 %) wiesen im spezifischeren immunchemischen ZNS-Nachweisverfahren mit NSE- und

GFAP-Antikörpern eine Immunreaktion auf (Tabelle 5-3). 17 Fleischerzeugnisse der insgesamt 59 immunchemisch positiven Proben wurden im enzymatischen Cholesterol-Screening nicht erkannt. Sie zeichneten sich in der Regel durch eine schwache Immunreaktion aus. Weitere elf Proben wurden nicht auf ihren Cholesterolgehalt untersucht.

Tabelle 5-2 Für den Zusatz von ZNS verdächtige sowie positive Proben

Art	Bezeichnung	Anzahl (n)	Verdächtige n>CP* (%)	Positive n (%)
Rohwurst	Salamiart	23	0 (0)	1 (4,3)
Brühwurst	Gelbwurst, Fleischkäse u.a.	164	22 (13,4)	16 (9,8)
Kochwurst	Leberwurst	257	59** (22,9)	25 (9,7)
	Kochmettwurst	81	45 (55,6)	17 (21,0)
	Blutwurst	46	7 (15,2)	0
	Sülz- und Preßwurst	44	17 (38,6)	0
Sonstige	Hackfleisch, Klopse, Markklößchen u.a.	46	9 (19,6)	0
Gesamt		661	159 (24,1)	59 (8,9)

* Cutoff normaler Cholesterolgehalt, alle außer Leberwürste: 108 mg/100 g (p=0,25)

** Cutoff normaler Cholesterolgehalt bei Leberwürsten: 152 mg/100 g (p=0,25)

Tabelle 5-3 Immunchemisch positive Proben im Cholesterol-Screening

Art	n > CP*	n < CP	nicht untersucht	Gesamt
Rohwurst	0	1	0	1
Brühwurst	1	7	7	16
Leberwurst	15**	7	3	25
Kochmettwurst	14	2	1	17
Gesamt	31	17	11	59

* Cutoff normaler Cholesterolgehalt, alle außer Leberwürste: 108 mg/100 g (p=0,25)

** Cutoff normaler Cholesterolgehalt bei Leberwürsten: 152 mg/100 g (p=0,25)

5.2 Immunchemisches ZNS-Nachweisverfahren

Das immunchemische Nachweisverfahren beruht auf den differierenden Gehalten zweier spezifischer Proteine, der neuronenspezifischen Enolase (NSE) sowie dem Sauren Gliafaserprotein (GFAP), in tierischen Geweben. Die NSE findet sich neben den Zellen des zentralnervösen Systems (ZNS) in peripheren Nervenzellen, neuroendokrinen Zellen und Tumorgewebe (SCHMECHEL et al., 1978; MARANGOS et al., 1979; KIMURA et al., 1986). Jedoch weist sie in den letztgenannten Geweben Konzentrationsgehalte auf, die mindestens um das 40fache geringer sind als im zentralnervösen Gewebe (SCHMECHEL et al., 1978; MARANGOS et al., 1979; KATO et al., 1982).

Die GFAP-Gehalte von Rückenmark sowie Gehirn liegen mindestens 3000fach höher als die in der Skelettmuskulatur (SCHMIDT et al., 1999b). Im *Nervus ischiadicus* haben SCHMIDT und Mitarbeiter (1999b) GFAP-Gehalte zwischen 17,5 ng und 51 ng/mg s.P. nachgewiesen. Mit polyklonalen Antikörpern stellten sie im GFAP-ELISA-Verfahren (enzyme linked immunosorbent assay) noch bei einem Anteil von 50 % Nerv in der Probe eine positive Reaktion fest. Diese ZNS-unspezifischen Reaktionen können jedoch durch die Verwendung von monoklonalen Antikörpern gegen zentralnervöses GFAP weitgehend ausgeschlossen werden (JESSEN et al., 1984; JESSEN und MIRSKY, 1985). Dies beruht auf den Unterschieden in der Antigendeterminanten, die anhand nativem Gewebematerial in zentralnervösen und peripheren Zellen beschrieben wurden (ALBRECHTSEN et al., 1984).

Die alleinige Beurteilung des immunchemischen Nachweises im Westernblot anhand der GFAP-Ergebnisse ist jedoch schwierig, da die Auswertung im Gegensatz zum NSE-Immunblot komplizierter ist. Infolge postmortalen Zersetzungsprozesse können im Westernblot bis zu acht GFAP-Immunbanden auftreten (DAHL und BIGNAMI, 1983), wobei nicht alle für das ZNS spezifisch sind. Bei Verwendung des NSE-Antikörpers weist man lediglich eine einzige Bande im Bereich von 45 - 50 kDa nach (SUZUKI et al., 1980; HEYDORN et al., 1985). Der Nachweis von zentralnervösem Gewebe beruht deshalb im be-

schriebenen immunchemischen Verfahren auf der Darstellung der NSE- sowie der GFAP-Immunbanden. In dieser Arbeit stimmten die NSE-Immunergebnisse mit den GFAP-Ergebnissen überein. Jedoch sind in der Literatur Fälle bekannt, bei denen meist schwach positive NSE-Reaktionen mit dem GFAP-Antikörper nicht bestätigt werden konnten (HORLACHER et al., 2001). Es handelte sich hierbei sowohl um Putenfleisch- als auch um Schweinefleischprodukte.

Eine Unterscheidung zwischen Gehirn- und Rückenmarkmaterial in Fleisch-erzeugnissen ist mit den verwendeten Markern NSE sowie GFAP nicht möglich. In Hirn und Rückenmark finden sich laut MARANGOS et al. (1979) annähernd gleiche NSE-Gehalte zwischen 10.000 ng und 17.000 ng/mg löslichem Protein (s.P.) (Anhang 3). Im Gegensatz dazu differieren die GFAP-Gehalte in diesen Materialien. So wurde in Rückenmark mit 55.000 ng – 220.000 ng GFAP/mg s.P. durchschnittlich ein 4fach höherer Gehalt nachgewiesen als in Gehirn (SCHMIDT et al., 1999b) (Anhang 4). Im Sinne des vorbeugenden Verbraucherschutzes sind jedoch sowohl Hirn als auch Rückenmark unerwünscht, da in beiden Geweben die höchsten Infektionstiter des BSE-Erregers gefunden wurden (SSC, 1999a).

Außerdem kann aus dem immunchemischen Ergebnis weder die Tierart noch das Alter des Tieres abgelesen werden, wie dies von Kritikern gefordert wird (SCHWÄGELE, 2001). Nach derzeitigem Wissensstand gelten Gehirn und Rückenmark von über 12 Monate alten Rindern, Schafen und Ziegen als spezifisiertes Risikomaterial (Anonym, 2001b und 2001c), das für die Verwendung in Lebensmitteln verboten ist. Die Verarbeitung von zentralnervösem Gewebe - unabhängig der Tierart und dem Alter des Tieres - in Lebensmitteln widerspricht desweiteren den allgemeinen Erwartungen der Verbraucher (GÜLLNER, 2001). Aus diesem Grund wurden die Leitsätze für Fleisch und Fleischerzeugnisse des Deutschen Lebensmittelbuches im Oktober 2001 entsprechend geändert (ANONYM, 2001a). Demnach ist es zukünftig verboten, Hirn und Rückenmark sowie andere Innereien in Fleischerzeugnissen zu verwenden (Tabelle 5-4). Im Vorfeld dieser Änderung wurde bei DLG-Qualitätswettbewerben bereits ein

entsprechender Maßstab für Wurst und Wurstqualität zugrunde gelegt (ANONYM, 2001e). Gestützt wurden diese Einschränkungen von Berichten über symptomlose BSE-Erkrankungen bei Labortieren (HILL et al., 2000). Desweiteren werden Überschreitungen der Artenschanke bei Schwein und Huhn nicht mehr gänzlich ausgeschlossen (RACE und CHESEBRO, 1998; HILL et al., 2000).

Tabelle 5-4 Definition des Begriffes „Innereien“ laut den Leitsätzen für Fleisch und Fleischerzeugnisse (Anonym, 2001a) (gültig seit Oktober 2001)

- | |
|--|
| <ul style="list-style-type: none"> • „<u>Innereien</u>“ für die Herstellung von Fleischerzeugnissen sind Leber, Herz*, Zunge ohne Schleimhaut. • Darüber hinaus werden <u>für spezielle, traditionelle Fleischerzeugnisse</u> die folgenden „sonstigen Tierkörper Teile“ unter Kenntlichmachung der Verwendung eingesetzt: Lunge*, Schweinemilz, Nieren, Magen und Vormagen ohne Schleimhaut. • <u>Nicht in Fleischerzeugnissen verarbeitet werden:</u> z.B. Därme, Harnblase, Gekröse, Hirn, Rindermilz, Rückenmark, Schleimhaut |
|--|

* bis zur wissenschaftlichen Klärung der Infektiosität von durch Bolzenschuß betäubten Rindern entspricht eine Verarbeitung nicht der allg. Verkehrsauffassung

Die Verarbeitung von Separatorenfleisch aus Rinderknochen ist durch die EU-Entscheidung 2000/418/EG stark eingeschränkt worden. Bisher war lediglich verboten, Kopf- und Röhrenknochen sowie Gliedmaßenenden von Säugetieren (§ 2.7a Fleischhygiene-Verordnung) für die maschinelle Restfleischgewinnung zu nutzen. Seit dem 1. Oktober 2000 dürfen auch die Wirbelsäulen von Rindern, Schafen und Ziegen nicht mehr für die Restfleischgewinnung verwendet werden (EU, 2000a). Allerdings besitzen Schweine und Geflügel in diesem Wirtschaftsbereich größere Bedeutung als Wiederkäuer (HILDEBRANDT et al., 2001). Da Separatorenfleisch neben zentralnervösem Gewebe stets vermehrt Knochen- und Knorpelpartikel enthält, kann dessen Verarbeitung in Lebensmitteln durch zusätzliche Nachweisverfahren, wie der Lebensmittelhistologie (BIJKER et al., 1985; TREMLOVÁ, 2000) oder der Bestimmung des Calciumgehaltes (FSIS, 1998), festgestellt werden. Um den Verbraucher vor

unerwünschten Zutaten zu schützen (§ 17 (1) Nr. 2b LMBG), muß gemäß den Leitsätzen für Fleisch und Fleischerzeugnisse die Verarbeitung von Separatenfleisch kenntlich gemacht werden (Anonym, 2001a; EU, 2001a).

Unter diesen Gesichtspunkten ist der vorgestellte immunchemische ZNS-Nachweis zur Kontrolle der Roh- und Endprodukte im Sinne der allgemeinen Verbrauchererwartung. Die Bestimmung der Tierart sowie des Alters des Tieres, von dem das zentralnervöse Material stammt, hat demzufolge lediglich wissenschaftliche Bedeutung.

5.2.1 Maximierung der immunchemischen Aktivität

5.2.1.1 Optimierung des Extraktionsmittels

Für den ZNS-Nachweis von nicht erhitzten Proben war die konventionelle Extraktionsmethode mit Tris-Harnstoff-Puffer mit oder ohne Zusatz von NaCl ausreichend. Bei stärker erhitzten Fleischerzeugnissen, insbesondere Vollkonserven, war eine Erhöhung der Empfindlichkeit des immunchemischen Verfahrens erforderlich. Dies war durch die Optimierung der Proteinextraktion möglich. So wurde nach der Extraktion unter Zusatz von 2-Mercaptoethanol (5 % v/v) in Verbindung mit 5 mM DTT eine beachtliche Steigerung der immunchemischen Empfindlichkeit erreicht. Dies ist sowohl in den immunchemischen Aktivitäten der Feldproben als auch in den Ergebnissen der Erhitzungsversuche zu erkennen.

5.2.1.2 Konzentrierung der Extrakte

Durch Filtration der Probenextrakte durch eine Membran mit einer Trenngrenze von 10 kDa werden Bestandteile mit einem größeren Molekulargewicht, wie z.B. das NSE-Monomer mit 45 – 50 kDa (SUZUKI et al., 1980; HEYDORN et al., 1985), zurückgehalten und aufkonzentriert. Da Gehirnmateriale zwischen 10.000 ng und 17.500 ng NSE/mg löslichem Protein (MARANGOS et al., 1979) enthält, wurde eine Proportionalität zwischen dem Hirnanteil in der Probe und der Konzentrierungsfähigkeit erwartet. Dies wurde jedoch in der Untersuchung des Referenzmaterials nicht bestätigt. Ursachen hierfür sind im Probenextrakt sowie der

Konzentrierungsmethode zu suchen. So können z.B. größere Proteine in der Probe die Membran verstopfen, so daß keine Konzentrierung mehr stattfinden kann. Daneben erniedrigt sich die Flußrate durch Proteinausfällungen infolge des pH-Wertes in der Lösung oder hoher Proteinkonzentrationen (Anonym, 1995b).

5.2.2 Laborinterne Standards

Die Validierung des immunchemischen Nachweisverfahrens erfolgte an in der hauseigenen Technologie hergestellten Referenzmaterials. Der experimentell ermittelte kleinste nachweisbare Anteil von zentralnervösem Gewebe in Fleisch-erzeugnissen betrug in dieser Arbeit - nach Optimierung des Extraktionsmittels (vgl. Kapitel 3.3.3.1 sowie 5.2.1.1) – 0,1 % in erhitzten Brühwürsten sowie 0,25 % in Kochwürsten. In nativem Material konnten unter optimalen Laborbedingungen Anteile von 0,01 % ZNS erkannt werden. Im Gegensatz dazu wiesen LÜCKER et al. (1998) in Brühwürsten einen ZNS-Anteil von 0,25 % sowie in Kochwürsten lediglich von 1 % nach. Durch vorherige Fettextraktion konnten LÜCKER und Mitarbeiter die Empfindlichkeit des Nachweisverfahrens in einigen Fällen auf 0,25 % ZNS-Anteil in der Probe reduzieren (LÜCKER et al., 1998). Bei Durchführung des Tests ist auffällig, daß Referenzmaterial ohne den Zusatz von Hirn- oder Rückenmarkmaterial - unabhängig der Zusammensetzung (Muskel- und Fettanteil) oder der Technologie (erhitzt oder nativ) – bei gleicher Probenextraktion weder eine NSE- noch eine GFAP-Immunreaktion aufwiesen.

Die visuelle Auswertung der NSE- und der GFAP-Banden im Westernblot zeigte eine Steigerung der Immunintensitäten, die proportional dem Hirnanteil im Referenzmaterial verlief. Diese Einschätzung erfolgte rein subjektiv, allerdings immer im Vergleich zu dem Westernblotergebnis des Brühwurststandards mit 1 % ZNS-Anteil und zum Teil mit dem Ergebnis der nativen Rinderhirnprobe. Objektiviert wurden diese Ergebnisse durch densitometrische Auswertung der Immunintensitäten des Rohwurst- sowie des erhitzten Brühwurststandards. Jedoch fällt dabei auf, daß die ermittelten Werte der beiden Standards nicht mit-

einander vergleichbar sind. Dies ist wahrscheinlich durch die geringe Datendichte und somit einer relativ ungenauen Abschätzung der linearen Regressionsgeraden zu erklären. Aus diesem Grunde sollten die dargestellten Diagramme lediglich als grobe Tendenz der relativen Immunintensitäten gewertet werden.

5.2.3 Externe Standards

5.2.3.1 Schweizer Referenzmaterial

Anhand der immunochemischen Untersuchungen des Schweizer Referenzmaterials wurde ebenfalls die Empfindlichkeit des Nachweisverfahrens gezeigt. So wiesen von neun Proben mit Hirnantteilen zwischen 0 % und 1 % acht Proben positive NSE- und GFAP-Reaktionen auf. Anhand der visuellen und densitometrischen Auswertung der Immunintensitäten konnten sie gemäß ihrer Abstufung richtig eingeordnet werden. Der kleinste nachweisbare Hirnanteil in diesen Brühwürsten betrug 0,05 % und lag somit sogar unterhalb der Empfindlichkeit, die für laborinterne Standards ermittelt wurde. Lediglich bei einer Probe mit einem Zusatz von 0,01 % Hirn (Probe G9) wurden keine Immunreaktionen nachgewiesen. Bei der Beurteilung des falsch negativen Ergebnisses ist die Herstellungsmethode dieses Referenzmaterials zu berücksichtigen. Hierbei wurde zu jeweils ca. 10 kg Grundbrät Kalbshirn gemäß den angegebenen Prozentanteilen zugesetzt und vermischt (Dr. JEMMI, Bundesamt für Veterinärwesen Bern, persönliche Mitteilung). Für die Probe G9 (0,01 %) bedeutete dies eine Zugabe von 1 g Kalbshirn zu 10 kg Grundbrät (Abb. 5-2). Da diese Menge in bezug auf die Grundmenge verschwindend gering war, kann es zu einer inhomogenen Verteilung im Probenmaterial kommen. Um diese Problematik zu umgehen, wurde für die Herstellung der eigenen laborinternen Wurststandards mit Zwischenverdünnungen gearbeitet (Abb. 5-2). Dabei wurden geringe ZNS-Konzentrationen im Fleischerzeugnis durch entsprechende Verdünnung eines 10 %igen Hirnstandards mit Grundbrät hergestellt.

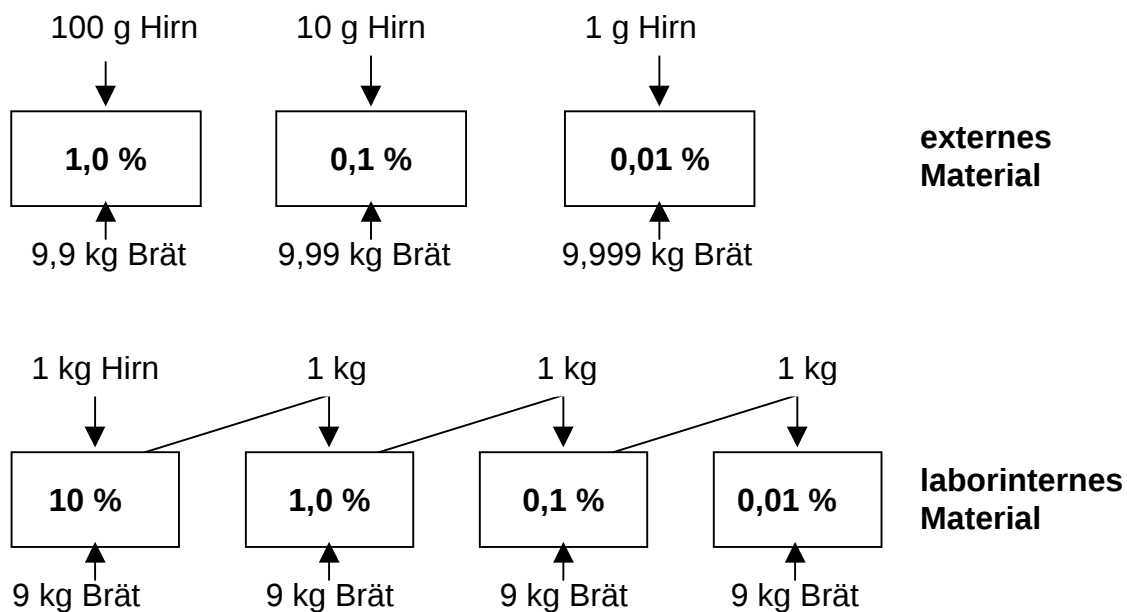


Abb. 5-2 Herstellungsverfahren des externen sowie des eigenen labor-internen Referenzmaterials im Vergleich

Dieses Beispiel zeigte, daß fehlende Immunreaktionen im Westernblot möglicherweise auf eine mangelhafte Verteilung des Hirnmaterials in der Probenmatrix zurückzuführen ist. Desweiteren müssen derartige Ergebnisse unter Berücksichtigung der Sensitivität des Nachweisverfahrens betrachtet werden. So lag die Probe G9 mit 0,01 % Hirnanteil unter der an erhitztem laborinternen Brühwurststandard ermittelten Nachweisgrenze von 0,1 % ZNS. Allerdings ist eine bewußte Zugabe von ZNS-Material in derart geringen Konzentrationen unter Praxisbedingungen eher unwahrscheinlich. Ein Vorkommen solcher ZNS-Konzentrationen in Fleischerzeugnissen kann durch die Verwendung von mit ZNS-behaftetem Separatorenfleisch erklärt werden.

5.2.3.2 Frankfurter Referenzmaterial

Zur Validierung des ZNS-Nachweisverfahrens diene ebenfalls das Frankfurter Referenzmaterial. Die NSE- sowie die GFAP-Ergebnisse zeigten, daß in den Proben S0 (3,3 % ZNS) und S2 (7,4 % ZNS) - im Gegensatz zu S1 (0 % ZNS) - zentralnervöses Gewebe enthalten war. Der Anteil in den Fleischerzeugnissen wurde anhand der Immunintensitäten im Vergleich zu denen des eigenen labo-

rinternen Standards auf ≥ 1 % ZNS grob geschätzt. Eine graduelle Differenzierung der Immunintensitäten der Proben konnte rein optisch nicht getroffen werden. Eine genauere Abschätzung der ZNS-Gehalte könnte durch densitometrische Auswertung versucht werden, jedoch sind hierzu repräsentative Standardkurven für jede Wurstmatrix nötig.

5.2.4 Feldproben

Insgesamt wurden bei 59 (8,9 %) Feldproben positive NSE-Immunreaktionen festgestellt, die mit GFAP bestätigt werden konnten. Die Ergebnisse wurden im folgenden hinsichtlich ihrer Reaktionsintensität im Westernblot ausgewertet. Hierbei wurde zwischen definierten Qualitätsabstufungen wie schwache, gut sichtbare und starke bis sehr starke Reaktion unterschieden. Bei der visuellen Auswertung wurde jeweils mit einem 1 %igen Brühwurststandard – mit „+“ beurteilt – verglichen. Rinderhirn wurde mit „++++“ bewertet.

Insgesamt wurde bei 38 (64,4 %) aller positiven Feldproben (n=59) eine mindestens gut sichtbare Reaktion nachgewiesen (Abb. 5-3; Tabelle 5-5). Vergleicht man diese Reaktionen mit Referenzmaterialien, so kann man davon ausgehen, daß diese Fleischerzeugnisse einen ZNS-Anteil von mindestens 1 % enthielten. Sechs Leberwurst- sowie eine Kochmettwurstprobe wiesen sogar eine sehr starke Immunreaktion auf. Dies spricht für die bewußte Zugabe einer größeren Menge zentralnervösen Gewebes. Dagegen wiesen 35,6 % der Feldproben (n=59) eine schwache NSE-Reaktion auf, die mit GFAP bestätigt wurde. Die Bestätigung ist notwendig, da es in einigen Fällen zu falsch positiven NSE-Reaktionen kommen kann (HORLACHER et al., 2001). Bestätigt sich die schwache NSE-Bande jedoch mit dem spezifischeren GFAP-Antikörper, deutet dies darauf hin, daß es sich hier wahrscheinlich um eine Kontamination, z.B. durch die Verwendung von mit zentralem Nervengewebe kontaminiertem Separatorenfleisch, und nicht um eine bewußte Zugabe von Hirn- oder Rückenmarkmaterial handelt. Der Verdacht der Verwendung von Separatorenfleisch ist durch weiterführende Untersuchungen, wie der Lebensmittelhistologie (BIJKER et al., 1985) oder der Calciumbestimmung (FSIS, 1998), abzuklären.

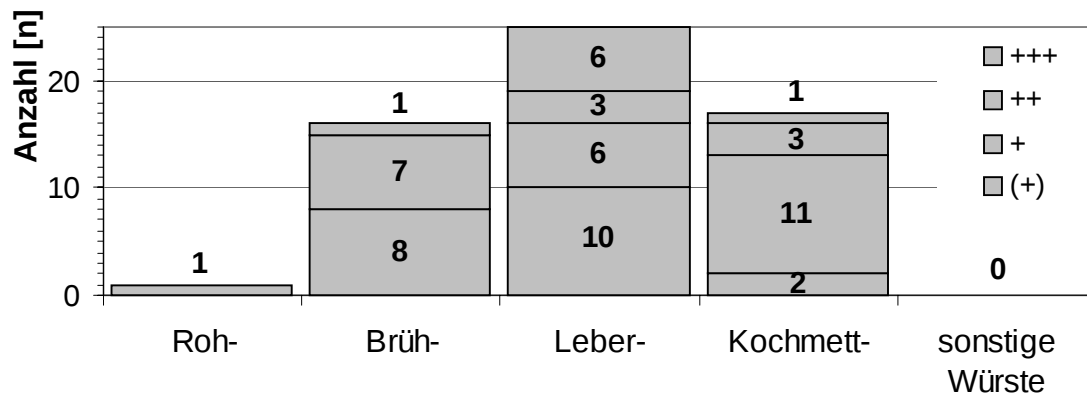


Abb. 5-3 Häufigkeitsverteilung qualitativer Immunreaktionen positiver Feldproben;
(+) schwach, + gut sichtbar, ++ stark, +++ sehr stark

Tabelle 5-5 Abstufung der Gesamtimmunreaktion positiver Feldproben

Art		Immunreaktionsabstufung n (%)				Gesamt n (%)
		(+)	+	++	+++	
Rohwurst		1 (100)	0	0	0	1 (1,7)
Brühwurst		8 (50)	7 (43,8)	1 (6,3)	0	16 (27,1)
Kochwurst	Leberwurst	10 (40)	6 (24)	3 (12)	6 (24)	25 (42,4)
	Kochmettwurst	2 (11,8)	11 (64,7)	3 (17,6)	1 (5,9)	17 (28,8)
Sonstige		0	0	0	0	0
Gesamt n (%)		21 (35,6)	24 (40,6)	7 (11,9)	7 (11,9)	59 (100)

Qualitative Reaktionsabstufung:

(+)	schwach	++	stark
+	gut sichtbar	+++	sehr stark

Negative Immunergebnisse insbesondere von hocherhitzten Fleischerzeugnissen, wie z.B. Vollkonserven, sollten kritisch betrachtet werden, da es aufgrund hitzeinduzierter Reaktionen zu Proteinveränderungen (HEISS und EICHNER, 1995) innerhalb des NSE- sowie des GFAP-Proteins kommen kann, die zu einer Reduktion der Immunaktivität führen können (vgl. Kapitel 5.3). In

diesen Fällen sollten zusätzliche Nachweisverfahren - wie z.B. das hitzeunabhängige Cholesterol-Screeningverfahren - durchgeführt werden. In der vorliegenden Arbeit wiesen jedoch Feldproben mit Cholesterolwerten über 200 mg/100 g FS mit Ausnahme zweier Fleischerzeugnisse nach Zusatz von Mercaptoethanol/DTT zum Extraktionspuffer sowohl eine positive NSE- als auch GFAP-Immunreaktion auf. Hierunter befanden sich auch vier nachweislich stark erhitze Mettwürste im Glas ($F_c > 4$), die bei herkömmlicher Tris-Harnstoff-Extraktion keine bzw. nur eine schwache Immunreaktion zeigten. Lediglich eine Leberwurst sowie eine gekochte Mettwurst wiesen keine Immunreaktion auf. Bei beiden Proben handelte es sich um mäßig erhitze Produkte ($F_c < 1$). Aufgrund der geringen Anzahl von Vollkonserven mit einem hohen Cholesterolwert, läßt sich in dieser Arbeit keine eindeutige Schlußfolgerung auf den Hitzeeinfluß treffen. Jedoch sind in der Literatur Fälle von hochehitzen Fleischerzeugnissen ($F_c > 4$) bekannt, die trotz einem hohen Cholesterolgehalt keine Immunreaktionen zeigten (LÜCKER et al., 2000; LÜCKER, 2001, Universität Leipzig, persönliche Mitteilung). Der Nachweis einer möglichen Eidotterverwendung verlief in diesen Fällen ebenfalls negativ (LÜCKER et al., 2000).

5.2.4.1 Rohwurst

Von 23 Rohwürsten wies lediglich eine Probe eine schwache NSE-Immunaktivität auf, die mit GFAP bestätigt werden konnte. Im Vergleich zu Referenzmaterial läßt sich der Gehalt von zentralnervösem Material auf 0,1 % bis 0,5 % schätzen. Der zugehörige Cholesterolgehalt von 77 mg/100 g spricht auch für einen eher geringen ZNS-Gehalt. Im Hinblick auf diese Ergebnisse ist ein Verdacht auf die Verwendung von Separatorenfleisch wahrscheinlich. Zur Abklärung wären weiterführende Untersuchungen (Lebensmittelhistologie, Calciumbestimmung) nötig.

5.2.4.2 Brühwurst

Unter den 16 positiven Brühwürsten wurden acht Proben mit einer schwachen, sieben mit gut sichtbaren sowie eine mit einer starken NSE-Immunreaktion festgestellt. Damit wiesen 50 % der 16 Feldproben eine Reaktion unter dem

Standard mit 1 % Hirnanteil auf. Diese geringen Reaktionen sind möglicherweise auf den Einsatz von Separatorenfleisch zurückzuführen. Durch zusätzliche Untersuchungen wie z.B. der Lebensmittelhistologie könnte ein Verdacht auf die Verarbeitung von Separatorenfleisch ausgesprochen werden. ZENS et al. (2000) wiesen in zwei dieser immunchemisch schwach positiven Proben (Nr. 6 und Nr. 9) eine vermehrte Anzahl an Knochen- und Knorpelsplittern nach.

