

VERGLEICHENDE UNTERSUCHUNGEN VON
ZWEI PHÄNOTYPISCHEN UND EINEM
GENOTYPISCHEN NACHWEISVERFAHREN
ZUR DETEKTION VON ZNS-RISIKOGEWEBE
IN FLEISCH UND FLEISCHERZEUGNISSEN

KATRIN-ANNETTE GÖBEL



INAUGURAL-DISSERTATION zur Erlangung des Grades eines Dr. med. vet.
beim Fachbereich Veterinärmedizin der Justus-Liebig-Universität Gießen



édition scientifique
VVB LAUFERSWEILER VERLAG

Das Werk ist in allen seinen Teilen urheberrechtlich geschützt.

Jede Verwertung ist ohne schriftliche Zustimmung des Autors oder des Verlages unzulässig. Das gilt insbesondere für Vervielfältigungen, Übersetzungen, Mikroverfilmungen und die Einspeicherung in und Verarbeitung durch elektronische Systeme.

1. Auflage 2010

All rights reserved. No part of this publication may be reproduced, stored in a retrieval system, or transmitted, in any form or by any means, electronic, mechanical, photocopying, recording, or otherwise, without the prior written permission of the Author or the Publishers.

1st Edition 2010

© 2010 by VVB LAUFERSWEILER VERLAG, Giessen
Printed in Germany



édition scientifique
VVB LAUFERSWEILER VERLAG

STAUFENBERGRING 15, D-35396 GIESSEN
Tel: 0641-5599888 Fax: 0641-5599890
email: redaktion@doktorverlag.de

www.doktorverlag.de

Aus dem Institut für Tierärztliche Nahrungsmittelkunde
der Justus-Liebig-Universität Gießen
Betreuer: Prof. Dr. M. Bülte

**Vergleichende Untersuchungen von zwei phänotypischen
und einem genotypischen Nachweisverfahren zur
Detektion von ZNS-Risikogewebe in Fleisch und
Fleischerzeugnissen**

INAUGURAL-DISSERTATION
zur Erlangung des Grades eines
Dr. med. vet.
im Fachbereich Tiermedizin der
Justus-Liebig-Universität Gießen

eingereicht von

Katrin-Annette Göbel

Tierärztin aus Lich

Gießen 2010

~

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

Dekan: Prof. Dr. Dr. habil. G. Baljer

Gutachter: Prof. Dr. M. Bülte
Prof. Dr. T. Rümenapf

Tag der Disputation: 10.02.2010

Meinen Eltern

**TEILE DIESER WISSENSCHAFTLICHEN ARBEIT WURDEN BEREITS
VERÖFFENTLICHT:**

GÖBEL, K. A., A. ABDULMAWJOOD, H. SCHÖNENBRÜCHER und M.
BÜLTE (2005):

Vergleichende Untersuchungen zum ZNS-Nachweis in Hackfleisch.

46. Arbeitstagung des Arbeitsgebietes Lebensmittelhygiene der Dtsch.
Vet. Med. Ges. (DVG), 2005, Garmisch-Partenkirchen

GÖBEL, K. A., A. ABDULMAWJOOD, H. SCHÖNENBRÜCHER, H.
EISGRUBER, H. MARX und M. BÜLTE (2006):

Detection of bovine CNS-tissue in meat products and carcasses.

TSE-Forum, 2006, Greifswald

GÖBEL, K. A., A. ABDULMAWJOOD, H. SCHÖNENBRÜCHER und M.
BÜLTE (2006):

Vergleichende Untersuchungen von drei Testsystemen zum Nachweis von
ZNS-Gewebe in verschiedenen Konserven über eine Lagerungsperiode
von bis zu 18 Monaten.

47. Arbeitstagung des Arbeitsgebietes Lebensmittelhygiene der Dtsch.
Vet. Med. Ges. (DVG), 2006, Garmisch-Partenkirchen

GÖBEL, K. A., A. ABDULMAWJOOD, H. SCHÖNENBRÜCHER, H.
EISGRUBER, H. MARX und M. BÜLTE (2006):

ZNS-Nachweis in Tupferproben von Rinderschlachtierkörpern und
-köpfen mittels Reverse Transkriptase-Real Time-PCR.

47. Arbeitstagung des Arbeitsgebietes Lebensmittelhygiene der Dtsch.
Vet. Med. Ges. (DVG), 2006, Garmisch-Partenkirchen

GÖBEL, K. A., A. ABDULMAWJOOD, H. SCHÖNENBRÜCHER und M. BÜLTE (2008):

Vergleichende Untersuchungen zum Einfluss des Untersuchungsmaterials und der Lagerdauer auf Sensitivität und Spezifität von zwei phänotypischen und einem genotypischen Verfahren zum Nachweis von ZNS-Gewebe in Fleischerzeugnissen.

49. Arbeitstagung des Arbeitsgebietes Lebensmittelhygiene der Dtsch. Vet. Med. Ges. (DVG), 2008, Garmisch-Partenkirchen

INHALTSVERZEICHNIS:

1	EINLEITUNG.....	16
2	LITERATURÜBERSICHT	18
2.1	Prionenerkrankungen.....	18
2.2	TSE-Erkrankungen bei Tieren.....	20
2.2.1	Scrapie, Traberkrankheit	20
2.2.2	Bovine spongiforme Enzephalopathie (BSE).....	21
2.2.3	Chronic Wasting Disease (CWD)	24
2.2.4	Feline spongiforme Enzephalopathie (FSE)	25
2.2.5	Transmissible Mink Encephalopathy (TME)	25
2.2.6	Weitere TSE-Erkrankungen bei Tieren.....	26
2.2.7	Diagnose von Scrapie und BSE	26
2.3	TSE bei Menschen.....	28
2.3.1	Kuru.....	28
2.3.2	Klassische Creutzfeldt-Jakob-Krankheit (CJK, CJD).....	29
2.3.3	Sporadische Creutzfeldt-Jakob-Krankheit (sCJK, sCJD).....	29
2.3.3.1	Familiäre Creutzfeldt-Jakob-Krankheit (fCJK, fCJD)	29
2.3.3.2	Iatrogene Creutzfeldt-Jakob-Erkrankung (iCJK, iCJD)	30
2.3.3.3	Neue Variante der Creutzfeldt-Jakob-Erkrankung	
	(vCJK, vCJD).....	30
2.3.4	Gerstmann-Sträussler-Scheinker-Syndrom (GSS).....	31
2.3.5	Fatale Familiäre Insomnie (FFI)	32
2.3.6	Diagnose humaner TSE-Erkrankungen.....	33
2.4	TSE aus fleischhygienerechtlicher Sicht.....	34
2.4.1	Verwendung von Risikomaterialien in Fleischerzeugnissen	36
2.4.2	Schlachttechnologisch bedingte Kontamination	37
2.4.3	Aktuelle Gesetzeslage und Verbraucherschutz.....	39

2.4.4	Wirtschaftliche Konsequenzen	41
2.5	ZNS-Nachweisverfahren	43
2.5.1	Cholesterin als Markersubstanz	43
2.5.2	Glial Fibrillary Acidic Protein.....	44
2.5.3	Neuronenspezifische Enolase	47
2.5.4	Weitere Markerproteine	48
2.5.5	Nachweis ZNS-spezifischer Fettsäuren mittels Gaschromatographie-Massenspektrometrie.....	48
2.5.6	Direkter Nachweis von PrP ^{RES} in Fleischerzeugnissen	49
3	MATERIAL UND METHODEN	50
3.1	Allgemeine Ausstattung Technologie.....	50
3.1.1	Geräte	50
3.1.2	Verbrauchsmaterial	50
3.2	Allgemeine Laborausstattung.....	51
3.2.1	Geräte	51
3.2.2	Verbrauchsmaterial	52
3.2.3	Reagenzien	52
3.3	Untersuchungsmaterial	53
3.3.1	Zutaten	53
3.3.2	Zusatzstoffe, Gewürze.....	53
3.3.3	Brühwurst-Voll- und Dreiviertelkonserven	54
3.3.4	Leberwurst-Kesselkonserven	55
3.3.5	Hackfleisch	57
3.3.6	Externes Untersuchungsmaterial	59
3.3.7	Gewinnung von Tupferproben von Rinder-Schlachttierkörpern und Rinderköpfen	59
3.4	Untersuchungsmethoden: ZNS-Nachweisverfahren	60
3.4.1	RIDASCREEN [®] Risk Material.....	60

3.4.1.1	Im Risk Material-Testkit enthaltene Reagenzien und Verbrauchsmaterial	60
3.4.1.2	Methode	60
3.4.1.3	Testvorbereitung.....	61
3.4.1.4	Probenvorbereitung	61
3.4.1.5	Testdurchführung	61
3.4.2	RIDASCREEN® Risk Material 10/5.....	64
3.4.2.1	Im Risk Material 10/5-Testkit enthaltene Reagenzien und Verbrauchsmaterial	64
3.4.2.2	Methode	64
3.4.2.3	Testvorbereitung.....	65
3.4.2.4	Testdurchführung	66
3.4.3	Brainostic™	67
3.4.3.1	Im Brainostic™-Testkit enthaltene Reagenzien und Verbrauchsmaterial	67
3.4.3.2	Methode	67
3.4.3.3	Testvorbereitung.....	68
3.4.3.4	Testdurchführung	68
3.4.4	Reverse Transkriptase-Real Time- PCR	71
3.4.4.1	RNA-Isolierung	71
3.4.4.2	Reverse Transkription	74
3.4.4.3	Real Time-PCR	76
3.5	Statistische Auswertung.....	79
4	ERGEBNISSE	81
4.1	Hackfleisch.....	81
4.1.1	Hackfleisch mit Rinderhirn, Lagerungsdauer 14 Tage, Lagerungstemperatur + 2° C	81
4.1.1.1	RIDASCREEN® Risk Material 10/5.....	81

4.1.1.2	Brainostic™	83
4.1.1.3	Reverse Transkriptase-Real Time-PCR	85
4.1.1.4	Zusammenfassung der Ergebnisse der Untersuchung von Rinder-Hackfleisch mit Rinderhirnzusatz	87
4.1.2	Validierung einer modifizierten Probenaufbereitung für den RIDASCREEN® Risk Material 10/5-Test	88
4.1.3	Hackfleisch mit Zusatz von Rinder-Rückenmark	90
4.1.3.1	RIDASCREEN® Risk Material 10/5.....	90
4.1.3.2	Brainostic™	93
4.1.3.3	Reverse Transkriptase-Real Time-PCR	95
4.1.3.4	Zusammenfassung der Ergebnisse der Untersuchung von Rinderhackfleisch mit Zusatz von Rinder-Rückenmark	96
4.1.4	Hackfleisch mit Zusatz von Rinderhirn, gelagert bei – 18° C....	97
4.1.4.1	RIDASCREEN® Risk Material 10/5.....	97
4.1.4.2	Brainostic™	99
4.1.4.3	Reverse Transkriptase-Real Time-PCR	101
4.1.4.4	Zusammenfassung der Ergebnisse der Untersuchung von tiefgekühlt gelagertem Rinder-Hackfleisch mit Zusatz von Rinderhirn.....	102
4.2	Brühwurst-Konserven	104
4.2.1	Brühwurst-Vollkonserven mit Rinderhirn	104
4.2.1.1	RIDASCREEN® Risk Material.....	104
4.2.1.2	Brainostic™	105
4.2.1.3	Reverse Transkriptase-Real Time-PCR	106
4.2.1.4	Zusammenfassung der Ergebnisse der Untersuchung von Brühwurst-Vollkonserven mit Zusatz von Rinderhirn.....	108
4.3	Brühwurst-Dreiviertelkonserven mit Rinderhirn.....	109
4.3.1.1	RIDASCREEN® Risk Material.....	109
4.3.1.2	Brainostic™	110

4.3.1.3	Reverse Transkriptase-Real Time-PCR	111
4.3.1.4	Zusammenfassung der Ergebnisse der Untersuchungen von Brühwurst-Dreiviertelkonserven mit Zusatz von Rinderhirn.....	113
4.4	Leberwurst-Kesselkonserven.....	114
4.4.1.1	RIDASCREEN® Risk Material.....	114
4.4.1.2	Brainostic™	115
4.4.1.3	Reverse Transkriptase-Real Time-PCR	117
4.4.1.4	Zusammenfassung der Ergebnisse der Untersuchung von Leberwurst-Kesselkonserven mit Zusatz von Rinderhirn.....	118
4.5	Tupferproben von Schlachttierkörpern und –köpfen	120
5	DISKUSSION	122
5.1	GFAP und GFAP-mRNA als Marker-Substanz	122
5.2	Auswahl der Untersuchungsmaterialien und der Nachweismethoden	122
5.3	Einfluss der Nachweismethoden.....	125
5.4	Fragliche Ergebnisse	126
5.5	Einfluss der Probenahmetechnik auf die Nachweisgrenze	127
5.5.1	Einfluss der Untersuchungsmethode und Lagerungsdauer auf die Nachweisgrenze in Hackfleisch.....	128
5.5.2	Einfluss der Untersuchungsmethode und Lagerungsdauer auf die Nachweisgrenze in Brühwurst-Voll- und Dreiviertelkonserven	130
5.5.3	Einfluss der Untersuchungsmethode und Lagerungsdauer auf die Nachweisgrenze in Leberwurst-Kesselkonserven	132
5.6	Falsch-positive Ergebnisse	134
5.7	Semiquantitative Auswertung der ELISA-Verfahren	135
5.8	Semiquantitative Auswertung des Reverse Transkriptase-Real Time-PCR-Verfahrens	136

5.9	Felduntersuchungen mit dem Reversen Transkriptase-Real Time-PCR-Verfahren: ZNS-Nachweis an Rinder-Köpfen und Rinder-Schlachttierkörpern	137
6	SCHLUSSFOLGERUNG	138
7	ZUSAMMENFASSUNG.....	140
8	SUMMARY	142
9	LITERATURVERZEICHNIS.....	144
10	ANHANG	176

VERZEICHNIS RELEVANTER BZW. HÄUFIG VERWENDETER ABKÜRZUNGEN UND EINHEITEN

%	Prozent
=	gleich
+	positiv, plus
-	negativ, minus
>	größer als
<	kleiner als
≥	größer oder gleich
≤	kleiner oder gleich
®	geschütztes Warenzeichen
™	geschütztes Warenzeichen, engl. <u>trademark</u>
Aqua dest.	Aqua destilata
BfR	Bundesinstitut für Risikobewertung
BSE	Bovine spongiforme Enzephalopathie
bp	Anzahl der Basenpaare
CJK	Creutzfeldt-Jakob-Krankheit, engl. CJD, Creutzfeldt-Jakob-Disease
Ct-Wert	Schwellenwertzyklus, engl. Tresholdcycle
CWD	Chronic Wasting Disease
DNA	Desoxyribonukleinsäure
ELISA	Enzyme-linked Immunosorbent Assay
engl.	englisch
et al.	und andere, et altera
EU	Europäische Union
fCJK	Familiäre Creutzfeldt-Jakob-Krankheit

FFI	Fatale Familiäre Insomnie
FSE	Feline spongiforme Enzephalopathie
g	Gramm
<i>g</i>	Erdschwerebeschleunigung
GC-MS	Gaschromatographie-Massenspektrometrie
GFAP	Saures Gliafaserprotein, engl. Glial Fibrillary Acidic Protein
GSS	Gerstmann-Sträussler-Scheinker-Syndrom
iCJK	Iatrogene Creutzfeldt-Jakob-Krankheit
LFGB	Lebensmittel-, Bedarfsgegenstände- und Futtermittel-Gesetzbuch
MBP	Basisches Myelinprotein, engl. Myelin Basic Protein
min	Minute
μl	Mikroliter
ml	Milliliter
mRNA	Boten-Ribonucleinsäure, engl. Messenger-RNA
nm	Nanometer
Nr.	Nummer
NSE	Neuronenspezifische Enolase
OD	Optische Dichte
PCR	Polymerase-Kettenreaktion, engl. Polymerase-Chain-Reaction
PrP	Prion-Protein, engl. Proteinaceous Infectious Particle
PrP ^C	zelluläres Prion-Protein
PrP ^{RES}	pathologisches Prionprotein, Proteinase-K-resistente Form
RFLP	Restriktionsfragmentlängenpolymorphismus
RKI	Robert Koch Institut, Berlin

sCJK	Sporadische Creutzfeldt-Jakob-Krankheit
SRM	Spezifiziertes Risikomaterial
TME	Transmissible Mink Enzephalopathy
TSE	Transmissible spongiforme Enzephalopathie
vCJK	Neue Variante der Creutzfeldt-Jakob-Krankheit
ZNS	Zentrales Nervensystem

1 EINLEITUNG

Nachdem die bovine spongiforme Enzephalopathie 1986 zum ersten Mal in Großbritannien diagnostiziert (WELLS et al., 1987) und 1995 erstmalig eine neue Variante der Creutzfeldt-Jakob-Krankheit des Menschen beschrieben wurde (BRITTON et al, 1995; WILL et al., 1996), gilt es heute als gesichert, dass die orale Übertragung von BSE-Erregern auf den Menschen zur Entstehung dieser neuartigen Erkrankung geführt hat (ALMOND und PATTISSON, 1997). Um die Erregerübertragung durch den Verzehr von Lebensmitteln tierischen Ursprungs auszuschließen, wurden Gewebe mit einem besonders hohem Gehalt an BSE-Erregern als spezifizierte Risikomaterialien ausgewiesen. Den höchsten Infektionstiter findet man dabei in den Geweben des Zentralen Nervensystems von infizierten Rindern, Schafen und Ziegen (SSC, 1998). Diese Risikomaterialien sind aus der Nahrungsmittelkette fernzuhalten (VO EG 999/2001). Um die Einhaltung dieser Verbraucherschutzmaßnahme verifizieren zu können, werden anwenderfreundliche und sensitive Verfahren zum Nachweis von ZNS-Gewebe in Fleisch und Fleischerzeugnissen benötigt. Diese Nachweisverfahren ermöglichen eine Kontrolle von Rohware und Endprodukten. Zurzeit stehen mehrere, auf dem Nachweis unterschiedlicher Markersubstanzen basierende Testmethoden zur Detektion von ZNS in Fleischerzeugnissen zur Verfügung.

Im Rahmen der hier vorliegenden Arbeit sollten zwei kommerziell erhältliche und in der Routinediagnostik eingesetzte Enzyme-Linked-Immunosorbent Assays (ELISA) zum Nachweis des ZNS-spezifischen sauren Gliafaserproteins (Glial fibrillary acidic protein, GFAP) mit einem neu entwickelten Reverse Transkriptase-Real Time-Polymerasekettenreaktion (PCR)-Verfahren zum Nachweis der messengerRNA dieses Proteins verglichen werden.

Das Ziel des vorliegenden Dissertationsvorhabens war es, die Sensitivität der jeweiligen Testverfahren an unterschiedlichen Probenmatrizes zu vergleichen. Dabei sollte insbesondere der Einfluss verschiedener technologischer Parameter wie Erhitzung und Lagerungsdauer auf die

Stabilität der Markersubstanz und deren Nachweisbarkeit mit den drei Verfahren berücksichtigt werden.

2 LITERATURÜBERSICHT

2.1 Prionenerkrankungen

Stanley B. Pruisner führte 1982 den Namen „Prion“ (proteinaceous infectious particle) für einen bis dahin unbekanntem, neuartigen Krankheitserreger ein, der ausschließlich aus Eiweißbestandteilen aufgebaut ist und somit keine eigene DNA besitzt (PRUISNER, 1982). Später gelang es Pruisner nachzuweisen, dass das krankheitserregende PrP^{RES} eine modifizierte Form des normalen, zellulären PrP^C darstellt (PRUISNER, 1991). PrP^C und PrP^{RES} unterscheiden sich nicht in ihrer Aminosäuresequenz, lediglich die Tertiärstruktur beider Proteinformen ist unterschiedlich. Während PrP^C zu etwa 42 % eine α -Helix- und zu 3 % β -Faltblattstruktur aufweist, besteht PrP^{RES} zu etwa 30 % aus α -Helix- und zu 43 % aus β -Faltblattanteilen (CAUGHEY et al., 1991; HARRIS et al., 1999; DORMONT, 2002). Mit dieser veränderten Konformation ist auch die extreme Stabilität gegen Hitze, Säuren, Proteasen und Strahlen zu erklären (DUFFEY et al., 1974; MEYER et al., 1986).

Das aus 250 Aminosäuren bestehende, physiologische Prionprotein PrP^C wird in zahlreichen Körpergeweben exprimiert, zum Beispiel in Nervenzellen, Muskulatur, Lunge und Leukozyten (BENDHEIM et al., 1992; DODELET et al., 1998; LEHMANN et al., 1999). PrP^C wird im rauen endoplasmatischen Retikulum synthetisiert und über den Golgi-Apparat auf die Zelloberfläche geschleust. Dort ist es mittels eines Glycosol-Phosphatidyl-Inositol-Restes in der Zellmembran verankert. Der überwiegende Teil des PrP^C wird auf der Zelloberfläche gefunden. Jedoch durchläuft PrP^C eine zyklische Wanderung zwischen Zelloberfläche und der Aufnahme mittels Endosomen in das Zytosol (HARRIS, 1999; AGUZZI, 2002). Die Funktion von PrP^C ist noch nicht endgültig geklärt. Es ist jedoch wahrscheinlich, dass es eine Rolle bei der Aufnahme und dem Transport von Liganden oder in der Zell-Zell-Kommunikation spielt. Diskutiert wird, ob es sich bei PrP^C um einen Kupfertransporter handelt (McATHUR et al., 1991; HARRIS, 1999). Gentechnisch veränderte Mäuse ohne PrP^C zeigen keinerlei Defekte. Einige Studien wiesen bei diesen

PrP^C-knockout-Mäusen jedoch Störungen im Tag-Wach-Rhythmus und in circadianen Rhythmen nach (TOBLER et al., 1996).

Das Einbringen von PrP^{RES} in eine Zelle katalysiert die kettenreaktionsartige Fehlfaltung von physiologischem PrP^C in die pathologische, Proteinase-K- resistente Isoform (PRUISNER, 1991). An der Umformung von PrP^C zu PrP^{RES} sind hochkomplexe und sehr spezifische Vorgänge beteiligt, die durch die Übertragung zwischen zwei Spezies deutlich erschwert werden. Diese Speziesbarriere bewirkt, dass nach einer Passage zwischen zwei Spezies die Inkubationszeit und das Fortschreiten der Erkrankung deutlich verlängert sind, während sich die Inkubationszeit der Erkrankung, wenn sie innerhalb einer Art übertragen wird, verkürzt und innerhalb weniger Passagen stabilisiert. Geringe Abweichungen in der Aminosäuresequenz der Prionproteine zweier unterschiedlicher Spezies können im Experiment sogar zur vollständigen Resistenz einer Spezies führen (PRUISNER, 1991).

Transmissible spongiforme Enzephalopathien (TSE) sind neurodegenerative Prionenerkrankungen (HARRIS, 1999). PrP^{RES} verursacht letztendlich eine letale Abnahme motorischer und kognitiver Fähigkeiten (CHAKRABORTY, 2005). Die Prionenerkrankungen treten sowohl beim Tier wie auch beim Menschen auf. Sie besitzen alle eine sehr lange Inkubationszeit, zeichnen sich durch histopathologische Charakteristika, mehr oder weniger stark ausgeprägte spongiforme Veränderungen im Hirngewebe, Nervenzelluntergang, Gliose und einen ausnahmslos tödlichen Ausgang aus. Jegliche Art von entzündlichen Infiltrationen fehlt bei TSE-Erkrankungen, es findet also keine Immunantwort statt (MÖSTEL und MÖSTEL, 1998; RKI, 2001; AGUZZI, 2002). Die durch aggregierte PrP^{RES}-Fragmente entstehenden Plaques im Gehirn stellen zwar ein nützliches diagnostisches Hilfsmittel zur Erkennung der Erkrankung dar, sind aber anscheinend nicht die Hauptursache für die auftretenden Symptome. Bei vielen Menschen und Tieren mit Prionenerkrankungen findet man überhaupt keine Aggregate dieser Art (PRUISNER, 1995; MÖSTEL und MÖSTEL, 1998).

Tabelle 1: Übersicht der TSE-Erkrankungen bei Mensch und Tier

TSE-Erkrankung	Wirt*
Scrapie	Schaf, Ziege, Mufflon
Bovine spongiforme Enzephalopathie	Rind, Ziege
Chronic Wasting Disease	Maultierhirsch, Weißwedelhirsch, Großohrhirsch, Rocky Mountain Elk
Feline spongiforme Enzephalopathie	Katze, Gepard, Puma
Transmissible Mink Encephalopathy	Nerz
Exotic Ungulate Encephalopathy	Nyala, Kudu
Kuru	Mensch
Klassische Creutzfeldt-Jakob-Krankheit	Mensch
Iatrogene Creutzfeldt-Jakob-Krankheit	Mensch
Neue Variante der Creutzfeldt-Jakob-Krankheit	Mensch
Gerstmann-Sträussler-Scheinker	Mensch
Fatale Familiäre Insomnie	Mensch

* In dieser Übersicht sind ausschließlich Wirtsspezies aufgelistet, bei denen Infektionen unter natürlichen Umständen beobachtet wurden.

2.2 TSE-Erkrankungen bei Tieren

2.2.1 Scrapie, Traberkrankheit

Die Traberkrankheit der Schafe kennt man seit über 250 Jahren (Mc GOWAN, 1922). Somit stellt sie die am längsten bekannte spongiforme Enzephalopathie dar. Die ersten Fallbeschreibungen aus der Mitte des 18. Jahrhunderts stammen aus Deutschland und Frankreich. Mittlerweile ist die endemisch auftretende Erkrankung Scrapie durch den weltweiten Handel mit Zuchtschafen weit verbreitet und betrifft vor allem Schafe in Großbritannien. Lediglich Australien und Neuseeland gelten aufgrund

strenger Importvorschriften als Scrapie-frei (McDIARMID, 1996). In der Regel beträgt die Anzahl der infizierten Tiere einer Herde zwischen 1 und 5 %, in Ausnahmefällen wurden aber auch bis zu 50 % infizierte Tiere beobachtet (ELSEN et al., 1999).

Eine Besonderheit der Scrapie ist, dass der Erreger vertikal sowie horizontal über die Fruchthülle, Nachgeburt und Geburtsflüssigkeiten, aber auch über kontaminiertes Weideland übertragen werden kann (PATTISON et al., 1973; FOOTE et al., 1993). Der englische Begriff Scrapie leitet sich von „to scrape“ (kratzen, jucken) ab und beschreibt somit bereits eines der Leitsymptome. Anfangs zeigen die betroffenen Tiere einen ausgeprägten Juckreiz, später treten ein schwankender Gang, Abmagerung, Übererregbarkeit und Festliegen hinzu, bis die Tiere nach etwa drei- bis vierjähriger Inkubationszeit versterben. Entscheidend für die Empfänglichkeit eines Schafes gegenüber der Infektion sind bestimmte Polymorphismen in der Aminosäuresequenz des Prionproteins (BELT, 1995). Dieser PrP-Genotyp beeinflusst auch die Topologie und zeitliche Abfolge des Auftretens des PrP^{SC} in verschiedenen Organen (ANDREOLETTI et al., 2000). Die Krankheit tritt ebenfalls, wenn auch ungleich seltener, bei Ziegen und Mufflons (*Ovis musimon*) auf (SEUBERLICHT et al., 2007). Bislang sind keine Infektionen des Menschen durch Scrapie bekannt. Dennoch verweisen BHAKDI und BOHL (2002) auf eine alte Bauernregel, die besagt, dass das Fleisch Scrapie-infizierter Tiere nicht verzehrt werden soll.

2.2.2 Bovine spongiforme Enzephalopathie (BSE)

BSE wurde 1986 zum ersten Mal in Großbritannien diagnostiziert (WELLS et al., 1987). Die Befragung von Tierärzten und Landwirten ergab aber, dass wahrscheinlich zumindest seit 1985 erste Erkrankungsfälle aufgetreten waren (BREADLY und WILESMITH, 1993). Der erste deutsche BSE-Fall trat am 26.11.2000 auf (STAUFENBIEL und HÄMÄLAINEN, 2002). Mittlerweile sind BSE-Erkrankungen in Belgien, Dänemark, Finnland, Frankreich, Deutschland, Griechenland, Holland, Irland, Israel, Italien, Japan, Lichtenstein, Luxemburg, Österreich, Polen, Portugal, Slowakei, Spanien, Schweiz, Tschechien und dem Vereinten

Königreich belegt (<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs113/en/>). BSE tritt unabhängig von Rasse und Geschlecht als Einzeltierkrankung auf (BREADLY und WILESMITH, 1993). Infizierte Rinder zeigen erst am Ende der etwa fünfjährigen Inkubationszeit überhaupt klinische Symptome. Diese sind Übererregbarkeit, Nervosität, Ängstlichkeit und Aggressivität sowie ausgeprägte motorische Störungen wie Ataxie, steifer Gang und Festliegen (BRAUN, 1989). Allerdings setzen die genannten Symptome schleichend ein und beginnen zunächst mit einem generellen Leistungsrückgang und Gewichtsverlust (BRAUN, 1989), so dass durchaus die Gefahr besteht, dass Tiere unbemerkt in diesem frühen Krankheitsstadium zur Schlachtung abgegeben werden.

Für die Entstehung und das seuchenhafte Auftreten der BSE wurden zwei erklärende Hypothesen aufgestellt. Beide Hypothesen fokussieren als Auslöser der BSE-Epidemie die 1981 bis 1982 durchgeführten Veränderungen im Herstellungsverfahren von Tiermehlen. Die Erhitzungstemperatur von Tiermehl wurde aus Kostengründen von 130° C auf nunmehr 80° C gesenkt und gleichzeitig wurde auf die Fettextraktion mit Chloroform und die anschließende Behandlung mit heißem Dampf verzichtet. Angesichts der Häufigkeit von Scrapie bei britischen Schafen erschien es wahrscheinlich, dass es der durch die veränderten chemischen und thermischen Prozesse bei der Tiermehlherstellung nicht inaktivierte Scrapie-Erreger geschafft hatte, die Speziesbarriere zu überwinden und bei Rindern die BSE zu verursachen. Die zweite Hypothese besagte, dass im Tiermehl der bis dahin unbekannte Erreger einer Rinder-spezifischen transmissiblen spongiformen Enzephalopathie angereichert wurde und es somit zu der großen Zahl der Erkrankungsfälle kommen konnte. Die biologischen Eigenschaften des BSE-Erregers weichen von den Eigenschaften sämtlicher heute bekannten Scrapie-Stämme ab. Diese Tatsache scheint die zweite Hypothese zu untermauern (RKI, 2001). Fütterungsversuche belegen, dass bereits 1 g Hirnhomogenat von BSE-kranken Rindern ausreicht um Kälber oral zu infizieren. Nach der oralen Infektion breitet sich der Erreger entlang des Darmnervensystems über die peripheren Nerven zum zentralen Nervensystem aus (WILL und IRONSIDE, 1999).

Im Zeitraum von 1986 bis 1993 kam es zu einem stetigen Anstieg der BSE-Fälle im Vereinten Königreich und schließlich auch in vielen weiteren Ländern, bis auf der Spitze der BSE-Krise im Jahr 1993 monatlich über 3500 BSE-Fälle im Vereinten Königreich diagnostiziert wurden. Erst fünf Jahre nach Inkrafttreten des Verfütterungsverbotes von Tiermehl an Wiederkäuer 1989 folgte ein deutlicher Rückgang der Fallzahlen (BREADLEY und WILESMITH, 1993). 2007 wurden im Vereinten Königreich nur noch 67 Fälle, 2008 noch 37 Fälle registriert. In Deutschland traten im Jahr 2001 die meisten, nämlich 125 BSE-Fälle, auf; 2008 wurden hier nur noch zwei erkrankte Tiere gefunden (http://www.oie.int/eng/info/en_esb.htm). Während in Großbritannien verseuchtes Tiermehl im Kraftfutter die Hauptinfektionsquelle darstellte, waren es in Deutschland die mit Wiederkäuerfett versetzten Milchaustauscher (RKI, 2001; BORCHERS, 2002). Bemerkenswert ist aber, dass es bislang aufgrund des Verfütterungsverbotes nicht zum völligen Erliegen der Infektionen gekommen ist. Mittlerweile sind über 400 der so genannten born-after-ban-Fälle bekannt. Dabei handelt es sich um Tiere, die erst nach Inkrafttreten des Verbotes geboren wurden und dennoch an BSE erkrankt sind. Es scheint also noch eine weitere Infektionsquelle zu geben; dabei kann es sich um Restbestände an kontaminiertem Tierfutter handeln oder aber auch um eine Übertragung der BSE von dem Muttertier auf das Kalb. Dieser vertikale Übertragungsweg wird allerdings als sehr unwahrscheinlich angesehen (FERGUSON et al., 1999). Eventuell handelt sich bei diesen born-after-ban-Tieren auch um spontan auftretende Einzeltier-Erkrankungen (www.maff.gov.uk/animalh/bse/bsestatistics/bse/bab).

Nachdem es bereits experimentell gelungen war, BSE auf Schafe und Ziegen zu übertragen (FORSTER et al., 1993), wurde 2002 in Frankreich der bislang einzige Fall einer unter natürlichen Umständen infizierten Ziege bekannt (ELIOT et al., 2005). Unter natürlichen Bedingungen konnte bisher keine BSE bei Schafen nachgewiesen werden. Es ist aber denkbar, dass die Krankheit bei Schafen vorkommt und aufgrund der ähnlichen Krankheitserscheinungen für Scrapie gehalten wird (FOSTER, 2001; ANONYMUS, 1998). Die Verfütterung von Tiermehl-haltigem Kraftfutter an gravide Mutterschafe war in den 80er Jahren durchaus üblich

(ANONYMUS, 1998). Anders als beim Rind lässt sich bei Schafen und Ziegen PrP^{RES} auch in der Milz und in den Lymphknoten nachweisen (FOSTER et al., 1993).

Weiterhin ist es gelungen, BSE auf parenteralem und auf oralem Weg auf eine Vielzahl weiterer Spezies, wie zum Beispiel Mäuse (FRASER et al., 1988; BARLOW und MIDDLETON, 1990), Nerze (ROBINSON et al., 1994), Makaken (LASMEZAS et al., 1996) und Lemuren (BUTLER, 1999) zu übertragen. Bei Schwein (DAWSON et al., 1990; WELLS et al., 2003) und Hamster (COLLEE und BREADLY, 1997) gelang nur die parenterale Übertragung. Ebenfalls erfolgreich verlief die parenterale Übertragung auf das Krallenäffchen (BAKER et al., 1993). Es war bislang nicht möglich, Hühner auf parenteralem oder oralem Weg zu infizieren (COLLEE und BREADLY, 1997; MATHEWS et al., 2003).

2.2.3 Chronic Wasting Disease (CWD)

Die endemisch auftretende Chronic Wasting Disease wurde bei folgenden Hirscharten in USA und Kanada beobachtet: Maultierhirsch (*Odocoileus hemionus columbianus*), Weißwedelhirsch (*Odocoileus virginianus virginianus*), Großohrhirsch (*Odocoileus hemionus hemionus*) und Rocky Mountain Elk (*Cervus elaphus nelsoni*). WILLIAMS et al. (1992) datieren die erste Identifizierung dieser Erkrankung auf 1967. Während bei in Gefangenschaft gehaltenen Cerviden eine Infektion über die Verfütterung von Tiermehl nicht auszuschließen ist, erscheint sie bei wildlebenden Tieren eher unwahrscheinlich. Auch haben Sequenzvergleiche der Prionenstämme ergeben, dass es sich bei dem Erreger der CWD nicht um den BSE-Erreger handelt (BRUCE et al., 1997). CWD kann ähnlich wie Scrapie sowohl horizontal durch Blut, Urin, Kot und Speichel als auch vertikal von Muttertieren auf die Nachkommen übertragen werden (WILLIAMS et al., 1992). Ob CWD eine Gefahr für den Menschen darstellt, ist bislang unklar. Zwar sind mehrere Fälle von Jägern, die in jungem Alter an spongiformen Enzephalopathien verstarben, belegt; ein Zusammenhang zu dem Verzehr von CWD-infiziertem Wildfleisch konnte jedoch nicht zweifelsfrei nachgewiesen werden (BELAY et al., 2001; BOSQUE, 2002). Bei einer breit angelegten Untersuchung von über 7000

frei lebenden Wildwiederkäuern in Deutschland wurde kein CWD-infiziertes Tier gefunden (SCHETTLER et al., 2005).

2.2.4 Feline spongiforme Enzephalopathie (FSE)

Zum ersten Mal dokumentiert wurde der Fall einer an der Felinen spongiformen Enzephalopathie erkrankten Katze 1990 (LEGETT et al., 1990). Abgesehen von einzelnen Erkrankungsfällen in Norwegen und Lichtenstein waren fast ausschließlich Katzen im Vereinigten Königreich betroffen, so dass anzunehmen ist, dass die Übertragung über BSE-Erreger-haltiges Futter erfolgte (JONAS und LACHMANN, 1999; BORCHERS, 2002).

Diese Hypothese wird durch das Ergebnis der Erregerstamm-Typisierung untermauert, die ergab, dass FSE eine Form der BSE bei Katzen ist (HEWICKER-TRAUTWEIN, 2001). Die infizierten Katzen fallen zunächst durch Verhaltensstörungen wie intensives Lecken, Kauzwang und starkes Speicheln auf. Später kommen Übererregbarkeit, Aggression und motorische Störungen hinzu.

FSE wurde auch bei in Zoos gehaltenen Großkatzen (Gepard und Puma) beobachtet (WILLOUGHBY et al., 1992; KIRKWOOD et al., 1994).

2.2.5 Transmissible Mink Encephalopathy (TME)

Die Transmissible Mink Encephalopathy wurde erstmals von HARTSOUGH und BURGER (1965) beschrieben und bislang ausschließlich bei in Gefangenschaft gehaltenen Zuchtnerzen beobachtet. Wie bei anderen spongiformen Enzephalopathien, sind die klinischen Symptome Verhaltensauffälligkeiten und motorische Ausfälle. Auch in diesem Fall wird von einer Erregerübertragung durch mit BSE kontaminiertes Futter ausgegangen (JONAS und LACHMANN, 1999).

2.2.6 Weitere TSE-Erkrankungen bei Tieren

Seit 1986 wurden bei zahlreichen Zoo-Wiederkäuern spongiforme Enzephalopathien vom Typ der BSE festgestellt. Es handelte sich dabei um ein Nyala (*Tragelaphus angasi*), vier Elenantilopen (*Taurotragus oryx*), sechs Kudus (*Tragelaphus strepsiceros*), einen südafrikanischen Spießbock (*Oryx gazella*), einen arabischen Spießbock (*Oryx leucoryx*) und eine Säbelantilope (*Oryx dammah*) (KIRKWOOD et al., 1994). Außerdem wird von zwei ebenfalls an spongiformen Enzephalopathien erkrankten Straußenvögeln berichtet, die Diagnose konnte jedoch nicht zweifelsfrei bestätigt werden (SCHOON et al., 1991).

2.2.7 Diagnose von Scrapie und BSE

Die diagnostischen Möglichkeiten der TSE-Erkrankungen unterscheiden sich in wesentlichen Punkten von denen anderer Infektionskrankheiten. Aufgrund der ausbleibenden Immunantwort ist ein Antikörpernachweis nicht möglich und es kann auch kein Nachweis erregerspezifischer DNA erfolgen (GROSCHUP et al., 2002). Am lebenden Tier steht nur der Untersuchungsgang nach BRAUN zur Verfügung, bei dem neben der Körperhaltung und dem Bewegungsablauf auch die Reaktionen des Tieres auf optische und akustische Reize beurteilt werden (BRAUN et al., 1998). Bei sämtlichen weiteren Diagnoseverfahren handelt es sich um post mortem-Testsysteme. Die teilweise Resistenz der veränderten Prionen PrP^{RES} gegen den Proteaseabbau wird von fast allen Diagnoseverfahren zur Differenzierung herangezogen. Der unverdaute Prionrest kann in verschiedenen, auf dem ELISA- oder Westernblott-Verfahren basierenden Schnelltests detektiert werden (GROSCHUP et al., 2002). Hierzu wird die Obex-Region aus dem Hirnstamm der Tiere verwendet, da sie eine besonders hohe Erregerdichte aufweist (PRUISNER, 1995). Zur Bestätigung der Schnelltests wird die immunhistochemische Untersuchung von Hirngewebe oder ein Westernblotting nach vorangegangener Anreicherung von PrP^{RES} mittels Ultrazentrifugation eingesetzt. Auch die histopathologische Untersuchung mit dem Nachweis einer ZNS-Vakuolisierung kann zur Bestätigung eines BSE-Verdachtsfalles herangezogen werden (GROSCHUP et al., 2002). Durch den

Mäuseinokulationsversuch lässt sich ebenfalls eine BSE-Erkrankung diagnostizieren. Dieses Verfahren ist aber für die routinemäßige Anwendung zu zeitintensiv (GROSCHUP et al., 2002). Während anfangs EU-weit noch alle Schlachtrinder ab einem Alter von 24 Monaten auf BSE untersucht werden mussten, wurde diese Altersgrenze mittlerweile schrittweise nach oben verschoben. In der Europäischen Union werden in den sogenannten „alten Mitgliedsstaaten“ (Belgien, Dänemark, Deutschland, Irland, Griechenland, Spanien, Frankreich, Italien, Luxemburg, Niederlande, Österreich, Portugal, Finnland, Schweden, Vereinigtes Königreich) gehaltene Schlachtrinder ab einem Alter von 48 Monaten mit Hilfe der Schnelltests auf BSE untersucht. In den „neuen Mitgliedstaaten“ (Bulgarien, Estland, Lettland, Litauen, Malta, Polen, Rumänien, Slowakei, Slowenien, Tschechische Republik, Ungarn und Zypern) gilt die Untersuchungspflicht für Schlachtrinder ab dem 30. Monat. Deutschland hat die Anhebung des Testalters zum 1. Januar 2009 umgesetzt (Verordnung zum Schutz der Rinder vor einer Infektion mit dem BVD-Virus und zur Änderung TSE-rechtlicher Vorschriften vom 11.12.2008, BGBl 2461). Zusätzlich werden alle not- oder krankgeschlachteten sowie getötete und verendete Rinder einem BSE-Schnelltest unterzogen. Ebenfalls werden geschlachtete Schafe und Ziegen ab einem Alter von 18 Monaten stichprobenartig auf BSE untersucht. Da sich der BSE-Erreger vom Darm in Richtung ZNS ausbreitet, wo er erst gegen Ende der Inkubationszeit nachzuweisen ist, kann ein negatives Schnelltest-Ergebnis eine Infektion mit dem BSE-Erreger nicht sicher ausschließen. Allerdings kann auch erst ab diesem Zeitpunkt eine Infektiosität im Mäuse-Inokulationstest nachgewiesen werden, so dass den BSE-Schnelltests eine bedeutende Rolle im vorbeugenden Verbraucherschutz zukommt (GROSCHUP et al., 2002). Am Tierärztlichen Institut der Universität Göttingen wird derzeit an einem Testverfahren gearbeitet, dass mit Hilfe der bei BSE-infizierten Rindern auftretenden Veränderungen an kurzen Nukleinsäurefragmenten im Blut die Diagnosestellung bereits am lebenden Tier erlauben soll. Bislang werden allerdings bei etwa 0,5 % der gesunden Tiere falsch-positive Ergebnisse beobachtet (Stellungnahme des Friedrich Löffler Institutes vom 13.07.2005).

2.3 TSE bei Menschen

Bei Menschen kommen sporadische, hereditäre und infektiöse spongiforme Enzephalopathien vor (AGUZZI, A., 2002; CHAKRABORTY, 2005). Etwa 10 % dieser Leiden treten familiär gehäuft auf, wobei dann etwa die Hälfte der Familienmitglieder erkrankt (PRUISNER, 1995).

2.3.1 Kuru

Zu den infektiösen spongiformen Enzephalopathien gehört die Kuru, welche in der Fore-Urbevölkerung in den nördlichen Provinzen Neuguineas aufgrund kannibalischer Rituale weit verbreitet war. Erstmals beschrieben wurde diese Erkrankung 1957 von Vincent Zigas vom Öffentlichen Gesundheitsdienst Australiens und D. Carleton Gajdusek von den Nationalen Gesundheitsinstituten der USA (GAJDUSEK und ZIGAS, 1957). Die Infektion erfolgt nicht ausschließlich oral, sondern auch nasal und dermal, besonders durch Kontakt des Erregers zu Augen und Bindehäuten (ALPERS und GAJDUSEK, 1965). Zunächst kommt es bei den Betroffenen zu einem progredienten Verlust der Bewegungskoordination und einem ausgeprägten Tremor (Kuru bedeutet übersetzt „schüttelfrostartiges Zittern“). Im weiteren Krankheitsverlauf nehmen die geistigen Fähigkeiten massiv ab (GAJDUSEK und ZIGAS, 1957). Charakteristisch sind die andauernde Euphorie und das häufige Lachen der Betroffenen, was zu der Bezeichnung „Lachender Tod“ führte (STÖCKLIN, 1967). Seitdem bei den Fore der Brauch, das Gehirn der Verstorbenen zu verzehren, erloschen ist, treten keine Kuru-Infektionen mehr auf (PRUISNER, 1995).

2.3.2 Klassische Creutzfeldt-Jakob-Krankheit (CJK, CJD)

Die Creutzfeldt-Jakob-Krankheit wurde erstmals Anfang der 20er Jahre des 20. Jahrhunderts von dem Kieler Neurologen Hans G. Creutzfeldt und dem Hamburger Neurologen Alfons M. Jakob beschrieben (CREUTZFELDT, 1920; JAKOB, 1921). Die klassische Form der CJK wird unterteilt in eine sporadische, eine familiäre und eine iatrogene Form. Die sporadische Form nimmt hierbei mit etwa 85 % aller Fälle den größten Anteil ein. Auf die familiäre Form entfallen etwa 10 bis 15 % und etwa 1 % der CJK werden iatrogen verursacht (RKI, 2001; BUDKA, 2001).

2.3.3 Sporadische Creutzfeldt-Jakob-Krankheit (sCJK, sCJD)

Die sporadische CJK (sCJK) stellt die häufigste menschliche TSE-Form dar. Sie betrifft in der Regel ältere Menschen über 60 Jahre (ANONYMOUS, 2001). Ihre Inzidenz beträgt 1 bis 1,5 pro 10⁶ Einwohner (AGUZZI, A., 2002.; CHAKTABORTY, 2005). Kennzeichnend ist eine bereits im Prodromalstadium rasch fortschreitende Demenz, begleitet von Sprachstörungen und Myoklonien. Im weiteren Verlauf kommen Hypo- und Akinese, Rigidität oder Spastik hinzu (AGUZZI, A., 2002). 90 % der Patienten versterben innerhalb eines Jahres, durchschnittlich beträgt die klinische Phase der Erkrankung etwa fünf Monate. Die häufigsten Todesursachen sind Pneumonie oder heftige Blutdruckabfälle aufgrund autonomer Regulationsstörungen (AGUZZI, A., 2002). Die Ursachen für das Entstehen der Erkrankung sind bislang ungeklärt (COLLINS et al., 2004).

2.3.3.1 Familiäre Creutzfeldt-Jakob-Krankheit (fCJK, fCJD)

10 bis 15 % aller CJK-Fälle lassen sich auf verschiedene autosomal-dominant vererbte Mutationen des Prionogenes zurückführen (VANDEVELDE et al., 1992). Etwa 100 Familien sind als Träger der familiären CJK-Mutationen bekannt (CHAKRABORTY, 2005).

2.3.3.2 Iatrogene Creutzfeldt-Jakob-Erkrankung (iCJK, iCJD)

Die iatrogen verursachte CJK-Form tritt am seltensten auf. Sie ist auf die Kontamination von Wachstums- und Geschlechtshormonpräparaten (Gonadotropin), Dura mater- oder Cornea-Transplantaten, Operationsinstrumentarium oder von Tiefenelektroden zur intrazerebralen Elektroenzephalogrammableitung mit CJK-Erregern zurückzuführen (DUFFEY, 1974; BERNOULLI et al., 1977; BROWN, 1988; BUDKA, 1997).