5.2.4.3 Kochwurst

5.2.4.3.1 Leberwurst

Von 25 positiven Leberwürsten wiesen 60 % (15) eine NSE-Reaktivität auf, die der Reaktion des Referenzmaterials entsprach bzw. darüber lag. Davon wurden drei Intensitäten als stark („++“) sowie sechs mit „+++“ beurteilt. Die übrigen 10 Leberwürste zeigten lediglich eine schwache Reaktion („(+“). Bei der industriellen Herstellung von Leberwurst wurde der Zusatz von Hirn als Emulgator eingesetzt (LÜCKER et al., 2001). Hier kamen Mengen zum Tragen, die deutlich über 1 % lagen. Dies bestätigte auch ein Fleischwarenerzeuger, indem er gegenüber dem Veterinäramt zugab, 4,6 % Schweinehirn zugesetzt zu haben (vgl. s. 146). Die Verwendung von Schweinehirn widersprach dem Verbot des spezifizierten Risikomaterials (Anonym, 2001b) nicht, jedoch der jetzigen Verbrauchererwartung (Anonym, 2001a). Die Verarbeitung von Schweinehirn in einem Produkt der Spitzenqualität, wie hier, entsprach allerdings nicht den damals geltenden Leitsätzen für Fleisch und Fleischerzeugnisse (Anonym, 1998), nach denen die Verarbeitung von Innereien mit Ausnahme von Leber untersagt war. Durch diesen Umstand täuschte er dem Verbraucher Eigenschaften der Leberwurst vor, die diese nicht erfüllte (§ 17 (1) Nr. 2b und 5b LMBG).

5.2.4.3.2 Kochmettwurst

Insgesamt wurden 17 Kochmettwürste als ZNS-positiv beurteilt. Der hohe Prozentsatz von 21 % ist im Hinblick auf den Stichprobenumfang zu betrachten sowie darauf, daß sich in dieser Gruppe zahlreiche amtliche ZNS-Verdachtsfälle befanden, die uns zur Verfügung gestellt wurden.

Die Abstufung der NSE- und GFAP-Immunreaktionen bei den Kochmettwürsten ergab bei insgesamt 88,2 % der 17 Proben eine mit dem 1 %igen Referenzmaterial vergleichbare bzw. stärkere Immunintensität. Hierbei häuften sich 11 Proben (64,7 %) in der Klasse, die als gut sichtbar („+“) beurteilt wurde. Lediglich in zwei Proben wurde eine schwache Reaktion nachgewiesen. Der hohe Anteil der Proben mit mindestens 1 % zentralnervösem Gewebe spricht für die bewußte Zugabe unter Ausnutzung der Emulgatorwirkung, der geringen Kosten und der bis Oktober 2000 (EU, 2000a) einfachen Verfügbarkeit von Hirngewebe (LÜCKER et al., 2000).

5.2.4.3.3 Blutwurst, Sülzwürste sowie sonstige Erzeugnisse

In diesen Gruppen wurden keine Proben mit zentralnervösem Gewebe nachgewiesen. Die geringen Cholesterolverwerte sprechen ebenfalls gegen einen Zusatz von ZNS-Material (s. Kap. 4.1.3.3.3, 4.1.3.3.4, 4.1.3.4 und 5.1.3.3.3).

5.2.4.4 Organe

Die immunchemischen Ergebnisse der Gewebeuntersuchung ergaben bei Rinderhirn und Rückenmark sehr starke NSE-Immunintensitäten („+++“). Nach Verdünnung mit Muskulatur war noch ein Gehalt von 0,1 % Rinderhirn bzw. Rückenmark mittels Westernblotverfahren feststellbar. Im Gegensatz dazu wiesen die dorsalen Wurzelganglien eine schwächere Reaktion auf („+“), die mit dem Brühwurststandard mit 1 % Hirnanteil vergleichbar war. Von den nicht zum ZNS gehörenden Gewebe reagierte die Probe mit 100 % Nebenniere mit einer gut sichtbaren Immunintensität („+“) am stärksten. Weitere Gewebe, die möglicherweise in Fleischerzeugnissen verarbeitet werden, wie z.B. Lymphknoten, Mandeln, Lunge, Milz oder Leber, wiesen lediglich in reiner Form eine schwache NSE-Reaktion („(+)“) auf, die jedoch mit GFAP nicht bestätigt wurde. Nach Verdünnung der Gewebeproben mit Muskulatur war keine Immunreaktion mehr nachweisbar. Diese schwach positiven NSE-Reaktionen können jedoch im Hinblick auf den ZNS-Nachweis in Fleischerzeugnissen vernachlässigt werden, da es unwahrscheinlich ist, daß diese Gewebe zu 100 % verarbeitet werden. Muskulatur und Fettgewebe, die üblicherweise einen großen Anteil in

Fleischerzeugnissen haben, wiesen weder eine NSE- noch eine GFAP-Reaktion auf.

Die immunchemische Untersuchung des *Nervus ischiadicus* als Vertreter des peripheren Nervensystems wies noch bis zu einem Anteil von 50 % eine Reaktion mit dem NSE-Antikörper nach, dies wurde jedoch mit dem GFAP-Antikörper nicht bestätigt. Bei geringeren Konzentrationen in der Probe konnte jedoch keine Immunbande festgestellt werden. Für den immunchemischen Nachweis von ZNS-Material in Fleischerzeugnissen können diese Ergebnisse ebenfalls vernachlässigt werden, da der Anteil großer Nerven üblicherweise weit unter diesen Prozentanteilen liegt. Außerdem sind große Mengen an peripherem Nervengewebe in Fleischerzeugnissen im Sinne des vorbeugenden Verbraucherschutzes ebenfalls nicht erwünscht, obwohl bislang keine BSE-Infektiosität in diesem Gewebe nachgewiesen werden konnte (KIMBERLIN und WILESMITH, 1994; COLLEE und BRADLEY, 1997a und 1997b).

Die Angaben der NSE-Gehalte aus der Literatur (SCHMECHEL et al., 1978; MARANGOS et al., 1979; KATO et al., 1982) sind mit den qualitativen Ergebnissen dieser Untersuchung vergleichbar (Abb. 5-4). In Rinderhirn und Rückenmark, die eine sehr starke Immunreaktion („+++“) aufwiesen, wurden Gehalte von 12.500 ng bzw. 13.000 ng NSE/mg löslichem Protein (s.P.) nachgewiesen (MARANGOS et al., 1979; KATO et al., 1982). Ihr Gehalt lag demnach um 2-3 Größenordnungen höher als die NSE-Gehalte in der Skelettmuskulatur bzw. dem Fettgewebe. Gewebe mit NSE-Gehalten zwischen 100 ng und 10.000 ng NSE/mg s.P., wie z.B. dorsale Wurzelganglien, periphere Nerven oder Nebennieren (Anhang 3), wiesen in dieser Studie eine gut sichtbare NSE-Immunreaktion auf. Dagegen wiesen Gewebe, in denen unter 100 ng NSE/mg s.P. festgestellt wurde (Anhang 3), mit Ausnahme der Niere, keine bzw. lediglich eine schwache („+“) Immunintensität auf (Anhang 15).

SCHMIDT et al. (1999b) wiesen in Rinderhirn GFAP-Gehalte nach, die je nach Hirnregion zwischen 9.000 ng und 55.000 ng GFAP/mg s.P. betrugen (Anhang

4). Demgegenüber enthält Material des Rückenmarks einen GFAP-Gehalt, der maximal um das vierfache höher liegt als der GFAP-Gehalt von Hirn. Diese Werte übersteigen die GFAP-Werte in der Skelettmuskulatur mit 2,8 ng/mg s.P. um mindestens 3 Größenordnungen. In Material des *Nervus ischiadicus* vom Rind wurden Gehalte zwischen 13,5 ng und 51 ng GFAP/mg s.P. nachgewiesen (SCHMIDT et al., 1999b). Ein schwach positives GFAP-Ergebnis in einer Probe, die *Nervus ischiadicus*-Gewebe zu 100 % enthält, ist demzufolge nicht auszuschließen, was unsere eigenen Untersuchungen bestätigten. Angaben über GFAP-Gehalte anderer Rindergewebe sind uns aus der Literatur nicht bekannt, jedoch können die Gehalte aufgrund unserer GFAP-Ergebnisse im Westernblot auf unter 100 ng/mg s.P. geschätzt werden.

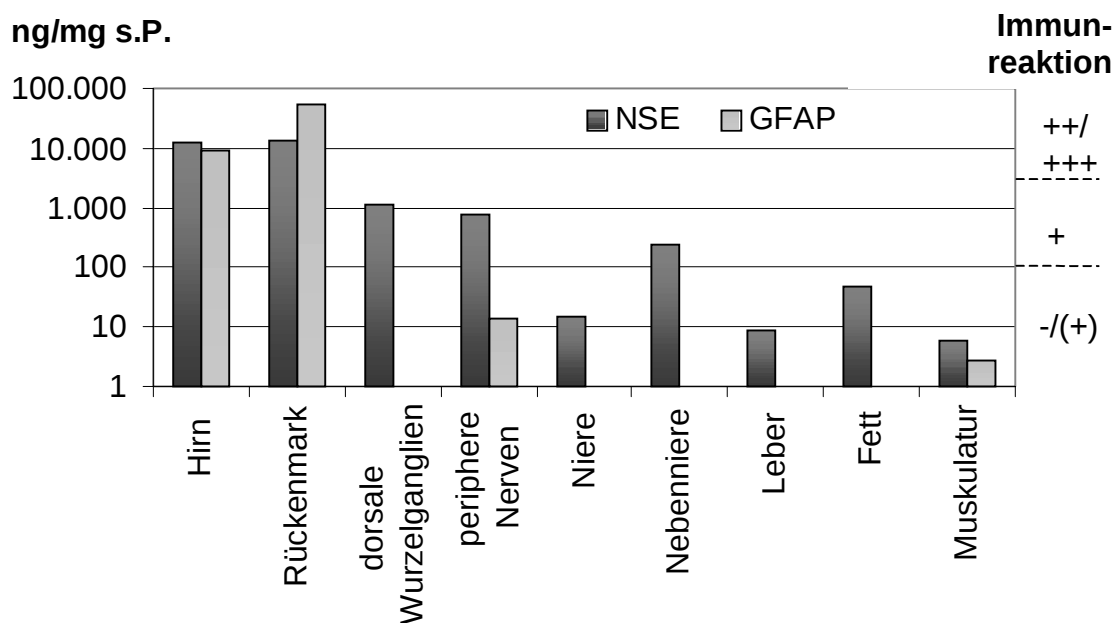


Abb. 5-4 NSE- sowie GFAP-Gehalte einiger Rinderorgane gemäß Literaturangaben (s.P.=soluble Protein);
- negativ, (+) schwach, + gut sichtbar, ++ stark, +++ sehr stark

5.3 Reduktion der immunchemischen NSE-Aktivität durch Erhitzen

Die Erhitzungsdauer sowie -temperatur bei der Herstellung der Fleischerzeugnisse hat einen Einfluß auf die Nachweisbarkeit der spezifischen ZNS-Proteine NSE sowie GFAP. Infolge Hitzeeinwirkung kommt es zu Proteinveränderungen durch sekundäre Peptidreaktionen (HEISS und EICHNER, 1995). Hierbei sind vor allem Änderungen in der tertiären sowie quartären Proteinstruktur zu nennen (LÜCKER et al., 2000), wogegen die Primärstruktur hitzeresistenter ist. Der Nachweis von zentralnervösem Gewebe in erhitzten Fleischerzeugnissen ist von der Anbindungsfähigkeit des monoklonalen Antikörpers an das spezifische Protein abhängig. Dies hängt mindestens zu einem Teil von der Form eines 3-dimensionalen Proteinepitops ab (EIGENBRODT et al., 1992). Infolge der Strukturänderungen nach starker Erhitzung kann der Antikörper wahrscheinlich nicht bzw. nicht optimal binden, so daß es zu einer Reduktion der nachweisbaren Immunaktivität kommt.

Diese chemischen Reaktionen können durch einen erhöhten Gehalt von Kohlenhydraten begünstigt werden (HEISS und EICHNER, 1995), wie die Ergebnisse des Kochwurst- gegenüber dem Brühwurststandard zeigten. Hiervon können vor allem Leberwürste aufgrund ihres relativ hohen Glycogen-Gehaltes im Leberanteil (SOUCI et al., 1994) betroffen sein. Durch den Zusatz von schwefligen Säuren, wie Mercaptoethanol, zur Proteinextraktion können wahrscheinlich Zwischenprodukte dieser Hitzereduktion reaktiviert werden, so daß eine vorher nicht nachweisbare Immunreaktion sichtbar wird (HEISS und EICHNER, 1995; LÜCKER et al., 1999b).

Zur Darstellung der Reduktion der Immunaktivität nach Erhitzung wurden in dieser Arbeit entsprechende Untersuchungen am Verhalten der neuronenspezifischen Enolase durchgeführt. Die dargestellten Ergebnisse wurden nach Hinzuziehung mehrerer Blots ermittelt und sind deshalb rein deskriptiv. Ein direkter Vergleich der Reduktionskurven des Referenzmaterials mit verschiedenen Hirnanteilen ist infolge unterschiedlicher Zusammensetzung und Technologie nicht möglich. Desweiteren fehlen genügend Daten, um die dezimale Redukti-

onszeit (D-Wert) sowie einen z-Wert (Temperaturerhöhung) berechnen zu können.

Insgesamt ist festzustellen, daß die NSE-Immunintensität durch Erhitzung reduziert wird, wobei die Reduktion bei der untersuchten Kochwurst stärker als bei den untersuchten Brühwürsten ausfiel. Durch Anwendung einer optimierten Extraktion im Vergleich zur herkömmlichen, wurde eine Reaktivierung der durch die Erhitzung reduzierten Immunaktivität erreicht. Eine deutliche Verzögerung der Reduktion beobachtet man bei Kochwürsten als auch bei stärker erhitzten Brühwürsten.

5.3.1 Brühwurststandard mit 10 % Hirnanteil

Bei Erhitzung auf 80 °C und herkömmlicher Tris-Harnstoff-Extraktion wurde die Ausgangsintensität nach 70 min um die Hälfte reduziert. Nach einer Zeitdauer von 400 min konnte keine NSE-Immunreaktion festgestellt werden. Bei Erhöhung der Temperatur um 20 °C fiel die exponentielle Reduktionskurve doppelt so schnell ab. Dagegen erreichte man eine deutliche Reaktivität der NSE-Immunintensität nach dem Zusatz von Mercaptoethanol/DTT. Bei einer Temperatur von 80 °C, die für die Konservenherstellung üblich ist, wurden noch nach einer über 500 min dauernden Erhitzung Werte der relativen Immunintensität von über 0,6 festgestellt. Bei höheren Temperaturen (100 °C) wurde die immunchemische Aktivität nach 150 min um 50 % reduziert; sie war jedoch im Westernblot noch feststellbar. Dies zeigt, daß der Zusatz einer schwefligen Säure, wie Mercaptoethanol, zu einer deutlichen Reaktivierung der NSE-Immunaktivität führen kann.

Die exponentiellen Reduktionskurven bei 80 °C sowie 100 °C lagen nach einer Mercaptoethanol-DTT-Extraktion über den entsprechenden Kurven des Referenzmaterials mit einem Hirnanteil von 5 % sowie 1 %.

5.3.2 Brühwurststandard mit 5 % Hirnanteil

Messungen nach Tris-Harnstoff-Extraktion ergaben bereits nach 20 min bei 80 °C eine vollständige Reduktion der Immunintensität. Durch den Zusatz von

Mercaptoethanol/DTT kam es zu einer deutlichen Reaktivierung. Eine 50 %ige Reduktion wurde bei 80 °C erst nach 350 min festgestellt. Eine Erhöhung der Erhitzungstemperatur auf 95 °C bzw. 100 °C führte zu einem steileren Abfall der Reduktionskurven. So verringerte sich die Ausgangsintensität der Probe innerhalb der ersten 10 min bei 100 °C um 94 %.

Gegenüber der Brühwurst mit einem Hirnanteil von 10 % war hier der Abfall der immunchemischen NSE-Aktivität bei einer Temperatur von 80 °C mit -0,002 um das 2fache steiler. Jedoch lagen die exponentiellen Reduktionskurven für 100 °C bzw. 95 °C unterhalb der entsprechenden Brühwurstkurve mit 1 % Hirnanteil. Allerdings sind die Reduktionskurven der Brühwurst mit einem Hirnanteil von 5 % infolge unterschiedlicher Technologie nicht mit denen anderer Referenzmaterialien vergleichbar. Aufgrund der geringen vorliegenden Datenmenge – 4-6 Westernblots und teilweise zu große Zeitabstände – ist die Erstellung einer repräsentativen Reduktionskurve in dieser Studie nicht möglich. Aus diesem Grunde sind zukünftig weitere Untersuchungen notwendig.

5.3.3 Brühwurststandard mit 1 % Hirnanteil

Nach Anwendung der herkömmlichen Tris-Harnstoff-Extraktion lag der Ausgangswert der Brühwurstprobe mit 1 % Hirnanteil bei 0,56 relativer NSE-Immunintensität. Dieser Wert wurde bereits nach ca. 6 min bei 100 °C um die Hälfte reduziert. Eine Reaktivierung der Immunintensität wurde durch den Zusatz von Mercaptoethanol/DTT erreicht. So wurde die Zeitspanne zur Reduktion des Ausgangswertes um 50 % auf 30 min verlängert. Nach ca. 180 min konnte jedoch keine NSE-Reaktion mehr festgestellt werden.

5.3.4 Kochwurststandard mit 10 % Hirnanteil

Die Ergebnisse des Kochwurststandards wiesen eine steilere Reduktionskurve der relativen NSE-Immunintensität auf als der Brühwurststandard mit einem Hirnanteil von 10 %. So wurde bei 80 °C und herkömmlicher Tris-Harnstoff-Extraktion eine Reduktion der relativen Immunintensität um 50 % bei Kochwurst bereits nach ca. 15 min nachgewiesen, wobei der Brühwurststandard die gleiche Intensität erst nach 70 min zeigte. Nach ca. 60 min wurde keine NSE-

Reaktion bei der Kochwurstprobe festgestellt. Bei einer Temperaturerhöhung um 20 °C zeigte sich innerhalb der ersten 10 min ein sehr steiler Abfall der Exponentialkurve. Der Zusatz von Mercaptoethanol/DTT verlängerte die Erhitzungsdauer bei 100 °C - nach der noch NSE nachweisbar war - von 15 min auf 180 min. Jedoch verlief die exponentielle Reduktionskurve für 100 °C nach Mercaptoethanol-DTT-Extraktion über derjenigen für 80 °C. Dies liegt wahrscheinlich an der ungenauen Kurvenberechnung infolge zu geringer Datendichte, da lediglich vier Meßzeiten bei einer Erhitzung auf 100 °C vorlagen.

6 Zusammenfassung

Im Hinblick auf die Problematik der bovinen spongiformen Enzephalopathie (BSE) und der daraus erwachsenden Sensibilisierung des Verbrauchers bezüglich der Zusammensetzung der Fleischerzeugnisse ist es notwendig, der Lebensmittelüberwachung ein geeignetes Kontrollverfahren der Roh- und Endprodukte an die Hand zu geben. Vorrangig ist die Einhaltung des Verarbeitungsverbots von Gewebe des zentralen Nervensystems (ZNS) in Lebensmitteln, da dies als Hauptinfektionsquelle der BSE angesehen wird. In der vorliegenden Arbeit wurde deshalb der Nachweis von zentralnervösem Gewebe in rohen sowie hitzebehandelten Fleischerzeugnissen mittels Cholesterol-Screening sowie immunchemischer Proteindetektion systematisch untersucht.

Die Bestimmung des Cholesterolgehalts ist ein einfach durchzuführendes Verfahren, das jedoch aufgrund seiner relativ geringen Spezifität und der hohen Schwankungsbreite der Meßergebnisse lediglich als Screeningmethode geeignet ist. Zur Beurteilung der Cholesterolwerte wurde anhand der ermittelten Meßdaten der ZNS-negativen Proben ein maximaler normaler Grenzwert, ein sogenannter Cutoff-Point (CP), berechnet. Dieser lag bei allen Fleischerzeugnissen mit Ausnahme von Leberwürsten bei 108 mg Cholesterol/100 g Frischsubstanz (FS) mit einer statistischen Sicherheit von 75 %. Aufgrund des Leberanteils lag der Cutoff-Point für Leberwürste bei 152 mg/100 g FS ($p=0,25$). Im Hinblick auf die geringe statistische Sicherheit muß man jedoch mit einer hohen Anzahl von falsch positiven Verdachtsproben im Cholesterol-Screeningverfahren rechnen. Deshalb sind spezifischere Methoden für den Nachweis von ZNS in Lebensmitteln notwendig. In der vorliegenden Arbeit wurde hierzu das immunchemische Verfahren verwendet.

Als Marker dienten die neuronenspezifische Enolase (NSE) sowie das Saure Gliafaserprotein (GFAP). Beide sind hoch spezifisch für das zentrale Nervensystem, jedoch ist die Auswertung der NSE-Banden einfacher als die der GFAP-Banden. Unter Berücksichtigung der NSE-Ergebnisse und der optimier-

ten Extraktion durch Zusatz von 2-Mercaptoethanol und 1,4-Dithio-D,L-threitol (DTT) wurden in erhitzten Fleischerzeugnissen noch 0,1 % ZNS-Gehalte in der Probe nachgewiesen. Bei nicht erhitztem Material konnten sogar bis 0,01 % ZNS-Zusätze festgestellt werden. Insgesamt erwiesen sich von 661 rohen sowie hitzebehandelten Fleischerzeugnissen 9 % als für den Zusatz von ZNS immunchemisch positiv.

Die Erhitzung von Fleischerzeugnissen, insbesondere bei Leberwürsten, führte zu einer exponentiellen Reduktion der NSE-Immunaktivität, nicht jedoch des Cholesterolgehaltes. Mit Hilfe schwefelhaltiger Extraktionsmittel, insbesondere Mercaptoethanol in Verbindung mit DTT, konnte die NSE-Immunintensität der Proben reaktiviert werden. Dies ist vor allem bei hitzekonservierten Fleischerzeugnissen von Bedeutung. Während hier die Tris-Harnstoff-Extraktion bei Proben, die im Cholesterol-Screening positiv beurteilt wurden, häufiger negative NSE-Reaktionen lieferte, wurde nach dem Zusatz von Mercaptoethanol und DTT zum herkömmlichen Extraktionsmittel eine teilweise stark ausgeprägte Immunreaktion erkennbar. Bei Referenzmaterial ohne Zusatz von ZNS war dagegen bei gleicher Behandlung weder eine NSE- noch eine GFAP-Reaktion erkennbar.

Eine weitere Empfindlichkeitssteigerung des Westernblotverfahrens konnte durch die Aufkonzentrierung der Probenextrakte erreicht werden.

Im Sinne des vorbeugenden Verbraucherschutzes ist die Anwendung der vorgestellten Methode zur Detektion von ZNS-Zusätzen in Fleischerzeugnissen im Rahmen einer Endproduktkontrolle zu empfehlen. Dabei ist dem Westernblotverfahren gegenüber dem Cholesterol-Screening, insbesondere unter Berücksichtigung der geringen Spezifität, bei mäßig erhitzten Wursterzeugnissen, der Vorzug zu geben. Die fehlende Nachweisbarkeit der Tierart sowie des Alters, als häufigsten Kritikpunkt, ist im Hinblick auf die allgemeine Verbrauchervorstellung von Fleischerzeugnissen sowie die geänderten Leitsätze für Fleisch und Fleischerzeugnisse des Deutschen Lebensmittelbuches vernachlässigbar.

7 Summary

In view of the crisis caused by bovine spongiform encephalopathy (BSE) and the growing sensibility of the consumer as pertaining to the composition of retail meat products, it was necessary to develop suitable analytical methods for official food control. First priority must be given to the ban on tissues on the central nervous system (CNS) as CNS is regarded as the main source of infection with the BSE agent. In the present study the detection of tissues of the CNS by means cholesterol quantification and immunochemical analysis of CNS specific proteins was systematically investigated in raw and heated meat products.

The quantification of cholesterol is a method easy to apply in routine food control. Therefore, it is suitable as screening method despite low specificity and the relatively high differences between measurements. In order to assess the results of cholesterol analysis of the samples, a normal maximum cholesterol content of cooked sausages, the cutoff point (CP), was calculated on the basis of the data from CNS negative sausages in this investigation. In this study upper limits (CP) of 108 mg cholesterol/100 g of fresh products for all meat products without liver addition with a statistical security of 75 % were established. The cutoff point for liver sausages was 152 cholesterol mg/100 g ($p=0.25$). The low statistical security will cause a relatively high number of false positive suspicious samples when using cholesterol quantification for detection of CNS. This fact necessitates the availability of more specific methods. In the own studies immunochemical methods were used which facilitated highly specific and sensitive CNS detection in meat products.

As markers, neuron specific enolase (NSE) and glial fibrillary acidic protein (GFAP) were used. Both are highly specific for the central nervous system, however, interpretation of the NSE-immunoblot was easier as that of the GFAP-immunoblot. Using NSE as marker and the optimised extracting buffer with 2-Mercaptoethanol and 1,4-Dithio-D,L-threitol the lowest detectable amount of CNS tissue in heated meat products was 0.1 %. In non heated material 0.01 %

CNS addition could still be detected. Taking all the 661 raw as well as heated meat products together 9 % showed a positive CNS reaction in the westernblot.

Whereas the heating of retail meat products, in particular of liver sausages, caused an exponential reduction of the NSE immunoresponse, cholesterol content was not reduced. After extracting the proteins with tris-urea buffer with Mercaptoethanol and 1,4-Dithio-D,L-threitol (DTT) the NSE immunoresponse could be reactivated. In particular this proved to be necessary in strongly heated canned samples. In such samples, which were analysed positive in the cholesterol screening, the tris-urea extraction buffer gave negative NSE reactions frequently. By use of Mercaptoethanol and DTT in the conventional extracting buffer immunoreactions became not only recognisable but were sometimes intensely pronounce. On the other hand reference material without the addition of CNS tissue showed neither a NSE- nor a GFAP-reaction. A further increase of the sensitivity of the immunochemical analysis could be achieved by the concentration of the sample extracts.

According to the principles of preventive consumer protection the application of the presented methods in official food control for detection of CNS tissues in retail meat products is well suitable. The immunochemical analysis of CNS specific proteins should have the distinction of the cholesterol screening, in particular with consideration of the low specificity, in moderate heated sausages. The test cannot detect the species or age of the animal the CNS was derived of, however, this is not essential when considering the consumer expectation of meat products and the modified German Food Code.

8 Literaturverzeichnis

- Acker L., Greve H. (1963) Untersuchungen über Sterine in Eierteigwaren und ihre quantitative Bestimmung - 1.Mitteilung: Die gravimetrische Bestimmung der Sterine. Z. Lebensm. Unters. Forsch. 124: 257-265.
- Aguzzi A., Weissmann C. (1997) Prion research: the next frontiers. Nature 389: 795-798.
- Aguzzi A., Weissmann C. (1998) The prion's perplexing persistence. Nature 392: 763-764.
- Albrechtsen M., von Gerstenberg A., Bock E. (1984) Mouse monoclonal antibodies reacting with human brain glial fibrillary acidic protein. J. Neurochem. 42: 86-93.
- Almond J., Pattison J. (1997) Human BSE. Nature 389: 437-438.
- Alper T., Cramp W., Haig D., Clarke M. (1967) Does the agent of scrapie replicate without nucleic acid? Nature 214: 764-766.
- Alpers M., Gajdusek D. (1965) Changing patterns of Kuru: epidemiological changes in the period of increasing contact of the fore people with western civilization. Am. J. Trop. Med. Hyg. 14 (5): 852-879.
- Anderson R., Donnelly C., Ferguson N., Woolhouse M., Watt C., Udy H., McWhinney S., Dunstan S., Southwood T., Wilesmith J., Ryan J., Hoinville L., Hillerton J., Austin A., Wells G. (1996) Transmission dynamics and epidemiology of BSE in british cattle. Nature 382: 779-788.
- Anil M., Love S., Williams S., Shand A., McKinsty J., Helps C., Waterman-Pearson A., Seghatchian J., Harbour D. (1999) Potential contamination of beef carcasses with brain tissue at slaughter. Vet. Rec. 145: 460-462.
- Anil M., Love S., Helps C., McKinsty J., Brown S., Philips A., Williams S., Shand A., Bakirel T., Harbour D. (2001) Jugular venous emboli of brain tissue induced in sheep by the use of captive bolt guns. Vet. Rec. 148: 619-620.
- Anonym (1991) Verordnung über anzeigepflichtige Tierseuchen. Bgbl I vom 23.05.91, S. 1178.
- Anonym (1993) Bovine spongiform encephalopathy in the United Kingdom: memorandum from a WHO meeting. Bull. World Health Organ. 71 (6): 691-694.
- Anonym (1994) Prions and public health. Nature 370: 2.
- Anonym (1995a) Farb-Test zur Bestimmung von Cholesterin in Lebensmitteln und anderen Probenmaterialien. Boehringer Mannheim/r-biopharm, Darmstadt.
- Anonym (1995b) Überblick über Ultrafiltration. Amicon GmbH, Witten.
- Anonym (1996a) Putting prions to the test. Science 273: 184-189.
- Anonym (1996b) CJD: Desinfektion und Sterilisation von chirurgischen Instrumenten - Empfehlungen einer Expertenberatung. Epidemiologisches Bulletin 7: 182-183.
- Anonym (1996c) Fleischtechnologie. ed. Heinz Sielaff, Behr's Verlag.
- Anonym (1998) Leitsätze für Fleisch und Fleischerzeugnisse. Dt. Lebensmittelbuch, Bundesanzeiger, Köln, 49-150.
- Anonym (1999) Änderung der Verordnung über anzeigepflichtige Tierseuchen. Bgbl I vom 05.05.99, S. 844.

- Anonym (2000a) Byrne states Commission intention to adopt key health protection measure to reduce BSE risk. http://europa.eu.int/comm/dg24/library/press/press61_en.html.
- Anonym (2000b) Fünfte Verordnung zur Änderung von Vorschriften zum Schutz der Verbraucher vor der Bovinen Spongiformen Enzephalopathie vom 29.06.00. Bgbl I, S. 997.
- Anonym (2001a) Änderung der Leitsätze für Fleisch und Fleischerzeugnisse vom 2.10.01. Dt. Lebensmittelbuch, Bundesanzeiger Nr. 199 vom 24.10.2001.
- Anonym (2001b) Verordnung (EG) Nr. 999/2001 des Europäischen Parlaments und des Rates vom 22. Mai 2001 mit Vorschriften zur Verhütung, Kontrolle und Tilgung bestimmter transmissibler spongiformer Enzephalopathien. ABl. Nr. L147 vom 31.05.01, S. 1-40.
- Anonym (2001c) Verordnung (EG) Nr. 1326/2001 der Kommission vom 29. Juni 2001 mit Übergangsmaßnahmen zur Erleichterung des Übergangs zur VO (EG) Nr. 999/2001 des Europäischen Parlaments und des Rates mit Vorschriften zur Verhütung, Bekämpfung und Tilgung bestimmter transmissibler spongiformer Enzephalopathien (TSE) sowie zur Änderung der Anhänge VII und XI dieser Verordnung. ABl. Nr. L177 vom 30.06.01, S. 60-67.
- Anonym (2001d) Erste Verordnung zur Änderung von Verordnungen zum Schutz vor transmissiblen spongiformen Enzephalopathien vom 13.12.01. Bgbl I Nr. 68, S. 3631.
- Anonym (2001e) Neuer DLG-Standard für Wurst und Wurstqualität. Rundschau für Fleischhygiene und Lebensmittelüberwachung 6: 132.
- Anonym (2002) Statistisches Bundesamt, Wiesbaden. www.destatis.de.
- Appel N., Decker K., Eberl M., Freist A., Geist S., Haas M., Hackl M., Kost H., Kriese J., Krumscheid R., Linnertz H., Starke D., Tyczka J., Wuhler M. (1998) BSE, Creutzfeldt-Jakob & Co oder ist Wahnsinn übertragbar? ed. Graduiertenkolleg Molekulare Biologie und Pharmakologie JLU Gießen, Kletsmeier-Verlag, ISBN 3-930494-44-2.
- Arneth W., Al-Ahmad H. (1995) Cholesterol-Bestimmung in Muskel- und Fettgewebe sowie in Innereien mittels HPLC. Fleischwirtschaft 75 (2): 185-187.
- ASUV (1980) Untersuchung von Lebensmitteln - Bestimmung des Gesamtfettgehaltes in Fleisch und Fleischerzeugnissen. Amtl. Sammlung von Untersuchungsverfahren nach §35 LMBG, L06.00-6, Beuth Verlag, Berlin.
- ASUV (1992) Bestimmung des Cholesteringehaltes in Eiern und Eiprodukten. Enzymatisches Verfahren. Amtl. Sammlung von Untersuchungsverfahren nach §35 LMBG, L05.00-17, Beuth Verlag, Berlin.
- Baker H., Ridley R., Wells G. (1993) Experimental transmission of BSE and scrapie to the common marmoset. Vet. Rec. 132 (16): 403-406.
- Barber P., Lindsay R. (1982) Schwann cells of the olfactory nerves contain glial fibrillary acidic protein and resemble astrocytes. Neuroscience 7: 3077-3099.
- Barlow R., Middleton D. (1990) Dietary transmission of bovine spongiform encephalopathy to mice. Vet. Rec. 126: 111-112.

- Basler K., Oesch B., Scott M., Westaway D., Wälki M., Groth D., McKinley M., Prusiner S., Weissmann C. (1986) Scrapie and cellular PrP isoforms are encoded by the same chromosomal gene. *Cell* 46: 417-428.
- Bateman D., Hilton D., Love S., Zeidler M., Beck J., Collinge J. (1995) Sporadic Creutzfeldt-Jakob disease in a 18-year-old in the UK. *Lancet* 346: 1155-1156.
- Beck E., Daniel P. (1979) Kuru and Creutzfeldt-Jakob disease: Neuropathological lesions and their significance. In: *Slow Transmissible Diseases of the Nervous System Vol. 1*; ed. Prusiner S., Hadlow W.; Academic Press, New York, S. 253-270.
- Belitz H., Grosch W. (1992) *Lehrbuch der Lebensmittelchemie*. 4. Auflage, Springer-Verlag, Berlin.
- Beutler H., Michal G. (1976) Eine Eigehaltsbestimmung für die Routineanalytik: Enzymatische Bestimmung von Cholesterin. *Getreide Mehl Brot* 30: 116-118.
- Bignami A., Dahl D. (1974) Astrocyte-specific protein and neuroglial-differentiation. An immunofluorescence study with antibodies to the GFAP. *J. Comp. Neur.* 153: 27-38.
- Bignami A., Eng L., Dahl D., Uyeda C. (1972) Localization of the glial fibrillary acidic protein in astrocytes by immunofluorescence. *Brain Res.* 43: 429-435.
- Bijker P., Koolmees P., Tuinstra-Melgers J. (1985) Histological detection of mechanically deboned meat in meat products. *Arch. Lebensmittelhyg.* 36: 71-74.
- BMVEL (Bundesministerium für Verbraucherschutz, Ernährung und Landwirtschaft) www.verbraucherministerium.de.
- Bradley R. (1996) Übertragbare spongiforme Enzephalopathien (TSE) bei Tieren: Klinische Symptome und Studien zur Übertragung von BSE. In: *BSE. Werkstattbericht der Stockmeyer Stiftung, Saassenberg-Füchtorf* 1: 15-32.
- Bradley R., Wilesmith J. (1993) Epidemiology and control of bovine spongiform encephalopathy (BSE). *Br. Med. Bull.* 49 (4): 932-959.
- Braun U. (1998) Klinische Symptome und Diagnose von BSE. In: *BSE und andere spongiforme Enzephalopathien*; ed. Braun U.; Parey Buchverlag.
- Braun U., Schicker E., Hörnlimann B. (1998) Diagnostic reliability of clinical signs in cows with suspected bovine spongiform encephalopathy. *Vet. Rec.* 143: 101-105.
- Braun E., Kihm U., Pusterla N., Schönmann M. (2001) Klinischer Untersuchungsgang bei Verdacht auf bovine spongiforme Enzephalopathie (BSE). *Deutsches Tierärzteblatt* 2: 124-129.
- Britton T., Al-Sarraj S., Shaw C., Campbell T., Collinge J. (1995) Sporadic Creutzfeldt-Jakob disease in a 16-year-old in the UK. *Lancet* 346: 1155.
- Brown P. (1988) The decline and fall of Creutzfeldt-Jakob disease associated with human growth hormone therapy. *Neurology* 38: 1135-1137.
- Brown P., Rohwer R., Gajdusek C. (1986) Newer data on the inactivation of scrapie virus or Creutzfeldt-Jakob disease virus in brain tissue. *J. Infectious Diseases* 153 (6): 1145-1148.

- Brown P., Liberski P., Wolff A., Gajdusek D. (1990) Resistance of scrapie infectivity to steam autoclaving after formaldehyde fixation and limited survival after ashing at 360°C: practical and theoretical implications. *J. Infectious Diseases* 161: 467-472.
- Brown P., Preece M., Will R. (1992) "Friendly fire" in medicine: hormones, homografts, and Creutzfeldt-Jakob disease. *Lancet* 340: 24-27.
- Bruce M., Will R., Ironside J., McConnell I., Drummond D., Suttie A., McCordle L., Chree A., Hope J., Birkett C., Cousens S., Fraser H., Bostock C. (1997) Transmissions to mice indicate that 'new variant' CJD is caused by the BSE agent. *Nature* 389: 498- 501.
- Büeler H., Fischer M., Lang Y., Bluethmann H., Lipp H., DeArmond S., Prusiner S., Aguet M., Weissmann C. (1992) Normal development and behaviour of mice lacking the neuronal cell-surface PrP protein. *Nature* 356: 577-582.
- Büeler H., Aguzzi A., Sailer A., Greiner R., Autenried P., Aguet M., Weissmann C. (1993) Mice devoid of PrP are resistant to scrapie. *Cell* 73: 1339-1347.
- Buschmann A., Groschup M. (1998) Übertragung der spongiformen Enzephalopathien unter natürlichen und experimentellen Bedingungen. In: BSE und andere spongiforme Enzephalopathien; ed. Braun U.; Parey Buchverlag.
- Butler D. (1999) Primate study may yield new CJD clues. *Nature* 398: 449.
- Cachin M., Vandeveld M., Zurbriggen A. (1991) Ein Fall von Spongiformer Enzephalopathie („Rinderwahnsinn“) bei einer Kuh in der Schweiz. *Schweiz. Arch. Tierheilkd.* 133: 53-57.
- Carlson G., Westaway D., DeArmond S., Peterson-Torchia M., Prusiner S. (1989) Primary structure of prion protein may modify scrapie isolate properties. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86: 7475-7479.
- Clark A. (1991) Diagnosis of scrapie. *Vet. Rec.* 128: 214.
- Clark A., Moar J. (1992) Scrapie: a clinical assessment. *Vet. Rec.* 130: 377-378.
- Clark A., Moar J., Nicholson J. (1994) Diagnosis of scrapie. *Vet. Rec.* 135: 560.
- Cohen F., Pan K., Huang Z., Baldwin M., Fletterick R., Prusiner S. (1994) Structural clues to prion replication. *Science* 264: 530-531.
- Collee J., Bradley R. (1997a) BSE: a decade on - part 1. *Lancet* 349: 636-641.
- Collee J., Bradley R. (1997b) BSE: a decade on - part 2. *Lancet* 349: 715-721.
- Collinge J., Sidle K., Meads J., Ironside J., Hill A. (1996) Molecular analysis of prion strain variation and the aetiology of 'new variant' CJD. *Nature* 383: 685-690.
- Creutzfeldt H. (1920) Über eine eigenartige herdförmige Erkrankung des Zentralnervensystems. *Z. Ges. Neurol. Psychiat.* 57: 1-20.
- Cuillé J., Chelle P. (1936) La maladie dite tremblante du mouton, est-elle inoculable? *CR Acad. Sci.* 203: 1552-1554.
- Cuillé J., Chelle P. (1939) Transmission expérimentale de la tremblante chez la chèvre. *CR Acad. Sci.* 208: 1058-1060.
- Czub M., Braig H., Diringer H. (1986) Pathogenesis of scrapie: study of the temporal development of clinical symptoms, of infectivity titres and scrapie-associated fibrils in brains of hamsters infected intraperitoneally. *J. Gen. Virol.* 67: 2005-2009.

- Dahl D., Bignami A. (1983) The glial fibrillary acidic protein and astrocytic 10-nanometer filaments. In: Handbook of neurochemistry, Vol. 5; ed. Lajtha A.; Plenum Press, New York, S. 127-151.
- Dahms S. (1997) Epidemiologische Studien zur Übertragung der Bovinen Spongiformen Enzephalopathie (BSE) - Anmerkungen aus biometrischer Sicht. BMTW 110: 161-165.
- Danner K. (1993) BSE - a risk for man through pharmaceutical products? Position and politics of the German pharmaceutical industry. Dev. Biol. Stand. 80: 199-205.
- Dawson M., Wells G., Parker B. (1990a) Preliminary evidence of the experimental transmissibility of bovine spongiform encephalopathy to cattle. Vet. Rec. 126: 112-113.
- Dawson M., Wells G., Parker B., Scott A. (1990b) Primary parenteral transmission of bovine spongiform encephalopathy to the pig. Vet. Rec. 127: 338.
- Dawson M., Wells G., Parker B., Francis M., Scott A., Hawkins S., Martin T., Simmons M., Austin A. (1993) Transmission studies of BSE in cattle, pigs and domestic fowl. Proceedings of a consultation on BSE with the Scientific Veterinary Committee of the Commission of the European Communities, Brüssel, Sep. 15, S. 161-167.
- Dealler S., Lacey R. (1990) Transmissible spongiform encephalopathies: The threat of BSE to man. Food Microbiol. 7: 253-279.
- DEFRA (Department for Environment, Food & Rural Affairs) www.defra.gov.uk/animalh/bse/index.html.
- Denny G., Hueston W. (1997) Epidemiology of bovine spongiform encephalopathy in Northern Ireland 1988 to 1995. Vet. Rec. 140: 302-306.
- Department of Health. www.doh.gov.uk/cjd/cjd_stat.htm.
- Deslys J., Lasmézas C., Streichenberger N., Hill A., Collinge J., Dormont D., Kopp N. (1997) New variant Creutzfeldt-Jakob disease in France. Lancet 349: 30-31.
- Dickinson A., Taylor D. (1978) Resistance of scrapie agent to decontamination. N. Engl. J. Med. 299: 1413-1414.
- Dickinson A., Stamp J., Renwick C., Rennie J. (1968) Some factors controlling the incidence of scrapie in Cheviot sheep injected with a Cheviot-passaged scrapie agent. J. Comp. Pathol. 78: 313-321.
- Diringer H., Beekes M., Oberdieck U. (1994) The nature of the scrapie agent: the virus theory. In: Slow infections of the central nervous system, Vol. 724, Ann. NY. Acad. Sci.
- Donnelly C., Ghani A., Ferguson N., Anderson R. (1997) Recent trends in the BSE epidemic. Nature 389: 903.
- Dormont D. (1999) Bovine spongiform encephalopathy and the new variant of Creutzfeldt-Jacob disease. In: Prions- Molecular and Cellular Biology; ed. Harris D.; horizon scientific press.
- Duffy P., Wolf J., Collins G., DeVoe A., Streeten B., Cowen D. (1974) Possible person-to-person transmission of Creutzfeldt-Jakob disease. N. Engl. J. Med. 290: 692-693.
- Eberle W. (2001) BSE-Tests schnell und zuverlässig – Testprozedur und Validierung geben hohe Sicherheit. Fresenius Symposium „BSE – Lebensmittelsicherheit auf dem Prüfstand“, 27.-28.06.01, Darmstadt.

- Eddy R. (1995) Origin of BSE. *Vet. Rec.* 137: 648.
- Ehrensperger F., Vandeveld M. (1998) Neuropathologie der transmissiblen spongiformen Enzephalopathien bei Tieren. In: BSE und andere spongiforme Enzephalopathien; ed. Braun U.; Parey Buchverlag.
- Eigenbrodt E., Reinacher M., Scheefers-Borchel U., Scheefers H., Friis R. (1992) Double role for pyruvate kinase type M2 in the expression of phosphometabolite pools found in tumor cells. *Crit. Rev. Oncog.* 3: 91-115.
- Eng L., Bigbee J. (1978) Immunohistochemistry of nervous system-specific antigens. In: *Advances in neurochemistry*, Vol. 3; ed. Agranoff B., Aprison M.; Plenum Press, New York, S. 43-98.
- Eng L., DeArmond S. (1983) Immunohistochemistry of glial fibrillary acidic protein. In: *Progress in neuropathology*, Vol 5; ed. Zimmerman H.; Raven Press, New York, S. 19-39.
- Eng L., Vanderhaeghen J., Bignami A., Gerstl B. (1971) An acidic protein isolated from fibrous astrocytes. *Brain Res.* 28: 351-354.
- EU (1990) 90/134/EG: Entscheidung der Kommission vom 6. März 1990 zur zweiten Änderung der Richtlinie 82/894/EWG des Rates über die Mitteilung von Viehseuchen in der Gemeinschaft und zur zeitweiligen Änderung der Häufigkeit der Meldepflicht bei Auftreten der spongiformen Rinderenzephalopathie. *ABl. Nr. L076* vom 22.03.1990, S. 23.
- EU (1994) 94/381/EG: Entscheidung der Kommission vom 27. Juni 1994 über Schutzmaßnahmen in Bezug auf die spongiforme Rinderenzephalopathie und die Verfütterung von aus Säugetieren gewonnenen Futtermitteln. *ABl. Nr. L172* vom 07.07.1994, S. 23-24.
- EU (1996a) 96/449/EG: Entscheidung der Kommission vom 18. Juli 1996 über die Zulassung alternativer Verfahren zur Hitzebehandlung von tierischen Abfällen im Hinblick auf die Inaktivierung der Erreger der spongiformen Enzephalopathie. *ABl. Nr. L184* vom 24.07.1996, S. 43-46.
- EU (1996b) 96/385/EG: Entscheidung der Kommission vom 24. Juni 1996 zur Genehmigung des Plans zur Bekämpfung und Tilgung der bovinen spongiformen Enzephalopathie im Vereinigten Königreich. *ABl. Nr. L151* vom 26.06.1996, S. 39-40.
- EU (1997) 97/534/EG: Entscheidung der Kommission vom 30. Juli 1997 über das Verbot der Verwendung von Material angesichts der Möglichkeit der Übertragung transmissibler spongiformer Enzephalopathien. *ABl. Nr. L216* vom 08.08.1997, S. 95-98.
- EU (1998a) 98/692/EG: Entscheidung der Kommission vom 25. November 1998 zur Änderung der Entscheidung 98/256/EG hinsichtlich bestimmter Dringlichkeitsmaßnahmen zum Schutz gegen die spongiforme Rinderenzephalopathie. *ABl. Nr. L328* vom 04.12.1998, S. 28-35.
- EU (1998b) 98/272/EG: Entscheidung der Kommission vom 23. April 1998 über die epidemiologische Überwachung der transmissiblen spongiformen Enzephalopathien und zur Änderung der Entscheidung 94/474/EG. *ABl. Nr. L122* vom 24.04.1998, S. 59-63.

- EU (2000a) 2000/418/EG: Entscheidung der Kommission vom 29. Juni 2000 zur Regelung der Verwendung von bestimmtem Tiermaterial angesichts des Risikos der Übertragung von TSE-Erregern und zur Änderung der Entscheidung 94/474/EG. ABl. Nr. L157 vom 30.06.2000, S. 76-82.
- EU (2000b) 2000/766/EG: Entscheidung des Rates vom 04. Dezember 2000 über Schutzmaßnahmen in Bezug auf die transmissiblen spongiformen Enzephalopathien und die Verfütterung von tierischem Protein. ABl. Nr. L603 vom 07.12.2000, S 32-33.
- EU (2000c) 2000/764/EG: Entscheidung der Kommission vom 29. November 2000 über die Untersuchung von Rindern auf bovine spongiforme Enzephalopathie und zur Änderung der Entscheidung 98/272/EG über die epidemiologische Überwachung der transmissiblen spongiformen Enzephalopathien. ABl. Nr. L305 vom 06.12.2000, S. 35-38.
- EU (2001a) 2001/101/EG: Richtlinie 2001/101/EG der Kommission vom 26. November 2001 zur Änderung der Richtlinie 2000/13/EG des Europäischen Parlaments und des Rates zur Angleichung der Rechtsvorschriften der Mitgliedstaaten über die Etikettierung und Aufmachung von Lebensmitteln sowie die Werbung hierfür. ABl. Nr. L310 vom 28.11.2001, S. 19-21.
- EU (2001b) 2001/9/EG: Entscheidung der Kommission vom 29. Dezember 2000 über Kontrollmaßnahmen zur Umsetzung der Entscheidung 2000/766/EG des Rates über Schutzmaßnahmen in Bezug auf die transmissiblen spongiformen Enzephalopathien und die Verfütterung von tierischem Protein. ABl. Nr. L002 vom 05.01.2001, S. 32-40.
- EU (2001c) 2001/233/EG: Entscheidung der Kommission vom 14. März 2001 zur Änderung der Entscheidung 2000/418/EG im Hinblick auf Separatenfleisch und Rinderwirbelsäule. ABl. Nr. L084 vom 23.03.2001, S. 59-61.
- EU (2001d) 2001/8/EG: Entscheidung der Kommission vom 29. Dezember 2000 zur Änderung der Entscheidung 2000/764/EG über die Untersuchung von Rindern auf bovine spongiforme Enzephalopathie und zur Aktualisierung von Anhang IV der Entscheidung 98/272/EG über die epidemiologische Überwachung der transmissiblen spongiformen Enzephalopathien. ABl. Nr. L031 vom 02.02.2001, S. 23.
- Feiden W. (1998) Creutzfeldt-Jakob-Krankheit (CJD): sporadische und neue variante Form (vCJD). Ist der Mensch durch BSE gefährdet?. In: BSE und andere spongiforme Enzephalopathien; ed. Braun U.; Parey Buchverlag.
- Ferguson N., Ghani A., Donnelly C., Hagenaars T., Anderson R. (2002) Estimating the human health risk from possible BSE infection of the British sheep flock. Nature online vom 09.01.02.
- Fischer M., Rüllicke T., Raeber A., Sailer A., Moser M., Oesch B., Brandner S., Aguzzi A., Weissmann C. (1996) Prion protein (PrP) with amino-proximal deletions restoring susceptibility of PrP knockout mice to scrapie. EMBO 115: 1255-1264.
- Foote W., Clark W., Maciulis A., Call J., Hourrigan J., Evans E., Marshall M., deCamp M. (1993) Prevention of scrapie transmission in sheep, using embryo transfer. Am. J. Vet. Res. 54: 1863-1868.

- Foster J., Hope J., Fraser H. (1993) Transmission of bovine spongiform encephalopathy to sheep and goats. *Vet. Rec.* 133 (14): 339-341.
- Foster J., Bruce M., McConnell I., Chree A., Fraser H. (1996) Detection of BSE infectivity in brain and spleen of experimentally infected sheep. *Vet. Rec.* 138: 546-548.
- Foster J., Parnham D., Chong A., Goldmann W., Hunter N. (2001) Clinical signs, histopathology and genetics of experimental transmission of BSE and natural scrapie to sheep and goats. *Vet. Rec.* 148 (6): 165-171.
- Frankhauser R., Fatzer R., Frauchinger E. (1972) Bemerkungen zur spastischen Parese des Rindes. *Schweiz. Arch. Tierheilkd.* 114: 24-32.
- Fraser H., McConnell I., Wells G., Dawson M. (1988) Transmission of bovine spongiform encephalopathy to mice. *Vet. Rec.* 123: 472.
- Fraser H., Bruce M., Chree A., McConnell I., Wells G. (1992) Transmission of bovine spongiform encephalopathy and scrapie to mice. *J. Gen. Virol.* 73 (8): 1891-1897.
- FSIS (Food Safety and Inspection Service)/ US Department of Agriculture (USDA) (1998) Proposed Rules: Meat produced by advanced meat/bone separation machinery and recovery systems. *Federal Register* 63 (70): 17959-17965.
- Gajdusek D., Zigas V. (1957) Degenerative disease of the central nervous system in New Guinea - The endemic occurrence of Kuru in the native population. *N. Engl. J. Med.* 257: 974-978.
- Gajdusek D., Zigas V. (1959) Kuru: clinical, pathological and epidemiological study of an acute progressive degenerative disease of the central nervous system among natives of the Eastern Highlands of New Guinea. *Am. J. Med.* 26: 442-469.
- Gajdusek D., Gibbs C., Alpers M. (1966) Experimental transmission of a Kuru-like syndrome to chimpanzees. *Nature* 209 (25): 794-796.
- Gareis M. (1995) Rinderwahnsinn - Eine Gefahr für den Menschen. *Kulmbacher Reihe Band 14*: 135-151.
- Garland T., Bauer N., Bailey M. (1996) Brain emboli in the lungs of cattle after stunning. *Lancet* 348: 610.
- Gerbermann (2001) Probenahme und Zuverlässigkeit von BSE-Tests. BgVV-Seminar am 7.-8.11.2001, Berlin.
- Gerstmann J. (1928) Über eine noch nicht beschriebenes Reflexphänomen bei einer Erkrankung des zerebellären Systems. *Wien. Med. Wochenschr.* 78: 906-908.
- Georgsson G., Gísladóttir E., Árnadóttir S. (1993) Quantitative assesement of the astrocytic response in natural scrapie of sheep. *J. Comp. Pathol.* 108: 229-240.
- Ghani A., Ferguson N., Donnelly C., Hagenaars T., Anderson R. (1998) Epidemiological determinants of the pattern and magnitude of the vCJD epidemic in Great Britain. *Proc. R. Soc. Lond. B* 265: 2443-2452.
- Ghani A., Donnelly C., Ferguson N., Anderson R. (2000) Assessment of the prevalence of vCJD through testing tonsils and appendices for abnormal prion protein. *Proc. R. Soc. Lond. B* 267: 23-29.

- Gibbs C. Jr., Gajdusek D., Asher D., Alpers M., Beck E., Daniel P., Matthews W. (1968) Creutzfeldt-Jakob disease (spongiform encephalopathy): transmission to the chimpanzee. *Science* 161 (839): 388-389.
- Gibbs C. Jr., Amyx H., Bacote A., Masters C., Gajdusek D. (1980) Oral transmission of kuru, Creutzfeldt-Jakob disease, and scrapie to nonhuman primates. *J. Infect. Dis.* 142 (2): 205-208.
- Goldgaber D., Goldfarb L., Brown P., Asher D., Brown W., Lin S., Teener J., Feinstone S., Rubenstein R., Kascsak R., Boellaard J., Gajdusek D. (1989) Mutations in familial Creutzfeldt-Jakob disease and Gerstmann-Sträussler-Scheinker's syndrome. *Exp. Neurol.* 106: 204-206.
- Graber H., Meyer R., Fatzer R., Vandevelde M., Zurbriggen A. (1995) In situ hybridization and immunohistochemistry for Prion Protein (PrP) in Bovine Spongiforme Encephalopathy (BSE). *J. Vet. Med. A.* 42: 453-459.
- Groschup M., Haas B. (1995) BSE - eine Gesundheitsgefährdung für den Menschen? *Fleischwirtschaft* 75: 1087-1091.
- Groschup M., Weiland F., Straub O., Pfaff E. (1996) Detection of scrapie agent in the peripheral nervous system of a diseased sheep. *Neurobiol. Dis.* 3: 191-195.
- Güllner B. (2001) Verbraucher und ihre Erwartungen. *Fleischwirtschaft* 10: 64-67.
- Hammer G. (2001) Maßnahmen-Bündel für mehr Sicherheit - die tierseuchen- und fleischhygienerechtliche Vorschriften zur BSE-Bekämpfung. *Fleischwirtschaft* 4: 54-60.
- Hartsough G., Burger D. (1965) Encephalopathy of mink. 1. Epizootiologic and clinical observations. *J. Infect. Dis.* 115: 387-392.
- Harris D. (1999) Cellular biology of prion diseases. *Clin. Microbiol. Rev.* 12 (3): 429-444.
- Hauck A., Bambara J., Edwards W. (1990) Embolism of brain tissue to the lung in a neonate. *Arch. Pathol. Lab. Med.* 114: 217-218.
- Heiss R., Eichner K. (1995) *Haltbarmachen von Lebensmitteln*. 3. Aufl., Springer Verlag Berlin.
- Hewicker-Trautwein M., Krueger N., Urban K., Trautwein G. (1994) Immunohistochemical localization of glial and neuronal cell markers in developing bovine brain. *Anat. Histol. Embryol.* 23: 154-165.
- Heydorn W., Creed G., Marangos P., Jacobowitz D. (1985) Identification of neuron-specific enolase and nonneuronal enolase in human and rat brain on two-dimensional polyacrylamide gels. *J. Neurochem.* 44: 201-209.
- Hildebrandt G., Kleer J. (1998) Kochwurst, gegarte Stückware und Schmalz – Hauptbericht über die DLG-Qualitätsprüfung 1998. *Fleischwirtschaft* 78 (11): 1120-1129.
- Hildebrandt G., Lückner E., Rauscher K. (2001) BSE-Risiko der Lebensmittel Fleisch und Milch. *Bundesgesundheitsblatt* 44: 437-449.
- Hill A., Desbruslais M., Joiner S., Sidle K., Gowland I., Collinge J., Doey L., Lantos P. (1997a) The same prion strain causes vCJD and BSE. *Nature* 389: 448-450.
- Hill A., Zeidler M., Ironside J., Collinge J. (1997b) Diagnosis of new variant Creutzfeldt-Jakob disease by tonsil biopsy. *Lancet* 349: 99-100.