2.3.3.3 Neue Variante der Creutzfeldt-Jakob-Erkrankung (vCJK, vCJD)

1995 wurde von BRITTON et al. erstmals eine neue Variante der CJK (vCJK) beschrieben, die sich sowohl epidemiologisch wie auch klinisch und histopathologisch deutlich von den bis dato bekannten Formen unterscheiden lässt (BRITTON et al., 1995; WILL et al., 1996; AGUZZI, 2002). Zum einen fehlen bei der vCJK die für die klassischen Formen typischen EEG-Veränderungen, zum anderen weist das histologische Bild charakteristische Amyloidablagerungen, die sogenannten floriden Plaques, auf (WILL und ZEIDLER, 1996). Die vCJK betrifft häufig junge Patienten im Alter von durchschnittlich 30 Jahren (WILL, 2001). VALLERON et al. (2001) führen dies darauf zurück, dass bei Kindern und Jugendlichen die Durchlässigkeit des Darms besonders hoch ist und die oral aufgenommenen BSE-Erreger somit leichter eindringen können. Denkbar ist aber auch die altersabhängig unterschiedliche Exposition gegenüber dem Erreger oder eine altersabhängige Dauer der Inkubationszeit (GAHNI et al., 2000; GAHNI et al., 2002). COMOY et al. (2005) vertreten die These, dass Cofaktoren wie bakterielle Enteritiden zu einer gesteigerten Empfänglichkeit gegenüber einer vCJK-Infektion führen können. Die klinische Phase der vCJD ist gegenüber der sporadischen Form verlängert; sie beträgt durchschnittlich 14 Monate (ANONYMUS, 2002a). Initial finden sich häufig Psychosen und Persönlichkeitsstörungen sowie Dysästhesien und Ataxie. Die für die sporadische Form typische Demenz tritt bei der neuen Variante erst im späteren Verlauf auf (FEIDEN, 1998; AGUZZI, 2002). Histopathologisch findet man spongiforme

Veränderungen und Ablagerungen von Prionen, diese sind von einem pathognomonischen Ring aus spongiformen Veränderungen umgeben, den floriden Plaques.

Sowohl der zeitliche und geographische Zusammenhang beider Erkrankungen (ANONYMUS, 2002a; STOLTENBURG-DIDINGER, 2002), die auffällige Ähnlichkeit der Aminosäuresequenz und des Glycolisierungsmusters des BSE- und vCJK-Prions (COLLING et al., 1996), als auch die Ergebnisse von Infektionsversuchen an Mäusen (BRUCE et al., 1997) lassen eine orale Übertragung der BSE auf den Menschen als äußerst wahrscheinlich erscheinen. Bislang sind von der vCJK nur Patienten mit einer bestimmten Aminosäuresequenz des Prionproteins (Homozygotie an Codon 129 für Methionin) betroffen. Inwieweit eine Heterozygotie Methionin/Valin bzw. die Homozygotie Valin/Valin zu einer Resistenz gegenüber der Erkrankung oder lediglich zu einer deutlich verlängerten Inkubationszeit führt, ist noch unklar (DESLYS et al., 1997; ZEIDLER et al., 2000). Bisher weisen alle an vCJK erkrankten Patienten im Codon 129 eine Homozygotie für Methionin auf. Dieser Genotyp findet sich nur bei etwa einem Drittel der kaukasischen Bevölkerung (AGUZZI, A., 2002). Dies wirft besonders vor dem Hintergrund der bei Kuru beobachteten sehr langen Inkubationszeit die Frage auf, inwieweit Betroffene mit einem anderen Genotyp sich noch in der Inkubationszeit befinden.

Anders als bei BSE-erkrankten Rindern, findet man den Erreger bei vCJK-Patienten auch im Blut, in der Milz und in den Tonsillen (HILL et al., 1999; WADSWORTH et al., 2001; IRONSIDE et al., 2003).

2.3.4 Gerstmann-Sträussler-Scheinker-Syndrom (GSS)

1928 beschrieb der Nervenarzt Joseph G. Gerstmann eine „eigenartige hereditär-familiäre Erkrankung des Zentralnervensystems“ (GERSTMANN, 1928). 1989 folgte die Beschreibung des zu Grunde liegenden genetischen Defekts, einer Punktmutation (Prolin zu Leucin) an Codon 102 des Priongens, durch HSIAO und PRUISNER (1990). Mittlerweile sind noch weitere Mutationen bekannt, die zu diesem Krankheitsbild führen können (zum Beispiel 105: Prolin zu Leucin, 117: Alanin zu Valin,

198: Phenylalanin zu Serin, 212: Glutamin zu Prolin, 217: Glutamin zu Arginin) (BUDKA, 2001; AGUZZI, 2002). Bislang wurden etwa 50 Familien identifiziert, bei denen GSS-Mutationen auftreten (CHAKRABORTY, 2005). Die Dauer der klinischen Phase beträgt etwa fünf bis sieben Jahre (MASTERS et al., 1981; AGUZZI, 2002; CHAKRABORTY, 2005). Es lassen sich eine ataktische und eine dementielle Form der Erkrankung unterscheiden (HSIAO und PRUISNER, 1990). Die Inzidenz beträgt 1 pro 10^8 Einwohner pro Jahr (AGUZZI, 2002).

2.3.5 Fatale Familiäre Insomnie (FFI)

Die Erstbeschreibung der Fatalen Familiären Insomnie (FFI) bei einer norditalienischen Familie erfolgte 1986 durch LUGARESI. Bei dieser autosomal dominant vererbten Erkrankung treten neben den ausgeprägten Schlafstörungen vegetative, motorische und kognitive Störungen auf (LUGARESI, 1986; BUDKA, 2001). Nachdem die Erkrankung im Folgenden bei weiteren Familien in Italien auftrat, sind mittlerweile auch Fälle aus Frankreich und den USA bekannt. Bislang wurde die FFI-Mutation des Priongens bei neun Familien gefunden (CHAKRABORTY, 2005). Die Inzidenz kann auf etwa 1 von 10^8 Einwohnern pro Jahr geschätzt werden. Bisher lassen sich alle Fälle von FFI auf eine einzige Punktmutation (Aspartat zu Asparagin) an der Position 178 zurückführen (AGUZZI, 2002). Auffallend bei der FFI ist, dass in untersuchtem Hirnmaterial kein oder nur sehr wenig PrP^{RES} nachweisbar ist und dass sowohl die spongiformen Veränderungen im Hirngewebe, als auch die Ablagerungen von Prionen nur sehr gering ausgeprägt sind oder teilweise völlig fehlen (AGUZZI, 2002).

Die Symptome treten etwa mit vierzig bis sechzig Jahren auf. Zuerst leiden die Patienten an Schlaflosigkeit, traumähnlichen Episoden und Gedächtnisschwund, zunehmend verstärken sich dann auch motorische und autonome Störungen (AGUZZI, 2002).

2.3.6 Diagnose humaner TSE-Erkrankungen

Da die klinischen Symptome in der Regel starke Ähnlichkeit mit Demenzen anderer Genese aufweisen, reichen sie für eine sichere Diagnosestellung nicht aus. Auch die klinische Diagnose kombiniert mit EEG- (Elektroenzephalogramm)- und MRT (Magnetresonanztomographie)-Befunden stellt lediglich eine Verdachtsdiagnose dar (ANONYMUS, 2002a; POSER et al., 2003; COLLINS et al., 2004). Veränderungen im Liquor, wie zum Beispiel die Erhöhung der Neuronenspezifischen Enolase oder des 14.3.3-Proteins, sind wertvolle diagnostische Marker, reichen aber ebenfalls zur eindeutigen Identifizierung der Erkrankung nicht aus (AGUZZI, 2002; POSER et al., 2003). Derzeit noch in der Erprobungsphase befindliche Testsysteme sollen mit Hilfe von Veränderungen im Blut, wie zum Beispiel dem Anstieg der mRNA von Alpha-Hämoglobin-Stabilizing-Protein, zur präklinischen Diagnose humaner TSE-Erkrankungen eingesetzt werden (VEITH et al., 2005). Bei hereditären humanen TSE-Erkrankungen können zusätzlich Familienanamnese und Sequenzierung des gesamten offenen Leserasters des Prions Aufschluss bringen (AGUZZI, 2002). Die Hirnbiopsie sollte aufgrund ihres hohen Risikos nur als letztes Mittel dienen. Bei Verdacht auf vCJK kann eine Diagnose durch Tonsillenbiopsie erfolgen (ANONYMUS, 2002a). Bildgebende Verfahren sind ebenfalls ein häufig gebrauchtes diagnostisches Hilfsmittel, besonders bei der neuen Variante der CJK, denn dort ist eine spezifische Veränderung – das Pulvinarzeichen – beschrieben (ANONYMUS, 2002a). Eine letztendliche Klärung der Diagnose kann nur mit Hilfe der postmortalen Untersuchung des Hirngewebes erfolgen (ANONYMUS, 2002a).

2.4 TSE aus fleischhygienerechtlicher Sicht

Hochrechnungen zufolge gelangten im Zeitraum zwischen 1985 und 1995 über 700 000 BSE-infizierte Rinder im Vereinten Königreich in die Lebensmittelkette (ANDERSON et al., 1996; ANONYMUS, 2000a). Verlässliche Daten zur Expositionsabschätzung in Deutschland liegen derzeit nicht vor (ANONYMUS, 2003a). Nachdem man von einer oralen Übertragung des BSE-Erregers auf den Menschen ausgehen musste, publizierte das Scientific Steering Committee (SSC) bereits 1998 eine auf intracerebralen Inokulationsversuchen an Mäusen basierende Liste, in der die Infektiosität der unterschiedlichen Gewebe BSE-kranker Rinder, Schafe und Ziegen bewertet wurde (Tabelle 2).

Tabelle 2: Potentielle BSE-Infektiosität von Organen gemäß SSC

Infektiosität	Schafe, Ziegen	Rinder
Hoch	Gehirn, Auge, Rückenmark, Spinalganglien, Wirbelsäule (K), Kopf ohne Zunge (K), Lunge (K)	Gehirn, Auge, Rückenmark, Spinalganglien, Wirbelsäule (K), Dura mater (K), Hypophyse (K), Kopf ohne Zunge (K), Lunge (K)
Mittel	Darm von Duodenum bis Rektum, Mandeln, Milz, Plazenta, Uterus, foetales Gewebe (K), Nebenniere, Cerebrospinalflüssigkeit, Lymphknoten	Darm von Duodenum bis Rektum, Mandeln, Plazenta, Uterus, foetales Gewebe (K), Nebenniere, Cerebrospinalflüssigkeit, Lymphknoten
Niedrig	Leber, Pankreas, Thymus, Knochenmark, Röhrenknochen, Nasenschleimhaut, periphere Nerven	
Nicht nachgewiesen	Skelettmuskel, Herz, Niere, Kolostralmilch, Milch, beim Zerlegen anfallendes Fett, Speicheldrüse, Speichel, Schilddrüse, Euter, Ovarien, Hoden, Nebenhoden, Knorpel, Kollagen, Haut, Haare, Blut, Fibrin, Serum, Harn, Gallenflüssigkeit, Kot	

K: hohe Infektiosität ergibt sich aus der Gefahr der Kontamination mit ZNS-Gewebe

Aufgrund der wissenschaftlichen Erkenntnisse wurden diese Gewebe aus der Lebens- und Futtermittelkette entfernt. Dieses Entfernen der spezifizierten Risikomaterialien stellt die wichtigste Maßnahme im Hinblick

auf den vorbeugenden Schutz der Gesundheit von Mensch und Tier dar (WIEMER, 2002).

Gemäß der Verordnung (EG) Nr. 1974/2005 der Kommission vom 2. Dezember 2005 und der Verordnung (EG) Nr. 999/2001 des Europäischen Parlaments und des Rates werden EU-weit folgende Gewebe des Rindes als spezifiziertes Risikomaterial eingestuft: Schädel ohne Unterkiefer, aber einschließlich Hirn und Augen, und das Rückenmark von über 12 Monate alten Rindern, Wirbelsäule ohne Schwanzwirbel, Dorn- und Querfortsätze der Hals-, Brust- und Lendenwirbel und Crista sacralis mediana sowie Kreuzbeinflügel, einschließlich der Spinalganglien von über 30 Monate alten Rindern, Tonsillen sowie Darm von Duodenum bis Rektum und Mesenterium von Rindern aller Altersklassen.

Diese spezifizierten Risikomaterialien sind gemäß der Verordnung (EG) Nr. 999/2001 bei der Schlachtung zu entfernen, zu kennzeichnen und als Material der Kategorie 1 unschädlich zu beseitigen. Zusätzlich verbietet die VO (EG) 1326/2001 die Verwendung von Wiederkäuer-Knochen zur Herstellung von Separatorenfleisch, womit der Eintrag eventuell anhaftenden ZNS-Gewebes verhindert werden soll. Aufgrund der besonders hohen Erregerdichte kommt dem Gewebe des Zentralen Nervensystems eine entscheidende Rolle in der Infektionskette zu. Mit Hilfe oraler Infektionsversuche an Makaken und einem theoretischen Rechenmodell, bei dem die Speziesbarriere zwischen Mensch und Rind mit einbezogen wurde, konnte mittlerweile berechnet werden, dass Menschen 1,5 kg ZNS-Gewebe eines im präklinischen Stadium an BSE erkrankten Rindes verzehren müssten, um sich zu infizieren. Selbst wenn man keine Speziesbarriere berücksichtigt, müssten Menschen noch immer 150 g ZNS-Material mit der Erregerdichte eines noch nicht klinisch auffälligen Tieres aufnehmen (LASMEZAS et al., 2005). Das Gehirn eines ausgewachsenen Rindes wiegt etwa 500 g, hinzukommen rund 200 g Rückenmarksgewebe (LASMEZAS et al., 2005). Allerdings ist es noch völlig offen, ob und wie sich die kumulative Aufnahme geringer Erregerdosen auf die Erkrankungswahrscheinlichkeit des Menschen auswirkt (ANONYMUS, 2003a).

2.4.1 Verwendung von Risikomaterialien in Fleischerzeugnissen

In Deutschland durfte Rinderhirn bis 2001 ausschließlich in hitzebehandelten Fleischerzeugnissen verwendet werden; Hackfleischerzeugnisse durften generell keine anderen tierischen Gewebe als Muskulatur und Fett enthalten (Deutsches Lebensmittelbuch, 1999; HILDEBRANDT und RAUSCHER, 2002). Hirngewebe stellt einen preiswerten und ernährungsphysiologisch wertvollen Emulgator in Fleischerzeugnissen dar (HILDEBRANDT et al, 2001). Während in Deutschland in Koch- und Brühwürsten überwiegend Schweinehirn zu diesem Zweck genutzt wurde, verwendete man besonders im Vereinigten Königreich auch Rinderhirn. Preisgünstige Beefburger konnten dort einen Rinderhirnanteil von bis zu 10 % enthalten (DEALLER und LACEY, 1990). Bis zur Änderung der Leitsätze des Deutschen Lebensmittelbuches im Oktober 2001, welches in Deutschland die Verkehrsauffassung fast rechtsverbindlich fixiert, waren darin auch Fleischerzeugnisse, insbesondere regionale Spezialitäten aufgeführt, die Hirn als Zutat beinhalten konnten. Allerdings war in keiner Rezeptur zwingend der Gebrauch von Rinderhirn vorgeschrieben. In der Regel wurde wahlweise Rinder- oder Schweinehirn verwendet. Schweinehirn ist bei der Schlachtung einfach zu gewinnen, da es durch die vorgeschriebene Spaltung des gesamten Schlachtkörpers leicht zugänglich ist. Für die Gewinnung von Rinderhirn muss zunächst der Schädel eröffnet werden, was einen erheblichen zusätzlichen Arbeitsaufwand darstellt (HILDEBRANDT et al., 2001). Bregen- oder Brägenwurst enthielt je nach Ortsüblichkeit entweder Schweine- oder Rinderhirn oder wurde ganz ohne Hirn-Zusatz hergestellt. Die Hirnwurst enthielt dagegen immer Hirn, wahlweise von Schwein und/oder Rind. Außerdem wurde Rinderhirn auch gebacken, als Pastete oder in Form einer Hirn-Suppe verzehrt. Diese Nahrungsmittel sollten zur Stärkung von Kranken beitragen. Die VO (EG) 999/2001 verbietet die Nutzung von Rinderhirn von über 12 Monate alten Tieren. Seit der Änderung der Leitsätze 2001 sind dem entsprechend keine Rezepturen mit Rinderhirn mehr gelistet. Generell ist die Verarbeitung von Hirngewebe unabhängig von Alter und Tierart nicht mehr in den Leitsätzen (Deutsches Lebensmittelbuch, 1999, Leitsatz-Nummer: LS.-Nr. 1.61) vorgesehen. Der Einsatz von Schweine- oder Geflügelhirn

stellt somit eine Abweichung von der Verkehrsauffassung dar und ist kennzeichnungspflichtig (BERG et al., 2002).

Eine Infektionsgefahr kann theoretisch auch von Produkten ausgehen, die Rinderlunge oder -herz enthalten, welche mit ZNS-Bestandteilen kontaminiert sein können. Die Lunge fällt heute nicht mehr unter die Begriffsdefinition der „Innereien“ des Deutschen Lebensmittelbuches. Allerdings darf sie in regionalen Gerichten weiterhin als Zutat verwendet werden (LS.-Nr. 1.51 und 1.52). Vornehmlich im süddeutschen Raum und Österreich werden Lungen zu regionalen Gerichten wie „Saure Lunge“, Lungenwurst oder Lungenhaschee verarbeitet. Herzmuskulatur zählt zu den Innereien und wird für Herzwurst oder Mortadella verwendet. Gelegentlich wird Herzmuskulatur auch zu dem Gericht „Saure Lunge“ zugefügt. In den Leitsätzen wird allerdings festgelegt, dass bis zur wissenschaftlichen Klärung der TSE-Infektiosität die Verwendung von Lunge und Herz bolzenschussbetäubter Tiere nicht der allgemeinen Verbrauchererwartung entspricht (LS.-Nr. 1.51 und 1.52). Von Lunge und Herz elektrobetäubter Rinder geht kein erhöhtes BSE-Risiko aus, da beide Organe *per se* kein Risikomaterial darstellen (SCC, 2002). Theoretisch kann auch das Blut bolzenschussbetäubter Rinder mit ZNS-Emboli kontaminiert sein, gegenwärtig wird in Deutschland allerdings ausschließlich Schweineblut zu Lebensmitteln verarbeitet (HILDEBRANDT und RAUSCHER, 2002).

Sämtliche Rinderdärme zur Umhüllung von Würsten stammen aus anerkannt BSE-freien Gebieten (HILDEBRANDT und RAUSCHER, 2002).

2.4.2 Schlachttechnologisch bedingte Kontamination

Eine bedeutende Rolle spielt heute die unbeabsichtigte Kontamination von Muskelfleisch mit ZNS-Gewebe. Die Rinderschlachtung beinhaltet eine Reihe von kritischen Prozesspunkten, an denen es zu einer Kontamination der Muskulatur oder der inneren Organe mit Zentralem Nervengewebe kommen kann. Beispielhaft seien hier nur die Bolzenschussbetäubung (ANIL et al., 1999; MARTIN et al., 2001; MOJE et al., 2001; HORLACHER et al., 2002a), das Zersägen des Tierkörpers in zwei Hälften (KELLY et al., 2000; DALY, 2002; TROEGER et al., 2002; BÄUERLE et al., 2004), das

Entfernen des Rückenmarks (SCHWÄGELE et al., 2002) und das Kopfabsetzen sowie die Kopfbearbeitung (TROEGER et al., 2002) genannt. Auch die Kreuzkontamination mehrerer Schlachttierkörper durch Arbeitsgeräte, Personal und Spritzwasser (HELPS et al., 2001) ist belegt. Besonders betroffen von ZNS-Kontaminationen sind Fleischabschnitte aus dem Bereich der gespaltenen Wirbelsäule und des gesamten Rinderkopfes (ANONYMUS, 2002d). Am Tierkörper selbst ist wiederum die Muskulatur der Nackenregion besonders häufig mit ZNS-Bestandteilen behaftet, da die Längsspaltung am hängenden Tierkörper von caudal nach cranial erfolgt, (SCHWÄGELE et al., 2002). Zusätzlich zur Kontamination mit Rückenmarks- und Hirngewebe spielt bei Fleischzuschnitten aus dem Bereich der Wirbelsäule auch das eventuelle Verbleiben der sympathischen Grenzstrangganglien und Spinalganglien eine Rolle. Besonders der *Musculus longus colli* und das Filet (innere Hüftmuskulatur Psoasmuskulatur, Rückenbeugemuskulatur; *Musculus iliopsoas* und *Musculus psoas minor*) können hiervon betroffen sein (EGGERS, 2003).

Auch das Fleisch des Rinderkopfes kann durch austretende ZNS-Bestandteile und abtropfenden *Liquor cerebrospinalis* kontaminiert sein. Gemäß LS-Nr. 1.113 zählt Kopffleisch zum so genannten „sehnenreichen Rindfleisch“ und wird in erster Linie in bestimmten Brühwürsten verwendet, für die ein sehnenreiches Ausgangsmaterial erwünscht und erlaubt ist. Lippenfleisch kommt als Zutat in Würsten oder im so genannten Flotzmaulsalat (Ochsenmaulsalat) vor.

Untersuchungen haben gezeigt, dass auch von Rinderzungen ein Infektionsrisiko ausgeht, da bei der Gewinnung von Rinderzungen gemäß EU-rechtlicher Vorgaben häufig Reste der Tonsillen, die ebenfalls zum spezifizierten Risikomaterial zählen, an der Zunge verbleiben (KÜHNE et al., 2005). Rinderzunge wird entweder gekocht und/oder gepökelt und eingedost bzw. auch frisch zum Verkauf angeboten. In Brühwürsten wird Zunge ohne Schleimhaut dem Fleisch bis zu 1 % des Endprodukts gleichgestellt (Ls.-Nr. 1.52).

2.4.3 Aktuelle Gesetzeslage und Verbraucherschutz

Seit 1990 zählt BSE gemäß der Entscheidung 90/134/EWG EU-weit zu den anzeigepflichtigen Krankheiten. Durch die Verordnung (EG) Nr. 999/2001 in Verbindung mit der nationalen BVD-Verordnung (Verordnung zum Schutz der Rinder vor einer Infektion mit dem BVD-Virus und zur Änderung TSE-rechtlicher Vorschriften vom 11.12.2008) wird sichergestellt, dass alle für den menschlichen Verzehr geschlachteten Rinder ab 48 Monaten sowie alle aus besonderem Anlass krank- oder notgeschlachteten Rinder ab einem Alter von 30 Monaten auf BSE untersucht werden müssen. Zusätzlich müssen verendete und getötete Rinder stichprobenartig überprüft werden. Erwähnt werden sollte in diesem Zusammenhang, dass bislang mindestens 19 BSE-Infektionen bei Rindern unter 30 Monaten belegt sind. Trotzdem geht das Bundesinstitut für Risikobewertung (BfR) davon aus, dass die Anhebung der Altersgrenze kein erhöhtes Risiko für den Verbraucher bedeutet.

Das Lebensmittel- und Futtermittelgesetz (LFGB) vom 01.09.2005 besagt in § 5, dass es verboten ist, Lebensmittel für andere derart herzustellen oder zu behandeln, dass ihr Verzehr gesundheitsschädlich ist. Unter den Begriff des Herstellens fallen hierbei das Gewinnen, einschließlich des Schlachtens oder Erlegens lebender Tiere, deren Fleisch als Lebensmittel zu dienen bestimmt ist, das Herstellen und das Zubereiten. Nach § 58 stellt ein Verstoß gegen § 5 Abs. 1 Satz 1 eine Straftat dar. Hieraus kann zunächst gefolgert werden, dass ein Lebensmittelhersteller, der mit ZNS-Gewebe kontaminiertes Fleisch in Verkehr bringt, eine Straftat begeht.

Dem amtlichen Tierarzt obliegt es, dafür Sorge zu tragen, dass der Lebensmittelunternehmer alle nötigen Maßnahmen trifft, um bei der Schlachtung (einschließlich der Betäubung) oder der Entfernung des spezifizierten Risikomaterials eine Kontamination des Fleisches mit spezifiziertem Risikomaterial zu verhindern. Ebenso hat er zu kontrollieren, dass die Vorschriften für die Beseitigung von spezifiziertem Risikomaterial ständig eingehalten werden. Der amtliche Tierarzt hat weiterhin zu prüfen, ob die Verfahren der Lebensmittelunternehmer so weit wie möglich sicherstellen, dass Fleisch kein spezifiziertes Risikomaterial enthält. Ferner regelt Kapitel V des LFGB, dass Fleisch für genussuntauglich zu erklären ist, wenn es spezifiziertes Risikomaterial

enthält, sofern dies nicht nach Gemeinschaftsvorschriften zulässig ist. Hieraus kann zunächst geschlossen werden, dass der Gesetzgeber eine Nulltoleranz für spezifiziertes Risikomaterial fordert. Gleichzeitig wird durch den Wortlaut „soweit wie möglich“ auf ein unvermeidbares Restrisiko hingewiesen. Der Lebensmittelunternehmer handelt also gesetzeskonform, wenn er ausreichende Maßnahmen zur Vermeidung einer Kontamination trifft. Hierbei wäre die Festlegung eines Grenzwertes für den ZNS-Gehalt oberhalb der Nachweisgrenze der gängigen Testverfahren, der den systematischen Zusatz bei der Herstellung der Erzeugnisse markiert, für die nachfolgende vor-Ort-Kontrolle und die weitergehenden ordnungsbehördlichen Maßnahmen hilfreich (BERG et al., 2002).

Die VO (EG) 1139/2004 der Kommission vom 27.06.2003 zur Änderung der VO (EG) 999/2001 beschreibt das Kontrollsystem, über das ein Schlachthof bzw. ein Zerlegebetrieb verfügen muss, wenn dort Kopffleisch von über 12 Monate alten Rindern gewonnen werden soll. Darin wird vorgeschrieben, dass die Gewinnung räumlich getrennt erfolgen muss. Falls der Kopf vom Haken genommen wird, müssen Einschussloch und Hinterhauptsloch versiegelt werden. Von Köpfen mit beschädigten oder entfernten Augen bzw. anderweitigen Beschädigungen, die eine Kontamination ermöglichen, darf kein Kopffleisch gewonnen werden. Zusätzlich müssen Stichproben zum Nachweis von ZNS-Gewebe eingeführt werden.

Im ministeriellen Schreiben des Bayerischen Staatsministeriums für Gesundheit, Ernährung und Verbraucherschutz vom 01.10.2003 heißt es, dass Köpfe von einem Schlachtbetrieb nur abgegeben werden dürfen, wenn sie gemäß den Anforderungen der VO (EG) 999/2001 und 1139/2003 behandelt worden sind und das Verbringen der Köpfe amtlich überwacht wird. Der Zerlegebetrieb wiederum muss ebenfalls die Anforderungen der VO (EG) 999/2001 erfüllen. Dies bedeutet, der Arbeitsablauf muss dargestellt werden und aus diesem muss ersichtlich sein, dass eine Verunreinigung des Fleisches mit spezifiziertem Risikomaterial ausgeschlossen ist; das heißt, dass alle praktischen Möglichkeiten zur Vermeidung von Verunreinigungen des Fleisches mit ZNS-Material genutzt werden. Im Rahmen des Stichprobenplans sollen

Köpfe-abgebende Betriebe wöchentlich mindestens drei Köpfe und Köpfe-gewinnende Zerlegebetriebe mindestens zwei Köpfe pro Woche und Lieferant sowie stichprobenartig das gewonnene Fleisch testen lassen. Diese Probenanzahl kann beim Erreichen ausschließlich negativer Ergebnisse verringert werden. Sollten positive Ergebnisse auftreten, so ist die Probenanzahl wieder zu erhöhen. Beim Auftreten positiver Befunde hat der Betrieb sofort Maßnahmen zu ergreifen, die Hygiene bei Beförderung und Gewinnung des Kopffleisches so zu verbessern, dass die Untersuchungsergebnisse wieder weitestgehend negativ werden. Vereinzelt positive Befunde sind also zu tolerieren. Der amtliche Tierarzt muss die Gefahr vermeidbarer Kontaminationen mit ZNS dem zuständigen Veterinäramt mitteilen.

Die Arbeitsgruppe Fleisch- und Geflügelfleischhygiene und fachspezifische Fragen von Lebensmitteln tierischer Herkunft benennt eine andere Probenanzahl (Stichprobenplan im Schlachtbetrieb zur Untersuchung von Rinderköpfen, von denen Kopffleisch in Zerlegungsbetrieben gewonnen werden soll. Sitzung vom 4. und 5.11.2005 in Erfurt): Zugelassene Schlachtbetriebe sollen wöchentlich fünf Kopftupfer untersuchen. Auch hier wird den Betrieben die Möglichkeit eingeräumt, die Probenanzahl in Abhängigkeit von Schlachtzahlen und den hygienischen Bedingungen vor Ort zu variieren. Genaue Zahlen für einen reduzierten Probenumfang werden hier nicht genannt. Auf den Umfang der Probenahme im Zerlegebetrieb und auf eventuelle Maßnahmen im Falle positiver Ergebnisse wird hier nicht eingegangen. Von der Arbeitsgruppe werden erstmals auch Lokalisationen der Probenahme (Stirn, Backe, Halsfett) vorgegeben.

2.4.4 Wirtschaftliche Konsequenzen

Die direkten Entsorgungskosten im Vereinten Königreich für mehr als 1,4 Millionen notgeschlachtete Rinder beliefen sich auf mindestens 280 Millionen DM (rund 143 Millionen Euro). Als Entschädigung für die betroffenen Landwirte wurden rund 11 Milliarden DM (rund 6 Milliarden Euro) ausbezahlt (JONAS und LACHMANN, 1999). Zusätzlich veränderte sich nachfolgend auch das Konsumentenverhalten. Auf dem Höhepunkt

der BSE-Krise reduzierte sich der Rindfleischkonsum in Großbritannien um 19 %, in Italien um 9 %, in Deutschland um 8 % und in Frankreich um 7 %. In Folge dieser Veränderungen kam es zu einem Preisverfall für Rindfleisch von bis zu 15 % (JONAS und LACHMANN, 1999). Der Preisrückgang betrug, kumuliert auf alle EG-Mitgliedsländer, rund 1,5 Milliarden DM (HAMBRÜCHEN, 1998). Doch nicht nur wirtschaftliche Einbußen sind zu verzeichnen, auch die ergriffenen Präventivmaßnahmen sind kostenintensiv. In den Jahren 2001 bis 2004 wurden an deutschen Schlachthöfen rund 1,6 Milliarden Euro für BSE-Schnelltests ausgegeben (SCHUH, 2006).

2.5 ZNS-Nachweisverfahren

Der Nachweis von ZNS-Gewebe in Fleischerzeugnissen stellt eine besondere Herausforderung dar, da es sich bei diesen Produkten in der Regel um ein Gemisch unterschiedlicher Zutaten und technologischer Hilfsstoffe handelt. Die Zutaten sind oft stark zerkleinert und einer Haltbarmachung durch Erhitzung unterzogen worden. Die histologische Gewebeuntersuchung ist mittlerweile durch neu entwickelte, auf der Verwendung von ZNS-spezifischen Markersubstanzen basierende, Nachweisverfahren abgelöst worden. Für den Einsatz dieser Markersubstanzen sind ausreichend hohe Spezifität und Sensitivität des jeweiligen Markers für ZNS-Material Voraussetzung. Als mögliche Markersubstanzen für das ZNS-Gewebe eignen sich Stoffwechselprodukte, Struktur- und Stoffwechselproteine sowie Produkte der gewebespezifischen Genexpression.

Eine Tierartendifferenzierung bezüglich des ZNS-Gewebes der fleischhygienerechtlich gemaßregelten Tierarten (Rind, Schaf und Ziege) und anderen Spezies ist zudem nur mit wenigen Nachweisverfahren möglich. Bislang gelingt es keinem Verfahren außerdem auch das Alter des Tieres, von dem das ZNS-Gewebe stammt, zuverlässig zu bestimmen.

2.5.1 Cholesterin als Markersubstanz

Cholesterin ist ein Strukturlipid tierischer Zellmembranen. Somit handelt es sich zunächst um keine ZNS-spezifische Substanz, jedoch ist der Cholesterin-Gehalt im ZNS-Gewebe deutlich höher als in anderen Organen, Muskulatur oder Fettgewebe. Lediglich Lebergewebe und Eigelb weisen ebenfalls einen hohen Cholesteringehalt auf (SOUCI et al., 1994). In Ahnlehnung an die Amtliche Sammlung von Untersuchungsverfahren nach § 35 des LMBG (bzw. jetzt § 64 LFGB) verwendeten LÜCKER et al. 1999 die enzymatische Bestimmung des Cholesteringehaltes in Fleischerzeugnissen mit Hilfe eines kommerziell erhältlichen Testsystems als Screeningverfahren zum Nachweis von zentralnervösem Gewebe. Das Verfahren beruht auf der 3- β -Oxidation von Cholesterol zu Δ^4 -

Cholestenon und ermöglicht die sichere Detektion von 1 % Rückenmark bzw. 5 % Hirngewebe (NIETSCH et al., 2001). Allerdings müssen bei dieser Methode für einige Fleischerzeugnisse, die aufgrund der verwendeten Zutaten, wie zum Beispiel Leber, einen erhöhten Cholesteringehalt aufweisen, individuelle Cut off-Werte definiert werden. Diese Werte müssen entsprechend hoch angesetzt werden, so dass in Folge Fleischerzeugnisse mit geringem ZNS-Zusatz unter die Nachweisgrenze des Verfahrens fallen (LÜCKER et al., 1999; LÜCKER et al., 2001).

Die enzymatische Bestimmung von Cholesterin kann zusätzlich mit dem immunochemischen Nachweis von Neuronenspezifischer Enolase (NSE) im Westernblot oder durch Immunhistochemie zum so genannten Integrierten Verfahren (INV) kombiniert werden. Dieses vereint den Vorteil eines schnellen, preisgünstigen Screeningverfahrens mit einer erhöhten Sensitivität durch die Bestätigungs-Methode (LÜCKER et al., 1999; LÜCKER et al., 2000; LÜCKER et al., 2001).

2.5.2 Glial Fibrillary Acidic Protein

Das Glial Fibrillary Acidic Protein (GFAP, saures Gliafaserprotein) gehört zu den Intermediärfilamenten der neuronalen Astrogliazellen. In der Humanmedizin wird GFAP verwendet, um Erkrankungen des ZNS, wie Astrogliose, Hirntumore und Hirntraumata zu diagnostizieren (ENG und DEARMOND, 1983; ENG, 1985). Auch bei spongiformen Enzephalopathien erhöht sich in Folge der Gliose der GFAP-Gehalt im ZNS (PRUISNER, 1993). Der GFAP-Gehalt im Rückenmark ist etwa dreimal höher als der im Hirngewebe. SCHMIDT et al. (2001) beziffern abhängig von der Messmethode den GFAP-Gehalt bei gesunden Rindern auf 2220 ng/mg im Rückenmark und 710 ng/mg im Gehirn bzw. 1724 ng/mg und 574 ng/mg.

Das saure Gliafaserprotein GFAP kann mittels Enzymimmunoassay nachgewiesen werden (SCHMIDT et al., 1999). Dieser Test weist ZNS-Gewebe in Blut, Muskelgewebe und in Fleischprodukten mit einer Nachweisgrenze von 0,2 – 1 µg/ml nach. Durch die Verwendung einer fluoreszierenden Substanz (GFAP-F-ELISA) konnte eine Steigerung der

Sensitivität um das 10 bis 30-fache im Vergleich zu dem Immunosorbent-ELISA erreicht werden (SCHMIDT et al., 2001).

In der Lebensmittelüberwachung wird GFAP hauptsächlich mit ELISA-Verfahren, aber auch im Westernblot-Verfahren oder in der Polymerasekettenreaktion (PCR) nachgewiesen. Gegenwärtig sind drei GFAP-basierte Testsysteme für den ZNS-Nachweis kommerziell erhältlich. Dabei handelt es sich um phänotypische, semiquantitative GFAP-Enzymimmunoassays: der RIDASCREEN[®] Risk Material 10/5 (R-biopharm, Darmstadt) zum Nachweis von bis zu 0,1 % ZNS-Material in rohen Fleisch- und Wurstwaren, sowie auf kontaminierten Oberflächen; der RIDASCREEN[®] Risk Material (R-biopharm) zum Nachweis von bis zu 0,2 % ZNS-Gewebe ausschließlich in hitzebehandelten Lebensmitteln; sowie der Brainostic[™] (Schebo[®], Gießen), der sowohl für natives wie auch hitzebehandeltes Untersuchungsmaterial und für Oberflächentupfer verwendet werden kann und dessen Nachweisgrenze bei 0,1 % ZNS-Material liegt. Diese drei Nachweisverfahren ermöglichen jeweils eine semiquantitative Aussage über den ZNS-Gehalt des Untersuchungsmaterials. Da der GFAP-Gehalt im Rückenmark jedoch um den Faktor 3 bis 4 höher liegt als im Gehirn, ist eine Quantifizierung abhängig von den ZNS-Bestandteilen nur grob abschätzbar (SCHMIDT et al., 1999b; HORLACHER et al., 2002b). SCHURR et al. (2003) und KUNATH et al. (2005) berichten über falsch-positive Ergebnisse mit dem RIDASCREEN[®]-Test bei stark bluthaltigem Probenmaterial. SCHMIDT et al. (1999) konnten ihren Untersuchungen hingegen keine negative Beeinflussung der Testergebnisse durch Blutbeimischungen feststellen. Eine Hitzebehandlung des Untersuchungsmaterials bei 80° C für 20 Minuten beeinträchtigte den GFAP-Nachweis im ELISA-Verfahren nicht (SCHMIDT et al., 2001). Allerdings erhöht eine stärkere Hitzebehandlung von 120° C für 20 Minuten die Nachweisgrenze auf 0,5 % ZNS-Gewebe (AGAZZI et al., 2002). SCHMIDT et al. (2001) fanden außerdem, dass der Zusatz von Gewürzen den GFAP-Nachweis behindert. KELLY et al. (2000) konnten nachweisen, dass GFAP gegenüber autolytischen Prozessen widerstandsfähiger ist als andere zelluläre Proteine.

Die messenger-RNA (mRNA) des GFAP kann ebenfalls als Markersubstanz zum Nachweis von ZNS-Gewebe mittels genotypischer

PCR-Verfahren genutzt werden. LANGE et al. (2002) kombinierten den Nachweis von GFAP-mRNA mit dem von MBP-mRNA in einer Reversen Transkriptase-PCR (RT-PCR), während SEYBOLDT (2003) ausschließlich die GFAP-mRNA mittels RT-PCR-Verfahren nachwies. Die mRNA in Fleischerzeugnissen zeichnet sich durch eine überraschend gute Stabilität auch über längere Lagerungszeiten hinweg oder nach der Hitzebehandlung des entsprechenden Lebensmittels aus (LANGE et al., 2002; SEYBOLDT et al., 2003). Untersuchungen zur Gewebespezifität zeigten eine quantitative Relation des GFAP-mRNA-Gehaltes von 530 in Rückenmark zu 80 in Hirngewebe und 1 in peripheren Nerven (SCHÖNENBRÜCHER et al., 2004a). Die geringen GFAP-Gehalte in anderen Organen sind eine Folge der unterschiedlichen Splice-Varianten des GFAP-Genes und auch der unterschiedlich starken Innervierung der Organe (SCHÖNENBRÜCHER et al., 2004b). Die schon auf Proteinebene beobachtete ungleichmäßige Verteilung von GFAP kann auch für dessen mRNA bestätigt werden. Durch den kombinierten Nachweis der mRNA von GFAP und MBP mit Hilfe der Primer „GFAP₈₇“ und „MBP₅₁“ ist die Spezies-spezifische Detektion von ZNS-Gewebe der Tierarten Rind, Schaf und Ziege möglich (LANGE et al., 2002). Die Methode von SEYBOLDT et al. (2003) weist mit Hilfe der Oligonukleotidprimer „GFAPforw“ und „GFAPrev“ ein 168 bp großes, Spezies-unspezifisches Fragment der GFAP-mRNA nach. Anschließend kann zusätzlich eine Tierartendifferenzierung mittels Restriktionsfragmentlängenpolymorphismus (RFLP) mit den Restriktionsenzymen Alu I, Hae III, Mbo I, Msp I und Sst I durchgeführt werden. Untersuchungen von nativem Rindergewebe mit diesem Verfahren erbrachten bei zerkleinertem Herz-, Muskel- und Rückenmarkgewebe über eine Lagerungsperiode von sieben Tagen positive, 168 bp große, GFAP-mRNA Signale. Erst nach Einwirkung von Hitze (70° C, 20 min.) waren die Signale von Herz- und Muskelgewebe nicht mehr detektierbar. Mittels der im RFLP verwendeten Restriktionsenzyme war eine Unterscheidung der ZNS-Gewebe der Tierarten Schaf, Rind, Pferd und der Tiergruppen Schwein und Wildschwein sowie Damwild, Rehwild und Rotwild möglich (SEYBOLDT et al., 2003).

SCHÖNENBRÜCHER et al. (2004a) und ABDULMAWJOOD et al. (2005) entwickelten eine Reverse Transkriptase-Real Time-PCR zum quantitativen und Tierarten-spezifischen ZNS-Nachweis in rohen und hitzebehandelten Fleischerzeugnissen sowie aus Tupferproben. Die in diesem Verfahren verwendeten Oligonucleotidprimer „RTGcowM56F2a“ und „RTGcowM56R2a“ heften jeweils an Exonregionen und überspannen eine Intronregion, so dass die Amplifikation genomischer DNA verhindert wird. Die Nachweisgrenze des Verfahrens liegt bei $1,0 \times 10^{-12}$ g/PCR GFAP-cDNA, bzw. bei 0,01 % Rinderhirnzusatz in Kesselkonserven und 0,1 % in Dreiviertel- und Vollkonserven (SCHÖNENBRÜCHER et al., 2004; ABDULMAWJOOD et al., 2005). Dieses am Institut für Tierärztliche Nahrungsmittelkunde der Justus-Liebig-Universität Gießen entwickelte Nachweisverfahren bildet die Grundlage der hier vorliegenden Dissertation und wurde im Rahmen der eigenen Untersuchungen mit den zuvor beschriebenen, kommerziell erhältlichen, immunologischen Verfahren verglichen.

Weiterhin kann mit diesem Reverse Transkriptase-Real Time-Verfahren durch die Verwendung der identischen Methoden zur RNA-Isolation und zur Transkription, wie sie beim Nachweis von Wiederkäuer-ZNS angewendet werden, gekoppelt mit der Verwendung anderer Spezies-spezifischer Primer auch ZNS der Tierart Schwein im Syber-Green[®]-Assay nachgewiesen werden. SCHÖNENBRÜCHER et al. wiesen mit dieser Methode porcines ZNS bis zu 1 pg cDNA pro ZNS-Ansatz nach (SCHÖNENBRÜCHER et al., 2004b).

2.5.3 Neuronenspezifische Enolase

Die neuronenspezifische Enolase (NSE) gehört zu der Gruppe der 2-Phospho-D-glycerat-Hydrolasen. Im Gehirn wiesen MARANGOS und Mitarbeiter (1979) einen NSE-Gehalt nach, der je nach Hirnregion zwischen 10.000 ng und 17.500 ng NSE/mg lösliches Protein beträgt. Rückenmark enthält 13.000 ng NSE/mg (KATO et al., 1982). NSE ermöglicht den Nachweis von immunologischen ZNS-Gewebe bis zu Konzentrationen von 0,25 % (LÜCKER et al., 2000). Die Immunoreaktivität vom NSE wird durch Hitzebehandlung der Probenmatrix deutlich reduziert.

Sowohl LÜCKER et al. (2000) wie auch NAGEL et al. (2002) konnten in auf mindestens 100° C erhitzten Fleischerzeugnissen kein ZNS-Gewebe mehr mit NSE-basierten Verfahren nachweisen. AGAZZI et al. (2002) gelang der Nachweis von mit mehr als 2 % ZNS-Material versetzten Proben auch nach einer Hitzebehandlung von 120° C für 20 Minuten. HORLACHER et al. (2001 und 2002b) und BERG et al. (2002) stellten in ihren Untersuchungen mit einem NSE-Westernblott eine große Zahl (bis zu 50 %) falsch-positiver Befunde fest. Besonders Geflügelfleischerzeugnisse, aber auch Produkte aus Schweinefleisch waren von diesen falsch-positiven Resultaten betroffen. Ein kommerziell verfügbarer, NSE-basierter Westernblott-Test wurde daraufhin vom Markt genommen.

2.5.4 Weitere Markerproteine

HERDE et al. (2004) gelang durch Kombination der beiden Marker GFAP und Myelin Basic Protein (basisches Myelinprotein, MBP) der Nachweis von bovinem ZNS-Gewebe in hitzebehandelten Fleischerzeugnissen sowohl mittels Immunohistochemie als auch mittels Westernblotting. Diese Kombination der zwei Markersubstanzen vereint die Vorteile von GFAP, die hohe ZNS-Spezifität, und von MBP, die Spezies-Spezifität. Mit dieser Methode war es möglich, ovines und bovines ZNS nachzuweisen, während es zu keiner Kreuzreaktion mit porcinem ZNS-Gewebe kam. Syntaxin 1B kann ebenfalls zum Nachweis von ZNS herangezogen werden, allerdings nicht bei hitzebehandeltem Untersuchungsmaterial (SCHMIDT et al., 2001).

2.5.5 Nachweis ZNS-spezifischer Fettsäuren mittels

Gaschromatographie-Massenspektrometrie

Die Sphingolipide im Zentralen Nervensystem enthalten sogenannte ungewöhnliche Fettsäuren. NIEDERER und BOLLHALDER (2001) verwendeten ein Spezies-spezifisches Verfahren, das auf dem Nachweis und der Quantifizierung dieser ZNS-spezifischen Fettsäuren aus Sphingolipiden mit Hilfe der Gaschromatographie-Massenspektrometrie

(GC-MS) beruht. Nach der Extraktion der Gesamtlipide erfolgt zunächst eine Aufreinigung durch Festphasenextraktion und eine säurekatalysierte Umesterung zu Fettsäuremethylestern (FAME). Anschließend kann die Auftrennung, Identifizierung und Quantifizierung der FAME mittels GC-MS erfolgen. Geeignet zur Detektion von ZNS sind aufgrund ihrer Spezifität in erster Linie die Fettsäuren Cerebronsäure (C24OH) und Trans-Nervonsäure (C24:1), Docosahexaensäure (C22:6) und Lignocerinsäure (C24) (LÜCKER et al., 2002). Die Nachweisgrenze dieses Verfahrens wird mit 0,01 % (NIEDERER und BOLLHALDER, 2001) bzw. zwischen 0,1 % und 0,5 % (LÜCKER et al., 2004) angegeben. Werden in einer zweiten, nachgeschalteten Analyse zusätzlich die unterschiedlichen Verhältnisse der Fettsäuren zueinander gemessen, so ermöglicht dies in begrenztem Maß Rückschlüsse auf Spezies und Alter des verwendeten Tieres. Besonders der Anteil der Cis-Nervonsäure im Vergleich zur Trans-Nervonsäure unterliegt einem altersspezifischen Anstieg. LÜCKER et al. (2004) konnten mit dieser Methode Labor-intern hergestelltes Referenzmaterial aus unterschiedlichen Spezies- und Alters-Kategorien richtig identifizieren. Bei der Untersuchung von Feldproben zeigten sich aber infolge der heterogenen Verteilung der Fettsäuren im ZNS und der Verwendung von heterogen zusammengesetzten Ausgangsprodukten die analytischen Grenzen dieses Verfahrens (LÜCKER et al., 2004; GRIESSBACH et al., 2005).

2.5.6 Direkter Nachweis von PrP^{RES} in Fleischerzeugnissen

Einen völlig anderen Ansatz wählten SCHLOTTERMÜLLER et al. (2002), die PrP^{RES} direkt in Fleischerzeugnissen nachweisen. Mit Hilfe eines konventionellen, für natives Rinderhirn validierten, immunometrischen BSE-Schnelltests (Biorad, München) gelang der Nachweis von bis zu 0,2 % PrP^{RES} in Würsten mit definiertem Zusatz BSE-positiven Rinderhirns (SCHLOTTERMÜLLER, 2002; GRUNDMANN et al., 2004).