- Hill A., Butterworth R., Joiner S., Jackson G., Rossor M., Thomas D., Frosh A., Tolley N., Bell J., Spencer M., King A., Al-Sarraj S., Ironside J., Lantos P., Collinge J. (1999) Investigation of variant Creutzfeldt-Jakob disease and other human prion diseases with tonsil biopsy samples. *Lancet* 353: 183-164.
- Hill A., Joiner S., Linham J., Desbruslais M., Lantos P., Collinge J. (2000) Species-barrier-independent prion replication in apparently resistant species. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 97 (18): 10284-10253.
- Hilton D., Fayers E., Edwards P., Ironside J., Zajicek J. (1998) Prion immunoreactivity in appendix before clinical of variant Creutzfeldt-Jakob disease. *Lancet* 352: 703-704.
- Hochberger A. (2001) Massenscreening mit BSE-Schnelltests als Maßnahme des Verbraucherschutzes: Aktueller Stand, Möglichkeiten und Zukunftsperspektiven. Fresenius Symposium „BSE – Lebensmittelsicherheit auf dem Prüfstand“, 27.-28.06.01, Darmstadt.
- Hofmann M. (1959) Bayrisches Kochbuch. 28. Auflage, Birken-Verlag GmbH, München.
- Hoinville L., Wilesmith J., Richards M. (1995) An investigation of risk factors for cases of bovine spongiform encephalopathy born after the introduction of the feed ban. *Vet. Rec.* 134: 274-275.
- Honikel K., Arneith W. (1996) Cholesteringehalt in Fleisch und Eiern. *Fleischwirtschaft* 76: 1244-1253.
- Hope J., Reekie L., Hunter N., Mulhaupt G., Beyreuther K., White K., Scott A., Stack J., Dawson M., Wells G. (1988) Fibrils from brains of cows with new cattle disease contain scrapie-associated protein. *Nature* 336: 390-392.
- Horlacher S., Bülte M. (2001) Nachweis von ZNS bei gehälfeten Rinderschlachttierkörpern. 42. DVG-Arbeitstagung des Arbeitsgebietes Lebensmittelhygiene, Garmisch-Partenkirchen, 25.-28. Sept. 2001 (in press).
- Horlacher S., Lückner E., Eigenbrodt E., Wenisch S. (2000) Kontamination der Rinderlunge mit ZNS. 41. DVG-Arbeitstagung des Arbeitsgebietes Lebensmittelhygiene, 25.-28.09.00 in Garmisch-Partenkirchen, S. 168-173.
- Horlacher S., Simon P., Bülte M. (2001) Bestimmung des ZNS-Gehaltes und der Tierart in Fleischerzeugnissen. *Fleischwirtschaft* 81 (12): 107-108.
- Horlacher S., Lückner E., Eigenbrodt E., Wenisch S. (2002) ZNS-Emboli in der Rinderlunge. *BMTW* 115 (1/2): 1-5.
- Horn D. (1997) Kennzeichnung von Separatorenfleisch in der Zutatenliste. 50. Sitzung Arbeitskreis Lebensmittelhygienischer Tierärztlicher Sachverständiger, Berlin, S. 41-42.
- Horn G., Bobrow M., Bruce M., Goedert M., McLean A., Webster J. (2001) Review of the origin of BSE vom 05.07.01. www.defra.gov.uk/animalh/bse/index.html.
- Hsiao K., Baker H., Crow T., Poulter M., Owen F., Terwilliger J., Westaway D., Ott J., Prusiner S. (1989) Linkage of a prion protein missense variant of Gerstmann-Sträussler-Scheinker syndrome. *Nature* 338: 342-345.

- Hsiao K., Meiner Z., Kahana E., Cass C., Kahana I., Avrahami D., Scarlato G., Abramsky O., Prusiner S., Gabizon R. (1991) Mutation of the prion protein in libyan jews with Creutzfeldt-Jakob disease. *N. Engl. J. Med.* 324 (16): 1091-1097.
- Institut de Veille Sanitaire, France. www.invs.sante.fr.
- Ironside J. (2000) Pathology of variant Creutzfeldt-Jakob disease. *Arch. Virol. Suppl.* 16: 143-151.
- Jackson G., Hosszu L., Power A., Hill A., Kenney J., Saibil H., Craven C., Waltho J., Clarke A., Collinge J. (1999) Reversible conversion of monomeric human prion protein between native and fibrillogenic conformations. *Science* 283: 1935-1937.
- Jakob A. (1921) Über eigenartige Erkrankungen des Zentralnervensystems mit bemerkenswerten anatomischen Befunden. *Z. Ges. Neurol. Psychiatr.* 64: 147-228.
- Jeffrey M., Wells G. (1988) Spongiform encephalopathy in a nyala (*Tragelaphus angasi*). *Vet. Pathol.* 25: 398-399.
- Jeffrey M., Goodbrand I., Goodsir C. (1995) Pathology of the transmissible spongiform encephalopathies with special emphasis on ultrastructure. *Micron* 26: 277-298.
- Jeffrey M., Ryder S., Martin S., Hawkins S., Terry L., Berthelin-Baker C., Bellworthy S. (2001) Oral BSE agent challenge of sheep. 1. Onset and distribution of disease specific PrP accumulation in brain and viscera of Romney sheep. *J. Comp. Pathol.* 124 (4): 280-289.
- Jessen K., Mirsky R. (1980) Glial cells in the enteric nervous system contain GFAP. *Nature* 286: 736-737.
- Jessen K., Mirsky R. (1983) Astrocyte-like glia in the peripheral nervous system: an immunohistochemical study of enteric glia. *J. Neuroscience* 3: 2206-2118.
- Jessen K., Mirsky R. (1985) Glial fibrillary acidic protein polypeptides in peripheral glia: Molecular weight, heterogeneity and distribution. *J. Neuroimmunol.* 8: 377-393.
- Jessen K., Thorpe R., Mirsky R. (1984) Molecular identity, distribution and heterogeneity of glial fibrillary acidic protein: An immunoblotting and immunohistochemical study of Schwann cells, satellite cells, enteric glia and astrocytes. *J. Neurocytol.* 13: 187-200.
- Kaaden O. (1997) Neue wissenschaftliche Erkenntnisse zu Diagnostik, Übertragbarkeit und Gefährdungspotential der BSE. DVG-Tagung der Fachgruppen Tierseuchen und Virologie, Gießen 1997; S. 86-88.
- Kao R., Gravenor M., Baylis M., Bostock C., Chihota C., Evans J., Goldmann W., Smith A., McLean A. (2001) The potential size and duration of an epidemic of bovine spongiform encephalopathy in british sheep. *Science online* 22.11.01.
- Kang J., Rajpert-de Meyts E., Skakkebaek N. (1996) Immunoreactive neuron-specific enolase (NSE) is expressed in testicular carcinoma-in-situ. *J. Pathology* 178 (2): 161-165.
- Kato K., Ishiguro Y., Suzuki F., Ito A., Semba R. (1982) Distribution of nervous system-specific forms of enolase in peripheral tissues. *Brain Res.* 237: 441-448.

- Kimberlin R. (1982) Scrapie agent: prions or virinos? *Nature* 297: 107-108.
- Kimberlin R., Walker C. (1979) Pathogenesis of mouse scrapie: dynamics of agent replication in spleen, spinal cord and brain after infection by different routes. *J. Comp. Pathol.* 89: 551-562.
- Kimberlin R., Wilesmith J. (1994) Bovine spongiform encephalopathy. Epidemiology, low dose exposure and risks. *Ann. NY Acad. Sci.* 724: 210-220.
- Kimura S., Hayano T., Kato K. (1984) Properties and application to immunoassay of monoclonal antibodies to neuron-specific γ - γ enolase. *Biochim. Biophys. Acta* 799: 252-259.
- Kimura S., Uchikawa H., Yamamoto R., Kato K. (1986) Two-site column enzyme immunoassay for neuron-specific enolase (NSE) in human serum using monoclonal antibodies. *J. Immunol. Methods* 94: 51-55.
- Kingsbury D., Kasper K., Stites D., Watson J., Hogan N., Prusiner S. (1983) Genetic control of scrapie and Creutzfeldt-Jakob disease in mice. *J. Immunology* 131 (1): 491-496.
- Kirkwood J., Wells G., Wilesmith J., Cunningham A., Jackson S. (1990) Spongiform encephalopathy in an arabian oryx (*Oryx leucoryx*) and a greater kudu (*Tragelaphus strpsiceros*). *Vet. Rec.* 127: 418-420.
- Koch, Fuchs, Gemmer (1992) Die Fabrikation feiner Fleisch- und Wurstwaren. 20.Aufl., Deutscher Fachverlag, S.2-3.
- Kretzschmar H. (1998) Übertragbare spongiforme Enzephalopathien (Prion-Krankheiten) - Molekulare Grundlagen und in-vitro-Modelle. *Wien. Med. Wochenschr.* 148 (4): 67-73.
- Kretzschmar H., Ironside J., DeArmond S., Tateishi J. (1996a) Diagnostic criteria for sporadic Creutzfeldt-Jakob disease. *Arch. Neurol.* 53: 913-920.
- Kretzschmar H., Giese A., Schulz-Schaeffer W., Windl O., Groschup M., Riesner D. (1996b) Besteht ein Zusammenhang zwischen BSE und Creutzfeldt-Jakob-Krankheit? *Deutsches Ärzteblatt* 93 (15): B-758-759.
- Lämmli U. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227: 680-685.
- Langhorst U. (1998) Entwicklung eines Schnellverfahrens zur Erfassung von zentralem Nervengewebe in Fleischerzeugnissen im Hinblick auf die bovine spongiforme Enzephalopathie (BSE). Diplomarbeit Haushalts- und Ernährungswissenschaften, Justus-Liebig-Universität, Gießen.
- Lasmézas C., Deslys J., Demaimay R., Adjou K., Lamoury F., Dormont D. (1996) BSE transmission to macaques. *Nature* 381: 743-744.
- Lasmézas C., Fournier J., Nouvel V., Boe H., Marcé D., Lamoury F., Kopp N., Hauw J., Ironside J., Bruce M., Dormont D., Deslys J. (2001) Adaptation of the bovine spongiform encephalopathy agent to primates and comparison with Creutzfeldt-Jakob disease: Implications for human health. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 98 (7): 4142-4147.
- Lehninger A., Nelson D., Cox M. (1994) Prinzipien der Biochemie. 2.Auflage, Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg.
- Liberski P., Yanagihara R., Wells G., Gibbs C. Jr., Gajdusek D. (1992a) Ultrastructural pathology of axons and myelin in experimental scrapie in hamsters and bovine spongiform encephalopathy in cattle and a comparison with the panencephalopathic type of Creutzfeldt-Jakob disease. *J. Comp. Pathol.* 106 (4): 383-398.

- Liberski P., Yanagihara R., Wells G., Gibbs C. Jr., Gajdusek D. (1992b) Comparative ultrastructural neuropathology of naturally occurring bovine spongiform encephalopathy and experimentally induced scrapie and Creutzfeldt-Jakob disease. *J. Comp. Pathol.* 106 (4): 361-381.
- Littmann-Nienstedt S. (1993) Auswertung des Ringversuches der §35-Arbeitsgruppe "Ei-Analytik" zur Bestimmung von Cholesterin in Eiprodukten. *Dt. Lebensmittel-Rundschau* 89: 283-285.
- Lledo P., Tremblay P., DeArmond S., Prusiner S., Nicoll R. (1996) Mice deficient for prion protein exhibit normal neuronal excitability and synaptic transmission in the hippocampus. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93: 2403-2407.
- Lorains J., Henry C., Agbamu D., Rossi M., Bishop M., Will R., Ironside J. (2001) Variant Creutzfeldt-Jakob disease in an elderly patient. *Lancet* 357 (9265): 1339-1340.
- Lücker E., Bülte M. (1997a) Bovine spongiforme Enzephalopathie - Risiko des Verbrauchers und Strategien der Schadensbegrenzung. 38. DVG-Arbeitstagung des Arbeitsgebietes Lebensmittelhygiene, Garmisch-Partenkirchen, S. 340-347.
- Lücker E., Bülte M. (1997b) Verfahren zum Nachweis von im Hinblick auf die bovine spongiforme Enzephalopathie (BSE) unerwünschten Zutaten in Fleischerzeugnissen - 1. Enzymatische Cholesterinbestimmung als Schnellverfahren zur Erfassung von Hirngewebe. *Fleischwirtschaft* 77: 836-840.
- Lücker E., Eigenbrodt E., Bülte M. (1998) Verfahren zum Nachweis von im Hinblick auf die bovine spongiforme Enzephalopathie (BSE) unerwünschten Zutaten in Fleischerzeugnissen - 2. Referenzverfahren für den Nachweis von zentralem Nervengewebe. *Fleischwirtschaft* 78 (8): 896-898.
- Lücker E., Eigenbrodt E., Wenisch S., Failing K., Leiser R., Bülte M. (1999a) Development of an integrated procedure for the detection of central nervous tissue in meat products using cholesterol and neuron-specific enolase as markers. *J. Food Protection* 62 (3): 268-276.
- Lücker E., Horlacher S., Eigenbrodt E., Bülte M. (1999b) Neue Ergebnisse zum Nachweis von zentralem Nervengewebe in Fleischerzeugnissen. 40. DVG-Arbeitstagung Lebensmittelhygiene vom 07.-10.10.99 in Garmisch-Partenkirchen, S. 125-130.
- Lücker E., Eigenbrodt E., Wenisch S., Leiser R., Bülte M. (2000) Identification of central nervous system tissue in retail meat products. *J. Food Protection* 63 (2): 258-263.
- Lücker E., Horlacher S., Eigenbrodt E. (2001) Brain in human nutrition and variant Creutzfeldt-Jakob disease risk (vCJD): Detection of brain in retail liver sausages using cholesterol and neuron specific enolase (NSE) as markers. *British Journal of Nutrition* 86, Suppl. 1: 115-119.
- Lugaresi E., Medori R., Montagna P., Baruzzi P., Cortelli P., Lugaresi A., Tinuper P., Zucconi M., Gambetti P. (1986) Fatal familial insomnia and dysautonomia, with selective degeneration of thalamic nuclei. *N. Engl. J. Med.* 315: 997-1003.
- MacKnight C., Rockwood K. (1996) BSE and CJD: Implications for physicians. *Can. Med. Assoc. J.* 155: 529-536.

- Manson J., Clarke A., McBride P., McConnell I., Hope J. (1994) PrP gene dosage determines the timing but not the final intensity or distribution of lesions in scrapie pathology. *Neurodegeneration* 3 (4): 331-340.
- Marangos P., Schmechel D., Parma A., Clark R., Goodwin F. (1979) Measurement of neuron-specific (NSE) and non-neuronal (NNE) isoenzymes of enolase in rat, monkey and human nervous tissue. *J. Neurochem.* 33: 319-329.
- Martin A., Schlottermüller B., Lückner E. (2001) Untersuchungen zur Problematik der Kontamination mit Geweben des zentralen Nervensystems (ZNS) in Abhängigkeit von der Schlachttechnologie. 42. DVG-Arbeitstagung des Arbeitsgebietes Lebensmittelhygiene, Garmisch-Partenkirchen, 25.-28. Sept. 2001 (in press).
- McGowan J. (1922) Scrapie in sheep. *Scott. J. Agri.* 5: 365-375.
- McMillan J. (1956) Emboli of cerebral tissue in the lungs following severe head injury. *Am. J. Pathol.* 32: 405-415.
- Meat and Livestock Commission (2000) BSE: Was tut Großbritannien zum Schutz der öffentlichen Gesundheit? Rundschau für Fleischhygiene und Lebensmittelüberwachung 52 (2): 35-37.
- Medori R., Tritschler H., LeBlanc A., Villare F., Manetto V., Chen H., Xue R., Leal S., Montagna P., Cortelli P., Tinuper P., Avoni P., Mochi M., Baruzzi A., Hauw J., Ott J., Lugaresi E., Autilio-Gambetti L., Gambetti P. (1992) Fatal familial insomnia, a prion disease with a mutation at codon 178 of the prion protein gene. *N. Engl. J. Med.* 326: 444-449.
- Merz P., Rohwer R., Kascsak R., Wisniewski H., Somerville R., Gibbs C., Gajdusek D. (1984) Infection-specific particle from the unconventional slow virus diseases. *Science* 225: 437-439.
- Meyer R., McKinley M., Bowman K., Braunfeld M., Barry R., Prusiner S. (1986) Separation and properties of cellular and scrapie prion proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 83: 2310-2314.
- Middleton D., Barlow R. (1993) Failure to transmit bovine spongiform encephalopathy to mice by feeding them with extraneural tissues of affected cattle. *Vet. Rec.* 132 (22): 545-547.
- Moritz A. (1995) Cholesterin- und Puringehalte von Wildfleisch. *Fleischwirtschaft* 75 (6): 814-818.
- Mould D., Dawson A., Smith W. (1965) Scrapie in mice - The stability of the agent to various suspending media, pH and solvent extraction. *Res. Vet. Sci.* 6: 151.
- Moynagh J., Schimmel H., Kramer G. (1999) The evaluation of tests for the diagnosis of transmissible spongiform encephalopathy in bovines - 8.7.99. http://europa.eu.int/comm/dg24/health/bse/bse12_en.pdf.
- National CJD Surveillance Unit (2000) Ninth Annual Report 2000. www.cjd.ed.ac.uk.
- Nickel R., Schummer A., Seiferle E. (1992) Lehrbuch der Anatomie – Bd IV. 3.Aufl., Verlag Paul Parey, S.31 und 74.
- Nisbet T. (1989) Creutzfeldt-Jakob disease in a second patient who received a cadaveric dura mater graft. *J. Am. Med. Ass.* 261 (8): 1118.
- Nitsch P., Wachsamnn G. (2001) Nachweis von Hirngewebs- und Rückenmarksanteilen in Fleischgemengen. *Fleischwirtschaft* 81 (3): 76-78.

- Nurmi E., Ring C. (1999) Gewinnung von hygienisch vertretbarem Separatorenfleisch. *Fleischwirtschaft* 79: 28-31.
- Nussbaum R., Henderson W., Pattison I., Elcock N., Davies D. (1975) The establishment of sheep flocks of predictable susceptibility to experimental scrapie. *Res. Vet. Sci.* 18: 49-58.
- Oesch B., Moser M. (1998) Stand der In vitro-Diagnostik. In: BSE und andere spongiforme Enzephalopathien; ed. Braun U.; Parey Buchverlag.
- OIE (Office International des Epizooties). www.oie.int/eng/info/en_esbmonde.htm.
- Ötzel M., Xi Y., Baldauf E., Diringer H., Pocchiari M. (1994) Small virus-like structure in brains from cases of sporadic and familial Creutzfeldt-Jakob disease. *Lancet* 344: 923-924.
- Owen F., Poulter M., Lofthouse R., Collinge J., Crow T., Risby D., Baker H., Ridley R., Hsiao K., Prusiner S. (1989) Insertion in prion protein gene in familial Creutzfeldt-Jakob disease. *Lancet* 1: 51-52.
- Pahlman S., Esscher T., Nilsson K. (1986) Expression of γ -subunit of enolase, neuron-specific enolase, in human non-neuroendocrine tumors and derived cell lines. *Lab. Invest.* 54 (5): 554-560.
- Palmer M., Dryden A., Hughes J., Collinge J. (1991) Homozygous prion protein genotype predisposes to sporadic Creutzfeldt-Jakob disease. *Nature* 352 (6333): 340-342.
- Pan K., Baldwin M., Nguyen J., Gasset M., Serban A., Groth D., Mehlhorn I., Huang Z., Fletterick R., Cohen F., Prusiner S. (1993) Conversion of α -helices into β -sheets features in the formation of the scrapie prion proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90: 10962-10966.
- Parchi P., Castellani R., Capellari S., Ghetti B., Young K., Chen S., Farlow M., Dickson D., Sima A., Trojanowski J., Petersen R., Gambetti P. (1996) Molecular basis of phenotypic variability in sporadic Creutzfeldt-Jakob disease. *Ann. Neurol.* 39 (6): 767-778.
- Parchi P., Giese A., Capellari S., Brown P., Schulz-Schaeffer W., Windl O., Zerr I., Budka H., Kopp N., Piccardo P., Poser S., Rojiani A., Streichenberger N., Julien J., Vital C., Ghetti B., Gambetti P., Kretzschmar H. (1999) Classification of sporadic Creutzfeldt-Jakob disease based on molecular and phenotypic analysis of 300 subjects. *Ann. Neurol.* 46: 224-233.
- Pattison I., Jones K. (1968) Modification of a strain of mouse-adapted scrapie by passage through rats. *Res. Vet. Sci.* 9: 408-410.
- Pattison I., Hoare M., Jebbet J., Watson W. (1972) Spread of scrapie to sheep and goats by oral dosing with foetal membranes from scrapie-affected sheep. *Vet. Rec.* 90: 465-467.
- Phillips N., Bridgeman J., Ferguson-Smith M. (2000) BSE Inquiry. www.defra.gov.uk/animalh/bse/index.html.
- Piccardo P., Safar J., Ceroni M., Gajdusek D., Gibbs C. (1990) Immunohistochemical localization of prion protein in spongiform encephalopathies and normal brain tissue. *Neurology* 40: 518-522.
- Pohlenz J. (1996) Zur Situation der BSE als neue Erkrankung. In: Spongiforme Enzephalopathien bei Tieren unter besonderer Berücksichtigung der BSE; ed. Hiepe T.; Nova Acta Leopoldina 298 (75): 13-14.

- Prusiner S. (1982) Novel protainaceous infectious particles cause scrapie. *Science* 216: 136 – 44.
- Prusiner S. (1995) Prionen Erkrankungen. *Spektrum der Wissenschaft* März: 44-54.
- Prusiner S. (1997) Prion diseases and the BSE crisis. *Science* 278: 245-251.
- Prusiner S., Scott M., Foster D., Pan K., Groth D., Mirende C., Torchia M., Yang S., Serban D., Carlson G., Hoppe P., Westaway D., DeArmond S. (1990) Transgenic studies implicate interactions between homologous PrP isoforms in scrapie prion replication. *Cell* 63 (4): 673-686.
- Prusiner S., Groth D., Serban A., Koehler R., Foster D., Torchia M., Burton D., Yang S., DeArmond S. (1993) Ablation of the prion (PrP) gene in mice prevents scrapie and facilitates production of anti-PrP antibodies. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90: 10608-10612.
- Rabenau H. (1997) Viren oder infektiöse Proteine? - die Erreger der subakuten spongiformen Enzephalopathien. *Mikrobiologie* 7: 165-169.
- Race R., Chesebro B. (1998) Scrapie infectivity found in resistant species. *Nature* 392: 770.
- Raeber A., Klein M., Frigg R., Brandner S., Blättler T., Aguzzi A. (1998) Die Bedeutung des Prion-Proteins in der Ausbreitung von Prionen und in der Pathogenese der spongiformen Enzephalopathien. *Wien. Med. Wochenschr.* 148 (4): 74-77.
- Ricketts M., Cashman N., Stratton E., ElSaadany S. (1997) Is Creutzfeldt-Jakob disease transmitted in blood? *Emerg. Infect. Dis.* 3: 155-163.
- Robinson M., Hadlow W., Huff T., Wells G., Dawson M., Marsh R., Gorham J. (1994) Experimental infection of mink with bovine spongiform encephalopathy. *J. Gen. Virol.* 75 (9): 2151-2155.
- Runquist M., Parmryd I., Thelin A., Chojnacki T., Dallner G. (1995) Distribution of branch point prenyltransferases in regions of bovine brain. *J. Neurochem.* 65 (5): 2299-2306.
- Saborio G., Permanne B., Soto C. (2001) Sensitive detection of pathological prion protein by cyclic amplification of protein misfolding. *Nature* 411: 810-813.
- Sachs L. (1992) *Angewandte Statistik – Anwendung statistischer Methoden.* 7.Aufl., Springer Verlag, Berlin.
- Schätzel H., Wopfner F., Gilch S., von Brunn A., Jäger G. (1997) Is codon 129 of prion protein polymorphic in human beings but not in animals? *Lancet* 349: 1603-1604.
- Scheid L. (1967) *Kochwurst, Sülzwurst.* Hans Holzmann Verlag.
- Schicker E. (1998) Spongiforme Enzephalopathien bei Mensch und Tier. In: *BSE und andere spongiforme Enzephalopathien*; ed. Braun U.; Parey Buchverlag.
- Schmechel D., Marangos P., Brightman M. (1978) Neurone-specific enolase is a molecular marker for peripheral and central neuroendocrine cells. *Nature* 276: 834-836.
- Schmidt G., Hossner K., Yemm R., Gould D. (1999a) Potential for disruption of central nervous system tissue in beef cattle by different types of captive bolt stunners. *J. Food Protection* 62 (4): 390-393.

- Schmidt G., Hossner K., Yemm R., Gould D., O`Callaghan J. (1999b) An enzyme-linked immunosorbent assay for glial fibrillary acidic protein as an indicator of the presence of brain of spinal cord in meat. *J. Food Protection* 62 (4): 394-397.
- Schreuder B., Geertsma R., van Keulen L., van Asten A., Enthoven P., Oberthür R., de Koeijer A., Osterhaus A. (1998a) Studies on the efficacy of hyperbaric rendering procedures in inactivating bovine spongiform encephalopathy (BSE) and scrapie agents. *Vet. Rec.* 142: 474-480.
- Schreuder B., van Keulen L., Vromans M., Langeveld J., Smits M. (1998b) Tonsillar biopsy and PrP^{Sc} detection in the preclinical diagnosis of scrapie. *Vet. Rec.* 142: 564-568.
- Schröter W., Lautenschläger K., Bibrack H. (1994) Taschenbuch der Chemie. 16. Aufl., Verlag Harri Deutsch, Thun und Frankfurt am Main.
- Schwägele F. (2001) Informationen über BSE - Möglichkeiten und Grenzen der Analytik. *Fleischwirtschaft* 4: 143-145.
- Scott M., Foster D., Mirenda C., Serban D., Coufal F., Wälchli M., Torchia M., Groth D., Carlson G., DeArmond S., Westaway D., Prusiner S. (1989) Transgenic mice expressing hamster prion protein produce species-specific scrapie infectivity and amyloid plaques. *Cell* 59: 847-857.
- Shimizu A., Suzuki F., Kato K. (1982) Purification of two enolases from human brain using a chromatofocussing column. *Biochim. Biophys. Acta* 717: 348-354.
- Shimizu A., Suzuki F., Kato K. (1983) Characterization of $\alpha\alpha$, $\beta\beta$, $\gamma\gamma$ human enolase isozymes, and preparation of hybrid enolases (α - γ , β - γ , and α - β) from homodimeric forms. *Biochim. Biophys. Acta* 748: 278-284.
- Simon D. (1996) Zusammenhänge zwischen menschlichen und tierischen übertragbaren spongiformen Enzephalopathien. *Infektionsepidemiologische Forschung InfFO* I/97: 1-6.
- Simon D., Pauli G. (1998) Krankenversorgung und Instrumentensterilisation bei CJK-Patienten und CJK-Verdachtsfällen. *Bundesgesundheitsblatt* 7: 279-284.
- Soler Federspiel B., Cras P., Gheuens J., Andries D., Lowenthal A. (1987) Human $\gamma\gamma$ -enolase: Two-site immunoradiometric assay with a single monoclonal antibody. *J. Neurochem.* 48: 22-28.
- Souci S., Fachmann W., Kraut H. (1994) Die Zusammensetzung der Lebensmittel – Nährwert-Tabellen. 5. Aufl., Medpharm Scientific Publishers, Stuttgart.
- SSC (1998) Listing of specified risk materials: a scheme for assessing relative risks to man - Opinion of the Scientific Steering Committee adopted on 9.12.1997. http://europa.eu.int/comm/food/fs/sc/ssc/outcome_en.html.
- SSC (1999a) Opinion of the Scientific Steering Committee on the human exposure risk (HER) via food with respect to BSE - adopted on 10.12.1999. http://europa.eu.int/comm/food/fs/sc/ssc/outcome_en.html.
- SSC (1999b) Opinion on BSE risk adopted by the Scientific Steering Committee at its plenary meeting of 26-27 march 1998, following a public consultation on the preliminary opinion adopted on 19.-20.02.1998. http://europa.eu.int/comm/food/fs/sc/ssc/outcome_en.html.