3 MATERIAL UND METHODEN

3.1 Allgemeine Ausstattung Technologie

3.1.1 Geräte

- Fleischwolf Elektrowolf 106 (K & G Wetter, Biedenkopf-Breitenstein)
- Kutter Schneidmischer 33 (K & G Wetter, Biedenkopf-Breitenstein)
- Diana-Tischkutter (Dianawerk, Kassel)
- Moulinette (Moulinex[®], Köln)
- Dosenverschließmaschine Typ V 10 Automat (Lanico Maschinenbau Otto Niemsch KG, Braunschweig)
- Waage Typ P3 (Mettler GmbH, Gießen)
- Vakuumgerät Autovac (K & G Wetter, Biedenkopf-Breitenstein)
- Autoklav (H+P Labortechnik, Oberschleißheim)
- Kerntemperaturmessgerät HI 92704 mit vier Messeinrichtungen bestehend aus vier Temperaturfühlern an teflonbeschichteten Kabeln und integriertem Drucker (Fuchs-Meßtechnik, Gütersloh)
- Kochkessel Typ ME/3 (Wilhelm Fessmann, Winnenden Brinkmannsweiler)

3.1.2 Verbrauchsmaterial

- Weißblechdosen 200 g und 125 g
- Dosendeckel
- Gefrierbeutel

3.2 Allgemeine Laborausstattung

3.2.1 Geräte

- Thermomixer 5436 / 5437 (Eppendorf, Hamburg)
- Analysenwaage Satorius analytic A 200 S (Satorius GmbH, Göttingen)
- Minischüttler MS 1 Minishaker (IKA-Labortechnik, Wilmington, USA)
- Fast Prep[®] 120 (Q-BIOgene, Heidelberg)
- Wasserbad 100°C Ser.Nr. 51134221 (Kottermann 3041, Uetze-Hänigsen)
- Stomacher Lab Blender Modell 400 (Seward, London, UK)
- Glaspipetten 10 ml
- Pipette Reference 10 – 100 µl (Eppendorf, Hamburg)
- Messpipetten 50µl, 100 µl (Eppendorf, Hamburg)
- Multipette plus (Eppendorf, Hamburg)
- Mehrkanalpipette Transferpette -12, 20 - 200 µl (Brand GmbH & Co, Wertheim)
- Metall-Spatel
- Tischzentrifuge Centrifuge 5415 C (Eppendorf, Hamburg)
- Kühlzentrifuge Centrifuge 5403 (Eppendorf, Hamburg)
- Haereus Macrofuge 4-6 Serien-Nr. 00079753 (Haereus, Osterode)
- PCR Kabinett UV-Chamber Typ 825-UCV/22 (PlasLabs Inc., Lansing, USA)
- ABI PRISM[®] 7000 Sequence Detection System (Applied Biosystems, Darmstadt)
- Thermocycler Gene Amp PCR-System 9600 (Perkin Elmer, Waltham, USA)
- Absorbance-Reader Sunrise Remote Serien-Nr. 03930006180 (Tecan Deutschland, Crailsheim)
- Software Magellan Standard 5.0

- MRX Reader 1.2 Model Nr. 1200 Serien-Nr. 2CXA-1769

3.2.2 Verbrauchsmaterial

- Swab-Tupfer (Lohmax Rauscher GmbH, Regensdorf)
- Verschließbare 12 ml Reagenzgläser Pyrex (IKA-Labortechnik, Staufen)
- Eppendorf-Tubes 2 ml (Eppendorf, Hamburg)
- Multiply[®]-Pro Gefäße 0,2 ml, Art.Nr. 72737002 (Sarstedt, Nümbrecht)
- Lysing Matrix D Tubes (Q-Biogene, Darmstadt)
- Sterile (RNase-freie) Pipettenspitzen (Eppendorf, Hamburg)
- Mikrotiterplatte 96well Art.Nr. 35900 (Sorenson Bio Science Inc., West Salt Lake City, Utha)
- Adhäsive Verschußfolie für PCR-Platten Art.Nr. 04-095-0050 (Nerbe Plus GmbH, Winsen/Luhe)
- Verschließbare Sedimentröhrchen 50 ml, Art. Nr. 02-582-1001 (Nerbe Plus GmbH, Winsen/Luhe)

3.2.3 Reagenzien

- Aqua dest. für PCR-Zwecke (steril filtriertes und autoklaviertes Aqua dest. aus Institutseigener Herstellung)
- Chloroform für die Chromatographie (Merck, Darmstadt)
- Ethanol 100%ig, Art.Nr. PO761 (Roth GmbH, Karlsruhe)
- Ethanol 70%ig (hergestellt unter Verwendung von 100%igem Ethanol und Aqua dest.)

3.3 Untersuchungsmaterial

3.3.1 Zutaten

- Schweinefleisch – S2
- Rindfleisch – R2
- Fetter Schweinebauch – S2
- Schweinespeck
- Schweineleber
- Eisschnee (Trinkwasserqualität)
- Heiße Kesselbrühe
- Rinderhirn
- Rinder-Rückenmark

Fleisch und Organe wurden vom Schlachthof Gießen (Firma Färber) bezogen.

3.3.2 Zusatzstoffe, Gewürze

- Nitritpökelsalz
- Kutterhilfsmittel (Natriumdiphosphat)
- Fertiggewürz („Kalbsleberwurst Morenoperle“, Gewürzmüller)
- Emulgator E471, E472

3.3.3 Brühwurst-Voll- und Dreiviertelkonserven

Die Herstellung des Grundbräts erfolgte nach einer Rezeptur gemäß der Leitsätze (Ls) des Deutschen Lebensmittelbuches (Ls-Nr. 2.222.1). Zunächst wurden 2,5 kg Schweinefleisch S2 mit maximal 10 % sichtbarem Fettanteil; 0,25 kg Rindfleisch R2; 1,25 kg Schweinespeck; 100 g Nitritpökelsalz und 15 g Kutterhilfsmittel im Kutter bis zur Entstehung einer leichten Bindung zerkleinert. Dabei wurden nach und nach 1000 ml Eisschnee zugesetzt. Das Brät wurde bei einer Temperatur von etwa 10° C bis zur Entstehung einer homogenen Masse gekuttert. In Tabelle 3 sind die Zutaten mit Mengenangabe aufgelistet.

Tabelle 3: Zutaten Brühwurstkonserven nach Art einer Lyoner

Zutat	Menge [g]
Schweinefleisch	2500
Rindfleisch	250
Schweinespeck	1250
Nitritpökelsalz	100
Kutterhilfsmittel	15
Eisschnee	1000 ml

Das native Rinderhirn wurde von anhaftenden Blutresten und Hirnhäuten befreit, mit dem Messer grob in Stücke geschnitten und anschließend in der Moulinette homogenisiert. Für jede Konzentrationsstufe wurde die entsprechende Menge Rinderhirn mit Grundbrät im Tischkutter vermischt. Die Mengenverhältnisse sind der Tabelle 4 zu entnehmen.

Tabelle 4: Mengenverhältnis Grundbrät und Rinderhirn [g]

ZNS-Gehalt	0 %	0,1 %	1 %	2 %	8 %
Grundbrät	1000	999	990	980	920
Rinderhirn	-	1	10	20	80

Von dem so hergestellten Referenzmaterial wurden 400 g je Konzentrationsstufe in zwei 200 g-Dosen gefüllt und diese verschlossen.

Jeweils eine Dose wurde im Autoklaven für 15 Minuten auf 117° C erhitzt und anschließend auf 86° C abgekühlt, so dass ein F-Wert > 5 (Vollkonserve) erreicht wurde. Die zweite Dose jeder Konzentrationsstufe wurde zwei Stunden bei einer Kesseltemperatur von ca. 99° C wallend gekocht (Dreiviertelkonserve, F-Wert 0,84).

Die Lagerung der Brühwurstkonserven mit Rinderhirn-Zusatz erfolgte bei + 2° C. Nach dem ersten Öffnen der Konservendose wurde die Wurstmasse für die weitere Lagerung in einen Plastikbeutel gefüllt und dieser nach jeder Entnahme mit dem Vakuumiergerät Autovac vakuumiert und verschweißt. Die Aufbereitung und Analyse der Brühwurstkonserven wurde vier, sechs, 12, 18 und 24 Monate nach Herstellung durchgeführt.

3.3.4 Leberwurst-Kesselkonserven

Die Streichleberwurst wurde entsprechend den Leitsätzen des deutschen Lebensmittelbuches (LS-Nr. 2.2312.5) hergestellt. 500 g Schweinefleisch S2 und 1250 g fetter Schweinebauch wurden eine Stunde lang bei ca. 90° C gebrüht und danach mit dem Fleischwolf Elektrowolf 106 gewolft. 375 g Schweineleber wurde im Tischkutter solange zerkleinert, bis die Masse Blasen schlug. Anschließend wurde das gewolft, noch heiße Fleisch ebenfalls in den Kutter gegeben und mit 4,5 g Nitritpökelsalz, 1 g Emulgator und 10 g Leberwurst-Fertiggewürz bis zu einer guten Emulsion fertig gekuttert (siehe Tabelle 5).

Tabelle 5: Zutaten Leberwurst-Kesselkonserven

Zutat	Menge [g]
Schweinefleisch S2	500
Fetter Schweinebauch	1250
Schweineleber	375
Nitritpökelsalz	4,5
Emulgator	1
Leberwurst-Fertiggewürz „Kalbsleberwurst Morenoperle“	10

Das Rinderhirn wurde, nachdem es von Blutresten und Hirnhäuten befreit worden war, in der Moulinette homogenisiert.

Zu dem Leberwurstbrät wurde in der Moulinette die entsprechende Menge Rinderhirn zugefügt (siehe Tabelle 6). Dabei wurde die Brät-Hirn-Masse zusätzlich zur Durchmischung in der Moulinette mehrfach manuell mit einem sterilen Metall-Spatel (abgeflammt mit 100%igem Alkohol) gründlich manuell vermengt.

Tabelle 6: Mengenverhältnis Rinderhirn und Leberwurstbrät [g]

ZNS-Gehalt	0 %	0,1 %	0,2 %	0,5 %	1 %	2 %	8 %
Brät	230,00	229,77	229,54	228,85	227,70	225,40	211,6
Rinderhirn	-	0,23	0,46	1,15	2,30	4,60	18,4

Jeweils 115 g Brät mit eingemischtem ZNS-Gewebe wurde in eine Dose abgefüllt, diese wurde verschlossen und anschließend für eine Stunde im offenen Kessel bei 80°C gebrüht (Kesselkonserve, F-Wert 0,48). Die Kontrolle der Erhitzungstemperatur erfolgte mit einem Kerntemperatur-Messgerät.

Die Kesselkonserven wurden bei Kühlschranktemperatur ($< 10^{\circ}\text{C}$) gelagert und am Tag der Herstellung, sowie einen, sechs und 12 Monate später untersucht.

3.3.5 Hackfleisch

4 kg Rindfleisch (Abschnitte für Hackfleisch, sehnen- und fettarm) wurden durch den Fleischwolf gedreht und anschließend im Tischkutter fein zerkleinert. Hierbei wurden 400 ml Eisschnee zugefügt. Der hohe Zerkleinerungsgrad und die Zugabe von Eisschnee entsprachen nicht dem üblichen Herstellungsprozess von Hackfleisch. Diese Abweichungen waren notwendig, um eine bessere Geschmeidigkeit und somit eine gleichmäßigere Verteilung des ZNS-Gewebes zu erreichen und dabei die Grundmasse nicht zu stark zu erwärmen. Das so hergestellte Ausgangsmaterial wurde in Portionen à 200 g aufgeteilt.

Das frische native Rinderhirn wurde von anhaftendem Blut, Hirnhäuten und Knochensplittern befreit, in grobe Stücke zerschnitten und in der Moulinette homogenisiert.

Zu jeweils 200 g Ausgangsmaterial wurde nun die zum Erreichen der gewünschten Konzentrationsstufe notwendige Menge homogenisiertes Rinderhirn zugegeben. Die genauen Mengenverhältnisse sind der Tabelle 7 zu entnehmen. Die Einmischung erfolgte in der Moulinette.

Tabelle 7: Mengenverhältnis Rinderhirn und Hackfleisch [g]

ZNS-Gehalt	0 %	0,1 %	0,2 %	0,5 %	1 %	5 %
Hackfleisch	200,0	199,8	199,6	199,0	198,0	190,0
Rinderhirn	-	0,2	0,4	1,0	2,0	10,0

Das so gewonnene Referenzmaterial jeder Konzentrationsstufe wurde in zwei Portionen von je 100 g aufgeteilt. Diese wurden in einen sterilen Stomacherbeutel eingefüllt und für 120 Sekunden bei mittlerer Geschwindigkeit mit einem Stomacher Lab Blender Modell 400

durchmischt. Jeweils eine Portion wurde in einem Plastikbeutel mit dem Vakuumgegät Autovac vakuumiert und verschweißt und bei + 2° C gelagert, die andere in ein 50 ml Sedimentröhrchen umgefüllt und bei – 18° C tiefgefroren. Das bei + 2° C gelagerte Hackfleisch wurde über einen Zeitraum von zwei Wochen am Tag der Herstellung sowie einen, drei, sieben und 14 Tage später untersucht. Das tiefgefrorene Referenzmaterial wurde am Tag der Herstellung sowie nach drei, sechs, neun und 12 Monaten Lagerung untersucht.

Für eine zweite Versuchsserie wurde als Untersuchungsmaterial Hackfleisch mit dem Zusatz von Rinder-Rückenmark hergestellt (Tabelle 8). Dabei wurde nach der oben beschriebenen Methode vorgegangen. Abweichend wurde das Rückenmark zuerst in der Moulinette zerkleinert und anschließend zusätzlich mit dem Ultra Turrax® feinst homogenisiert. Dieser weitere Zerkleinerungsschritt wurde durchgeführt, da Rückenmark aufgrund seiner festeren Konsistenz schwieriger zu homogenisieren war, als Hirngewebe. Das Referenzmaterial wurde bei + 2° C gelagert und der ZNS-Gehalt wurde am Tag der Herstellung, sowie einen, drei, sieben und 14 Tage später bestimmt.

Tabelle 8: Mengenverhältnis Rinder-Rückenmark und Hackfleisch [g]

ZNS-Gehalt	0 %	0,1 %	0,2 %	0,5 %
Hackfleisch	200 ,0	199,8	199,6	199,0
Rinder-Rückenmark	-	0,2	0,4	1,0

3.3.6 Externes Untersuchungsmaterial

Zusätzlich wurde für weitere Untersuchungen Rinderhackfleisch mit Rinderhirnzusatz in den Konzentrationsstufen 0 %; 0,05 %; 0,1 %; 0,5 % und 1 % vom Labor der Firma R-biopharm (Darmstadt) zur Verfügung gestellt. Das externe Referenzmaterial wurde dort hergestellt, indem sehnenarmes Rindfleisch in einem Mixer zerkleinert wurde und homogenisiertes Rinderhirn zum Erreichen einer 10%igen Konzentration im Mixer zugefügt wurde. Diese Ausgangskonzentration wurde durch Zugabe von homogenisiertem Rindfleisch ohne ZNS-Zusatz auf die gewünschten Konzentrationsstufen verdünnt. Das Probenmaterial wurde während des Untersuchungszeitraums von 10 Tagen ebenfalls bei + 2° C gelagert. Die Aufbereitungen wurden nach einem, zwei, sieben und zehn Tagen nach der Herstellung vorgenommen.

3.3.7 Gewinnung von Tupferproben von Rinder-Schlachttierkörpern und Rinderköpfen

Mit einem Baumwolltupfer wurde ein mit einer sterilen Schablone gekennzeichneteter, 10 x 10 cm großer Bereich des Schlachttierkörpers (Muskulatur dorsal und ventral der gespaltenen Wirbelsäule) bzw. Rinderkopfes (Stirn, Backe oder Halsfett) meanderförmig abgewischt. Die Probenahme an Rinderköpfen erfolgte somit gemäß den von der Arbeitsgruppe „Fleisch- und Geflügelfleischhygiene und fachspezifische Fragen von Lebensmitteln tierischer Herkunft“ herausgegebenen Empfehlungen.

3.4 Untersuchungsmethoden: ZNS-Nachweisverfahren

3.4.1 RIDASCREEN® Risk Material

3.4.1.1 Im Risk Material-Testkit enthaltene Reagenzien und Verbrauchsmaterial

RIDASCREEN® Risk Material (Art.Nr. R6701)

- Mikrotiterplatte mit 96 Kavitäten (12 Streifen à 8 Einzelkavitäten) beschichtet mit Antikörpern gegen GFAP
- vier Standards (GFAP in wässriger Lösung entsprechend 0 %; 0,2 %; 1 % und 2 % Risikomaterial in einer Probe)
- Konjugat (Peroxidasegekoppelter Antikörper gegen GFAP)
- Red Chromogen (Substrat, enthält Tetramethylbenzidin)
- Stopp-Reagenz (enthält 1 N Schwefelsäure)
- Probenpuffer (enthält 0,5 % SDS, als 10faches Konzentrat)
- Extraktionspuffer (enthält 10 % SDS, als 10faches Konzentrat)
- Waschpuffer (Salz zur Herstellung eines 10mM Phosphatpuffers, pH 7,4; enthält 0,05 % Tween 20)

3.4.1.2 Methode

Bei dem Risk Material-Testsystem handelt es sich um ein Enzymimmunoassay zur quantitativen Bestimmung von saurem Gliafaserprotein zum Nachweis von ZNS-Risikomaterial in prozessierten Fleisch- und Wurstwaren. Das an die Antikörper der Mikrotiterplatte gebundene Zielantigen wird mittels eines peroxidasegekoppeltem Antikörpers und einer Farbreaktion nachgewiesen (ANONYMUS, 2002b).

3.4.1.3 Testvorbereitung

Der Extraktionspuffer lag als 10faches Konzentrat vor und musste vor Gebrauch im Verhältnis 1 : 10 (1 + 9) mit destilliertem Wasser verdünnt werden. Das entspricht 100 ml Konzentrat ad 900 ml Aqua dest.

Der Probenpuffer lag ebenfalls als 10faches Konzentrat vor und wurde vor Gebrauch im Verhältnis 1 : 10 mit destilliertem Wasser verdünnt.

Das im Testkit enthaltene Puffersalz zur Herstellung des Waschpuffers wurde in 1000 ml destilliertem Wasser gelöst.

3.4.1.4 Probenvorbereitung

2 g Probenmaterial wurden in ein verschließbares, hitzebeständiges, zentrifugierbares Reagenzröhrchen eingewogen und mit 10 ml Extraktionspuffer durch gründliches Mischen mit dem Minischüttler solange suspensiert, bis sich die Probe vollständig gelöst hatte.

Anschließend wurde diese Suspension 15 Minuten im Wasserbad bei 100° C wallend aufgekocht. Die Proben wurden in Eiswasser abgekühlt und für 10 Minuten bei 3500 g und 10° C zentrifugiert.

Mit der Eppendorfpipette konnte nun die obere Fettschicht der Probe vorsichtig durchstoßen werden, um 50 µl des fettfreien Überstandes zu entnehmen. Dieser wurde in ein Eppendorf-Tube überführt und im Verhältnis 1 : 20 mit Probenpuffer versetzt. Von der so hergestellten Probenaufbereitung wurden 50 µl im ELISA-Test eingesetzt.

3.4.1.5 Testdurchführung

Alle Reagenzien wurden vor Gebrauch auf Raumtemperatur gebracht. Die benötigte Anzahl der Kavitäten (= Anzahl der Proben im Doppelansatz plus vier Standardlösungen) wurde in den Halterahmen eingesetzt. Die Standardlösungen wurden entsprechend der Herstellerangaben im Einfachansatz mitgeführt. Je 50 µl der Standardlösungen bzw. der Proben wurden in die Kavitäten pipettiert und sofort 50 µl Konjugat zugefügt. Nach vorsichtigem manuellem Mischen wurde die Mikrotiterplatte 30 Minuten im Dunkeln bei Raumtemperatur inkubiert.

Danach wurden die Kavitäten durch kräftiges Ausschlagen geleert und dreimal mit jeweils 250 µl Waschpuffer gewaschen. Anschließend wurden in jede Kavität 100 µl Red Chromogen gegeben und die Platte wurde erneut für 30 Minuten im Dunkeln bei Raumtemperatur inkubiert.

Nach Zugabe von 100 µl Stoppreagenz konnte die Optische Dichte mit dem ELISA-Reader bei 450 nm innerhalb von 30 Minuten gemessen werden. Der Abgleich erfolgte gegen die Luft. Erreichte oder überstieg eine Probe die OD des mitgeführten Standards 2 (entspricht 0,2 % GFAP), so wurde sie entsprechend der Herstellerangaben als ZNS-positiv gewertet. Die OD des Standards 2 definierte somit den Cut off-Wert des ELISA-Tests. Abweichend von den Angaben des Herstellers wurden außerdem Proben mit einer Signalstärke, die den Cut off-Wert des Tests nicht erreichte, aber deren OD die doppelte OD des Nullstandards (S1) überstieg, als fraglich bewertet. Ein Fließschema für Probenvorbereitung und Testdurchführung ist in Abbildung 1 dargestellt.

Probenvorbereitung:

Probe homogenisieren



2 g Probenhomogenat in Pyrex-Zentrifugenglas einwiegen, mit 10 ml Extraktionslösung versetzen, gründlich vortexen



15 min bei 100° C im Wasserbad aufkochen.



Probe in Eiswasser abkühlen, vortexen und 10 min bei 3500 g und 10° C in der Heraeus Multifuge zentrifugieren



Obere Fettphase vorsichtig mit Pipettenspitze durchstoßen, **50 µl** fettfreien Überstand entnehmen und mit dem Probenpuffer in Verhältnis 1:20 verdünnen (z.B. **50 µl + 950 µl**).



Im ELISA-Test werden pro Kavität **50 µl** der so hergestellten Probenlösung verwendet.

Testdurchführung:

Anzahl benötigte Kavitäten aus Folienbeutel entnehmen und in Halterahmen einsetzen. Restliche Kavitäten mit Trockenmittel im Beutel belassen und bei 2-8° C lagern.



Positionen der Proben und Standards protokollieren.



Je **50 µl** der Standardlösung bzw. der Probenlösung in die Kavitäten pipettieren.



Je **50 µl** des Konjugats in die entsprechenden Kavitäten pipettieren, vorsichtig manuell mischen und 30 min bei Raumtemperatur inkubieren.



Kavitäten durch Ausschlagen der Flüssigkeit leeren, Restflüssigkeit durch dreimaliges Ausklopfen auf saugfähigen Papiertüchern entfernen. Kavitäten mit jeweils **250 µl** Waschpuffer waschen.

Gesamten Vorgang zweimal wiederholen.



Je **100 µl** Red Chromogen-Lösung in jede Kavität pipettieren. Vorsichtig manuell mischen und 30 min bei Raumtemperatur im Dunkeln inkubieren.



Je **100 µl** Stoppreagenz in jede Kavität pipettieren. Vorsichtig manuell mischen. Die Extinktion bei 450 nm innerhalb von 30 min nach Zugabe des Stoppreagenz messen. Der Abgleich des Nullwertes erfolgt gegen die Luft.

Abbildung 1: Fließschema zum Einsatz des RIDASCREEN®

Risk Material-Verfahrens

3.4.2 RIDASCREEN® Risk Material 10/5

3.4.2.1 Im Risk Material 10/5-Testkit enthaltene Reagenzien und Verbrauchsmaterial

RIDASCREEN® Risk Material 10/5 Art.Nr. R6703

- Mikrotiterplatte mit 96 Kavitäten (12 Streifen à 8 Einzelkavitäten) beschichtet mit Antikörpern gegen GFAP
- vier Standards (GFAP in wässriger Lösung entsprechend 0 %; 0,1 %; 0,2 %; 0,4 % ZNS-Risikomaterial in einer Probe)
- Konjugat (Peroxidasegekoppelter Antikörper gegen GFAP)
- Red Chromogen (Substrat, enthält Tetramethylbenzidin)
- Stopp-Reagenz (enthält 1 N Schwefelsäure)
- Probenpuffer (enthält 0,5 % SDS, als 10faches Konzentrat)
- Extraktionspuffer (enthält 10 % SDS, als 10faches Konzentrat)
- Waschpuffer (Salz zur Herstellung eines 10mM Phosphatpuffers, pH 7,4; enthält 0,05 % Tween 20)

3.4.2.2 Methode

Bei dem Risk Material 10/5 handelt es sich um ein Sandwich-Enzymimmunoassay zur semiquantitativen Bestimmung von ZNS-Gewebe in und auf rohem Fleisch sowie auf kontaminierten Oberflächen. Als Antigen wird auch hierbei das saure Gliafaserprotein genutzt, welches von spezifischen Antikörpern an die Mikrotiterplatte gebunden wird. Ein Peroxidase-gekoppelter zweiter Antikörper (Enzymkonjugat) weist das vorhandene GFAP nach, indem es das rötliche Substrat/Chromogen in ein blaues Endprodukt umsetzt. Die Zugabe des Stopp-Reagenz führt zu einem Farbumschlag nach gelb. Die Messung des umgesetzten Substrates erfolgt photometrisch (ANONYMUS, 2002c) .