- SSC (2000) Geographical risk of bovine spongiform encephalopathy (GBR) - preliminary opinion of the Scientific Steering Committee; 25.05.2000. http://europa.eu.int/comm/food/fs/sc/ssc/outcome_en.html.
- SSC (2001a) Preliminary scientific opinion and report on stunning methods and BSE risks – the risk of dissemination of brain particles into the blood and carcass when applying certain stunning methods; 06.09.2001. http://europa.eu.int/comm/food/fs/sc/ssc/outcome_en.html.
- SSC (2001b) TSEs in small ruminants - Opinion on the safety of small ruminant products should BSE in small ruminants become probable /confirmed - adopted by the SSC at its meeting of 18.-19.10.2001. http://europa.eu.int/comm/food/fs/sc/ssc/outcome_en.html.
- SSC (2002) 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 – adopted by the SSC at its meeting of 11.-11.01.2002. http://europa.eu.int/comm/food/fs/sc/ssc/outcome_en.html.
- Stockmann S. (1913) Scrapie: an obscure disease of sheep. J. Comp. Pathol. 26: 317-327.
- Sturges H. (1926) The choice of a class interval. J. Amer. Statist. Assoc. 21: 65-66.
- Suzuki F., Umeda Y., Kato K. (1980) Rat brain enolase isozymes - Purification of three forms of enolase. J. Biochem. 87: 1587-1594.
- Tan L., Williams M., Khan M., Champion H., Nielsen N. (1999) Risk of transmission of bovine spongiform encephalopathy to humans in the United States - Report of the Council on Scientific Affairs. J. Am. Med. Ass. 281 (41): 2330-2339.
- Taylor D. (1993) Inactivation of SE agents. Br. Med. Bull. 49 (4): 810-821.
- Taylor D., Fraser H., McConnell I., Brown D., Brown K., Lamza K., Smith G. (1994) Decontamination studies with the agents of bovine spongiform encephalopathy and scrapie. Arch. Virol. 139 (3-4): 313-326.
- Taylor D., Woodgate S., Atkinson M. (1995a) Inactivation of the bovine spongiform encephalopathy agent by rendering procedures. Vet. Rec. 137: 605-610.
- Taylor D., Ferguson C., Bostock C., Dawson M. (1995b) Absence of disease in mice receiving milk from cows with bovine spongiform encephalopathy. Vet. Rec. 136: 592.
- Taylor D., Ferguson C., Chree A. (1996) Absence of detectable infectivity in trachea of BSE-infected cattle. Vet. Rec. 138: 160-161.
- Taylor D., Woodgate S., Fleetwood A., Cawthorne R. (1997) Effect of rendering procedures on the scrapie agent. Vet. Rec. 141: 643-649.
- Towbin H., Staehelin T., Gordon J. (1979) Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: Procedure and some applications. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 76 (9): 4350-4354.
- Tremlová B. (2000) Histologischer Nachweis von Knochenpartikeln in Fleischprodukten. Fleischwirtschaft 7: 73-74.
- Troeger K., Przytulla J. (1996) Technologische Verwertung von Rinderorganen und Geweben. 37. -Arbeitstagung des Arbeitsgebietes Lebensmittelhygiene, S. 385-391.

- Vandeveld M., Zurbriggen A., Fatzer R. (1992) Die spongiformen Enzephalopathien mit besonderer Berücksichtigung der bovinen spongiformen Enzephalopathie. *Schweiz. Med. Wochenschr.* 122 (23): 887-892.
- van Keulen L., Schreuder B., Meloen R., Poelen-van den Berg M., Mooij-Harkes G., Vromans M., Langeveld J. (1995) Immunohistochemical detection and localization of prion protein in brain tissue of sheep with natural scrapie. *Vet. Pathol.* 32: 299-308.
- Verdrager J. (1996) Creutzfeldt-Jakob disease. *Lancet* 347: 1704.
- Verdrager J. (1997) Kuru and new variant CJD. *Southeast Asian J. Trop. Med. Public Health* 28 (3): 535-539.
- Weissmann C. (1996) Prionen - Neuartige Krankheitserreger. *Naturwiss. Rundsch.* 49: 211-214.
- Wells G., Wilesmith J. (1995) The neuropathology and epidemiology of bovine spongiform encephalopathy. *Brain Pathol.* 5 (1): 91-103.
- Wells G., Scott A., Johnson C., Gunning R., Hancock R., Jeffrey M., Dawson M., Bradley R. (1987) A novel progressive spongiform encephalopathy in cattle. *Vet. Rec.* 121: 419-420.
- Wells G., Hancock R., Cooley W., Richards M., Higgins R., David G. (1989) Bovine spongiform encephalopathy: diagnostic significance of vacuolar changes in selected nuclei of the medulla oblongata. *Vet. Rec.* 125: 521-524.
- Wells G., Dawson M., Hawkins S., Green R., Dexter I., Francis M., Simmons M., Austin A., Horgan M. (1994) Infectivity in the ileum of cattle challenged orally with bovine spongiform encephalopathy. *Vet. Rec.* 135: 40-41.
- Wells G., Hawkins S., Green R., Austin A., Dexter I., Spencer Y., Chaplin M., Stack M., Dawson M. (1998) Preliminary observations on the pathogenesis of experimental bovine spongiform encephalopathy (BSE): an update. *Vet. Rec.* 142: 103-106.
- Wenthe S., Zens W., Horlacher S., Abdulmajwood A., Bülte M. (2001) Problematik der Verarbeitung von Hartseparatorenfleisch. *Fleischwirtschaft* 6: 93-95.
- Westermeyer R., Gronau-Czybulka S., Habeck C., Schach H., Schickle H., Thesseling G., Wiesner P. (1990) Elektrophorese-Praktikum. VCH Verlagsgesellschaft mbH, Weinheim.
- Wiemer U. (1997) BSE - Aktuelle Situation und Maßnahmen. DVG-Tagung der Fachgruppen Tierseuchen und Virologie, Gießen; S. 78-85.
- Wilesmith J., Ryan J. (1992) Bovine spongiform encephalopathy recent observations on the age-specific incidences. *Vet. Rec.* 130: 491-492.
- Wilesmith J., Ryan J. (1993) Bovine spongiform encephalopathy: observations on the incidence during 1992. *Vet. Rec.* 132: 300-301.
- Wilesmith J., Ryan J. (1997) Absence of BSE in the offspring of pedigree suckler cows affected by BSE in Great Britain. *Vet. Rec.* 141: 250-251.
- Wilesmith J., Wells G., Cranwell M., Ryan J. (1988) Bovine spongiform encephalopathy: epidemiological studies. *Vet. Rec.* 123 (25): 638-644.
- Wilesmith J., Ryan J., Atkinson M. (1991) Bovine spongiform encephalopathy: epidemiological studies on the origin. *Vet. Rec.* 128 (9): 199-203.

- Wilesmith J., Wells G., Ryan J., Gavier-Widen D., Simmons M. (1997) A cohort study to examine maternally-associated risk factors for bovine spongiform encephalopathy. *Vet. Rec.* 141: 239-243.
- Will R. (1999) New variant CJD. Characterization and diagnosis of prion diseases in animals and men. Tübingen, 23-29.09.1999.
- Will R., Matthews W. (1982) Evidence for case-to-case transmission of Creutzfeldt-Jakob disease. *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry* 45: 235-238.
- Will R., Zeidler M. (1996) Diagnosing Creutzfeldt-Jakob disease. *BMJ* 313: 833-834.
- Will R., Ironside J., Zeidler M., Cousens S., Estibeiro K., Alperovitch A., Poser S., Pocchiari M., Hofman A. (1996a) A new variant of Creutzfeldt-Jakob disease in the UK. *Lancet* 347: 921-925.
- Will R., Zeidler M., Brown P., Harrington M., Lee K., Kenney K. (1996b) Cerebrospinal fluid test for new variant Creutzfeldt-Jakob disease. *Lancet* 348: 955.
- Williams E., Young S. (1980) Chronic wasting disease of captive mule deer: a spongiform encephalopathy. *J. Wildl. Dis.* 16: 89-98.
- Williams E., Young S. (1982) Spongiform encephalopathy of rocky mountain elk. *J. Wildl. Dis.* 18: 465-471.
- Wisniewski H., Sigurdarson S., Rubenstein R., Kascak R., Carp R. (1996) Mites as vectors for scrapie. *Lancet* 347: 1114.
- Wortberg B. (1975) Zur Spezifität der Cholesterinoxidase für die enzymatische Cholesterinbestimmung. *Z. Lebensm. Unters. Forsch.* 157: 333-338.
- Wyatt J., Pearson G., Smerdon T., Gruffydd-Jones T., Wells G. (1990) Spongiform encephalopathy in a cat. *Vet. Rec.* 126: 513.
- Yen S., Fields K. (1981) Antibodies to neurofilament, glial filament and fibroblast intermediate filament proteins. *J. Cell. Biol.* 88: 115-126.
- Zeidler M., Stewart G., Cousens S., Estibeiro K., Will R. (1997) Codon 129 genotype and new variant CJD. *Lancet* 350: 668.
- Zens W., Lückner E., Bülte M., Stojanovic V. (2000) Sensorische, mikrobiologische, histologische und chemische Untersuchung von Brühwürsten in Konserven. 41. DVG-Arbeitstagung des Arbeitsgebietes Lebensmittelhygiene, 25.-28.09.00 in Garmisch-Partenkirchen.
- Zerr I., Bodemer M., Racker S., Grosche S., Poser S., Kretzschmar H., Weber T. (1995) Cerebrospinal fluid concentration of neuron-specific enolase in diagnosis of Creutzfeldt-Jakob disease. *Lancet* 345: 1609-1610.
- Zlotník I. (1958) The histopathology of the brain stem of sheep affected with natural scrapie. *J. Comp. Pathol.* 68: 148-166.
- Zlotník I., Rennie J. (1958) A comparative study of the incidence of vacuolated neurons in the medulla from apparently healthy sheep of various breeds. *J. Comp. Pathol.* 68: 411-415.

9 **Abbildungsverzeichnis**

Abb. 2-1:	Kaskadenartige Konversion des PrP ^c in PrP ^{res}	15
Abb. 2-2:	Zeitpunkt der PrP ^{res} -Nachweisbarkeit nach BSE-Infektion (nach GERBERMANN, 2001)	19
Abb. 2-3:	Anteil der produzierten Fleisch- und Knochenmehle (MBM) nach Einführung des kontinuierlichen Systems und Reduzierung der Fettextraktion von 1964 bis zum BSE- Ausbruch 1986 (modifiziert nach WILESMITH et al., 1991)	22
Abb. 2-4:	Erregerkreislauf über Fleisch- und Knochenmehl: vom Schaf zum Rind	23
Abb. 2-5:	Bestätigte BSE-Fälle im Vereinigten Königreich mit Angabe der Tiere, die nach dem Fütterungsverbot im Jahre 1988 geboren sind (BAB=Born-after-ban)	24
Abb. 2-6:	Strukturformel des Cholesterols (LEHNINGER et al., 1994)	43
Abb. 3-1:	Reaktionsschemata der enzymatischen Gesamtcholesterol- bestimmung (n. SCHRÖTER et al., 1994; ANONYM, 1995a)	64
Abb. 3-2:	Prinzip der Signalverstärkung durch das Biotin-Streptavidin- System	76
Abb. 3-3:	BioRad [®] Protean II-Elektrophoresekammer mit Power Supply	80
Abb. 3-4:	Trans-Blot [®] SD Semi Dry Transfer Cell mit Power Pac 200	81
Abb. 3-5:	Häufigkeitsverteilung der Dicke der gefüllten Beutel	86
Abb. 3-6:	Messung der Kerntemperatur im Brät bei 80 °C Wassertempe- ratur	87
Abb. 4-1:	Graphische Darstellung der Mittelwerte sowie der linearen Re- gressionsgeraden des laborinternen Rohwurststandards	89
Abb. 4-2:	Graphische Darstellung der mittleren Cholesterolgehalte des nativen und des erhitzten Brühwurststandards (Bw) und des Frankfurter Referenzmaterials (S0, S1 und S2) sowie der linearen Regressionsgeraden des nativen Standards	92
Abb. 4-3:	Graphische Darstellung der Einzelwerte sowie des Gesamt- mittelwertes mit Standardabweichung des "Cholesterol- standards"	93
Abb. 4-4:	Graphische Darstellung der Mittelwerte sowie der linearen Re- gressionsgeraden des Kochwurststandards mit 16 % bzw. 32 % Leberanteil	96
Abb. 4-5:	Graphische Darstellung der mittleren Gesamtcholesterolge- halte sowie der Standardabweichung des Schweizer Re- ferenzmaterials (nach Nummern geordnet)	98
Abb. 4-6:	Vergleich der Gesamtcholesterolgehalte des erhitzten labor- internen Brühwurststandards (Bw) (lineare Trendlinie) und des Schweizer Referenzmaterials (Ref.mat.)	99
Abb. 4-7:	Häufigkeitsverteilung der Gesamtcholesterolgehalte in Brüh- wurst (dunkel dargestellte Werte: immunchemisch ZNS- positiv)	103
Abb. 4-8:	Häufigkeitsverteilung der Gesamtcholesterolgehalte in Leber- wurst (dunkel dargestellte Werte: immunchemisch ZNS- positiv)	106

Abb. 4-9:	Häufigkeitsverteilung der Gesamtcholesterolgehalte im Probenkollektiv A (dunkel dargestellte Werte: immunchemisch ZNS-positiv)	109
Abb. 4-10:	Häufigkeitsverteilung der Gesamtcholesterolgehalte im Probenkollektiv B (dunkel dargestellte Werte: immunchemisch ZNS-positiv)	112
Abb. 4-11:	Häufigkeitsverteilung der Gesamtcholesterolgehalte in Kochmettwurst (dunkel dargestellte Werte: immunchemisch ZNS-positiv)	113
Abb. 4-12:	Häufigkeitsverteilung der Gesamtcholesterolgehalte in Sülzwurst	116
Abb. 4-13:	Relative NSE-Immunintensität in Abhängigkeit der Konzentrierung von 2-Mercaptoethanol im Tris-Harnstoff-Extraktionspuffer	121
Abb. 4-14:	Relative NSE-Immunintensitäten in Abhängigkeit des Extraktionsmittels und der Erhitzungstemperatur	123
Abb. 4-15:	Reaktivierung der NSE-Immunaktivität von Brühwurst mit 5 % Hirn durch Zusatz von 5 % Mercaptoethanol $\pm$ DTT zur Tris-Harnstoff-Extraktion	123
Abb. 4-16:	NSE-Immunreaktion des erhitzten Brühwurststandards nach unterschiedlicher Extraktion	124
Abb. 4-17:	Häufigkeitsverteilung und kumulierte Häufigkeitskurve der Konzentrierung des Probenextraktes mit Microcon 10 kDa	125
Abb. 4-18:	Reaktivierung der NSE-Immunreaktion des Kochwurststandards mit 1 % Hirnanteil	126
Abb. 4-19:	Reaktivierung der NSE-Immunreaktion in einer Kochmettwurst Konserve	127
Abb. 4-20:	NSE-Immunreaktivitäten des Rohwurststandards	128
Abb. 4-21:	Relative NSE-Immunintensität des Rohwurststandards	128
Abb. 4-22:	NSE-Immunaktivitäten des nativen Brühwurststandards	129
Abb. 4-23:	NSE-Immunaktivitäten des erhitzten Brühwurststandards	130
Abb. 4-24:	NSE-Immunaktivitäten des Kochwurststandards nach Extraktion mit Mercaptoethanol/DTT	131
Abb. 4-25:	Vergleich der immunchemischen Reaktion von NSE und GFAP	132
Abb. 4-26:	Graphische Darstellung der relativen NSE-Immunintensität sowie der Standardabweichung	133
Abb. 4-27:	Vergleich der relativen NSE-Immunintensität des Schweizer Referenzmaterials (Ref.mat.) und des erhitzten laborinternen Brühwurststandards (Bw) (lineare Trendlinie)	134
Abb. 4-28:	NSE-Immunreaktion des Frankfurter Referenzmaterials S0 bis S2 bei herkömmlicher und optimierter Extraktion	135
Abb. 4-29:	Vergleich der NSE- und GFAP-Immunintensität der Probe S0 (3,3 % Hirnanteil) nach herkömmlicher (T-Harn) sowie optimierter Extraktion (M/D)	136
Abb. 4-30:	NSE-Immunintensität einer Salami (191/99) nach Tris-Harnstoff- sowie Mercaptoethanol-DTT-Extraktion	136

Abb. 4-31:	Vorkommen definierter qualitativer NSE-Immunintensitätsgrade 16 positiver Brühwürste	137
Abb. 4-32:	NSE-Immunintensitäten schwach positiver Brühwurst-Feldproben (147/99 bis 149/99) nach Mercaptoethanol-DTT-Extraktion	138
Abb. 4-33:	NSE-Immunreaktionen schwach positiver Brühwurstproben (Nr. 6 und 9) nach Mercaptoethanol-DTT-Extraktion	138
Abb. 4-34:	Vorkommen definierter qualitativer NSE-Immunintensitätsgrade 25 positiver Leberwürste	139
Abb. 4-35:	Relative sowie qualitative NSE-Immunintensitäten ausgewählter Leberwurstproben nach Entfettung (entf) und Anwendung Tris-Harnstoff-Extraktion (T-Harn) sowie Zusatz von Mercaptoethanol/DTT (M/D)	142
Abb. 4-36:	NSE-Immunbanden mit und ohne Entfettung positiver und negativer (Nr. 5) Proben bei herkömmlicher Tris-Harnstoff-Extraktion und nach Zusatz von Mercaptoethanol/DTT	143
Abb. 4-37:	NSE-Immunbanden mit und ohne Entfettung positiver und negativer (Nr. 68, 69) Proben bei herkömmlicher Tris-Harnstoff-Extraktion und nach Zusatz von Mercaptoethanol/DTT	143
Abb. 4-38:	GFAP-Immunblot mit spezifischen und unspezifischen Immunbanden positiver und negativer (Nr. 5) Proben	144
Abb. 4-39:	NSE-Immunblot der schwach positiven Proben 71 und 119 sowie negativer Proben 69 und 91	145
Abb. 4-40:	Vergleich von NSE- und GFAP-Immunreaktivitäten einer feinen Leberwurst (verschiedene Chargen) nach Mercaptoethanol-DTT-Extraktion	146
Abb. 4-41:	Vorkommen definierter qualitativer NSE-Immunintensitätsgrade 17 positiver Mettwürste	147
Abb. 4-42:	NSE-Immunblot mit positiven und negativen (159/99, 165/99) Mettwurstproben nach Mercaptoethanol-DTT-Extraktion	147
Abb. 4-43:	NSE-Immunblot mit positiven und negativen (187/99, 188/99) Mettwurstproben nach Mercaptoethanol-DTT-Extraktion	148
Abb. 4-44:	NSE-Immunblot mit positiven und negativen (M-013, BCL-010) Feldproben nach Mercaptoethanol-DTT-Extraktion	148
Abb. 4-45:	NSE-Immunblot mit Mettwürsten sowie Leberwürsten (BCB-003, -016) nach i.d.R. Mercaptoethanol-DTT-Extraktion sowie teilweiser Entfettung	149
Abb. 4-46:	Vergleich von NSE- sowie GFAP-Immunbanden definierter Rinderhirnkonzentrationen	151
Abb. 4-47:	NSE-Immunblot einiger Rinderorgane	151
Abb. 4-48:	NSE-Immunblot verschiedener Rindergewebe /-organe	152
Abb. 4-49:	NSE-Immunreaktionen von Rinder- und Schweinelunge	153
Abb. 4-50:	Reduktion der NSE-Immunaktivität in Brühwurst mit 10 % Hirnanteil durch Erhitzung bei 80 °C nach Extraktion mit Tris-Harnstoff (T-Harn) bzw. 5 % Mercaptoethanol/DTT (M/D)	154
Abb. 4-51:	Reduktion der NSE-Immunaktivität in Brühwurst mit 10 % Hirnanteil durch Erhitzung bei 100 °C nach Extraktion mit Tris-Harnstoff (T-Harn) bzw. 5 % Mercaptoethanol/DTT (M/D)	155

Abb. 4-52:	Reduktion sowie Reaktivierung der NSE-Immunreaktion in Brühwurst mit 10 % Hirnanteil durch Erhitzung bei 100 °C	155
Abb. 4-53:	Reduktion der NSE-Immunaktivität in Brühwurst mit 10 % Hirnanteil bei 80 °C und 100 °C nach Extraktion mit Tris-Harnstoff (T-Harn) bzw. 5 % Mercaptoethanol- und DTT-Zusatz (M/D)	156
Abb. 4-54:	Reduktion der NSE-Immunaktivität in Brühwurst mit 5 % Hirnanteil bei 80 °C, 95 °C und 100 °C nach Extraktion mit 5 % Mercaptoethanol/DTT (M/D)	157
Abb. 4-55:	Reduktion der NSE-Immunreaktion in Brühwurst mit 5 % Hirnanteil durch Erhitzung auf 80 °C nach Mercaptoethanol-DTT-Extraktion	158
Abb. 4-56:	Reduktion der NSE-Immunreaktion in Brühwurst mit 5 % Hirnanteil durch Erhitzung auf 95 °C nach Mercaptoethanol-DTT-Extraktion	158
Abb. 4-57:	Reduktion der NSE-Immunaktivität in Brühwurst mit 1 % Hirnanteil bei 100 °C nach Extraktion mit Tris-Harnstoff (T-Harn) bzw. 5 % Mercaptoethanol/DTT (M/D)	159
Abb. 4-58:	Reduktion der NSE-Immunaktivität in Kochwurst mit 10 % Hirnanteil bei 80 °C nach Extraktion mit Tris-Harnstoff (T-Harn) bzw. 5 % Mercaptoethanol/DTT (M/D)	161
Abb. 4-59:	Reduktion der NSE-Immunreaktion in Kochwurst mit 10 % Hirn durch Erhitzung bei 80 °C nach Tris-Harnstoff-Extraktion	161
Abb. 4-60:	Reduktion der NSE-Immunaktivität in Kochwurst mit 10 % Hirnanteil bei 100 °C nach Extraktion mit Tris-Harnstoff (T-Harn) bzw. 5 % Mercaptoethanol/DTT (M/D) sowie Extraktkonzentrierung durch Ultrafiltration	162
Abb. 4-61:	Reduktion der NSE-Immunreaktion in Kochwurst mit 10 % Hirnanteil durch Erhitzung bei 100 °C nach Tris-Harnstoff-Extraktion sowie Reaktivierung durch Zusatz von Mercaptoethanol/DTT und Microcon-Ultrafiltration	163
Abb. 4-62:	Reduktion der NSE-Immunaktivität in Kochwurst mit 10 % Hirnanteil bei 80 °C und 100 °C sowie nach Extraktion mit Tris-Harnstoff (T-Harn) bzw. 5 % Mercaptoethanol- und DTT-Zusatz (M/D) sowie Ultrafiltration	163
Abb. 5-1:	Gemessene Cholesterolgehalte einiger Rindergewebe im Vergleich zu Angaben aus der Literatur (Souci et al., 1994; RUNQUIST et al., 1995)	173
Abb. 5-2:	Herstellungsverfahren des externen sowie des eigenen labor-internen Referenzmaterials im Vergleich	183
Abb. 5-3:	Häufigkeitsverteilung qualitativer Immunreaktionen positiver Feldproben	185
Abb. 5-4:	NSE- sowie GFAP-Gehalte einiger Rinderorgane gemäß Literaturangaben (s.P. = soluble Protein)	190

10 Verzeichnis der Gleichungen

Gleichung 3-1:	Berechnung der Extinktionsdifferenz ΔE (n. ASUV,1992)	66
----------------	---	----

Gleichung 3-2:	Allgemeine Berechnungsformel für die Bestimmung der Konzentration in verdünnten Lösungen (n. ANONYM, 1995a)	66
Gleichung 3-3:	Berechnung der Gesamtcholesterolkonzentration in g/l Probelösung (n. ANONYM, 1995a)	67
Gleichung 3-4:	Berechnung des Gesamtcholesterolgehaltes in g/100 g FS (n. ANONYM, 1995a)	67
Gleichung 3-5:	Berechnung des Gesamtcholesterolgehaltes in mg/100 g FS (n. ANONYM, 1995a)	68
Gleichung 3-6:	Berechnung des Gesamtcholesterolgehaltes in Würsten mit Rinderhirnzusatz (LÜCKER und BÜLTE, 1997b)	69
Gleichung 3-7:	Berechnung des Cutoff-Points (n. LÜCKER und BÜLTE, 1997b)	69

11 Tabellenverzeichnis

Tabelle 2-1:	Übersicht über die transmissiblen spongiformen Enzephalopathien (PRUSINER, 1995; MACKNIGHT und ROCKWOOD, 1996; BRADLEY, 1996)	5
Tabelle 2-2:	Übersicht über die transmissiblen spongiformen Enzephalopathien beim Menschen (PRUSINER, 1995; MACKNIGHT und ROCKWOOD, 1996; BRADLEY, 1996)	9
Tabelle 2-3:	Unterschiede zwischen vCJD und der klassischen Form der CJD (KRETZSCHMAR et al., 1996b; BRUCE et al., 1997; VERDRAGER, 1997; HILL et al., 1999; *LORAINS et al., 2001)	12
Tabelle 2-4:	Unterschied zwischen dem normalen zellulären (PrP ^C) und dem krankheitsspezifischen Prionprotein (PrP ^{res}) (AGUZZI und WEISSMANN, 1997; RABENAU, 1997; APPEL et al., 1998)	14
Tabelle 2-5:	Überblick über Nachweismethoden der TSE (DEFRA)	18
Tabelle 2-6:	Übersicht über angebotene Schnelltests (MOYNAGH et al., 1999)	19
Tabelle 2-7:	Zeitlicher Verlauf der BSE-Erkrankung nach oraler Aufnahme (WELLS et al., 1998)	20
Tabelle 2-8:	Übersicht über BSE-Fälle in Europa (DEFRA; OIE) Stand: Feb. 2002	25
Tabelle 2-9:	Anzahl importierter BSE-Fälle (DEALLER und LACEY, 1990; OIE) Stand: Feb. 2002	26
Tabelle 2-10:	Vergleich der Effektivität verschiedener Übertragungswege (in Anlehnung an SIMON und PAULI, 1998)	28
Tabelle 2-11:	Experimentelle Übertragung von BSE	29
Tabelle 2-12:	Infektiosität der Gewebe von Schafen und Rindern mit Scrapie bzw. BSE (KIMBERLIN und WILESMITH, 1994; LÜCKER und BÜLTE, 1997a; COLLEE und BRADLEY, 1997a und 1997b)	32
Tabelle 2-13:	Definition der Länderklassifizierung (ANONYM, 2001b)	35
Tabelle 2-14:	Jährlicher Anfall an Gehirn und Rückenmark bei ausgewählten Schlachttieren (NICKEL et al., 1992; ANONYM, 2002)	36
Tabelle 2-15:	Ausnahmen nach den Leitsätzen für Fleisch und Fleischerzeugnisse für die Verarbeitung von spezifischen Innereien	

	in deutschen Wurstwaren (ANONYM, 1998) (gültig bis Oktober 2001)	37
Tabelle 2-16:	Verarbeitung von Lunge in speziellen Wurstwaren (SCHEID, 1967; ANONYM, 1998)	39
Tabelle 2-17:	Spezifiziertes Risikomaterial (SRM) gemäß VO 999/2001, zuletzt geändert durch VO 1326/2001 (gültig seit 01.07.01)	41
Tabelle 3-1:	Zutaten und Zusatzstoffe des Rohwurstbrätes	50
Tabelle 3-2:	Rohwurststandards mit verschiedenen Rinderhirnantteilen	50
Tabelle 3-3:	Zutaten und Zusatzstoffe des Brühwurstbrätes	51
Tabelle 3-4:	Brühwurststandards mit verschiedenen Rinderhirnantteilen	52
Tabelle 3-5:	Zutaten und Zusatzstoffe des Brühwurststandards mit 5 % Hirnanteil	52
Tabelle 3-6:	Zutaten und Zusatzstoffe für den „Cholesterolstandard“	54
Tabelle 3-7:	Zutaten und Zusatzstoffe für das Grundbrät der Kochwurststandards	55
Tabelle 3-8:	Kochwurststandards mit verschiedenen Rinderhirnantteilen	56
Tabelle 3-9:	Zutaten und Zusatzstoffe des nativen Kochwurststandards	56
Tabelle 3-10:	Zutaten und Zusatzstoffe des Schweizer Referenzmaterials	57
Tabelle 3-11:	Schweizer Referenzmaterial mit verschiedenen Kalbshirnantteilen	58
Tabelle 3-12:	Stichprobenumfang nach Leitsatznummern aufgegliedert (ohne Probenkollektiv A)	60
Tabelle 3-13:	Stichprobenumfang nach Art der Fleischerzeugnisse getrennt	61
Tabelle 3-14:	Pipettierschema für den Bestimmungsansatz (modifiziert n. ANONYM, 1995a)	65
Tabelle 3-15:	Extraktionsmittel in Abhängigkeit von der zu untersuchenden Probe (verwendeter Puffer mit X markiert)	77
Tabelle 3-16:	Pipettierschema für den Probenansatz	79
Tabelle 4-1:	Gesamtcholesterolgehalte des Rohwurststandards (Rw)	89
Tabelle 4-2:	Gesamtcholesterolgehalte des nativen Brühwurststandards (Bw)	90
Tabelle 4-3:	Analytisch ermittelte und berechnete Gesamtcholesterolgehalte des erhitzten Brühwurststandards	91
Tabelle 4-4:	Analytisch ermittelte und berechnete Gesamtcholesterolgehalte des Kochwurststandards (Kw) mit 16 % Leberanteil	94
Tabelle 4-5:	Analytisch ermittelte und berechnete Gesamtcholesterolgehalte des Kochwurststandards mit 32 % Leberanteil	96
Tabelle 4-6:	Gesamtcholesterolgehalte des Schweizer Referenzmaterials	97
Tabelle 4-7:	Gesamtcholesterolgehalte der Proben S0 bis S2	100
Tabelle 4-8:	Statistische Parameter für die Gesamtcholesterolgehalte bei Rohwurst	101
Tabelle 4-9:	Häufigkeitsverteilung für Rohwurst	101
Tabelle 4-10:	Statistische Parameter für die Gesamtcholesterolgehalte bei Brühwurst	102
Tabelle 4-11:	Häufigkeitsverteilung für ZNS-negative und -positive Brühwurst	103

Tabelle 4-12:	Statistische Parameter für die Gesamtcholesterolgehalte aller Leberwurstproben	105
Tabelle 4-13:	Häufigkeitsverteilung für alle ZNS-negativen und -positiven Leberwurstproben	106
Tabelle 4-14:	Statistische Parameter für die Gesamtcholesterolgehalte des Probenkollektives A	107
Tabelle 4-15:	Häufigkeitsverteilung für ZNS-negative und -positive Proben im Kollektiv A	108
Tabelle 4-16:	Statistische Parameter für die Gesamtcholesterolgehalte im Probenkollektiv B	110
Tabelle 4-17:	Häufigkeitsverteilung für ZNS-negative und -positive Proben im Kollektiv B	111
Tabelle 4-18:	Statistische Parameter für die Gesamtcholesterolgehalte bei Kochmettwurst	112
Tabelle 4-19:	Häufigkeitsverteilung für ZNS-negative und -positive Kochmettwurst	114
Tabelle 4-20:	Statistische Parameter für die Gesamtcholesterolgehalte bei Blutwurst	115
Tabelle 4-21:	Häufigkeitsverteilung für Blutwurst	115
Tabelle 4-22:	Statistische Parameter für die Gesamtcholesterolgehalte bei Sülzwurst	116
Tabelle 4-23:	Häufigkeitsverteilung für Sülzwurst	117
Tabelle 4-24:	Statistische Parameter für die Gesamtcholesterolgehalte bei sonstigen Erzeugnissen	118
Tabelle 4-25:	Häufigkeitsverteilung für sonstige Erzeugnisse	118
Tabelle 4-26:	Cholesterolgehalte von Rindergewebe (Minimum, Maximum und Median innerhalb bestimmter Klassengrenzen)	120
Tabelle 4-27:	Semiquantitativer Vergleich der Immunintensitäten abhängig vom Extraktionsmittel am Beispiel der erhitzten Brühwurststandards (1 h bei 100°C)	124
Tabelle 4-28:	Häufigkeitsverteilung der erzielten Konzentrierung mit Microcon 10 kDa	126
Tabelle 4-29:	Relative NSE-Immunintensität des Schweizer Referenzmaterials	133
Tabelle 4-30:	NSE- sowie GFAP-Immunaktivität sowie Gesamtcholesterolgehalte der ZNS-positiven Proben	141
Tabelle 4-31:	Gleichung sowie Bestimmtheitsmaß r^2 der exponentiellen Reduktionskurven bei 80 °C und 100 °C sowie verschiedener Extraktionsmittel in Brühwurst 10 %	157
Tabelle 4-32:	Gleichung und Bestimmtheitsmaß r^2 der exponentiellen Reduktionskurven bei Brühwurst 5 % nach Anwendung der Mercaptoethanol-DTT-Extraktion bei verschiedenen Temperaturen	159
Tabelle 4-33:	Gleichung und Bestimmtheitsmaß r^2 der exponentiellen Reduktionskurven bei 100 °C sowie verschiedener Extraktionsmittel in Brühwurst 1 %	160

Tabelle 4-34:	Gleichung und Bestimmtheitsmaß r^2 der exponentiellen Reduktionskurven bei 80 °C und 100 °C sowie verschiedener Extraktionsmittel und Ultrafiltration in Kochwurst 10 %	164
Tabelle 5-1:	Übersicht über ermittelte Cutoff-Werte normaler Cholesterolgehalte mit unterschiedlicher statistischer Sicherheit	175
Tabelle 5-2:	Für den Zusatz von ZNS verdächtige sowie positive Proben	176
Tabelle 5-3:	Immunchemisch positive Proben im Cholesterol-Screening	176
Tabelle 5-4:	Definition des Begriffes „Innereien“ laut den Leitsätzen für Fleisch und Fleischerzeugnisse (Anonym, 2001a) (gültig seit Oktober 2001)	179
Tabelle 5-5:	Abstufung der Gesamtimmunreaktion positiver Feldproben	185

12 Verzeichnis der Anhangstabellen

Anhang 1:	Cholesterolgehalte in Lebensmitteln tierischer Herkunft (n. SOUCI et al., 1994)	230
Anhang 2:	Mittlere Sterinzusammensetzung von Pflanzenölen [mg/kg] (n. BELITZ und GROSCH, 1992)	231
Anhang 3:	NSE-Gehalte in tierischen Geweben in ng/mg löslichem Protein (s.P.)	231
Anhang 4:	GFAP-Gehalte in Rindergeweben in ng/mg löslichem Protein (s.P.) (SCHMIDT et al., 1999b)	232
Anhang 5:	Rohwurststandard	232
Anhang 6:	Erhitzter Brühwurststandard	232
Anhang 7:	Gesamtcholesterolgehalte sowie NSE- und GFAP-Ergebnisse für Rohwurst	233
Anhang 8:	Gesamtcholesterolgehalte sowie NSE- und GFAP-Ergebnisse für brühwurstartige Erzeugnisse	233
Anhang 9:	Gesamtcholesterolgehalte sowie NSE- und GFAP-Ergebnisse für Kochwurst, Art Leberwurst, Probenkollektiv A	239
Anhang 10:	Gesamtcholesterolgehalte sowie NSE- und GFAP-Ergebnisse für Kochwurst, Art Leberwurst, Probenkollektiv B	242
Anhang 11:	Gesamtcholesterolgehalte sowie NSE- und GFAP-Ergebnisse für Kochwurst, Art Kochmettwurst	247
Anhang 12:	Gesamtcholesterolgehalte sowie NSE- und GFAP-Ergebnisse für Kochwurst, Art Blutwurst	249
Anhang 13:	Gesamtcholesterolgehalte sowie NSE- und GFAP-Ergebnisse für Kochwurst, Art Sülzen und Preßwurst	251
Anhang 14:	Gesamtcholesterolgehalte sowie NSE- und GFAP-Ergebnisse für Erzeugnisse aus zerkleinertem Fleisch und andere Lebensmittel	252
Anhang 15:	Cholesterolgehalte (*Souci et al., 1994; Runquist et al., 1995) sowie NSE- und GFAP-Ergebnisse von Rinderorganen	254
Anhang 16:	Brühwurst 10 % nach Erhitzung bei 80 °C und Tris-Harnstoff-Extraktion	255
Anhang 17:	Brühwurst 10 % nach Erhitzung bei 80 °C und M/D-Extraktion	255
Anhang 18:	Brühwurst 10 % nach Erhitzung bei 100 °C und Tris-Harnstoff-Extraktion	256

Anhang 19:	Brühwurst 10 % nach Erhitzung bei 100 °C und M/D-Extraktion	256
Anhang 20:	Brühwurst 5 % nach Erhitzung bei 80 °C und M/D-Extraktion	256
Anhang 21:	Brühwurst 5 % nach Erhitzung bei 95 °C und M/D-Extraktion	257
Anhang 22:	Brühwurst 5 % nach Erhitzung bei 100 °C und M/D-Extraktion	257
Anhang 23:	Brühwurst 1 % nach Erhitzung bei 100 °C und Tris-Harnstoff-Extraktion	257
Anhang 24:	Brühwurst 1 % nach Erhitzung bei 100 °C und M/D-Extraktion	258
Anhang 25:	Kochwurst 10 % nach Erhitzung bei 80 °C und Tris-Harnstoff-Extraktion	258
Anhang 26:	Kochwurst 10 % nach Erhitzung bei 80 °C und M/D-Extraktion	258
Anhang 27:	Kochwurst 10 % nach Erhitzung bei 100 °C und Tris-Harnstoff-Extraktion	259
Anhang 28:	Kochwurst 10 % nach Erhitzung bei 100 °C und M/D-Extraktion	259
Anhang 29:	Kochwurst 10 % nach Erhitzung bei 100 °C und M/D-Extraktion sowie Ultrafiltration mit Microcon 10 kDa	259
Anhang 30:	Brühwurst 5 % nach Erhitzung bei 80 °C und Tris-Harnstoff-Extraktion mit definierten Mercaptoethanol-Zusätzen	260
Anhang 31:	Brühwurst 5 % nach Erhitzung bei 100 °C und Tris-Harnstoff-Extraktion mit definierten Mercaptoethanol-Zusätzen	260
Anhang 32:	Brühwurst 5 % nach Tris-Harnstoff-Extraktion ± Mercaptoethanol-DTT-Zusatz bei definierter Temperatur	261

13 Abkürzungsverzeichnis

%	Prozent	ASUV	Amtliche Sammlung von Untersuchungsverfahren
Ø	Durchmesser	BAB	Born after Ban
®	geschütztes Warenzeichen	Bgbl	Bundesgesetzblatt
$\bar{X}$	Mittelwert (arithmetisch)	BSE	bovine spongiforme Enzephalopathie
µl	Mikroliter	Bw	Brühwurst
µm	Mikrometer	bzw.	beziehungsweise
~	ungefähr	c	Stoffmengenkonzentration
±	plus minus	ca.	circa
+	positiv	CHAPS	3[(3-Cholamidopropyl)-dimethylammonio]-propan-sulfonat
-	negativ	Chol.	Cholesterol
≡	entspricht	CJD	Creutzfeldt-Jakob-Disease
=	gleich	cm	Zentimeter
<	kleiner als	cm ²	Quadratcentimeter
>	größer als	CoID ₅₀	Cattle oral Infective Dose ₅₀
≤	kleiner oder gleich	CP	Cutoff-Point
≥	größer oder gleich	CWD	Chronic wasting disease of elk
§	Paragraph	DAB	3,3'-Diaminobenzidintetrahydrochloriddihydrat
°C	Grad Celsius		
Abb.	Abbildung		
ABl.	Amtsblatt		
AP	Ammoniumpersulfat		

DBES	Date-based Export Scheme	I	Liter
DEFRA	Department for Environment, Food & Rural Affairs	LD ₅₀	Letale Dosis für 50 %
dest.	destilliert	LMBG	Lebensmittel- und Bedarfsgegenständegesetz
d.h.	das heißt	Lob.caud.dex.	Lobus caudalis dexter (rechter hinterer Lungenlappen)
DLG	Deutsche Landwirtschaftsgesellschaft	Lob.cran.sin.	Lobus cranialis sinister (linker vorderer Lungenlappen)
dors.	dorsal	Lw	Leberwurst
DTT	1,4-Dithio-D,L-threitol	M	Molar
E	Extinktion	M/D	Mercaptoethanol-DTT-Extraktionspuffer
EEG	Elektroenzephalogramm	mA	Milliampere
EG	Europäische Gemeinschaft	max.	maximal
ELISA	enzyme linked immunosorbent assay	MBM	Meat and Bone Meal
entf	entfettet	M/D	5 % Mercaptoethanol + 5 mM DTT in Tris-Harnstoff
et al.	et alibi	Mercapto	Mercaptoethanol
EU	Europäische Union	Met	Methionin
exkl.	exklusiv	mg	Milligramm
f	Sicherheitsfaktor (einseitig)	MG	Molekulargewicht
FFI	Fatal familial insomnia	min	Minuten
FS	Frischsubstanz	ml	Milliliter
FSE	feline spongiforme Enzephalopathie	mm	Millimeter
FSIS	Food Safety and Inspection Service	mM	Millimolar
g	Gramm	N.	Nervus
GBR	geographisches BSE-Risiko	n	Stichprobenumfang
gek.	gekocht	n.	nach
GFAP	Saures Gliafaserprotein (glial fibrillary acidic protein)	n.u.	nicht untersucht
GSS	Gerstmann-Sträussler-Scheinker-Syndrom	NaCl	Kochsalz
h	Stunden	NaOCl	Natriumhypochlorit
H ₂ O	Wasser	NaOH	Natronlauge
H ₂ O ₂	Wasserstoffperoxid	ng	nanogramm
HER	humanes Expositionsrisiko	NH ₄ ⁺	Ammoniumionen
i.c.	intracerebral	nm	Nanometer
i.p.	intraperitoneal	Nr.	Nummer
i.s.	intraspinal	NSE	Neuronenspezifische Enolase
i.v.	intravenös	O ₂	Sauerstoff
ID ₅₀	Infektöse Dosis für 50%	OIE	Office International des Epizooties
IE	Infektiöse Einheit	OMTS	Over 30 Month Scheme
inkl.	inklusiv	p	Wahrscheinlichkeit
Kap.	Kapitel	p.a.	pro analysi
kDa	Kilodalton	p.o.	per oral
kg	Kilogramm		
KOH	Kalilauge		
Kw	Kochwurst		

PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese	SRM	Spezifiziertes Risikomaterial
pH	pH-Wert	SSC	Scientific Steering Committee
Prion	proteinaceous infectious particle	TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylenediamin
PRNP	Prionproteingen	T-Harn	Tris-Harnstoff-Puffer
PrP ^C	zelluläres Prionprotein	TKBA	Tierkörperbeseitigungsanstalt
PrP ^{res}	krankheitsspezifisches Prionprotein	TME	transmissible mink Enzephalopathie
PVDF	Polyvinylidendifluorid	Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
r ²	Bestimmtheitsmaß	TSE	transmissible spongiforme Enzephalopathie
rel.	relativ	UK	Vereinigtes Königreich
RM	Rückenmark	Upm	Umdrehung pro Minute
Rw	Rohwurst	USA	United States of America
S.	Seite	V	Volumen
s.	siehe	Val	Valin
s.c.	subcutan	VO	Verordnung
s.P.	soluble Protein (lösliches Protein)	vCJD	neue Variante der Creutzfeldt-Jakob-Krankheit
SAF	Scrapie assoziierte Fibrillen	vgl.	vergleiche
SBM	Specified bovine material	WHO	World Health Organization
SBO	Specified bovine offals	z.B.	zum Beispiel
sd	Standardabweichung	ZNS	Zentrales Nervensystem
SDS	Dodecylhydrogensulfat Natriumsalz		
SE	Spongiforme Enzephalopathie		

14 Anhang

14.1 Cholesterol

Anhang 1 Cholesterolgehalte in Lebensmitteln tierischer Herkunft (n. Souci et al., 1994)

Tierart	Gewebe	mittlerer Cholesterolgehalt [mg/100 g FS]
Rind	Muskulatur	58
	Fettgewebe	70
	Blut	190
	Leber	261
	Lunge	234
	Niere	358
	Hirn	2.340
Kalb	Muskulatur	70
	Leber	360
	Niere	380
	Hirn	2.000
Schwein	Muskulatur	64
	Fettgewebe	76
	Blut	40
	Leber	354
	Lunge	314
	Niere	385
	Hirn	2.550
Huhn	Muskulatur	81
	Leber	492
Hühnerei	Gesamtei	396
	Flüssigeigelb	1.260
	Eiklar	-

Anhang 2 Mittlere Sterinzusammensetzung von Pflanzenölen [mg/kg] (n. BELITZ und GROSCH, 1992)

Sterin	Sonnenblumen	Erdnuß	Soja	Mais	Oliven
Cholesterin	0,5	6,2	0,5	0,5	0,5
Brassicasterin	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5
Campesterin	242	278	563	2.655	19
Stigmasterin	236	145	564	499	0,5
β -Sitosterin	1.961	1.145	1.317	9.187	732
Δ^5 -Avenasterin	163	253	46	682	78
Δ^7 -Stigmasterin	298	0,5	92	96	0,5
Δ^7 -Avenasterin	99	34	63	102	30
24-Methylencycloartenol	204	0,5	53	425	580
Summe [mg/kg]	3.204	1.863	2.699	13.647	1.441
Summe [mg/100 g]	320	186	270	1365	144

14.2 Neuronenspezifische Enolase (NSE)

Anhang 3 NSE-Gehalte in tierischen Geweben in ng/mg löslichem Protein (s.P.)

Gewebe	NSE-Gehalt [ng/mg s.P.]	Quelle
Gehirn	10.000 – 17.500	MARANGOS et al., 1979
Rückenmark	13.000	KATO et al., 1982
dors. Wurzelganglien	831 – 1145	MARANGOS et al., 1979
Nebenniere	250	SCHMECHEL et al., 1978
Herz	40	KATO et al., 1982
Lunge	28,2	KATO et al., 1982
Niere	15,3	KATO et al., 1982
Leber	8,4	KATO et al., 1982
Milz	5,5	KATO et al., 1982
Skelettmuskulatur	5,7	KATO et al., 1982
Zwerchfell	9	MARANGOS et al., 1979
<i>Nervus ischiadicus</i>	765	MARANGOS et al., 1979
<i>Nervus phrenicus</i>	230	MARANGOS et al., 1979
<i>Nervus vagus</i>	59	MARANGOS et al., 1979

14.3 Saures Gliafaserprotein

Anhang 4 GFAP-Gehalte in Rindergeweben in ng/mg löslichem Protein (s.P.) (SCHMIDT et al., 1999b)

Gewebe	GFAP-Gehalt [ng/mg s.P.]
Gehirn	9.000 – 55.000
Rückenmark	55.000 – 220.000
Skelettmuskulatur	2,8
Zwerchfell	0
<i>Nervus ischiadicus</i>	13,5 - 51

14.4 Ergebnisse

Zeichenerklärung:

n.u. nicht untersucht

- keine Immunreaktion

(+) schwache Immunreaktion

+ gut sichtbare Immunreaktion

++ starke Immunreaktion

+++ sehr starke Immunreaktion

14.4.1 Densitometrie der laborinternen Standards

Anhang 5 Rohwurststandard

Hirnzusatz [%]	Anzahl [n]	Densitometrie		
		Mittelwert	sd	Relative NSE-Intensität
0,0	6	15,49	1,04	0,0
0,1	6	26,37	1,62	0,2
0,5	6	151,21	4,30	1,0
1,0	6	179,77	4,01	1,2
2,0	6	228,92	2,97	1,5
10,0	6	254,99	0,32	1,6

Anhang 6 Erhitzter Brühwurststandard

Hirnzusatz [%]	Anzahl [n]	Densitometrie		
		Mittelwert	sd	Relative NSE-Intensität
0,0	5	13,38	0,07	0,00
0,1	5	16,53	0,12	0,02
0,2	5	41,84	0,32	0,21
1,0	5	149,35	0,48	1,00
2,0	5	214,19	0,05	1,48

14.4.2 Feldproben

Anhang 7 Gesamtcholesterolgehalte sowie NSE- und GFAP-Ergebnisse für Rohwurst

Proben-Nr.	Probenbezeichnung	Gesamtcholesterol [mg/100g FS]	NSE		GFAP
			T-Harn	M/D	M/D
139/99	Kochsalami	70,39	n.u.	-	n.u.
154/99	Salami	71,81	-	-	n.u.
191/99	Salami	77,50	n.u.	(+)	(+)
RW001	Salami	49,77	n.u.	-	n.u.
RW002	Salami	19,20	n.u.	-	n.u.
RW003	Salami	87,81	n.u.	-	-
RW004	Salami	72,52	n.u.	-	n.u.
RW005	Salami	57,13	n.u.	-	n.u.
RW006	Salami	64,70	n.u.	-	n.u.
RW007	Salami	63,48	n.u.	-	n.u.
RW008	Salami	67,28	n.u.	-	n.u.
RW009	Salami	64,19	n.u.	-	n.u.
RW010	Salami	68,26	n.u.	-	n.u.
RW011	Salami	58,78	n.u.	-	n.u.
RW012	Salami	49,77	n.u.	-	n.u.
RW013	Salami	23,46	n.u.	-	n.u.
RW014	Salami	38,09	n.u.	-	n.u.
RW015	Salami	65,86	n.u.	-	n.u.
	Rindersalami	62,32	n.u.	-	n.u.
	Cervelatwurst	54,19	n.u.	-	n.u.
	Hausmacher RW	51,19	n.u.	-	n.u.
	Käsesalami	73,23	n.u.	n.u.	n.u.
	Fesselsalami	60,80	n.u.	n.u.	n.u.

Anhang 8 Gesamtcholesterolgehalte sowie NSE- und GFAP-Ergebnisse für brühwurstartige Erzeugnisse

Proben-Nr.	Probenbezeichnung	Gesamtcholesterol [mg/100g FS]	NSE		GFAP
			T-Harn	M/D	M/D
100/00	Bockwurst	n.u.	n.u.	-	-
101/00	Rindswurst	n.u.	n.u.	-	-
101/98	Leberkäse	86,74	n.u.	n.u.	n.u.
102/00	Schinkenwurst	n.u.	n.u.	-	-

Fortsetzung von Anhang 8 Ergebnisse für brühwurstartige Erzeugnisse

Proben-Nr.	Probenbezeichnung	Gesamtcholesterol [mg/100g FS]	NSE		GFAP
			T-Harn	M/D	M/D
103/00	Bockwurst	n.u.	n.u.	-	-
103/98	Fleischkäse	90,30	n.u.	n.u.	n.u.
104/00	Rostbratwurst	n.u.	n.u.	-	-
104/98	Fleischkäse	81,41	-	n.u.	n.u.
105/00	Currywurst	n.u.	n.u.	-	-
106/00	Rostbratwurst	n.u.	n.u.	-	-
109/98	Leberkäse.	101,67	-	n.u.	n.u.
110/98	Leberkäse	84,25	n.u.	n.u.	n.u.
111/98	Leberkäse	86,03	n.u.	n.u.	n.u.
112/98	Leberkäse	125,85	-	n.u.	n.u.
113/98	Leberkäse	83,90	-	n.u.	n.u.
119/98	Kräuterleberkäse	118,74	-	n.u.	n.u.
12/97	Hirnwurst	180,27	+	++	++
125/98	Leberkäse	118,74	-	n.u.	n.u.
126/98	Leberkäse	89,59	-	n.u.	n.u.
128/98	Leberkäse	94,56	-	n.u.	n.u.
129/98	Leberkäse	92,43	-	n.u.	n.u.
130/98	Leberkäse	80,34	n.u.	n.u.	n.u.
134/98	Leberkäse	79,63	-	n.u.	n.u.
136/98	Leberkäse	72,88	-	n.u.	n.u.
137/98	Fleischkäse	82,48	n.u.	n.u.	n.u.
140/98	Leberkäse	113,76	-	n.u.	n.u.
141/98	Fleischkäse	106,65	-	n.u.	n.u.
147/98	Leberkäse, rustikal, ofengeb.	134,38	-	n.u.	n.u.
147/99	Mortadella italiana	58,30	n.u.	(+)	(+)
148/98	Fleischkäse, fein	88,16	-	n.u.	n.u.
148/99	Mortadella italiana	73,23	n.u.	(+)	(+)
149/98	Leberkäse	102,38	n.u.	n.u.	n.u.
149/99	Mortadella italiana	74,66	n.u.	(+)	(+)
150/98	Leberkäse	86,74	n.u.	n.u.	n.u.
150/99	Mortadella	60,44	n.u.	-	n.u.
151/98	Leberkäse, bayr. Art	88,88	-	n.u.	n.u.
151/99	Mortadella	60,44	n.u.	(+)	(+)

Fortsetzung von Anhang 8 Ergebnisse für brühwurstartige Erzeugnisse

Proben-Nr.	Probenbezeichnung	Gesamtcholesterol [mg/100g FS]	NSE		GFAP
			T-Harn	M/D	M/D
152/99	Mortadella	99,54	n.u.	-	-
153/99	Mortadella	77,50	n.u.	-	-
154/98	Thüringer Leberkäse	163,50	-	n.u.	n.u.
185/99	Schinkenwurst	77,50	n.u.	n.u.	n.u.
186/99	Schinkenwurst	59,72	n.u.	n.u.	
191/98	Bratwurst	133,33	(+)	n.u.	(+)
215/99	Hirnwurst	68,97	n.u.	-	n.u.
216/99	Hirnwurst	61,15	n.u.	-	n.u.
42/98	Preßkopf	78,92	n.u.	n.u.	n.u.
53/00	Wienerwürstchen	77,50	n.u.	(+)	-
54/00	Geflügelwürstchen	74,66	n.u.	(+)	(+)
58/00	Rheinländische Schinkenwurst	49,06	n.u.	(+)	-
59/00	Rheinländische Schinkenwurst	67,55	n.u.	(+)	-
64/00	Putenlyoner	61,15	n.u.	+	+
65/00	Putenlyoner	51,90	n.u.	+	+
66/00	Putenlyoner	n.u.	n.u.	+	+
67/00	Putenlyoner	n.u.	n.u.	+	+
68/00	Putenlyoner	n.u.	n.u.	+	+
84/00	Geflügelwürstchen	n.u.	n.u.	(+)	(+)
85/00	Wienerwürstchen	n.u.	n.u.	-	-
87/00	Wienerwürstchen	n.u.	n.u.	-	-
88/00	Rheinländische Schinkenwurst	n.u.	n.u.	-	-
89/00	Frankfurter Würst- chen	n.u.	n.u.	-	-
89/98	Leberkäse	121,58	-	n.u.	n.u.
90/00	Bierwurst-Creme	n.u.	n.u.	-	-
91/98	Leberkäse	136,42	-	n.u.	n.u.
93/98	Fleischkäse	87,45	n.u.	n.u.	n.u.
94/98	Fleischkäse	72,17	n.u.	n.u.	n.u.
95/00	Geflügelwurst	n.u.	n.u.	(+)	(+)
95/98	Leberkäse	114,47	-	n.u.	n.u.
96/98	Leberkäse	98,83	n.u.	n.u.	n.u.

Fortsetzung von Anhang 8 Ergebnisse für brühwurstartige Erzeugnisse

Proben-Nr.	Probenbezeichnung	Gesamtcholesterol [mg/100g FS]	NSE		-
			T-Harn	M/D	
BCB-001	Schinkenwurst	65,41	-	n.u.	n.u.
BCB-004	Schinkenwurst	90,30	-	n.u.	n.u.
BCB-010	Jagdwurst, norddt. Art	126,56	-	n.u.	n.u.
BCB-011	Lyoner	120,87	-	n.u.	n.u.
BCB-014	dän. Frühstücksfleisch	118,74	-	n.u.	n.u.
BCB-026	Jagdwurst	100,25	-	n.u.	n.u.
BCL-003	Rostbratwurst	63,28	n.u.	n.u.	n.u.
BCL-004	Rostbratwurst	72,52	n.u.	n.u.	n.u.
BCL-016	Bratwurst	75,37	n.u.	n.u.	n.u.
BCL-018	Münchner Weißwurst	58,30	n.u.	n.u.	n.u.
BCL-019	Jagdwurst	84,61	n.u.	n.u.	n.u.
BCL-020	Gelbwurst	90,30	n.u.	n.u.	n.u.
BCL-021	Bratwurst, Nürnberger Art	61,15	n.u.	n.u.	n.u.
BCL-023	Bratwurst, Nürnberger Art	61,86	n.u.	n.u.	n.u.
BCL-024	Bratwurst, grob	80,34	n.u.	n.u.	n.u.
BCL-025	Wiener Würstchen	63,99	n.u.	n.u.	n.u.
BCL-028	Bratwurst	64,70	n.u.	n.u.	n.u.
BCL-031	Bratwurst	102,38	-	n.u.	n.u.
BCL-033	Bratwurst	73,23	n.u.	n.u.	n.u.
BCL-035	Bratwurst	80,34	n.u.	n.u.	n.u.
BCL-039A	Wiener Würstchen	76,08	n.u.	n.u.	n.u.
BCL-040	Bratwurst, grob	66,12	n.u.	n.u.	n.u.
BCL-041	Bratwurst, fein	63,28	n.u.	n.u.	n.u.
BCL-042	Bratwurst, grob	78,21	n.u.	n.u.	n.u.
BCL-043	Wiener Würstchen	63,99	n.u.	n.u.	n.u.
BCL-044	Wiener Würstchen	68,97	n.u.	n.u.	n.u.
BCL-045A	Wiener Würstchen	62,57	n.u.	n.u.	n.u.
BCL-046	Fleischwurst	68,26	n.u.	n.u.	n.u.
BCL-047A	Bratwurst, fein	62,57	n.u.	n.u.	n.u.
BCL-048A	Frankfurter Wurst m. Käse	79,63	n.u.	n.u.	n.u.
BCL-049A	Wiener Würstchen	121,58	-	n.u.	n.u.