3.4.2.3 Testvorbereitung

Der als 10faches Konzentrat vorliegenden Extraktionspuffer musste ebenso wie der Probenpuffer vor Gebrauch im Verhältnis 1 : 10 (1 + 9) mit destilliertem Wasser verdünnt werden.

Zur Herstellung des Waschpuffers wurde das Puffersalz in 1000 ml destilliertem Wasser gelöst.

3.4.2.3.1 Probenvorbereitung mit Swab-Tupfern entsprechend der Gebrauchsanleitung des Herstellers

In der Gebrauchsanleitung des Herstellers war die Probenahme mit Hilfe von sterilen Baumwolltupfern beschrieben. Dazu wurde der trockene Tupfer an sechs verschiedenen Stellen in das homogenisierte Probenmaterial eingetaucht und die gesamte Tupferoberfläche jeweils für etwa 3 Sekunden durch Drehen des Tupfers in Kontakt mit der Probe gebracht. Anhaftende größere Probenpartikel wurden anschließend abgestreift. Der Tupfer wurde in einem Eppendorf-Hütchen mit 1 ml Probenpuffer durch Pressen an den Gefäßrand gründlich ausgedrückt. 50 µl der so hergestellten Lösung wurden im anschließenden ELISA-Test eingesetzt.

3.4.2.3.2 Modifizierte Probenvorbereitung durch Einwaage von Probenmaterial

Diese modifizierte Form der Probenahme durch direktes Überführen einer definierten Probenmenge in den Probenpuffer wurde in Zusammenarbeit mit der Firma R-biopharm entwickelt und am Institut für Tierärztliche Nahrungsmittelkunde validiert. Dazu wurde sowohl institutsintern hergestelltes Referenzmaterial als auch externes, von R-biopharm zur Verfügung gestelltes Untersuchungsmaterial verwendet.

Nach Durchmischen der homogenisierten Probe wurden 50 mg Probenmaterial in ein 12 ml Reagenzglas eingewogen. Es wurde 1 ml Probenpuffer zugegeben und diese Suspension sorgfältig mit einem Minischüttler vermischt bis keine groben Partikel mehr vorhanden waren.

Diese Suspension wurde etwa 15 Minuten bei Raumtemperatur stehen gelassen und dann nach erneutem Durchmischen 50 µl im ELISA-Test eingesetzt.

3.4.2.4 Testdurchführung

Alle Reagenzien wurden vor Gebrauch auf Raumtemperatur gebracht. Die benötigte Anzahl der Kavitäten wurde in den Halterahmen eingesetzt (= Anzahl der Proben im Doppelansatz plus vier Standards). Je 50 µl der Standardlösungen bzw. der Proben wurden in die Kavitäten pipettiert und sofort 50 µl Konjugat zugefügt. Nach vorsichtigem manuellem Mischen wurde die Mikrotiterplatte 30 Minuten im Dunkeln bei Raumtemperatur inkubiert. Danach wurden die Kavitäten durch kräftiges Ausschlagen geleert und dreimal mit jeweils 250 µl Waschpuffer pro Kavität gewaschen und trocken geklopft. Anschließend wurden in jede Kavität 100 µl Red Chromogen gegeben und die Platte wurde erneut für 30 Minuten im Dunkeln bei Raumtemperatur inkubiert.

Nach Zugabe von 100 µl Stoppreagenz konnte die Optische Dichte innerhalb von 30 Minuten bei einer Wellenlänge von 450 nm gemessen werden. Der Abgleich erfolgte gegen die Luft. Proben mit einer OD größer oder gleich der OD des mitgeführten Standard 2 (0,1 % GFAP) galten als ZNS-positiv. Wie bereits für die Auswertung des RIDASCREEN® Risk Material beschrieben, wurde auch hier abweichend von den Angaben des Herstellers ein fraglicher Bereich definiert. Erreichte oder überstiegt die OD einer Probe die doppelte OD des Leerwerts (S1), so wurde sie in der hier vorliegenden Arbeit abweichend als fraglich bewertet.

3.4.3 Brainostic™

3.4.3.1 Im Brainostic™-Testkit

enthaltene Reagenzien und Verbrauchsmaterial

Schebo® Brainostic™ Art.Nr. 13

- Mikrotiterplatte, beschichtet mit polyklonalen GFAP-Antikörpern, 12 Streifen mit je 8 Kavitäten, 96 Kavitäten insgesamt
- Vier Standards, GFAP in phosphatgepufferter Kochsalzlösung mit pH 7,2; entsprechend 0,1 %; 0,2 %; 0,4 % und 1 % ZNS-Risikomaterial in einer Probe
- Positivkontrolle, GFAP in phosphatgepufferter Kochsalzlösung
- GFAP-Anti-POD, Peroxidasegekoppelter Antikörper gegen GFAP in phosphatgepufferter Kochsalzlösung mit Detergenz, gebrauchsfertig
- Substratlösung, enthält Tetramethylbenzidin in wässriger Lösung, gebrauchsfertig
- Stoppreagenz, wässrige saure Lösung, gebrauchsfertig
- Extraktionspuffer, Detergenzlösung, gebrauchsfertig
- Proben-/Waschpuffer, Konzentrat zur Herstellung einer phosphatgepufferten Kochsalzlösung mit Detergenz, pH 7,2

3.4.3.2 Methode

Bei diesem Testsystem handelte es sich um einen Enzyme-linked-Immunosorbent Assay (ELISA). Polyklonale Antikörper binden saures Gliafaserprotein als ZNS-spezifisches Antigen an die Mikrotiterplatte. Danach erfolgt eine Inkubation mit Peroxidase-markierten Antikörpern gegen GFAP. Während des folgenden Inkubationsschrittes oxidiert die Peroxidase das Tetramethylbenzidin-Substrat (TMB). Die Konzentration von oxidiertem TMB wird anschließend photometrisch gemessen. (ANONYMUS ,2004).

3.4.3.3 Testvorbereitung

Der Proben-/Waschpuffer wurde im Testkit als 5faches Konzentrat geliefert und musste vor Verwendung mit destilliertem Wasser verdünnt werden. Dabei wurden 100 ml Probenpuffer-Konzentrat mit 400 ml destilliertem Wasser verdünnt. Der fertige Puffer konnte bis zum angegebenen Verfallsdatum bei 4 - 8° C im Kühlschrank aufbewahrt werden.

3.4.3.3.1 Probenvorbereitung

50 mg des homogenisierten Untersuchungsmaterials wurden in ein Lysing-Matrix-E-Tube eingewogen und im Verhältnis 1 : 10 mit 500 µl raumtemperiertem Extraktionspuffer verdünnt. Nach gründlichem Vermischen mit einem Minischüttler MS 1 Minishaker wurden die Proben für 5 Minuten bei 90° C im Thermomixer 5436/5437 erhitzt. Anschließend erfolgte die Gewebeerstörung im Fast Prep[®] 120 bei einer Rotationsgeschwindigkeit von 5,5 m/sec für 45 Sekunden. Nachdem die Probe fünf Minuten zur Sedimentation der Partikel ruhen gelassen wurde, konnten anschließend 200 µl des Extraktes in ein Eppendorfgefäß überführt werden. Dieses Extrakt konnte nach Herstellerangaben bei Bedarf zwei Tage bei + 4° C gelagert werden.

Für die Aufbereitung von Tupferproben wurde der Tupfer in einem Eppendorftube in 1 ml Extraktionspuffer gründlich ausgedrückt. Die weitere Bearbeitung folgte wie bereits für feste Matrices beschrieben.

3.4.3.4 Testdurchführung

Nachdem die verwendeten Reagenzien auf Raumtemperatur gebracht waren, wurden die benötigten Kavitäten für die zu untersuchenden Proben und die mitgeführten Standards in den Halterahmen eingesetzt (= Anzahl der Proben im Doppelansatz plus 12).

Zuerst wurde für Lebensmittelproben eine Probenendverdünnung im Verhältnis 1 : 50 aus 10 µl Extrakt und 500 µl Proben-/Waschpuffer hergestellt. Tupferproben wurden im Verhältnis 1 : 500 verdünnt.

Je 50 µl des Leerwertes (Waschpuffer), der Standards, Positivkontrolle oder Proben wurden im Doppelansatz in eine Kavität der Mikrotiterplatte pipettiert. Die Platte wurde 30 Minuten im Dunkeln inkubiert. Anschließend folgte das Waschen der Platte, wobei alle Kavitäten drei Mal mit Waschpuffer gefüllt, ausgeschlagen und gründlich auf einem Stapel Papierhandtücher trocken geklopft wurden. In jede Kavität wurden 50 µl GFAP-Anti-POD zugegeben und es folgte eine 15-minütige Inkubationszeit im Dunkeln. Anschließend wurde erneut gewaschen, 100 µl TMB-Substratlösung hinzu pipettiert und die Platte 5 Minuten im Dunkeln inkubiert. Es wurden 100 µl Stopplösung zugegeben und es folgte die photometrische Messung der Extinktion bei einer Wellenlänge von 450 nm gegen eine Referenz von 620 nm im Absorbance-Reader Sunrise Remote. Eine Probe galt als ZNS-positiv, wenn ihre Optische Dichte (OD) die OD des Standards 1 (entsprechend 0,1 % GFAP) erreichte. Abweichend von den Herstellerangaben wurden in der hier vorliegenden Arbeit OD-Werte, die größer oder gleich der doppelten OD des Leerwertes (Blank) waren, als fraglich bewertet. Ein Fließschema zu Probenaufbereitung von Lebensmittelproben und Testdurchführung ist in Abbildung 2 dargestellt.

Probenaufbereitung:

Wasserbad auf 90° C vorheizen



0,05-0,1 g Probenhomogenat in Matrix D Tube einwiegen und im Verhältnis **1:10** mit Extraktionspuffer versetzen (z.B. 0,1 g Probe +1 ml Puffer), vortexen



5 min bei 90° C im Thermomix erhitzen



Probe im Fastprep[®] für 45 Sekunden bei Speed 5,5 m/sec zerkleinern



5 min bei Raumtemperatur sedimentieren lassen



200 µl des fertigen Extraktes in ein Eppendorf tube überführen, eine 1:50-Endverdünnung mit Probenwaschpuffer herstellen (10 µl Extrakt + 500 µl Probenwaschpuffer) herstellen.

Im ELISA-Test werden pro Kavität **50 µl** der so hergestellten Probenlösung verwendet

Testdurchführung:

Anzahl benötigter Kavitäten aus Folienbeutel entnehmen und in Halterahmen einsetzen. Restliche Kavitäten mit Trockenmittel im Beutel belassen und bei 2-8° C lagern.



Positionen der Proben und Standards protokollieren.



Für den Blank **50 µl** Waschpuffer, für die Standards **50 µl der jeweiligen** Standardlösung, für die Kontrolle **50 µl** der Kontrolllösung bzw. für die Proben **50 µl** der Probenlösung in die Kavitäten pipettieren und 30 min. abgedunkelt bei Raumtemperatur inkubieren.



Waschen: Kavitäten durch Ausschlagen der Flüssigkeit leeren, Restflüssigkeit durch mehrfaches Ausklopfen auf saugfähigen Papiertüchern entfernen. Kavitäten mit jeweils **250 µl** Waschpuffer waschen, Puffer etwa 30 sek einwirken lassen.

Waschvorgang dreimal wiederholen.



Je **50 µl** des Konjugats anti-GFAP-POD in die Kavitäten pipettieren und 15 min abgedunkelt bei Raumtemperatur inkubieren.



Waschen siehe oben.



Je **100 µl** Substratlösung in jede Kavität pipettieren und 5 min abgedunkelt bei Raumtemperatur inkubieren.



Je **100 µl** Stoppreagenz in jede Kavität pipettieren. Vorsichtig manuell mischen, Luftblasen mit Pipettenspitze entfernen.

Die Extinktion bei 450 nm innerhalb von 30 min nach Zugabe des Stoppreagenz messen.

Abbildung 2: Fließschema zum Einsatz des Brainostic[™]-Verfahrens

3.4.4 Reverse Transkriptase-Real Time- PCR

3.4.4.1 RNA-Isolierung

3.4.4.1.1 Im RNeasy[®] Lipid Tissue Mini Kit (Cat.No. 74804, Qiagen, Darmstadt) enthaltene Reagenzien und Verbrauchsmaterial:

- RNeasy[®] Mini Spin Columns in collection tubes
- Collection tubes 2 ml
- QIAzol Lysis Reagenz (enthält Phenol, Guanidinthiocyanat)
- Puffer RW 1 (enthält Ethanol)
- Puffer RPE
- Zusätzlich: RNase-Free DNase Set (Cat.No. 79254, Qiagen) (enthält DNase-Stammlösung und RDD-Puffer)

3.4.4.1.2 Methode

Bei dem RNeasy[®] Lipid Tissue Mini Kit handelt es sich um ein speziell auf fettreiches Gewebe abgestimmtes Verfahren zur Isolierung von RNA-Molekülen mit einer Länge von mehr als 200 Nucleotiden mittels einer Kombination aus Phenol/Guanidin-basierter Lysis und Aufreinigung mit einer Silica-Membran. Kürzere RNA-Abschnitte (wie t-RNA, rRNA) werden nicht gezielt angereichert. Das QIAzol Lysis Reagenz enthält Phenol und Guanidinthiocyanat, wodurch eine Lysis fettreicher Gewebe ermöglicht wurde bei gleichzeitiger Hemmung der RNA-abbauenden Enzyme (RNasen). Zu der in Qiazol Lysis Reagenz homogenisierten Probe wurde Chloroform zugegeben und durch Zentrifugation der Probe eine Auftrennung in drei Phasen erreicht. In der untersten Phase befanden sich organische Bestandteile, in der mittleren Phase hauptsächlich DNA und in der obersten, wässrigen Phase reicherte sich die RNA an. Die Zugabe von Ethanol schuf geeignete Bindungsverhältnisse und die Probe wurde auf die RNeasy Mini Spin Column appliziert. Die RNA band an der Säule und das Phenol und andere Bestandteile konnten in mehreren Waschungsschritten entfernt werden. Die hoch-qualitative RNA konnte

anschließend in RNase-freies Wasser eluiert werden. Durch die Verwendung der Silica-Membran wurde bereits der überwiegende Anteil der DNA effektiv entfernt. Zusätzlich wurde während der RNA-Aufreinigung ein Verdau von eventuell vorhandener DNA mit RNase-Free DNase Set durchgeführt (ANONYMUS, 2003).

3.4.4.1.3 Vorbereitung

Der Puffer RPE wurde als Konzentrat geliefert und musste vor Verwendung mit 44 ml 100%igem Ethanol verdünnt werden.

3.4.4.1.4 Durchführung

Die RNA-Extraktion mit dem RNeasy[®] Lipid Tissue Mini Kit wurde in Anlehnung an die Gebrauchsanleitung der Firma Qiagen (ANONYMUS, 2003) durchgeführt.

50 mg homogenisiertes Probenmaterial und 1000 µl Qiazol Lysis Reagenz wurden in Lysing Matrix D Tubes eingewogen und einer Gewebeerstörung im Fast-Prep Ribolyzer unterzogen. Hierbei wurden Rotationsgeschwindigkeit („Speed“) und Zeit an die jeweilige Probenmatrix angepasst. Grundsätzlich sollten keine mit bloßem Auge erkennbaren Partikel mehr in der homogenisierten Probe vorhanden sein. Waren mehrere Wiederholungen der kurzzeitigen Homogenisationsschritte notwendig, so wurden die Proben zwischendurch auf Eis gekühlt. Anschließend wurden 200 µl Chloroform zugegeben und sorgfältig mit der Probe vermischt. Es folgte eine 15- bis 30-minütige Zentrifugation in der Kühlzentrifuge Centrifuge 5403 bei 1000 g und 4° C. Dadurch trennte sich das Gemisch in drei Phasen. In der oberen, wässrigen Phase reicherte sich dabei die RNA an. Von der oberen Phase wurden 600 µl abgenommen und diese mit dem gleichen Volumen Ethanol vermischt. Bei der RNA-Isolation aus Tupferproben konnten in der Regel nur 550 µl der wässrigen Phase gewonnen werden. Dann wurde die Menge Ethanol entsprechend angepasst. Dieses Gemisch wurde nun in zwei Schritten auf die Säule des RNeasy[®] Lipid Tissue Mini Kits überführt und jeweils

anschließend für 15 Sekunden bei 10000 g in der Tischzentrifuge Centrifuge 5415 C zentrifugiert.

Der im Sammelbehälter der Säule aufgefangene Durchfluss wurde verworfen. Es folgte ein erster Waschschrift mit 350 µl RW1-Puffer. Danach wurde ein DNA-Verdau durchgeführt. Dazu wurden die nach Herstellerangaben mit Puffer verdünnte DNase auf die Säule gegeben und 15 Minuten bei Raumtemperatur stehen gelassen. Es folgte ein weiterer Waschschrift mit RW1-Puffer und zwei Waschungen mit jeweils 500 µl RPE-Puffer. Um die an die Säule gebundene RNA zu lösen, wurden 100 µl RNase-freies Wasser aufgetragen und die Säule für eine Minute bei 10000 g zentrifugiert. Das so erhaltene RNA-Eluat wurde ein zweites Mal auf die Säule gegeben und erneut zentrifugiert.

Zusätzlich zu den Proben wurde als Positivkontrolle die RNA von Rinderhirn oder –Rückenmark isoliert. Das RNA-Eluat wurde unverzüglich nach der Gewinnung transkribiert.

3.4.4.1.5 RNA-Isolierung aus Tupferproben

Der Tupfer wurde unmittelbar nach der Probenahme in ein Eppendorfgefäß mit 1000 µl Qiazol Lysis Reagenz überführt. Für den Transport wurden die am Schlachthof entnommenen Proben in Lysis Reagenz überführt und gekühlt transportiert. Die maximale Lagerungs- und Transportdauer der Tupferproben betrug 24 Stunden. Dieser Ansatz wurde 10 Sekunden mit einem Schüttelmixer gründlich vermischt, dann wurde der Holzstiel des Tupfers mit einer mit Alkohol abgeflamten Pinzette gefasst und der Tupfer durch Pressen an den Gefäßrand gründlich ausgedrückt. Die so gewonnene Flüssigkeit wurde in ein Lysing-Matrix-D-Gefäß pipettiert. Die anschließende Aufbereitung der Tupferproben erfolgte wie bereits für die Aufbereitung von Lebensmittelproben beschrieben.

3.4.4.2 Reverse Transkription

3.4.4.2.1 Im Reverse Transcription Reagents Kit (Art. No. N808-0234, Applied Biosystems) enthaltene Reagenzien:

- 10 x Reverse Transkriptase-Puffer
- 25 mM MgCl₂
- deoxyNTPs
- Random Hexamere (Einzelbestellung Art. No. N8080127)
- RNase Inhibitor
- Multiscribe[®] Reverse Transcriptase (50U/μl) (Einzelbestellung Art. No. 4311235)

3.4.4.2.2 Methode

Die Umschreibung der gesamten isolierten RNA in DNA wurde unter Verwendung eines kommerziell erhältlichen Two-step-Reverse Transcriptase-PCR-Systems und des Enzyms Multiscribe[®]-Reverse Transcriptase durchgeführt. Im PCR-Kabinett wurden die in Tabelle 9 aufgelisteten Reagenzien ohne RNA in der angegebenen Reihenfolge zusammenpipettiert. Anschließend wurden von dem so hergestellten Mastermix jeweils 30,7 μl in Multiply[®]-Pro-Gefäße vorgelegt und 19,3 μl der RNA zugefügt. Während des Arbeitsvorganges waren Mastermix und RNA in Kühlblöcken aufzubewahren. Anschließend erfolgte die Two-Step-Reverse Transcriptase-PCR im Thermocycler Gene Amp PCR-System 9600.

Tabelle 9: PCR-Ansatz für die Reverse Transkription der RNA

Reagenz	Menge/50 µl-Ansatz
Mastermix:	30,7 µl
10 x Reverse Transkriptase Puffer	5,0µl
25 mM MgCl ₂	11,0 µl
deoxyNTPs	10,0 µl
Random Hexamere	2,5 µl
RNase Inhibitor	1,0 µl
Multiscribe [®] Reverse Transcriptase	1,25 µl
RNA	19,3 µl

Die PCR-Bedingungen wurden wie folgt gewählt:

Inkubation	25° C	10 min
Reverse Transkription	48° C	30 min
Inaktivierung Reverse Transkriptase	95° C	5 min

Zusätzlich zu den Proben und der RNA-Aufbereitungskontrolle wurde RNA aus Rinderhirn oder –Rückenmark als Positivkontrolle transkribiert. Diese RNA stammte aus einer vorangegangenen Untersuchung, hatte in einer vorangegangenen Real Time-PCR schon ein Signal in der zu erwartenden Intensität erbracht und wurde bis zur Verwendung als Kontrolle bei mindestens – 25° C tiefgefroren gelagert.

3.4.4.3 Real Time-PCR

3.4.4.3.1 Reagenzien:

- Primerpaare „RTGcowM56F2a“ und „RTGcowM56R2a“ (MWG Biotech, Edersberg)
- Fluoreszenzsonde OptiR TaqMan[®]_{mgb} (Applied Biosystems, Darmstadt)
- TaqMan Universal PCR Mastermix Prod. Nr. 4304437 (Applied Biosystems)

Vorwärtsprimer RTGcowM56F2a: 5'-ACC TGC GAC CTG GAG TCC T-3'
Rückwärtsprimer RTGcowM56R2a: 5'-CTC GCG CAT CTG CCG-3'
Sonde (OptiR): 6-FAM-ACT CGT TCG TGC CGC GC-MGB

Abbildung 3: Sequenzen der verwendeten Primer und der Fluoreszenzsonde nach SCHÖNENBRÜCHER et al., 2004b

3.4.4.3.2 Methode

Mit Hilfe dieser Reverse Transkriptase-Real Time-PCR wird eine 86 bp lange Untereinheit der für das bovine, caprine und ovine GFAP codierenden Gensequenz amplifiziert und detektiert. Die Entwicklung der verwendeten Spezies-spezifischen Oligonucleotidprimer (Abbildung 3) erfolgte unter Einsatz der Computerprogramme MS-Oligo, Version 4.0, Primer Express[®] der Firma Applied biosystems und DNASTAR[®] und BLAST[®] (National Center for Biotechnology Information). Die verwendete TaqMan[®]_{mgb}-Sonde wurde so gewählt, dass sie die Exon-Grenzen zweier benachbarter Exons überspannt. Dadurch wurde sichergestellt, dass keine DNA sondern selektiv nur cDNA nachgewiesen wurde (SCHÖNENBRÜCHER et al., 2004b; ABDULMAWJOOD et al., 2005).

3.4.4.3.3 Vorbereitung

Die vom Hersteller als Lyophilisat gelieferten Primer mussten in einer Konzentration von 10 pmol/ μ l vorliegen; dazu wurde aus dem Lyophilisat zunächst durch Auflösen in Aqua dest. für PCR-Zwecke eine Stammlösung mit 100 pmol/ μ l hergestellt werden, die wiederum zur endgültigen Gebrauchslösung verdünnt werden konnte. Beide Lösungen konnten bis zum Gebrauch in entsprechenden Aliquots bei -18° C tiefgefroren gelagert werden.

Die OptiR-Sonde wurde mit Aqua dest. für PCR-Zwecke auf eine Konzentration von 2 μ M verdünnt.

3.4.4.3.4 Durchführung

Die in Tabelle 10 aufgelisteten Reagenzien - ohne cDNA - wurden in dieser Reihenfolge miteinander vermischt. Dieser Arbeitsschritt erfolgte im PCR-Kabinett, um das Risiko einer Kontamination zu minimieren.