Fortsetzung von Anhang 8: Ergebnisse für brühwurstartige Erzeugnisse

Proben-Nr.	Probenbezeichnung	Gesamtcholesterol [mg/100g FS]	NSE		GFAP
			T-Harn	M/D	M/D
BCL-050A	Wiener Würstchen	73,94	n.u.	n.u.	n.u.
	Gelbwurst	89,00	n.u.	n.u.	n.u.
G-001	Gelbwurst	60,00	n.u.	n.u.	n.u.
G-002	Gelbwurst	102,00	n.u.	n.u.	n.u.
G-003	Gelbwurst	107,00	n.u.	n.u.	n.u.
G-004	Gelbwurst	100,00	n.u.	n.u.	n.u.
G-005	Gelbwurst	100,00	n.u.	n.u.	n.u.
G-006	Gelbwurst	83,00	n.u.	n.u.	n.u.
G-007	Gelbwurst	83,00	n.u.	n.u.	n.u.
G-008	Gelbwurst	110,00	n.u.	n.u.	n.u.
G-009	Gelbwurst	101,00	n.u.	n.u.	n.u.
G-010	Gelbwurst	95,00	n.u.	n.u.	n.u.
G-011	Gelbwurst	114,00	n.u.	n.u.	n.u.
G-012	Gelbwurst	92,00	n.u.	n.u.	n.u.
G-013	Gelbwurst	101,00	n.u.	n.u.	n.u.
G-014	Gelbwurst	117,00	n.u.	n.u.	n.u.
G-015	Gelbwurst	91,00	n.u.	n.u.	n.u.
G-016	Gelbwurst	95,00	n.u.	n.u.	n.u.
G-017	Gelbwurst	89,00	n.u.	n.u.	n.u.
G-018	Gelbwurst	133,00	n.u.	n.u.	n.u.
G-019	Gelbwurst	97,00	n.u.	n.u.	n.u.
G-020	Gelbwurst	90,00	n.u.	n.u.	n.u.
G-021	Gelbwurst	63,00	n.u.	n.u.	n.u.
G-022	Gelbwurst	90,00	n.u.	n.u.	n.u.
G-023	Gelbwurst	96,00	n.u.	n.u.	n.u.
G-024	Gelbwurst	63,00	n.u.	n.u.	n.u.
G-025	Gelbwurst	134,00	n.u.	n.u.	n.u.
G-026	Gelbwurst	107,00	n.u.	n.u.	n.u.
G-027	Gelbwurst	102,00	n.u.	n.u.	n.u.
G-028	Gelbwurst	80,00	n.u.	n.u.	n.u.
G-029	Gelbwurst	107,00	n.u.	n.u.	n.u.
G-030	Gelbwurst	105,00	n.u.	n.u.	n.u.
G-031	Gelbwurst	119,00	n.u.	n.u.	n.u.
G-031	Gelbwurst	107,00	n.u.	n.u.	n.u.
G-032	Gelbwurst	91,00	n.u.	n.u.	n.u.

Fortsetzung von Anhang 8 Ergebnisse für brühwurstartige Erzeugnisse

Proben-Nr.	Probenbezeichnung	Gesamtcholesterol [mg/100g FS]	NSE		GFAP
			T-Harn	M/D	M/D
G-033	Gelbwurst	85,00	n.u.	n.u.	n.u.
G-034	Gelbwurst	97,00	n.u.	n.u.	n.u.
G-035	Gelbwurst	100,00	n.u.	n.u.	n.u.
G-036	Gelbwurst	84,00	n.u.	n.u.	n.u.
G-037	Gelbwurst	69,00	n.u.	n.u.	n.u.
G-038	Gelbwurst	92,00	n.u.	n.u.	n.u.
G-039	Gelbwurst	100,00	n.u.	n.u.	n.u.
G-040	Gelbwurst	109,00	n.u.	n.u.	n.u.
G-041	Gelbwurst	108,00	n.u.	n.u.	n.u.
G-042	Gelbwurst	88,00	n.u.	n.u.	n.u.
G-043	Gelbwurst	87,00	n.u.	n.u.	n.u.
G-044	Gelbwurst	100,00	n.u.	n.u.	n.u.
G-045	Gelbwurst	107,00	n.u.	n.u.	n.u.
1	Putenwiener (Glas)	n.u.	n.u.	-	n.u.
2	Geflügelwürstchen (Glas)	n.u.	n.u.	-	n.u.
3	Wiener (Glas)	n.u.	n.u.	-	n.u.
4	Bockwurst (Glas)	n.u.	n.u.	-	n.u.
5	Bockwürstchen (Glas)	n.u.	n.u.	-	n.u.
6	Echte Land-Bockwurst (Glas)	n.u.	n.u.	+	(+)
7	Bockwürstchen (Glas)	n.u.	n.u.	-	n.u.
8	Bockwurst (Dose)	n.u.	n.u.	-	n.u.
9	Bockwurst (Dose)	n.u.	n.u.	+	(+)
10	Bio-Wiener (Dose)	n.u.	n.u.	-	n.u.
11	zarte Wiener (Dose)	n.u.	n.u.	-	n.u.
12	Wiener (Dose)	n.u.	n.u.	-	n.u.
13	Wiener (Dose)	n.u.	n.u.	-	n.u.
14	Stramme Jungs (Dose)	n.u.	n.u.	-	n.u.
15	Saftwürstl (Dose)	n.u.	n.u.	-	n.u.
16	Wiener (Dose)	n.u.	n.u.	-	n.u.

Anhang 9 Gesamtcholesterolgehalt sowie NSE- und GFAP-Ergebnisse für Kochwurst, Art Leberwurst, Probenkollektiv A

Proben-Nr.	Probenbezeichnung	Gesamtcholesterol [mg/100g FS]	NSE		GFAP
			T-Harn	M/D	M/D
1	feine Leberwurst	145,76	-	n.u.	n.u.
2	feine Leberwurst	155,71	-	(+)	+
3	feine Leberwurst	128,69	-	n.u.	n.u.
4	feine Leberwurst	127,27	-	n.u.	n.u.
5	feine Leberwurst	115,18	-	-	-
6	feine Leberwurst	66,83	-	n.u.	n.u.
7	feine Leberwurst	62,57	-	n.u.	n.u.
8	feine Leberwurst	86,74	-	n.u.	n.u.
9	feine Leberwurst	83,90	-	n.u.	n.u.
10	feine Leberwurst	79,63	-	n.u.	n.u.
11	feine Leberwurst	113,05	-	n.u.	n.u.
12	feine Leberwurst	94,56	-	n.u.	n.u.
13	feine Leberwurst	100,25	-	n.u.	n.u.
14	feine Leberwurst	59,01	-	n.u.	n.u.
15	feine Leberwurst	148,60	-	n.u.	n.u.
16	feine Leberwurst	110,92	-	n.u.	n.u.
17	feine Leberwurst	105,23	-	n.u.	n.u.
18	feine Leberwurst	106,65	-	n.u.	n.u.
19	feine Leberwurst	122,29	-	n.u.	n.u.
20	feine Leberwurst	97,41	-	n.u.	n.u.
21	feine Leberwurst	227,05	+	+++	++
22	feine Leberwurst	123,00	-	n.u.	n.u.
23	feine Leberwurst	107,36	-	n.u.	n.u.
24	feine Leberwurst	122,29	-	n.u.	n.u.
25	feine Leberwurst	147,89	-	n.u.	n.u.
26	feine Leberwurst	86,74	-	n.u.	n.u.
27	feine Leberwurst	86,74	-	n.u.	n.u.
28	feine Leberwurst	125,85	-	n.u.	n.u.
29	feine Leberwurst	72,52	-	n.u.	n.u.
30	feine Leberwurst	105,23	-	n.u.	n.u.
31	feine Leberwurst	124,43	-	n.u.	n.u.
32	feine Leberwurst	151,44	-	(+)	+
33	feine Leberwurst	118,74	-	n.u.	n.u.
34	feine Leberwurst	147,18	-	n.u.	n.u.

Fortsetzung von Anhang 9 Ergebnisse des Probenkollektives A

Proben-Nr.	Probenbezeichnung	Gesamtcholesterol [mg/100g FS]	NSE		GFAP
			T-Harn	M/D	M/D
35	feine Leberwurst	147,18	-	n.u.	n.u.
36	feine Leberwurst	156,19	(+)	++	++
37	feine Leberwurst	137,93	-	n.u.	n.u.
38	feine Leberwurst	137,22	-	n.u.	n.u.
39	feine Leberwurst	120,16	-	n.u.	n.u.
40	feine Leberwurst	125,85	-	n.u.	n.u.
41	feine Leberwurst	118,74	-	n.u.	n.u.
42	feine Leberwurst	148,60	-	n.u.	n.u.
43	feine Leberwurst	100,96	-	n.u.	n.u.
44	feine Leberwurst	103,10	-	n.u.	n.u.
45	feine Leberwurst	132,96	-	n.u.	n.u.
46	feine Leberwurst	152,15	+	++	++
47	feine Leberwurst	103,10	-	n.u.	n.u.
48	feine Leberwurst	110,21	-	n.u.	n.u.
49	feine Leberwurst	107,36	-	n.u.	n.u.
50	feine Leberwurst	125,85	-	n.u.	n.u.
51	feine Leberwurst	285,82	++	+++	++
52	feine Leberwurst	127,27	-	n.u.	n.u.
53	feine Leberwurst	93,14	-	n.u.	n.u.
54	feine Leberwurst	100,96	-	n.u.	n.u.
55	feine Leberwurst	119,45	-	n.u.	n.u.
56	feine Leberwurst	112,34	-	n.u.	n.u.
57	feine Leberwurst	142,20	-	n.u.	n.u.
58	feine Leberwurst	83,19	-	n.u.	n.u.
59	feine Leberwurst	120,16	-	n.u.	n.u.
60	feine Leberwurst	135,45	-	n.u.	n.u.
61	feine Leberwurst	134,38	-	n.u.	n.u.
62	feine Leberwurst	127,27	-	n.u.	n.u.
63	feine Leberwurst	149,55	-	(+)	+
64	feine Leberwurst	129,40	-	(+)	(+)
65	feine Leberwurst	140,07	-	n.u.	n.u.
66	feine Leberwurst	145,04	-	n.u.	n.u.
67	feine Leberwurst	128,69	-	n.u.	n.u.
68	feine Leberwurst	141,25	-	-	-
69	feine Leberwurst	148,78	-	-	-

Fortsetzung von Anhang 9 Ergebnisse des Probenkollektives A

Proben-Nr.	Probenbezeichnung	Gesamtcholesterol [mg/100g FS]	NSE		GFAP
			T-Harn	M/D	M/D
70	feine Leberwurst	139,36	-	n.u.	n.u.
71	feine Leberwurst	156,42	-	+	+
72	feine Leberwurst	138,65	-	n.u.	n.u.
73	feine Leberwurst	113,76	-	n.u.	n.u.
74	feine Leberwurst	118,03	-	n.u.	n.u.
75	feine Leberwurst	113,76	-	n.u.	n.u.
76	feine Leberwurst	110,21	-	n.u.	n.u.
77	feine Leberwurst	109,49	-	n.u.	n.u.
78	feine Leberwurst	104,52	-	n.u.	n.u.
79	feine Leberwurst	93,14	-	n.u.	n.u.
80	feine Leberwurst	118,74	-	n.u.	n.u.
81	feine Leberwurst	89,59	-	n.u.	n.u.
82	feine Leberwurst	100,25	-	n.u.	n.u.
83	feine Leberwurst	118,74	-	n.u.	n.u.
84	feine Leberwurst	91,72	-	n.u.	n.u.
85	feine Leberwurst	119,45	-	n.u.	n.u.
86	feine Leberwurst	102,38	-	n.u.	n.u.
87	feine Leberwurst	114,47	-	n.u.	n.u.
88	feine Leberwurst	141,73	-	+	+
89	feine Leberwurst	146,47	-	n.u.	n.u.
90	feine Leberwurst	147,18	-	n.u.	n.u.
91	feine Leberwurst	153,58	-	-	-
92	feine Leberwurst	160,21	+	+++	++
93	feine Leberwurst	122,29	-	n.u.	n.u.
94	feine Leberwurst	117,32	-	n.u.	n.u.
95	feine Leberwurst	97,41	-	n.u.	n.u.
96	feine Leberwurst	145,76	-	n.u.	n.u.
97	feine Leberwurst	136,51	-	n.u.	n.u.
98	feine Leberwurst	125,85	-	n.u.	n.u.
99	feine Leberwurst	143,62	-	n.u.	n.u.
100	feine Leberwurst	120,16	-	n.u.	n.u.
101	feine Leberwurst	130,11	-	n.u.	n.u.
102	feine Leberwurst	124,43	-	n.u.	n.u.
103	feine Leberwurst	135,80	-	n.u.	n.u.
104	feine Leberwurst	136,51	-	n.u.	n.u.

Fortsetzung von Anhang 9 Ergebnisse des Probenkollektives A

Proben-Nr.	Probenbezeichnung	Gesamtcholesterol [mg/100g FS]	NSE		GFAP
			T-Harn	M/D	M/D
105	feine Leberwurst	115,89	-	n.u.	n.u.
106	feine Leberwurst	119,45	-	n.u.	n.u.
107	feine Leberwurst	88,88	-	n.u.	n.u.
108	feine Leberwurst	113,76	-	n.u.	n.u.
109	feine Leberwurst	98,83	-	n.u.	n.u.
110	feine Leberwurst	113,76	-	n.u.	n.u.
111	feine Leberwurst	98,12	-	n.u.	n.u.
112	feine Leberwurst	100,25	-	n.u.	n.u.
113	feine Leberwurst	105,94	-	n.u.	n.u.
114	feine Leberwurst	60,44	-	n.u.	n.u.
115	feine Leberwurst	117,32	-	n.u.	n.u.
116	feine Leberwurst	99,54	-	n.u.	n.u.
117	feine Leberwurst	119,45	-	n.u.	n.u.
118	feine Leberwurst	109,49	-	n.u.	n.u.
119	feine Leberwurst	140,07	-	(+)	(+)
120	feine Leberwurst	111,63	-	n.u.	n.u.
121	feine Leberwurst	130,82	-	n.u.	n.u.
122	feine Leberwurst	125,85	-	n.u.	n.u.
123	feine Leberwurst	131,56	-	n.u.	n.u.
124	feine Leberwurst	134,38	-	-	n.u.
125	feine Leberwurst	122,29	-	n.u.	n.u.
126	feine Leberwurst	117,32	-	n.u.	n.u.

Anhang 10 Gesamtcholesterolgehalt sowie NSE- und GFAP-Ergebnisse für Kochwurst, Art Leberwurst, Probenkollektiv B

Proben-Nr.	Probenbezeichnung	Gesamtcholesterol [mg/100g FS]	NSE		GFAP
			T-Harn	M/D	M/D
10/00	Leberwurst, grob	n.u.	n.u.	(+)	(+)
100/98	Kalbsleberwurst im Golddarm	125,14	-	n.u.	n.u.
105/98	Streichleberwurst	153,58	-	n.u.	n.u.
106/98	Leberwurst	100,96	-	n.u.	n.u.
107/98	Leberwurst	113,05	-	n.u.	n.u.
108/98	Leberwurst, fein	303,95	n.u.	+++	+

Fortsetzung von Anhang 10 Ergebnisse des Probenkollektives B

Proben-Nr.	Probenbezeichnung	Gesamtcholesterol [mg/100g FS]	NSE		GFAP
			T-Harn	M/D	M/D
11/00	Leberwurst, grob	n.u.	n.u.	(+)	(+)
114/98	Streichleberwurst	121,58	-	n.u.	n.u.
115/98	Streichleberwurst	161,40	-	n.u.	n.u.
116/98	Streichleberwurst, fein	175,62	-	n.u.	n.u.
117/98	Streichleberwurst	144,33	-	n.u.	n.u.
118/98	Gutskalsleberwurst	163,53	-	n.u.	n.u.
12/00	Leberwurst, grob	n.u.	n.u.	-	n.u.
120/98	Streichleberwurst, fein	169,22	-	n.u.	n.u.
121/98	Kalbsleberwurst m. Sahne	150,73	-	n.u.	n.u.
122/98	Leberwurst, fein	167,09	-	n.u.	n.u.
124/98	Leberwurst, fein	148,60	-	n.u.	n.u.
13/00	Leberwurst, grob	113,05	n.u.	-	n.u.
131/98	Streichleberwurst	176,33	-	n.u.	n.u.
133/98	Kalbsleberwurst "Spitzenqualität"	337,37	-	n.u.	n.u.
135/98	Delikateß Leberwurst	137,22	-	n.u.	n.u.
138/99	Leberwurst, fein	131,54	n.u.	-	n.u.
14/00	Leberwurst, grob	115,18	n.u.	-	n.u.
141/99	Leberwurst, fein	119,81	n.u.	-	n.u.
142/98	"Pfälzer Leberwurst"	137,22	-	n.u.	n.u.
143/98	Kalbsleberwurst im Golddarm	138,65	-	n.u.	n.u.
144/98	Kalbsleberwurst im Golddarm	159,98	-	n.u.	n.u.
145/98	Leberwurst, fein	115,89	-	n.u.	n.u.
145/99	Leberwurst, fein	123,71	n.u.	-	n.u.
146/98	Kalbsleberwurst	155,00	-	n.u.	n.u.
15/00	Leberwurst, grob	n.u.	n.u.	-	n.u.
152/98	Streichleberwurst, geräuchert	181,51	-	-	n.u.
156/99	Kalbsleberwurst, fein	108,78	n.u.	-	n.u.
157/98	Leberwurst, fein	156,14	-	n.u.	n.u.
157/99	Kalbsleberwurst, fein	112,34	n.u.	-	n.u.

Fortsetzung von Anhang 10 Ergebnisse des Probenkollektives B

Proben-Nr.	Probenbezeichnung	Gesamtcholesterol [mg/100g FS]	NSE		GFAP
			T-Harn	M/D	M/D
158/98	Streichleberwurst	145,57	-	(+)	(+)
158/99	Kalbsleberwurst, fein	123,36	n.u.	+	n.u.
16/00	Leberwurst, grob	n.u.	n.u.	-	n.u.
163/98	Leberwurst, fein	159,47	-	n.u.	n.u.
163/99	Kalbsleberwurst, fein	121,58	n.u.	-	n.u.
164/99	Kalbsleberwurst, fein	115,89	n.u.	-	n.u.
165/98	Kalbsleberwurst, fein	186,31	-	(+)	(+)
166/99	Kalbsleberwurst, fein	120,16	n.u.	-	n.u.
168/99	Kalbsleberwurst, fein	113,76	n.u.	-	n.u.
169/99	Kalbsleberwurst, fein	114,47	n.u.	-	n.u.
17/00	Leberwurst, grob	n.u.	n.u.	(+)	(+)
18/00	Leberwurst, grob	n.u.	n.u.	-	n.u.
189/99	Kalbsleberwurst, fein	133,67	n.u.	n.u.	n.u.
19/00	Leberwurst, grob	n.u.	n.u.	-	n.u.
190/99	Kalbsleberwurst, fein	114,47	n.u.	n.u.	n.u.
20/00	Leberwurst, grob	n.u.	n.u.	-	n.u.
21/00	Leberwurst, grob	n.u.	n.u.	-	n.u.
22/00	Leberwurst, grob	n.u.	n.u.	-	n.u.
23/00	Leberwurst, grob	n.u.	n.u.	-	n.u.
24/00	Leberwurst, grob	n.u.	n.u.	-	n.u.
255/98	Leberwurst, fein	157,49	n.u.	-	n.u.
268/98	Hausm. Leberwurst	116,79	-	n.u.	n.u.
41/00	Kalbsleberwurst, fein	n.u.	n.u.	-	-
46/00	Kalbsleberwurst, fein	n.u.	n.u.	-	n.u.
6/00	Leberwurst, grob	n.u.	n.u.	-	n.u.
7/00	Leberwurst, grob	n.u.	n.u.	-	n.u.
8/00	Leberwurst, grob	n.u.	n.u.	-	n.u.
9/00	Leberwurst, grob	103,10	n.u.	-	n.u.
90/98	Pfälzer Leberwurst	148,60	-	n.u.	n.u.
92/98	Apfel-Zwiebel-Leberwurst	141,29	-	n.u.	n.u.
97/98	Leberwurst	155,47	-	n.u.	n.u.
98/00	Delikateß Leberwurst, fein	160,00	n.u.	-	n.u.
98/98	Kalbsleberwurst	150,02	-	n.u.	n.u.

Fortsetzung von Anhang 10 Ergebnisse des Probenkollektives B

Proben-Nr.	Probenbezeichnung	Gesamtcholesterol [mg/100g FS]	NSE		GFAP
			T-Harn	M/D	M/D
99/98	Kalbsleberwurst im Golddarm	136,51	-	n.u.	n.u.
BCB-002	Kalbsleberwurst	136,51	-	n.u.	n.u.
BCB-003	Kalbsleberwurst	340,57	-	(+)	(+)
BCB-005	Kalbsleberwurst	202,64	+	n.u.	(+)
BCB-006	Landleberwurst	131,54	-	n.u.	n.u.
BCB-007	Leberwurst, Pfälzer Art	129,40	-	n.u.	n.u.
BCB-009	Leberwurst	115,18	-	n.u.	
BCB-012	Delikateß Leberwurst, fein	256,28	+++	n.u.	++
BCB-013	Pfälzer Leberwurst	155,00	-	n.u.	n.u.
BCB-016	Leberwurst	301,11	-	+	(+)
BCB-020	Leberwurst	150,73	n.u.	n.u.	n.u.
BCB-021	Leberwurst, unger.	145,04	n.u.	n.u.	n.u.
BCB-024	Leberwurst	124,43	n.u.	n.u.	n.u.
BCB-027	Leberwurst	161,40	n.u.	n.u.	n.u.
BCB-029	Leberwurst	163,66	-	-	n.u.
BCB-030a	Delikateß Leberwurst, fein	285,01	+++	+++	++
BCB-030b	Delikateß Leberwurst, fein	242,80	+++	+++	++
L-001	Leberwurst	155,00	n.u.	n.u.	n.u.
L-002	Leberwurst	156,00	n.u.	n.u.	n.u.
L-003	Leberwurst	107,00	n.u.	n.u.	n.u.
L-004	Leberwurst	169,00	n.u.	n.u.	n.u.
L-005	Leberwurst	141,00	n.u.	n.u.	n.u.
L-006	Leberwurst	92,00	n.u.	n.u.	n.u.
L-007	Leberwurst	137,00	n.u.	n.u.	n.u.
L-008	Leberwurst	135,00	n.u.	n.u.	n.u.
L-009	Leberwurst	160,00	n.u.	n.u.	n.u.
L-010	Leberwurst	210,00	n.u.	n.u.	n.u.
L-011	Leberwurst	203,00	n.u.	n.u.	n.u.
L-016	Leberwurst	146,00	n.u.	n.u.	n.u.
L-017	Leberwurst	135,00	n.u.	n.u.	n.u.
L-018	Leberwurst	145,00	n.u.	n.u.	n.u.

Fortsetzung von Anhang 10 Ergebnisse des Probenkollektives B

Proben-Nr.	Probenbezeichnung	Gesamtcholesterol [mg/100g FS]	NSE		GFAP
			T-Harn	M/D	M/D
L-019	Leberwurst	137,00	n.u.	n.u.	n.u.
L-020	Leberwurst	165,00	n.u.	n.u.	n.u.
L-021	Leberwurst	148,00	n.u.	n.u.	n.u.
L-022	Leberwurst	166,00	n.u.	n.u.	n.u.
L-023	Leberwurst	151,00	n.u.	n.u.	n.u.
L-024	Leberwurst	131,00	n.u.	n.u.	n.u.
L-025	Leberwurst	146,00	n.u.	n.u.	n.u.
L-026	Leberwurst	177,00	n.u.	n.u.	n.u.
L-027	Leberwurst	122,00	n.u.	n.u.	
L-028	Leberwurst	181,00	n.u.	n.u.	n.u.
L-029	Leberwurst	148,00	n.u.	n.u.	n.u.
L-030	Leberwurst	166,00	n.u.	n.u.	n.u.
L-031	Leberwurst	226,00	n.u.	n.u.	n.u.
L-032	Leberwurst	150,00	n.u.	n.u.	n.u.
L-033	Leberwurst	149,00	n.u.	n.u.	n.u.
L-034	Leberwurst	129,00	n.u.	n.u.	n.u.
L-035	Leberwurst	141,00	n.u.	n.u.	n.u.
L-036	Leberwurst	151,00	n.u.	n.u.	n.u.
L-037	Leberwurst	178,00	n.u.	n.u.	n.u.
L-038	Leberwurst	151,00	n.u.	n.u.	n.u.
L-039	Leberwurst	183,00	n.u.	n.u.	n.u.
L-040	Leberwurst	176,00	n.u.	n.u.	n.u.
L-041	Leberwurst	182,00	n.u.	n.u.	n.u.
L-042	Leberwurst	136,00	n.u.	n.u.	n.u.
L-043	Leberwurst	189,00	n.u.	n.u.	n.u.
L-044	Leberwurst	209,00	n.u.	n.u.	n.u.
L-045	Leberwurst	161,00	n.u.	n.u.	n.u.
L-046	Leberwurst	181,00	n.u.	n.u.	n.u.
L-047	Leberwurst	178,00	n.u.	n.u.	n.u.
L-048	Leberwurst	169,00	n.u.	n.u.	n.u.
L-049	Leberwurst	159,00	n.u.	n.u.	n.u.
L-050	Leberwurst	177,00	n.u.	n.u.	n.u.

Anhang 11 Gesamtcholesterolgehalt sowie NSE- und GFAP-Ergebnisse für Kochwurst, Art Kochmettwurst

Proben-Nr.	Probenbezeichnung	Gesamtcholesterol [mg/100g FS]	NSE		GFAP
			T-Harn	M/D	M/D
1/00	Zwiebelmettwurst	n.u.	-	(+)	(+)
102/98	gekochte Zwiebelwurst	84,25	-	n.u.	n.u.
123/98	gekochte Zwiebelmettwurst	95,99	-	n.u.	n.u.
132/98	Zwiebling	156,78	-	n.u.	n.u.
138/98	gekochte Zwiebelmettwurst	92,43	-	n.u.	n.u.
139/98	gekochte Röstzwiebelwurst	103,81	-	n.u.	n.u.
140/99	Mettwurst, gekocht	364,39	n.u.	+	+
142/99	Mettwurst, frisch	47,64	n.u.	-	n.u.
143/99	Mettwurst, Konserve	63,99	n.u.	-	n.u.
144/99	Mettwurst, Konserve	71,10	n.u.	-	n.u.
146/99	Mettwurst, Konserve	73,94	n.u.	-	n.u.
159/99	Zwiebelmettwurst	53,33	n.u.	-	n.u.
160/99	Zwiebelmettwurst	65,41	n.u.	+	+
161/99	Mettwurst gekocht	358,10	n.u.	+++	+
162/99	Mettwurst gekocht	356,57	n.u.	++	+
165/99	Mettwurst gekocht	60,44	n.u.	-	n.u.
167/99	Mettwurst gekocht	72,52	n.u.	-	n.u.
170/99	Zwiebelmettwurst	81,05	n.u.	+	+
181/99	Zwiebelmettwurst	238,90	n.u.	+	+
182/99	Zwiebelmettwurst	253,83	n.u.	+	+
183/99	Mettwurst gekocht	338,44	n.u.	++	(+)
184/99	Mettwurst gekocht	455,75	n.u.	++	(+)
187/99	Mettwurst gekocht	86,03	n.u.	-	n.u.
188/99	Mettwurst gekocht	78,92	n.u.	-	n.u.
219/98	Mettwurst im Glas	300,00	-	+	+
220/98	Mettwurst im Glas	336,50	(+)	+	(+)
241/98	Mettwurst im Glas	296,50	+	+	(+)
242/98	Mettwurst im Glas	329,00	+	n.u.	(+)
256/98	Mettwurst, gekocht	237,09	-	-	n.u.
43/00	gek. Mettwurst	n.u.	n.u.	-	n.u.
45/00	gek. Mettwurst	n.u.	n.u.	-	n.u.

Fortsetzung von Anhang 11 Ergebnisse für Kochmettwurst

Proben-Nr.	Probenbezeichnung	Gesamtcholesterol [mg/100g FS]	NSE		GFAP
			T-Harn	M/D	M/D
5/00	Rügenwalder Mettwurst	n.u.	n.u.	-	n.u.
66/98	Saumagen Pfälzer Art	67,90	n.u.	n.u.	n.u.
BCB-015	Mettwurst, gekocht	380,86	+	+	(+)
BCB-017	Zwiebelwurst, gekocht	257,14	-	(+)	(+)
BCB-018	Mettwurst, gekocht	104,52	-	n.u.	n.u.
BCB-022	Mettwurst, ger.	96,70	-	n.u.	n.u.
BCB-023	Mettwurst, gekocht	113,05	-	n.u.	n.u.
BCB-025	Mettwurst, gekocht	129,40	-	n.u.	n.u.
BCB-028	Mettwurst, gekocht	105,23	-	n.u.	n.u.
BCB-031	Mettwurst, gekocht	389,63	-	+	+
M-001	gek. Mettwurst	129,00	n.u.	n.u.	n.u.
M-002	gek. Mettwurst	114,00	n.u.	n.u.	n.u.
M-003	gek. Mettwurst	139,00	n.u.	n.u.	n.u.
M-004	gek. Mettwurst	130,00	n.u.	n.u.	n.u.
M-005	gek. Mettwurst	149,00	n.u.	-	n.u.
M-006	gek. Mettwurst	132,00	n.u.	n.u.	n.u.
M-007	gek. Mettwurst	104,00	n.u.	n.u.	n.u.
M-008	gek. Mettwurst	141,00	n.u.	n.u.	n.u.
M-009	gek. Mettwurst	124,00	n.u.	n.u.	n.u.
M-010	gek. Mettwurst	82,00	n.u.	n.u.	n.u.
M-011	gek. Mettwurst	123,00	n.u.	n.u.	n.u.
M-012	gek. Mettwurst	112,00	n.u.	n.u.	n.u.
M-013	gek. Mettwurst	122,80	n.u.	-	n.u.
M-014	gek. Mettwurst	122,00	n.u.	n.u.	n.u.
M-015	gek. Mettwurst	129,00	n.u.	n.u.	n.u.
M-016	gek. Mettwurst	117,00	n.u.	n.u.	n.u.
M-017	gek. Mettwurst	132,00	n.u.	n.u.	n.u.
M-018	gek. Mettwurst	120,00	n.u.	n.u.	n.u.
M-021	gek. Mettwurst	127,00	n.u.	n.u.	n.u.
M-022	gek. Mettwurst	109,00	n.u.	n.u.	n.u.
M-024	gek. Mettwurst	107,00	n.u.	n.u.	n.u.
M-025	gek. Mettwurst	115,00	n.u.	n.u.	n.u.
M-026	gek. Mettwurst	126,00	n.u.	n.u.	n.u.
M-027	gek. Mettwurst	94,00	n.u.	n.u.	n.u.

Fortsetzung von Anhang 11 Ergebnisse für Kochmettwurst

Proben-Nr.	Probenbezeichnung	Gesamtcholesterol [mg/100g FS]	NSE		GFAP
			T-Harn	M/D	M/D
M-028	gek. Mettwurst	106,00	n.u.	n.u.	n.u.
M-029	gek. Mettwurst	133,00	n.u.	n.u.	n.u.
M-030	gek. Mettwurst	107,00	n.u.	n.u.	n.u.
M-031	gek. Mettwurst	109,00	n.u.	n.u.	n.u.
M-032	gek. Mettwurst	132,00	n.u.	n.u.	n.u.
M-033	gek. Mettwurst	132,00	n.u.	n.u.	n.u.
M-034	gek. Mettwurst	91,00	n.u.	n.u.	n.u.
M-035	gek. Mettwurst	106,00	n.u.	n.u.	n.u.
M-036	gek. Mettwurst	95,00	n.u.	n.u.	n.u.
M-037	gek. Mettwurst	109,00	n.u.	n.u.	n.u.
M-038	gek. Mettwurst	96,00	n.u.	n.u.	n.u.
M-040	gek. Mettwurst	119,00	n.u.	n.u.	n.u.
M-042	gek. Mettwurst	98,00	n.u.	n.u.	n.u.
M-043	gek. Mettwurst	103,00	n.u.	n.u.	n.u.
M-044	gek. Mettwurst	86,00	n.u.	n.u.	n.u.
M-045	gek. Mettwurst	119,00	n.u.	n.u.	n.u.

Anhang 12 Gesamtcholesterolgehalt sowie NSE- und GFAP-Ergebnisse für Kochwurst, Art Blutwurst

Proben-Nr.	Probenbezeichnung	Gesamtcholesterol [mg/100g FS]	NSE		GFAP
			T-Harn	M/D	M/D
10/98	Blutwurst m. Einlage	91,72	n.u.	n.u.	n.u.
11/98	Blutmagen m. Einlage	87,45	n.u.	n.u.	n.u.
12/98	Zungenblutwurst	114,47	n.u.	n.u.	n.u.
13/98	Zungenblutwurst	93,14	n.u.	n.u.	n.u.
14/98	Zungenblutwurst	115,89	-	n.u.	n.u.
15/98	Zungenblutwurst	98,83	n.u.	n.u.	n.u.
16/98	Zungenblutwurst	70,39	n.u.	n.u.	n.u.
17/98	Blutwurst m. Einlage	64,70	n.u.	n.u.	n.u.
18/98	Blutwurst m. Zunge	85,32	n.u.	n.u.	n.u.
19/98	Zungenblutwurst, Pa- stete	70,39	n.u.	n.u.	n.u.
20/98	Thüringer Rotwurst	131,54	-	n.u.	n.u.
21/98	Zungenwurst	78,57	n.u.	n.u.	n.u.

Fortsetzung von Anhang 12 Ergebnisse für Blutwurst

Proben-Nr.	Probenbezeichnung	Gesamtcholesterol [mg/100g FS]	NSE		GFAP
			T-Harn	M/D	M/D
22/98	Zungenblutwurst	60,08	n.u.	n.u.	n.u.
23/98	Zungenblutwurst	44,79	n.u.	n.u.	n.u.
24/98	Zungenblutwurst	56,52	n.u.	n.u.	n.u.
25/98	Zungenblutwurst	103,10	n.u.	n.u.	n.u.
26/98	Rotwurst	69,68	n.u.	n.u.	n.u.
27/98	Zungenblutwurst	66,12	n.u.	n.u.	n.u.
28/98	Blutwurst	91,72	n.u.	n.u.	n.u.
29/98	Blutwurst	83,19	n.u.	n.u.	n.u.
3/98	Blutwurst m. Einlage	56,52	n.u.	n.u.	n.u.
30/98	Hausm. Blutwurst	32,35	n.u.	n.u.	n.u.
31/98	Zungenblutwurst	68,26	n.u.	n.u.	n.u.
4/98	Zungenblutwurst	109,49	n.u.	n.u.	n.u.
41/97	Blutwurst	44,79	n.u.	n.u.	n.u.
42/97	Blutwurst	124,43	-	n.u.	n.u.
43/97	Blutwurst	56,88	n.u.	n.u.	n.u.
44/97	Blutwurst	84,61	n.u.	n.u.	n.u.
45/97	Blutwurst	104,52	n.u.	n.u.	n.u.
46/97	Blutwurst	63,28	n.u.	n.u.	n.u.
47/97	Blutwurst	71,81	n.u.	n.u.	n.u.
48/97	Blutwurst	87,45	n.u.	n.u.	n.u.
49/97	Blutwurst	42,30	n.u.	n.u.	n.u.
5/98	Blutwurst m. Einlage	72,52	n.u.	n.u.	n.u.
50/97	Blutwurst	97,41	n.u.	n.u.	n.u.
51/97	Blutwurst	88,88	n.u.	n.u.	n.u.
51/98	Thüringer Rotwurst	71,46	n.u.	n.u.	n.u.
52/97	Blutwurst	86,74	n.u.	n.u.	n.u.
53/97	Blutwurst	63,99	n.u.	n.u.	n.u.
54/97	Blutwurst	100,96	n.u.	n.u.	n.u.
55/97	Blutwurst	132,25	-	n.u.	n.u.
6/98	Zungenblutwurst	61,15	n.u.	n.u.	n.u.
7/98	Zungenblutwurst	72,52	n.u.	n.u.	n.u.
8/98	Zungenblutwurst	116,60	-	n.u.	n.u.
9/98	Thüringer Blutwurst	78,21	n.u.	n.u.	n.u.
BCB-008	Blutwurst	71,81	n.u.	n.u.	n.u.

Anhang 13 Gesamtcholesterolgehalt sowie NSE- und GFAP-Ergebnisse für Kochwurst, Art Sülzen und Preßwurst

Proben-Nr.	Probenbezeichnung	Gesamtcholesterol [mg/100g FS]	NSE		GFAP
			T-Harn	M/D	M/D
32/98	Preßkopf	108,78	n.u.	n.u.	n.u.
33/98	Preßkopf	95,99	n.u.	n.u.	n.u.
34/98	Preßkopf im Magen	35,55	n.u.	n.u.	n.u.
35/98	Kümmelfleischmagen	63,99	n.u.	n.u.	n.u.
36/98	Schwartenmagen mit Kümmel	91,72	n.u.	n.u.	n.u.
37/98	Bauernsülze	77,50	n.u.	n.u.	n.u.
38/98	Schwartenmagen	118,74	n.u.	n.u.	n.u.
39/98	Schwartenmagen	93,14	n.u.	n.u.	n.u.
40/98	Preßkopf	121,58	-	n.u.	n.u.
41/98	Preßkopf	121,58	-	n.u.	n.u.
43/98	Preßkopf	118,06	-	n.u.	n.u.
44/98	Preßkopf	121,58	-	n.u.	n.u.
45/98	Preßkopf	81,05	n.u.	n.u.	n.u.
46/98	Preßkopf	82,48	n.u.	n.u.	n.u.
47/98	Fleischmagen, weiß	10,00	n.u.	n.u.	n.u.
48/98	Hausmacher Preßwurst	70,39	n.u.	n.u.	n.u.
49/98	Preßkopf	82,12	n.u.	n.u.	n.u.
50/98	Preßkopf	70,39	n.u.	n.u.	n.u.
52/98	grober hausmacher Preßkopf	145,76	-	n.u.	n.u.
53/98	grober Preßkopf	137,22	-	n.u.	n.u.
54/98	Schinkenpreßkopf	109,49	n.u.	n.u.	n.u.
55/98	Preßkopf	66,48	n.u.	n.u.	n.u.
56/98	Preßkopf	79,63	n.u.	n.u.	n.u.
57/98	Schwartenmagen	91,01	n.u.	n.u.	n.u.
58/98	Fuldaer Preßkopf	86,03	n.u.	n.u.	n.u.
59/98	Schwartenmagen	120,87	n.u.	n.u.	n.u.
60/98	Schwartenmagen	77,50	n.u.	n.u.	n.u.
61/98	Sülzpreßwurst	14,22	n.u.	n.u.	n.u.
62/98	Schwartenmagen	75,37	n.u.	n.u.	n.u.
63/98	Preßkopf, weiß	135,09	-	n.u.	n.u.
64/98	Preßkopf	108,78	n.u.	n.u.	n.u.

Fortsetzung von Anhang 13 Ergebnisse für Sülzen und Preßwurst

Proben-Nr.	Probenbezeichnung	Gesamtcholesterol [mg/100g FS]	NSE		GFAP
			T-Harn	M/D	M/D
65/98	Preßkopf	124,43	-	n.u.	n.u.
67/98	Fuldaer Preßkopf	88,88	n.u.	n.u.	n.u.
68/98	Preßkopf	115,18	-	n.u.	n.u.
69/98	Preßkopf	86,74	n.u.	n.u.	n.u.
70/98	Kümmelmagen	62,57	n.u.	n.u.	n.u.
71/98	Preßkopf	68,26	n.u.	n.u.	n.u.
72/98	Fuldaer Schwarten- magen	77,50	n.u.	n.u.	n.u.
73/98	Schwartenmagen	76,79	n.u.	n.u.	n.u.
74/98	Preßkopf	123,71	-	n.u.	n.u.
75/98	Hausmacher Preß- kopf	111,19	-	n.u.	n.u.
76/98	Kümmelmagen	41,24	n.u.	n.u.	n.u.
77/98	Preßsack	78,92	n.u.	n.u.	n.u.
BCB-019	Preßkopf	113,76	-	n.u.	n.u.

Anhang 14 Gesamtcholesterolgehalt sowie NSE- und GFAP-Ergebnisse für Erzeugnisse aus zerkleinertem Fleisch und andere Lebensmittel

Proben-Nr.	Probenbezeichnung	Gesamtcholesterol [mg/100g FS]	NSE		GFAP
			T-Harn	M/D	M/D
201/99	Königsberger Klopse	34,13	n.u.	-	n.u.
202/99	Königsberger Klopse	34,84	n.u.	-	n.u.
203/99	Königsberger Klopse	68,26	n.u.	-	n.u.
204/99	Königsberger Klopse	55,46	n.u.	-	n.u.
205/99	Königsberger Klopse	75,37	n.u.	-	n.u.
206/99	Ragout fin	39,11	n.u.	-	n.u.
207/99	Königsberger Klopse	95,27	n.u.	-	n.u.
208/99	Königsberger Klopse	38,39	n.u.	-	n.u.
209/99	Markklößchen	90,30	n.u.	-	n.u.
210/99	Markklößchen	108,78	n.u.	-	n.u.
211/99	Markklößchen	98,12	n.u.	-	n.u.
212/99	Markklößchen	83,90	n.u.	-	n.u.
213/99	Markklößchen	85,32	n.u.	-	n.u.

Fortsetzung von Anhang 14 Ergebnisse für sonstige Erzeugnisse

Proben-Nr.	Probenbezeichnung	Gesamtcholesterol [mg/100g FS]	NSE		GFAP
			T-Harn	M/D	M/D
214/99	Markklößchen	112,34	n.u.	-	n.u.
217/99	Markklößchen	93,14	n.u.	-	n.u.
218/99	Königsberger Klopse	22,04	n.u.	-	n.u.
219/99	Markklößchen	39,82	n.u.	-	n.u.
220/99	Markklößchen	115,89	n.u.	-	n.u.
221/99	Markklößchen	14,93	n.u.	-	n.u.
222/99	Königsberger Klopse	n.u.	n.u.	-	n.u.
223/99	Königsberger Klopse	n.u.	n.u.	-	n.u.
224/99	Markklößchen	n.u.	n.u.	-	n.u.
225/99	Markklößchen	n.u.	n.u.	-	n.u.
BCL-001	Hamburger, TG	88,88	n.u.	n.u.	n.u.
BCL-002	Frikadelle	114,47	-	n.u.	n.u.
BCL-005	Hamburger	96,70	-	n.u.	n.u.
BCL-006	Fisch-Nuggets	51,90	n.u.	n.u.	n.u.
BCL-007	Seemanns-Schmaus	78,21	n.u.	n.u.	n.u.
BCL-008	Gold. Backfisch	90,30	n.u.	n.u.	n.u.
BCL-009	Geflügelsticks	75,37	n.u.	n.u.	n.u.
BCL-010	Markklößchen	179,88	-	-	n.u.
BCL-011	Cevapcici	105,94	-	n.u.	n.u.
BCL-012	Steaklet	70,39	n.u.	n.u.	n.u.
BCL-013	Geflügelnuggets	61,86	n.u.	n.u.	n.u.
BCL-014	Lemon & Pepper Schnitzel	84,61	n.u.	n.u.	n.u.
BCL-015	Knusper Dinosaurus	83,19	n.u.	n.u.	n.u.
BCL-017	Frikadelle, erhitzt	82,48	n.u.	n.u.	n.u.
BCL-022	Thür. Mett, Hackepeter	95,99	-	n.u.	n.u.
BCL-026	Frikadelle	115,18	-	n.u.	n.u.
BCL-027	Bayr. Frikadelle	94,56	-	n.u.	n.u.
BCL-030	Hamburger	132,96	-	n.u.	n.u.
BCL-032	Frikadelle	77,50	n.u.	n.u.	n.u.
BCL-034	Frikadelle	74,66	n.u.	n.u.	n.u.
BCL-036	Frikadelle	82,48	n.u.	n.u.	n.u.
BCL-037	Frikadelle	127,27	-	n.u.	n.u.
BCL-038	Frikadelle m. Lauch	135,09	-	n.u.	n.u.

Anhang 15 Cholesterolgehalte (*Souci et al., 1994; RUNQUIST et al., 1995) sowie NSE- und GFAP-Ergebnisse von Rinderorganen

Probe	Cholesterol [mg/100g FS]			ZNS-Nachweis	
	Anzahl [n]	Wert aus Literatur*	Mittelwert, gemessen	NSE	GFAP
Rinderhirn	10	2223 ± 271	1333,53	+++	+++
dorsale Wurzelganglien	1		1747,64	+	+
Rückenmark (RM)	3	2420 ± 310	1524,38	+++	+++
RM-Hüllen	1		83,90	+	(+)
Netzhaut (Retina)	1		142,20	++	+
Sehnerv (<i>Nervus opticus</i>)	1		139,36	++	++
Milz	3		369,19	(+)	-
Mandeln (Tonsillen)	1		214,01	(+)	-
Lymphknoten	4		210,05	(+)	-
Magen-Darm-Trakt	1		209,27	-	
periphere Nerven (<i>N. ischiadicus</i>)	1		433,33	+	(+)
Knochenmark	2		134,38	-	
Leber	2	365 ± 82	189,84	(+)	-
Lunge (Lob.cran.dex)	1	239 ± 72	329,90	(+)	-
Bauchspeicheldrüse (Pankreas)	3		150,36	-	
Muskulatur	2	69 ± 7	57,40	-	-
Niere	1	376 ± 12	365,50	+	(+)
Nebenniere	1		359,80	+	+
Fett (Brust)	7	72 ± 4	93,41	-	-
Gallenblase-Schleimhaut	1		100,96	-	
Zwerchfell	2		49,05	-	-

14.4.3 Reduktion der immunchemischen NSE-Aktivität durch Erhitzen

Anhang 16 Brühwurst 10 % nach Erhitzung bei 80 °C und Tris-Harnstoff-Extraktion

min	Anzahl [n]	Densitometrie		
		Mittelwert	sd	Relative NSE-Intensität
0	16	250,17	1,01	1,00
2	6	247,68	4,29	0,99
4	6	246,15	7,47	0,98
6	10	242,98	6,36	0,97
8	10	239,40	9,59	0,96
10	6	244,55	7,79	0,98
14	6	246,85	5,31	0,99
18	10	235,54	16,64	0,94
20	4	141,88	5,99	0,57
22	10	229,62	5,97	0,92
30	10	193,44	22,49	0,77
60	8	127,61	6,71	0,51
90	4	54,61	32,76	0,22
120	4	116,28	4,43	0,46
165	4	94,46	2,84	0,38
200	6	45,07	0,85	0,00
300	6	23,13	0,34	0,00
400	6	24,92	0,52	0,00
500	6	26,92	0,43	0,00

Anhang 17 Brühwurst 10 % nach Erhitzung bei 80 °C und M/D-Extraktion

min	Anzahl [n]	Densitometrie		
		Mittelwert	sd	Relative NSE-Intensität
0	6	249,19	0,97	1,00
200	6	236,93	4,75	0,95
300	6	195,63	9,00	0,78
400	6	199,24	3,90	0,80
500	6	120,61	3,87	0,48

Anhang 18 Brühwurst 10 % nach Erhitzung bei 100 °C und Tris-Harnstoff-Extraktion

min	Anzahl [n]	Densitometrie		
		Mittelwert	sd	Relative NSE-Intensität
0	12	250,17	0,40	1,00
1	4	246,37	2,58	0,98
5	4	247,32	1,17	0,99
10	4	221,69	6,25	0,89
20	6	196,00	4,75	0,78
30	10	141,09	43,66	0,56
60	4	60,09	0,02	0,24
90	4	29,38	1,14	0,12

Anhang 19 Brühwurst 10 % nach Erhitzung bei 100 °C und M/D-Extraktion

min	Anzahl [n]	Densitometrie		
		Mittelwert	sd	Relative NSE-Intensität
60	8	229,73	8,71	0,92
100	8	192,87	19,40	0,77
200	10	99,22	20,90	0,40
300	10	39,11	10,43	0,16
400	4	23,30	0,81	0,00

Anhang 20 Brühwurst 5 % nach Erhitzung bei 80 °C und M/D-Extraktion

min	Anzahl [n]	Densitometrie		
		Mittelwert	sd	Relative NSE-Intensität
0	6	220,41	6,71	1,00
10	6	235,76	2,98	1,07
20	6	222,80	2,18	1,01
30	6	225,94	2,90	1,03
60	6	214,15	3,53	0,97
120	6	160,53	2,74	0,73
200	6	160,60	1,53	0,73
300	6	117,71	0,56	0,53
400	6	101,14	2,41	0,46
500	6	82,16	0,72	0,37

Anhang 21 Brühwurst 5 % nach Erhitzung bei 95 °C und M/D-Extraktion

min	Anzahl [n]	Densitometrie		
		Mittelwert	sd	Relative NSE-Intensität
0	8	220,40	2,90	1,00
10	4	118,09	7,16	0,54
20	4	49,09	2,70	0,22
30	4	38,12	1,91	0,17
60	4	22,70	1,61	0,10
90	4	15,94	0,79	0,07
105	4	17,67	1,74	0,08
150	4	9,31	1,12	0,00

Anhang 22 Brühwurst 5 % nach Erhitzung bei 100 °C und M/D-Extraktion

min	Anzahl [n]	Densitometrie		
		Mittelwert	sd	Relative NSE-Intensität
0	8	220,40	2,90	1,00
10	4	14,18	0,75	0,06
20	4	6,93	0,16	0,03
30	4	3,03	0,12	0,00
60	4	4,05	0,18	0,00

Anhang 23 Brühwurst 1 % nach Erhitzung bei 100 °C und Tris-Harnstoff-Extraktion

min	Anzahl [n]	Densitometrie		
		Mittelwert	sd	Relative NSE-Intensität
0	4	120,04	1,41	0,56
10	4	29,75	1,62	0,14
50	4	11,57	0,15	0,00
100	4	12,29	0,78	0,00

Anhang 24 Brühwurst 1 % nach Erhitzung bei 100 °C und M/D-Extraktion

min	Anzahl [n]	Densitometrie		
		Mittelwert	sd	Relative NSE-Intensität
0	4	213,00	0,62	1,00
10	4	60,83	2,32	0,29
50	4	43,07	0,27	0,20
100	4	38,60	0,41	0,18
200	4	17,10	0,70	0,00
300	4	14,67	1,09	0,00

Anhang 25 Kochwurst 10 % nach Erhitzung bei 80 °C und Tris-Harnstoff-Extraktion

min	Anzahl [n]	Densitometrie		
		Mittelwert	sd	Relative NSE-Intensität
0	13	245,66	1,85	1,00
2	7	228,19	1,26	0,93
4	7	222,40	3,11	0,91
6	7	186,12	7,22	0,76
10	7	167,99	5,65	0,68
18	7	76,75	2,24	0,31
30	7	42,70	1,67	0,17
60	7	18,77	0,99	0,00
90	7	13,61	0,65	0,00
120	7	15,34	0,53	0,00

Anhang 26 Kochwurst 10 % nach Erhitzung bei 80 °C und M/D-Extraktion

min	Anzahl [n]	Densitometrie		
		Mittelwert	sd	Relative NSE-Intensität
0	6	240,86	4,35	0,98
30	6	99,57	4,41	0,41
60	6	55,51	1,61	0,23
90	6	33,14	0,30	0,00
120	6	36,42	0,15	0,00
200	6	26,40	1,08	0,00

Anhang 27 Kochwurst 10 % nach Erhitzung bei 100 °C und Tris-Harnstoff-Extraktion

min	Anzahl [n]	Densitometrie		
		Mittelwert	sd	Relative NSE-Intensität
0	29	248,62	6,80	1,00
1	6	202,50	5,17	0,81
2	6	42,88	1,56	0,17
5	12	21,81	1,59	0,09
10	12	19,95	3,07	0,08
15	6	13,10	0,42	0,00
20	4	12,43	0,34	0,00
30	12	9,72	2,46	0,00

Anhang 28 Kochwurst 10 % nach Erhitzung bei 100 °C und M/D-Extraktion

min	Anzahl [n]	Densitometrie		
		Mittelwert	sd	Relative NSE-Intensität
15	6	211,56	4,04	0,85
20	6	191,60	7,88	0,77
30	11	109,67	4,03	0,44
60	6	89,05	3,29	0,36
100	6	59,86	1,70	0,24
200	6	25,12	0,44	0,00
300	6	14,34	0,19	0,00

Anhang 29 Kochwurst 10 % nach Erhitzung bei 100 °C und M/D-Extraktion sowie Ultrafiltration mit Microcon 10 kDa

min	Anzahl [n]	Densitometrie		
		Mittelwert	sd	Relative NSE-Intensität
60	6	134,32	0,70	0,54
100	12	126,93	60,85	0,51
300	6	7,66	0,32	0,00
500	6	7,64	0,46	0,00

14.4.4 Maximierung der immunchemischen Aktivität

Anhang 30 Brühwurst 5 % nach Erhitzung bei 80 °C und Tris-Harnstoff-Extraktion mit definierten Mercaptoethanol-Zusätzen

Mercaptozusätze [%]	Anzahl [n]	Densitometrie		
		Mittelwert	sd	Relative NSE-Intensität
1	6	203,89	0,73	0,85
2	6	199,93	1,37	0,84
3	6	201,90	0,54	0,85
4	6	197,85	0,87	0,83
5	6	199,67	0,99	0,84
6	6	199,41	0,77	0,84
7	6	196,48	0,80	0,82
8	6	199,60	0,97	0,84
9	6	200,33	0,94	0,84
10	6	198,00	0,61	0,83
12	6	195,60	3,40	0,82

Anhang 31 Brühwurst 5 % nach Erhitzung bei 100 °C und Tris-Harnstoff-Extraktion mit definierten Mercaptoethanol-Zusätzen

Mercaptozusätze [%]	Anzahl [n]	Densitometrie		
		Mittelwert	sd	Relative NSE-Intensität
1	5	92,80	6,41	0,39
2	5	111,91	5,22	0,47
5	5	229,56	11,98	0,96
7	5	113,94	10,52	0,48
10	5	101,49	2,54	0,43
12	5	103,90	8,25	0,44

Anhang 32 Brühwurst 5 % nach Tris-Harnstoff-Extraktion $\pm$ Mercaptoethanol-DTT-Zusatz bei definierter Temperatur

Mercaptozusätze [%]	Anzahl [n]	Densitometrie		
		Mittelwert	sd	Relative NSE- Intensität
M/D				
nativ	5	240,93	5,57	1,01
80 °C	5	241,83	11,11	1,01
100 °C	5	230,21	8,78	0,96
TH				
nativ	5	238,60	10,86	1,00
80 °C	5	169,61	21,54	0,71
100 °C	5	28,71	16,28	0,12

Eigene Veröffentlichungen zum Thema ZNS-Nachweis in Fleischerzeugnissen

- Lücker E., Horlacher S., Eigenbrodt E., Bülte M. (1999) Neue Ergebnisse zum Nachweis von zentralem Nervengewebe in Fleischerzeugnissen. 40. DVG-Arbeitstagung des Arbeitsgebietes Lebensmittelhygiene, Garmisch-Partenkirchen, 29. Sept. 1999.
- Lücker E., Horlacher S., Eigenbrodt E., Bülte M. (2000) Verfahren zum Nachweis von im Hinblick auf die bovine spongiforme Enzephalopathie (BSE) unerwünschten Zutaten in Fleischerzeugnissen. 3. Nachweis von zentralem Nervengewebe in Fleischerzeugnissen. Fleischwirtschaft 80 (5): 74-77.
- Lücker E., Horlacher S., Eigenbrodt E. (2000) NSE und GFAP als Marker für vCJD-Risiko in Fleischprodukten. 14. DVG-Tagung der Fachgruppe Physiologie und Biochemie, München, 3.-4. April 2000.
- Horlacher S., Lücker E., Bülte M. (2001) Nachweis von Risikomaterial in Fleischerzeugnissen. Lebensmittelchemie 55: 121-122.
- Bülte M., Horlacher S., Simon P. (2001) Vergleichende Untersuchungen zum Nachweis von ZNS in Fleischerzeugnissen. 54. Arbeitstagung des ALTS, Berlin, 19.-21.06.01.
- Lücker E., Horlacher S., Eigenbrodt E. (2001) Brain in human nutrition and variant Creutzfeldt-Jakob disease risk (vCJD): detection of brain in retail liver sausages using cholesterol and neuron specific enolase (NSE) as markers. British Journal of Nutrition 86 Suppl.1, 115-119.
- Horlacher S., Simon P., Bülte M. (2001) Bestimmung des ZNS-Gehaltes und der Tierart in Fleischerzeugnissen. Fleischwirtschaft 12: 107-108.
- Horlacher S., Simon P., Bülte M. (2002) Vergleich zweier ZNS-Nachweisverfahren in Lebensmitteln. Fleischwirtschaft 1: 91-93.
- Horlacher S., Simon P., Bülte M. (2002) ZNS-Nachweismethoden in Lebensmitteln. Arbeitstagung der DVG-Lebensmittelhygiene und Lebensmittelchemische Gesellschaft, Fachgruppe der Gesellschaft Dt. Chemiker, Münster, 08.-10. April 2002.

Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. E. Lücker am Institut für Lebensmittelhygiene, Professur für Fleischhygiene der Veterinärmedizinischen Fakultät der Universität Leipzig für die Überlassung des Themas sowie die jederzeit gewährte freundliche Unterstützung bei der Durchführung und Erstellung dieser Arbeit.

Herrn Prof. Dr. M. Bülte möchte ich für die Ermöglichung der Arbeit am Institut für Tierärztliche Nahrungsmittelkunde der Justus-Liebig-Universität Gießen Dank sagen.

Herrn Prof. Dr. E. Eigenbrodt sowie den Mitarbeitern seiner Arbeitsgruppe am Institut für Veterinär-Biochemie und Endokrinologie der Justus-Liebig-Universität Gießen, insbesondere Frau S. Mazurek und Herrn M. Ott, danke ich für die gewährte Unterstützung.

Ferner danke ich dem Staatlichen Medizinal-, Lebensmittel- und Veterinäruntersuchungsamt Mittelhessen, Herrn Dr. Seeger vom Staatlichen Medizinal-, Lebensmittel- und Veterinäruntersuchungsamt Frankfurt, Herrn Dr. Stegen vom Veterinäramt der Stadt Karlsruhe sowie Herrn Dr. Jemmi vom Bundesamt für Veterinärwesen Bern für die Bereitstellung von Untersuchungsmaterial. Desweiteren danke ich Frau Dr. S. Thorius-Ehrler vom Städtischen Schlachthof Gießen für die Ermöglichung der Untersuchung von Rinderorganen.

Herrn Dr. K. Failing der Arbeitsgruppe Biomathematik und Datenverarbeitung des Institutes für Veterinär-Physiologie der Justus-Liebig-Universität Gießen danke ich für die Hilfe bei der statistischen Auswertung der Ergebnisse.

Den Mitarbeitern des Institutes für Tierärztliche Nahrungsmittelkunde der Justus-Liebig-Universität Gießen danke ich für die freundliche Unterstützung. Insbesondere möchte ich Frau E. Hornung für die tatkräftige Hilfe bei der praktischen Durchführung der Arbeit sowie Herrn Fleischermeister F. Schmitt für die Herstellung des Referenzmaterials danken.

Mein spezieller Dank gilt meiner Schwester für das unermüdliche Korrekturlesen der Arbeit.