Tabelle 10: PCR-Ansatz für Real Time-PCR

Reagenz	Menge / 50 μ l- Ansatz	Menge / 25 μ l- Ansatz
TaqMan Universal PCR Master Mix	25,0 μ l	12,5 μ l
Primer RTGcowM56F2a	1,5 μ l	1,5 μ l
Primer RTGcowM56R2a	1,5 μ l	1,5 μ l
TaqMan Sonde Opti R	5,0 μ l	2,5 μ l
Aqua dest.	12 μ l	2,0 μ l
cDNA	5,0 μ l	5,0 μ l

Von dem so erstellten Mastermix wurden dann für 25 μ l-Ansätze jeweils 20,0 μ l in die einzelnen Kavitäten der Mikrotiterplatte vorgelegt und 5,0 μ l cDNA zugefügt. Anschließend wurde die Mikrotiterplatte mit selbstklebender Folie verschlossen und für etwa 20 Sekunden bei 2000 g

zentrifugiert, um am Boden der Mikrotiterplatte befindliche Luftblasen zu entfernen.

Die Bedingungen für die Real Time-PCR wurden wie folgt gewählt:

Initiale UNG-Inkubation	50° C	2 min	
Aktivierung der AmpliTaq Gold® -			
DNA Polymerase	95° C	10 min	
Denaturierung	95° C	15 s	} 40 Zyklen
Annealing und Extension	60° C	1 min	

Zusätzlich zu den jeweiligen Proben im Doppelansatz wurden außerdem die Aufbereitungskontrolle der RNA-Isolierung, die Transkriptionskontrolle, eine weitere Positivkontrolle (100 % Rinderhirn oder –Rückenmark), zwei Negativkontrollen (RNA aus Schweinehirn und DNA aus Rindermuskulatur) und ein Leerwert des verwendeten Mastermixes mitgeführt. Die Anzahl der PCR-Ansätze ergab sich also aus der Anzahl der Proben im Doppelansatz plus sechs Kontrollen.

3.4.4.3.5 Auswertung

Die Software des ABI Prism zeigte nach Wahl des Parameters „Auto Analyse“ (automatische Analyse) den Schwellenwertzyklus (Thresholdcycle, Ct-Wert) der jeweiligen Probe an. Mit dem Ct-Wert wird der PCR-Zyklus bezeichnet, in dem das Fluoreszenzsignal der Probe deutlich die unspezifische Hintergrundfluoreszenz übersteigt. Damit der Real Time-PCR-Lauf als auswertbar galt, mussten folgende Kriterien erfüllt sein:

Die Positivkontrolle musste mit einem Schwellenwert kleiner oder gleich Ct-Wert 20 detektiert sein, während die Negativ-Kontrollen und der Leerwert des Mastermixes kein Fluoreszenzsignal zeigen durften.

Das Signal einer nicht hitzebehandelten Probe wurde als positiv gewertet, wenn ein Ct-Wert von 32,20 Zyklen erreicht bzw. unterschritten wurde. Das Signal einer hitzebehandelten Probe wurde als positiv gewertet, wenn ein Ct-Wert von 37,00 Zyklen oder weniger erreicht wurde. Eine

Abweichung des Ct-Werts einer Probe von weniger als einem PCR-Zyklus vom Cut off-Wert wurde als fragliches Ergebnis gewertet. Zur semiquantitativen Bestimmung des ZNS-Gehalts wurden empirisch festgelegte Grenzwerte herangezogen. Je nach Ct-Wert des Untersuchungsmaterials sollte so die vorhandene ZNS-Einmischung größtmäßig erfasst werden.

3.5 Statistische Auswertung

Datenhaltung und Datenauswertung wurden auf den Rechnern im lokalen Rechnernetzwerk (LAN) der Arbeitsgruppe Biomathematik und Datenverarbeitung des Fachbereichs Veterinärmedizin der Justus-Liebig-Universität Gießen durchgeführt. Für die statistische Auswertung wurde das Statistikprogrammpaket BMDP/Dynamic, Release 7.0 verwendet (DIXON, 1993). Zur Beschreibung der Daten wurden arithmetische Mittelwerte (\bar{x}), Standardabweichungen (s), Minima (x_{\min}), Maxima (x_{\max}) und Stichprobenumfang (n) berechnet und in Tabellenform dargestellt. Bei rechtsschiefer Verteilung positiver quantitativer Merkmale wurde eine logarithmische Transformation der Daten durchgeführt und die Datenbeschreibung in Form von Intervallen (X_g/SF ; $X_g \cdot SF$) mit geometrischen Mittelwerten (x_g) und Streufaktoren (SF) dargestellt.

Zur statistischen Prüfung des Gruppeneinflusses auf Signifikanz wurde eine ein- bzw. zweifache Varianzanalyse mit dem Programm BMDP7D benutzt.

Die Untersuchung der Zusammenhänge erfolgte in Form einer multiplen polytomen logistischen Regressionsanalyse mit dem Programm BMDP6D unter Angabe des Korrelationskoeffizienten (r) und der Regressionsgeraden ($y = m \cdot x + b$) bzw. mit dem Rangkorrelationskoeffizienten nach Spearman (r_s). Für die Umsetzung der logistischen Darstellung wurde die Probe ohne ZNS-Zusatz näherungsweise mit 0,001 % ZNS angegeben. Negative, fragliche und positive Ergebnisse wurden getrennt angegeben.

Für eine Bewertung der statistischen Signifikanz wurde das Signifikanzniveau $\alpha = 0,05$ zugrunde gelegt. Dies bedeutet, Ergebnisse mit

einem p-Wert $< 0,05$ wurden als statistisch signifikant angegeben. Der exakte p-Wert wurde soweit möglich angegeben.

4 ERGEBNISSE

4.1 Hackfleisch

4.1.1 Hackfleisch mit Rinderhirn, Lagerungsdauer 14 Tage, Lagerungstemperatur + 2° C

4.1.1.1 RIDASCREEN® Risk Material 10/5

In diesen ersten Untersuchungen mit dem Risk Material 10/5-ELISA wurde die vom Hersteller vorgegebene Probenahme-Technik mit Swab-Tupfern angewendet. Sämtliche Proben mit 1 % und 5 % Rinderhirnzusatz wurden über die gesamte Untersuchungsperiode von 14 Tagen als ZNS-positiv ($\geq S2$) erkannt. Die Probe mit 0,5 % Hirn wurde während der ersten drei Untersuchungstage als ZNS-positiv erkannt, am siebten Tag erreichte die im Doppelansatz untersuchte Probe nur eine Signalstärke im fraglich-positiven Bereich (\geq doppelter Nullstandard S1) und am 14. Tag war ein Ergebnis des Doppelansatzes positiv und eines fraglich-positiv. Die mit 0,2 % Rinderhirn gespikete Probe erreichte nur in einer von insgesamt zehn Aufbereitungen eine eindeutig positive Signalstärke, in weiteren acht Aufbereitungen blieb das Ergebnis im fraglichen Bereich und am 14. Untersuchungstag wurde eine Probe des Doppelansatzes nicht als ZNS-positiv detektiert. Das 0,1%ige Untersuchungsmaterial wurde in 18 von 20 Aufbereitungen falsch-negativ eingestuft. Zwei Aufbereitungen der 0,1%igen Proben erreichten immerhin ein fragliches Ergebnis mit einer OD über dem doppelten Nullstandard. Diese fraglich-positiven Ergebnisse der 0,1%igen Probe wurden am Tag der Herstellung des Referenzmaterials und nach drei Tagen Lagerungszeit beobachtet.

Insgesamt entstanden somit bei 60 Einzeluntersuchungen von ZNS-positiven Hackfleisch-Proben 19 falsch-negative Ergebnisse, bei denen Proben mit ZNS-Zusatz nicht als solche erkannt wurden. Diese falsch-negativen Ergebnisse traten, abgesehen von einer Aufbereitung der 0,2%igen Probe am 14. Tag, ausnahmslos bei der im Niedrigkonzentrationsbereich mit 0,1 % Hirngewebe versetzten Probe auf. Die Probe ohne ZNS-Zusatz wurde in sämtlichen Aufbereitungen korrekt

als negativ (< 0,1 % ZNS-Gehalt) erkannt. In Tabelle 11 sind die Untersuchungsergebnisse dargestellt.

**Tabelle 11: Ergebnisse zum Nachweis von ZNS (Rinderhirn) in
artifiziiell kontaminierten Rinderhackfleischproben nach
unterschiedlichen Lagerungszeiten (bei + 2° C) mit dem
RIDASCREEN® Risk Material 10/5**

ZNS- Gehalt	Lagerungsdauer in Tagen				
	0	1	3	7	14
0 %	-	-	-	-	-
0 %	-	-	-	-	-
0,1 %	-	-	-	-	-
0,1 %	-	-	-	-	-
0,1 %	-	-	(+)	-	-
0,1 %	(+)	-	-	-	-
0,2 %	(+)	+	(+)	(+)	(+)
0,2 %	(+)	(+)	(+)	(+)	-
0,5 %	+	+	+	(+)	(+)
0,5 %	+	+	+	(+)	+
1 %	+	+	+	+	+
1 %	+	+	+	+	+
5 %	+	+	+	+	+
5 %	+	+	+	+	+

+ positiv, ZNS nachgewiesen

(+) fraglich positiv (OD der Probe \geq doppelter S1)

- negativ, kein ZNS nachgewiesen

Im Rahmen der semiquantitativen Auswertung wurde der ZNS-Gehalt bei 48 der Proben als zu niedrig bewertet, das entspricht 69 % der Untersuchungen. So erreichte beispielsweise das Untersuchungsmaterial mit 1 % Hirnbeimischung am Tage der Herstellung eine Signalstärke, die nur einem ZNS-Gehalt zwischen 0,2 und 0,4 % entspricht. Bei keiner Probe wurde der ZNS-Gehalt höher als der tatsächliche bewertet. Für 22

Proben wurde der ZNS-Gehalt in der korrekten Größenordnung wiedergegeben, wobei hiervon zehn Proben kein ZNS enthielten, also richtig als „ZNS-Gehalt < 0,1 %“ eingestuft wurden. Auch die Proben mit 5 % ZNS-Beimischung wurden in allen Aufbereitungen insofern größtmäßig richtig erfasst, dass ihr ZNS-Gehalt als „> Standard 4, also > 0,4 % ZNS“ erkannt wurde. Die Proben mit zwischen 0,1 und 1 % ZNS-Kontamination wurden bei quantitativer Auswertung, abgesehen von zwei Aufbereitungen der 1%igen Probe, ausnahmslos zu niedrig eingestuft.

4.1.1.2 Brainostic™

In den Untersuchungen mit dem Brainostic™-ELISA konnten sämtliche artifiziell mit 0,5 % und mehr Rinderhirn kontaminierten Proben während des gesamten Untersuchungszeitraumes eindeutig als ZNS-positiv ($\geq S1$) erkannt werden. Die Probe mit 0,2 % Rinderhirn wurde in sieben von zehn Analysen als positiv eingestuft, ein weiteres Ergebnis lag im fraglichen Bereich (\geq doppelter Leerwert) und in zwei Fällen wurde der ZNS-Gehalt der 0,2%igen Probe nicht detektiert. Diese falsch-negativen Ergebnisse traten nach einem und drei Tagen Lagerungsdauer auf. Das Untersuchungsmaterial mit 0,1 % Rinderhirn erreichte in zehn von 20 Untersuchungen eine eindeutig positive Signalstärke, in drei Untersuchungen blieb das Ergebnis fraglich und siebenmal wurde ein falsch-negatives Ergebnis erzielt. Diese sieben falsch-negativen Ergebnisse traten verteilt über die gesamte Lagerungsdauer auf. Insgesamt wurden also bei 60 Einzeluntersuchungen von Proben mit Hirnzusatz, neun ZNS-haltige Proben nicht detektiert.

Das Untersuchungsmaterial ohne Hirnzusatz wurde in sämtlichen zehn Analysen richtig als negativ (ZNS-Gehalt unter 0,1 %) eingestuft, es traten somit keine falsch-positiven Ergebnisse auf.

In der semiquantitativen Auswertung wurde bei 36 Proben (51 %) der ZNS-Gehalt zu niedrig bewertet. Bei zwei Untersuchungen (Tag 1 und Tag 7) wurde der ZNS-Gehalt der 0,1%igen Proben deutlich zu hoch einkategorisiert, insgesamt kam es zu sieben zu hohen Einstufungen des ZNS-Gehalts. Bei 27 Proben konnte die enthaltene ZNS-Menge durch Vergleich der Signalintensität mit den Standardlösungen größtmäßig

richtig erfasst werden. Unter diesen Proben, deren ZNS-Kontamination korrekt erfasst wurde, befanden sich sämtliche zehn Nullproben. In der semiquantitativen Auswertung mit dem Brainostic™-ELISA konnten außerdem immerhin vier 0,1%ige, zwei 0,2%ige, drei 0,5%ige und acht 5%ige Proben richtig eingestuft werden.

Während des Lagerungszeitraumes von 14 Tagen konnte keine kontinuierliche Abnahme der Signalstärke beobachtet werden. In Tabelle 12 werden die einzelnen Ergebnisse wiedergegeben.

**Tabelle 12: Ergebnisse zum Nachweis von ZNS (Rinderhirn) in
artifiziiell kontaminierten Rinderhackfleischproben nach
unterschiedlichen Lagerungszeiten (bei + 2° C) mit dem
Brainostic™**

ZNS- Gehalt	Lagerungsdauer in Tagen				
	0	1	3	7	14
0 %	-	-	-	-	-
0 %	-	-	-	-	-
0,1 %	-	-	-	+	+
0,1 %	(+)	+	+	+	+
0,1 %	(+)	-	-	+	-
0,1 %	(+)	+	-	+	+
0,2 %	(+)	+	+	+	+
0,2 %	+	-	-	+	+
0,5 %	+	+	+	+	+
0,5 %	+	+	+	+	+
1 %	+	+	+	+	+
1 %	+	+	+	+	+
5 %	+	+	+	+	+
5 %	+	+	+	+	+

+ positiv, ZNS nachgewiesen

(+) fraglich positiv (OD der Probe \geq doppelter Blank)

- negativ, kein ZNS nachgewiesen

4.1.1.3 Reverse Transkriptase-Real Time-PCR

Mit dem RT-Real Time-PCR-Verfahren gelang es, sämtliche Hackfleischproben mit 0,1 % und mehr Rinderhirn während der gesamten Lagerungsdauer als ZNS-positiv zu detektieren.

Das Hackfleisch ohne ZNS-Kontamination erbrachte in allen 10 Analysen einen Ct-Wert von 35,36 und höher; dies entsprach einem negativen Ergebnis (ZNS-Gehalt < 0,01 %). Somit wurde mit dem RT-Real Time Verfahren in dieser Untersuchungsreihe kein falsch-negatives und kein falsch-positives Ergebnis ermittelt (Tabelle 13).

Mit Hilfe der unterschiedlichen Ct-Werte sollte eine semiquantitative Auswertung durchgeführt werden. Bei 48 von insgesamt 70 Proben (69 %) wurde der tatsächliche ZNS-Gehalt in der richtigen Größenordnung eingestuft. Hierunter befanden sich die zehn Aufbereitungen der Probe ohne ZNS, 11 Aufbereitungen der 0,1%igen, sieben Aufbereitungen der 0,2%igen, sechs Aufbereitungen der 0,5%igen, vier Aufbereitungen der 1%igen und sämtliche zehn Aufbereitungen der 5%igen Probe. Bei vier Untersuchungen erreichte die 0,5%ige Probe einen Ct-Wert, der auf einen höheren ZNS-Zusatz als den tatsächlichen hinweist. Bei 18 Proben wurde der ZNS-Gehalt zu niedrig eingestuft.

**Tabelle 13: Ergebnisse zum Nachweis von ZNS (Rinderhirn) in
artifiziiell kontaminierten Rinderhackfleischproben nach
unterschiedlichen Lagerungszeiten (bei + 2° C) mit dem
Reverse Transkriptase-Real Time-PCR-Verfahren**

ZNS- Gehalt	Lagerungsdauer in Tagen				
	0	1	3	7	14
0 %	-	-	-	-	-
0 %	-	-	-	-	-
0,1 %	+	+	+	+	+
0,1 %	+	+	+	+	+
0,1 %	+	+	+	+	+
0,1 %	+	+	+	+	+
0,2 %	+	+	+	+	+
0,2 %	+	+	+	+	+
0,5 %	+	+	+	+	+
0,5 %	+	+	+	+	+
1 %	+	+	+	+	+
1 %	+	+	+	+	+
5 %	+	+	+	+	+
5 %	+	+	+	+	+

+ positiv, ZNS nachgewiesen

- negativ, kein ZNS nachgewiesen

4.1.1.4 Zusammenfassung der Ergebnisse der Untersuchung von Rinder-Hackfleisch mit Rinderhirnzusatz

Die Tabelle 14 gibt die Anzahl der falsch-positiven, falsch negativen und fraglich-positiven Ergebnisse aller drei Testverfahren vergleichend wieder. In dieser Übersicht bleiben die ZNS-Konzentration der Proben und die Lagerungsdauer zunächst unberücksichtigt.

Tabelle 14: Falsch-positive, falsch-negative und fragliche Ergebnisse der unterschiedlichen Nachweisverfahren in den Untersuchungen von artifiziell mit Rinderhirn kontaminiertem Hackfleisch, gelagert bei + 2° C

	RIDASCREEN® Risk Material 10/5	Brainostic™	Reverse Transkriptase- Real Time-PCR
Falsch-positive Ergebnisse	0 / 10	0 / 10	0 / 10
Falsch-negative Ergebnisse	19 / 60	9 / 60	0 / 60
Fraglich-positive Ergebnisse	13 / 60	4 / 60	0 / 60

Die in Tabelle 14 gezeigten Ergebnisse wurden in der Untersuchung von jeweils 60 ZNS-positiven und 10 ZNS-negativen Proben ermittelt.

Die statistische Auswertung mit Hilfe der multiplen polytomen logistischen Regression zeigte für diese Untersuchungsreihe hoch signifikante Einflüsse auf den ZNS-Nachweis für die beiden Variablen Nachweismethode ($p < 0,0001$) und Einmischkonzentration ($p < 0,0001$). Die Reversen Transkriptase-Real Time-PCR stellte das sensitivste Nachweisverfahren dar (Odds Ratio OR = 1100), darauf folgte der Brainostic™-ELISA (OR = 18) und dann der Risk Material 10/5-EILSA. Die Erhöhung der eingemischten ZNS-Menge führte wie nicht anders erwartet ebenfalls zu einer deutlichen Steigerung der Nachweisbarkeit (OR = 2100 bei Erhöhung der Konzentration um eine 10er Potenz; $p < 0,0001$).

Der Einfluss der vierzehntägigen Lagerungsdauer des Probenmaterials auf die Nachweisführung war dagegen nicht signifikant ($p = 0,7075$).

4.1.2 Validierung einer modifizierten Probenaufbereitung für den RIDASCREEN® Risk Material 10/5-Test

Bei der vom Hersteller für den Risk Material 10/5-Test empfohlenen Probenahme-Technik mit Tupfern bestand das Risiko, dass sich die verwendeten Tupfer unterschiedlich stark mit Probenmaterial absättigen. Je nach Kontaktzeit zwischen Lebensmittelprobe und Tupfer nahmen die Tupfer eine unterschiedliche Menge Probenmaterial auf. Für die im Rahmen dieser Arbeit gewonnenen Ergebnisse sollte daher eine bessere Standardisierung der Probenahme und damit eine bessere Vergleichbarkeit der Ergebnisse erreicht werden. Daher wurde eine modifizierte Probenahmetechnik entwickelt, bei der 50 mg Probenhomogenat direkt in Probenpuffer eingewogen werden. Um diese veränderte Probenahmetechnik zu validieren, wurde zunächst von der Herstellerfirma R-biopharm zur Verfügung gestelltes Hackfleisch mit Rinderhirn untersucht. Am ersten Tag der Aufbereitung wurden alle Proben vergleichend sowohl mit der herkömmlichen Probenahme-Technik wie auch mit der neu entwickelten Technik mit definierter Einwaage von 50 mg untersucht (Tabelle 15). Schon in diesen Untersuchungen zeichnete sich ab, dass der Nachweis von ZNS-Gewebe in Niedrigkonzentrationsbereich zuverlässiger mit Hilfe der Probenahme durch definierte Einwaage ermöglicht wurde. Während der Nachweis von Rinderhirn bei der Probenahme mit Tupfern erst ab 0,5 % Hirnzusatz gelang, war durch Einwaage von 50 mg bereits der Nachweis von 0,1 % Hirngewebe möglich.

Die Untersuchung des externen Referenzmaterials mit der modifizierten Probenahmetechnik wurde über einen Lagerungszeitraum von 10 Tagen fortgesetzt (Anhangstabelle 4). Dabei konnte gezeigt werden, dass die modifizierte Probenahme zu einer verbesserten Nachweisbarkeit von kleinen Mengen ZNS führte. Die mit 0,1 % und 0,25 % Hirngewebe kontaminierten Proben konnten in sämtlichen Untersuchungen, also nach einem, drei, sieben und zehn Tagen Lagerung, zuverlässig detektiert

werden. Dies stellte eine Verbesserung der Nachweisbarkeit gegenüber der ersten Untersuchungsreihe dar. In der im folgenden Kapitel beschriebenen Untersuchungsreihe von Rinderhackfleisch mit Rinderhirn wurden ebenfalls beide Techniken zur Probengewinnung vergleichend eingesetzt. Die dort erhaltenen Ergebnisse bestätigen ebenfalls die Vorteile der direkten Einwaage einer definierten Probenmenge (Tabellen 16 und 17).

**Table 15: Ergebnisse zum Nachweis von ZNS (Rinderhirn) in
artifiziiell kontaminierten Rinderhackfleischproben bei
Gegenüberstellung von zwei Probenahmetechniken mit
dem RIDASCREEN® Risk Material 10/5**

Lagerungs- dauer in Tagen	ZNS- Gehalt	Probenahmetechnik	
		Tupfer	50 mg Einwaage
1	0 %	-	-
	0 %	-	-
	0,025 %	-	-
	0,025 %	-	-
	0,05 %	-	-
	0,05 %	-	-
	0,1 %	-	+
	0,1 %	-	+
	0,25 %	-	+
	0,25 %	-	+
	0,5 %	+	+
	0,5 %	+	+
	1 %	+	+
	1 %	+	+

+ positiv, ZNS nachgewiesen

- negativ, kein ZNS nachgewiesen

4.1.3 Hackfleisch mit Zusatz von Rinder-Rückenmark

4.1.3.1 RIDASCREEN® Risk Material 10/5

Für die Untersuchungen mit dem RIDASCREEN® Risk Material 10/5 wurden beide Methoden zur Probenaufbereitung (Tupfer und Einwaage von 50 mg) vergleichend geprüft. Durch die modifizierte Probenaufbereitung konnte die Probe mit 0,5 % Rückenmark während der gesamten Lagerungsperiode sicher als ZNS-positiv (> S2) erkannt werden. Die 0,2%ige Probe wurde am dritten und siebten Tag der Lagerung insgesamt dreimal als fraglich und in den restlichen sieben Untersuchungen als eindeutig ZNS-positiv bewertet. Die 0,1%ige Hackfleischprobe wurde sechsmal im fraglichen und viermal im eindeutig positiven Bereich nachgewiesen.

Die Nachweisgrenze des RIDASCREEN® Risk Material 10/5 wird vom Hersteller mit 1 % ZNS-Gehalt angegeben. Die mit 0,05 % Rückenmark versetzte Probe lag also unterhalb der angegebenen Nachweisgrenze. Dennoch erreichte diese Probe in neun von zehn Aufbereitungen immerhin ein fraglich-positives Ergebnis mit einer Signalstärke oberhalb des doppelten Nullstandards. Ohne Berücksichtigung der 0,05%igen Probe, deren ZNS-Gehalt ja unter der vom Hersteller angegebenen Nachweisgrenze des Tests liegt, wurden alle Rückenmark-haltigen Proben über die gesamte Lagerungszeit als positiv bzw. fraglich-positiv erkannt.

Das Hackfleisch ohne ZNS-Zusatz wurde am Tag der Herstellung mit einer OD oberhalb des doppelten Nullstandards gemessen. Wie bereits erläutert, ist eine OD oberhalb des doppelten Nullstandards laut Herstellerangaben als negativ zu bewerten. Erst eine OD größer bzw. gleich Standard 2 stellt ein sicheres positives Ergebnis dar. Aufgrund der zahlreichen Untersuchungen von Proben mit einem ZNS-Zusatz im Bereich der Nachweisgrenze wurden in der hier vorliegenden Arbeit Proben mit einer OD über der des doppelten Nullstandards als fraglich-positiv bewertet. In den folgenden acht Aufbereitungen wurde diese Probe korrekt als negativ eingestuft (Tabelle 16).

In der semiquantitativen Auswertung wurde bei 25 Untersuchungen der ZNS-Gehalt zu niedrig und 25-mal richtig eingeschätzt. Unter den 25 richtig einkategorisierten Proben befanden sich auch die zehn Proben

ohne ZNS-Zusatz. Sowohl das Auftreten von falsch-negativen ebenso wie fraglichen Resultaten wie auch die zu niedrigen Einstufungen des ZNS-Gehaltes traten während der gesamten Lagerungszeit auf, so dass keine kontinuierliche, lagerungsabhängige Abnahme der Signalintensität beobachtet werden konnte.

Tabelle 16: Ergebnisse zum Nachweis von ZNS (Rinder-Rückenmark) in artifiziell kontaminierten Rinderhackfleischproben nach unterschiedlichen Lagerungszeiten (bei + 2° C) mit dem RIDASCREEN® Risk Material 10/5, Probenaufbereitung mit 50 mg Einwaage

ZNS-Gehalt	Lagerungsdauer in Tagen				
	0	1	3	7	14
0 %	(+)	-	-	-	-
0 %	(+)	-	-	-	-
0,05 %	(+)	(+)	-	(+)	(+)
0,05 %	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)
0,1 %	+	(+)	(+)	(+)	(+)
0,1 %	+	+	(+)	(+)	+
0,2 %	+	+	(+)	(+)	+
0,2 %	+	+	+	(+)	+
0,5 %	+	+	+	+	+
0,5 %	+	+	+	+	+

+ positiv, ZNS nachgewiesen

(+) fraglich positiv (OD der Probe \geq doppelter S1)

- negativ, kein ZNS nachgewiesen

Die Untersuchung der mit Hilfe von Tupfern entnommenen Proben erbrachten erwartungsgemäß etwas schlechtere Ergebnisse. Auch in dieser Untersuchungsreihe wurden Proben ab einer Konzentration von 0,5 % Rückenmark eindeutig über den gesamten Lagerungszeitraum als ZNS-positiv erkannt. Allerdings wurde die mit 0,2 % versetzte Hackfleischprobe nur am Tag der Herstellung und nach einem Tag sowie

14tägiger Lagerung eindeutig als ZNS-positiv detektiert; am siebten Tag ergaben beide Ansätze dieser Probe ein fragliches Ergebnis. Drei Tage nach der Herstellung erreichte die OD der 0,2%igen Probe nicht die OD des mitgeführten Standards 2 und war somit als falsch-negativ zu bewerten. Die 0,1%ige Probe wurde in neun von zehn Untersuchungen als fraglich-positiv bewertet, nur eine Aufbereitung erbrachte ein eindeutig positives Ergebnis. Die Probe mit 0,05 % Rückenmark erbrachte in vier von zehn Untersuchungen eine OD im fraglich-positiven und sechsmal im negativen Bereich. Die Nachweisgrenze des Risk Material 10/5-Testsystems wird vom Hersteller mit 0,1 % ZNS-Gewebe angegeben.

Das Hackfleisch ohne Zusatz von ZNS-Gewebe wurde gemäß der Auswertung nach Herstellerangaben in sämtlichen zehn Aufbereitungen als negativ erkannt. Bewertet man allerdings OD-Werte ab dem zweifachen Nullstandard (S1) als fraglich, so ergeben sich für die Probe ohne ZNS-Zusatz drei Ergebnisse im fraglichen Bereich. Tabelle 17 gibt die Ergebnisse dieser Untersuchung wieder.

In der semiquantitativen Beurteilung des ZNS-Gehalts wurde 29-mal ein zu niedriger ZNS-Gehalt angezeigt (58 % der Untersuchungen). 21 Proben erbrachten eine ihrem tatsächlichen ZNS-Gehalt entsprechende Signalstärke, wobei auch hier wieder die zehn Aufbereitungen der Nullprobe einbezogen sind.

Vergleicht man beide Techniken zur Probenahme, so wird deutlich, dass mit der modifizierten Probenahme-Technik mehr Proben mit ZNS-Gehalt detektiert werden konnten. So wurde mit der modifizierten Probenahme in insgesamt 40 Einzeluntersuchungen nur ein falsch-negatives Ergebnis erzielt, während es bei der Probenahme mit Tupfern acht falsch-negative Ergebnisse waren. Auch die quantitative Bewertung des ZNS-Gehaltes fiel bei der modifizierten Probenahme-Technik etwas zuverlässiger aus. Hier wurde der ZNS-Gehalt 25-mal zu niedrig beurteilt, während es bei den mit Tupfern entnommenen Proben 29-mal der Fall war.

Tabelle 17: Ergebnisse zum Nachweis von ZNS (Rinder-Rückenmark) in artifiziell kontaminierten Rinderhackfleischproben nach unterschiedlichen Lagerungszeiten (bei + 2° C) mit dem RIDASCREEN® Risk Material 10/5, Probenaufbereitung mit Tupfern

ZNS-Gehalt	Lagerungsdauer in Tagen				
	0	1	3	7	14
0 %	-	-	(+)	-	-
0 %	(+)	-	(+)	-	-
0,05 %	(+)	(+)	(+)	-	-
0,05 %	(+)	-	-	-	-
0,1 %	(+)	+	(+)	(+)	(+)
0,1 %	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)
0,2 %	+	+	-	(+)	+
0,2 %	+	+	-	(+)	+
0,5 %	+	+	+	+	+
0,5 %	+	+	+	+	+

- + positiv, ZNS nachgewiesen
- (+) fraglich positiv (OD der Probe \geq doppelter S1)
- negativ, kein ZNS nachgewiesen

4.1.3.2 Brainostic™

Mit dem Brainostic™-ELISA-Test gelang es in dieser Untersuchungsreihe, bei sämtlichen artifiziell kontaminierten Proben über den gesamten Zeitraum von 14 Tagen ZNS-Gewebe eindeutig nachzuweisen. Insgesamt wurde also in 40 Einzeluntersuchungen kein falsch-negatives Ergebnis erzielt. In den acht Untersuchungen der nicht mit ZNS-Gewebe versetzten Nullprobe wurde kein falsch-positives Ergebnis beobachtet.

Im Bezug auf die semiquantitative Auswertung wurde der überwiegende Teil der mit Rückenmark gespickten Proben zu hoch eingestuft, das heißt der tatsächliche ZNS-Gehalt wurde in 29 Fällen überschätzt (58 % der Untersuchungen). Lediglich der ZNS-Gehalt der Nullprobe in sämtlichen zehn Aufbereitungen, der 0,5%igen Probe in 9 Aufbereitungen, sowie die

0,1%ige Probe in einer Aufbereitung wurde entsprechend des tatsächlichen ZNS-Gehalts eingestuft. In einer Aufbereitung der 0,5%igen Probe kam es zu einer Unterbewertung.

Weder in der qualitativen noch hinsichtlich der semiquantitativen Auswertung wurde eine Reduktion der Signalstärke in Abhängigkeit von der Lagerungsdauer deutlich.

Die Hackfleischprobe ohne ZNS-Zusatz (Nullprobe) wurde in den eigenen Untersuchungen am Tag der Herstellung, sowie nach einem, drei und sieben Tagen Lagerung als ZNS-negativ erkannt. Aufgrund eines technischen Ausfalls des Photometers liegt für den 14. Untersuchungstag kein Ergebnis für diese Probe ohne ZNS-Zusatz vor. Die einzelnen Ergebnisse sind in Tabelle 18 dargestellt.

Tabelle 18: Ergebnisse zum Nachweis von ZNS (Rinder-Rückenmark) in artifiziell kontaminierten Rinderhackfleischproben nach unterschiedlichen Lagerungszeiten (bei + 2° C) mit dem Brainostic™

ZNS-Gehalt	Lagerungsdauer in Tagen				
	0	1	3	7	14
0 %	-	-	-	-	Daten liegen nicht vor
0 %	-	-	-	-	
0,05 %	+	+	+	+	+
0,05 %	+	+	+	+	+
0,1 %	+	+	+	+	+
0,1 %	+	+	+	+	+
0,2 %	+	+	+	+	+
0,2 %	+	+	+	+	+
0,5 %	+	+	+	+	+
0,5 %	+	+	+	+	+

+ positiv, ZNS nachgewiesen

- negativ, kein ZNS nachgewiesen

4.1.3.3 Reverse Transkriptase-Real Time-PCR

Mit dem Reverse Transkriptase-Real Time-PCR-Verfahren gelang der korrekte Nachweis sämtlicher artifiziell kontaminierten Proben über den gesamten Untersuchungszeitraum. Es ergaben sich keine falsch-negativen und auch keine falsch-positiven Untersuchungsergebnisse (Tabelle 19).

In der semiquantitativen Auswertung wurde der tatsächliche ZNS-Gehalt achtmal unterbewertet und 12-mal überbewertet. Eine richtige Zuordnung des ZNS-Gehaltes erfolgte bei 30 Untersuchungen, unter denen sich die zehn Aufbereitungen der Probe ohne ZNS-Zusatz befand. Die richtige Einschätzung des ZNS-Gehalts von immerhin 60 % der Proben relativiert sich jedoch vor dem Hintergrund, dass die Einkategorisierung in relativ grobe Bereiche, nämlich < 0,01 %, 0,01 bis 0,1 % und 0,1 bis 1 % erfolgte.

Tabelle 19: Ergebnisse zum Nachweis von ZNS (Rinder-Rückenmark) in artifiziell kontaminierten Rinderhackfleischproben nach unterschiedlichen Lagerungszeiten (bei + 2° C) mit dem Reverse Transkriptase-Real Time-PCR-Verfahren

ZNS-Gehalt	Lagerungsdauer in Tagen				
	0	1	3	7	14
0 %	-	-	-	-	-
0 %	-	-	-	-	-
0,05 %	+	+	+	+	+
0,05 %	+	+	+	+	+
0,1 %	+	+	+	+	+
0,1 %	+	+	+	+	+
0,2 %	+	+	+	+	+
0,2 %	+	+	+	+	+
0,5 %	+	+	+	+	+
0,5 %	+	+	+	+	+

+ positiv, ZNS nachgewiesen

- negativ, kein ZNS nachgewiesen

4.1.3.4 Zusammenfassung der Ergebnisse der Untersuchung von Rinderhackfleisch mit Zusatz von Rinder-Rückenmark

In Tabelle 20 sind die falsch-positiven, falsch-negativen und fraglichen Ergebnisse dargestellt, die mit den drei Testverfahren ermittelt wurden, in dieser Übersicht wurden die ZNS-Konzentration und die Lagerungsdauer zunächst nicht berücksichtigt. Die Ergebnisse des RIDASCREEN® Risk Material-Tests werden abhängig von der Art der Probenahme (Tupfer oder Einwaage) getrennt wiedergegeben.

Tabelle 20: Falsch-positive, falsch-negative und fragliche Ergebnisse der unterschiedlichen Nachweisverfahren in den Untersuchung von artifiziell mit Rinder-Rückenmark kontaminiertem Hackfleisch, gelagert bei + 2° C

	RIDASCREEN® Risk Material 10/5		Brainostic™	Reverse Transkriptase-Real Time-PCR
	Tupfer	50 mg		
Falsch-positive Ergebnisse	0* / 10	0* / 10	0 / 8	0 / 10
Falsch-negative Ergebnisse	8 / 40	1 / 40	0 / 40	0 / 40
Fraglich-positive Ergebnisse	15** / 40	18** / 40	0 / 40	0 / 40

Die in Tabelle 21 dargestellten Ergebnisse wurden in der Untersuchung von jeweils 40 ZNS-positiven und 10 ZNS-negativen Proben ermittelt.

* Auswertung der Nullproben hier gemäß Herstellerangaben

** Nullproben nicht berücksichtigt

Besonders im Niedrigkonzentrationsbereich wurde deutlich, dass mit Hilfe der modifizierten Probenaufbereitung des Risk Material 10/5-ELISA mehr ZNS-positive Proben detektiert wurden als es bei der Probenahme mit Tupfern der Fall war. In den Untersuchungen mit dem RIDASCREEN® Risk Material 10/5 wurden für die Proben ohne ZNS mehrere OD-Werte im

fraglichen Bereich gemessen. Wie bereits in der Untersuchungsreihe von Hackfleisch mit Rinderhirn ging auch in den Untersuchungen von Hackfleisch mit Rinder-Rückenmark ein hoch signifikanter Einfluss von der Wahl des verwendeten Nachweisverfahrens aus ($p < 0,0001$). Während die Reverse Transkriptase-Real Time-PCR (OR = 70) und der Brainostic[™]-ELISA (OR = 77) eine annähernd gleiche Empfindlichkeit zeigten, konnten mit dem RIDASCREEN[®]-ELISA Risk Material 10/5-ELISA weniger ZNS-positive Proben richtig erkannt werden. Während die Einmischungskonzentration ebenfalls einen hoch signifikanten Einfluss auf die Nachweisbarkeit hatte ($p < 0,0001$), blieb auch hier der Effekt der Lagerungsdauer nicht signifikant ($p = 0,5390$).

4.1.4 Hackfleisch mit Zusatz von Rinderhirn, gelagert bei – 18° C

4.1.4.1 RIDASCREEN[®] Risk Material 10/5

Die Untersuchung des tiefgekühlten Hackfleisches mit dem RIDASCREEN[®] Risk Material 10/5-Verfahren erfolgte am Tag der Herstellung sowie einen Monat später mit der vom Hersteller angegebenen Probenahme-Technik mit Tupfern. Ab einer Lagerungsdauer von drei Monaten wurde die neu entwickelte Probenahmetechnik mit Einwaage von 50 mg Probenmaterial verwendet. Die mit 0,1 % Rinderhirn kontaminierte Probe wurde über die gesamte Lagerungsperiode insgesamt 24mal aufbereitet. Davon konnte sie achtmal eindeutig als ZNS-positiv erkannt werden. Weitere neunmal erreichte sie eine Signalstärke im fraglich-positiven Bereich. Siebenmal wurde die 0,1%ige Probe falsch-negativ bewertet. Sechs der sieben falsch-negativen Ergebnisse wurden mit der Probenahme-Technik mit Tupfern beobachtet.

Die 0,2%ige Hackfleischprobe erzielte in den vier Aufbereitungen mit der Tupfer-Probenahmetechnik nur fraglich-positive Ergebnisse. Sämtliche Untersuchungen der 0,2%igen Probe mit der modifizierten Probenahmetechnik waren eindeutig positiv. Die Proben ab einem ZNS-Gehalt von 0,5 % und mehr ZNS-Gehalt erzielten während des gesamten 12-monatigen Untersuchungszeitraumes positive Ergebnisse unabhängig von der Art der Probenaufbereitung.

Bei den Untersuchungen der nicht mit ZNS-Gewebe versetzten Nullprobe wurde kein falsch-positives Ergebnis beobachtet (Tabelle 21).

In der semiquantitativen Beurteilung wurde bei insgesamt 84 Aufbereitungen der ZNS-Gehalt 35-mal zu niedrig und 49-mal korrekt (58 % der Untersuchungen) bewertet. Wobei sich bei den richtig eingestuft Proben auch die 12 Aufbereitungen der Probe ohne ZNS-Zusatz befanden. 20 der 35 Proben, deren ZNS-Gehalt zu niedrig bewertet wurden, waren mit der Probenahmetechnik durch Tupfer aufbereitet worden.

Tabelle 21: Ergebnisse zum Nachweis von ZNS (Rinderhirn) in
artifiziiell kontaminierten Rinderhackfleischproben nach
unterschiedlichen Lagerungszeiten (bei -18° C) mit dem
RIDASCREEN® Risk Material 10/5-Verfahren

ZNS- Gehalt	Lagerungsdauer in Monaten					
	0*	1*	3**	6**	9**	12**
0 %	-	-	-	-	-	-
0 %	-	-	-	-	-	-
0,1 %	-	-	+	+	(+)	+
0,1 %	-	-	-	(+)	(+)	(+)
0,1 %	-	(+)	(+)	+	+	(+)
0,1 %	(+)	-	(+)	+	+	+
0,2 %	(+)	(+)	+	+	+	+
0,2 %	(+)	(+)	+	+	+	+
0,5 %	+	+	+	+	+	+
0,5 %	+	+	+	+	+	+
1 %	+	+	+	+	+	+
1 %	+	+	+	+	+	+
5 %	+	+	+	+	+	+
5 %	+	+	+	+	+	+

+ positiv, ZNS nachgewiesen

(+) fraglich positiv (OD der Probe \geq doppelter S1)

- negativ, kein ZNS nachgewiesen

* Probenahme mit Tupfern

** Probenahme mit 50 mg Einwaage

4.1.4.2 Brainostic™

In den Untersuchungen mit dem Brainostic™-ELISA-Test wurde das im Niedrigkonzentrationsbereich mit 0,1 % Hirngewebe kontaminierte Untersuchungsmaterial in 12 von insgesamt 24 Aufbereitungen eindeutig als ZNS-positiv erkannt. Achtmal wurden ein fraglich-positives und viermal ein falsch-negatives Ergebnis beobachtet. Die 0,2%ige Probe erbrachte in einer von 12 Untersuchungen ein fraglich-positives Ergebnis, die übrigen

11 Untersuchungen waren eindeutig positiv. Alle Proben mit 0,5 % und mehr ZNS-Zusatz wurden während der gesamten Lagerungsdauer richtig als ZNS-positiv erkannt. Das Untersuchungsmaterial ohne ZNS-Gewebe wurde in sämtlichen 12 Untersuchungen als ZNS-negativ erkannt (Tabelle 22).

Bezogen auf die semiquantitative Bewertung wurde der tatsächliche ZNS-Gehalt in 50 von insgesamt 84 Aufbereitungen zu niedrig (60 % der Untersuchungen) und 34-mal korrekt bewertet. Hierbei wurde die Probe ohne ZNS-Zusatz in sämtlichen Aufbereitungen richtig eingestuft und bei 22 Proben mit ZNS konnte der tatsächliche Gehalt richtig einkategorisiert werden.

Tabelle 22: Ergebnisse zum Nachweis von ZNS (Rinderhirn) in artifiziell kontaminierten Rinderhackfleischproben nach unterschiedlichen Lagerungszeiten (bei -18° C) mit dem Brainostic™-Verfahren

ZNS-Gehalt	Lagerungsdauer in Monaten					
	0	1	3	6	9	12
0 %	-	-	-	-	-	-
0 %	-	-	-	-	-	-
0,1 %	-	+	+	(+)	-	+
0,1 %	(+)	+	+	(+)	+	+
0,1 %	(+)	+	-	(+)	+	+
0,1 %	(+)	+	(+)	(+)	-	+
0,2 %	(+)	+	+	+	+	+
0,2 %	+	+	+	+	+	+
0,5 %	+	+	+	+	+	+
0,5 %	+	+	+	+	+	+
1 %	+	+	+	+	+	+
1 %	+	+	+	+	+	+
5 %	+	+	+	+	+	+
5 %	+	+	+	+	+	+

+ positiv, ZNS nachgewiesen

(+) fraglich positiv (OD der Probe \geq doppelter Blank)

- negativ, kein ZNS nachgewiesen

4.1.4.3 Reverse Transkriptase-Real Time-PCR

Mit dem Reverse Transkriptase-Real Time-PCR-Verfahren konnten sämtliche mit 0,2 % und mehr Rinderhirn kontaminierten Proben während des einjährigen Untersuchungszeitraumes korrekt als ZNS-positiv erfasst werden. Die 0,1%ige Hackfleischprobe wurde insgesamt 24-mal aufbereitet. Davon wurde sie in 21 Untersuchungen als positiv erkannt. Nach dreimonatiger Lagerung konnte eine Probe des Vierfachansatzes nicht detektiert werden. Nach 12-monatiger Lagerung wurden zwei Proben des Vierfachansatzes nicht detektiert.

Es wurden keine falsch-positiven Ergebnisse beobachtet. Tabelle 23 gibt die einzelnen Untersuchungsergebnisse wieder.

Die semiquantitative Bestimmung der enthaltenen ZNS-Menge stimmte 63-mal (76 %) mit dem tatsächlichen ZNS-Gehalt überein. Hierunter vielen die 12 Aufbereitungen der Nullprobe. Acht Bewertungen fielen zu hoch und 13 zu niedrig aus.

**Tabelle 23: Ergebnisse zum Nachweis von ZNS (Rinderhirn) in
artifiziiell kontaminierten Rinderhackfleischproben nach
unterschiedlichen Lagerungszeiten (bei -18° C) mit dem
Reverse Transkriptase-Real Time-PCR-Verfahren**

ZNS- Gehalt	Lagerungsdauer in Monaten					
	0	1	3	6	9	12
0 %	-	-	-	-	-	-
0 %	-	-	-	-	-	-
0,1 %	+	+	+	+	+	+
0,1 %	+	+	+	+	+	-
0,1 %	+	+	+	+	+	-
0,1 %	+	+	-	+	+	+
0,2 %	+	+	+	+	+	+
0,2 %	+	+	+	+	+	+
0,5 %	+	+	+	+	+	+
0,5 %	+	+	+	+	+	+
1 %	+	+	+	+	+	+
1 %	+	+	+	+	+	+
5 %	+	+	+	+	+	+
5 %	+	+	+	+	+	+

+ positiv, ZNS nachgewiesen

- negativ, kein ZNS nachgewiesen

4.1.4.4 Zusammenfassung der Ergebnisse der Untersuchung von tiefgekühlt gelagertem Rinder-Hackfleisch mit Zusatz von Rinderhirn

In Tabelle 24 werden für jede der drei verwendeten Nachweismethoden die während der gesamten Lagerungsdauer bei allen untersuchten Proben erzielten falsch-positiven, falsch-negativen und fraglichen Ergebnisse zusammengefasst.

Tabelle 24: Falsch-positive, falsch-negative und fragliche Ergebnisse der unterschiedlichen Nachweisverfahren in den Untersuchungen von artifiziell mit Rinderhirn kontaminiertem Hackfleisch, Lagerung bei – 18° C

	RIDASCREEN® Risk Material 10/5	Brainostic™	Reverse Transkriptase- Real Time-PCR
Falsch-positive Ergebnisse	0 / 12	0 / 12	0 / 12
Falsch-negative Ergebnisse	7 / 72	4 / 72	3 / 72
Fraglich-positive Ergebnisse	13 / 72	9 / 72	0 / 72

Die Ergebnisse wurden in der Untersuchung von jeweils 72 ZNS-positiven und 12 ZNS-negativen Proben ermittelt.

Auch in dieser Untersuchungsreihe zeigte sich erneut ein hoch signifikanter Einfluss der Nachweismethode ($p < 0,0001$): Die Reverse Transkriptase-Real Time-PCR stellte das empfindlichste Nachweisverfahren dar ($OR = 20$), während im Vergleich zwischen den beiden ELISA-Systemen der Brainostic™-Test eine etwas höhere Nachweisempfindlichkeit ($OR 2,8$) aufwies.

Der scheinbare Anstieg der Nachweisbarkeit zum Ende der Lagerungszeit hin, ist dadurch begründet, dass für das RIDASCREEN® Risk Material 10/5-Verfahren zu Beginn die weniger effiziente Probenahme durch Tupfer verwendet wurde.

Selbstverständlich zeigte sich auch hier wieder ein starker Effekt der Einmischkonzentration ($OR = 3900$; $P < 0,001$).

4.2 Brühwurst-Konserven

4.2.1 Brühwurst-Vollkonserven mit Rinderhirn

4.2.1.1 RIDASCREEN® Risk Material

Die Nachweisgrenze des Risk Material-ELISAs für erhitzte Fleischerzeugnisse wurde vom Hersteller mit 0,2 % ZNS-Gehalt angegeben. Die Probe mit 0,1 % ZNS-Zusatz fiel also unter die Nachweisgrenze dieses Verfahrens. Erwartungsgemäß wurde die Probe mit 0,1 % Rinderhirnzusatz somit auch in keiner der Untersuchungen detektiert.

Die Probe mit 1 % Rinderhirn erbrachte in insgesamt zehn Untersuchungen sechsmal ein eindeutig positives Ergebnis. Auch nach 24 Monaten konnte die 1%ige Vollkonserve noch detektiert werden. Viermal (Monat 4 und 6) erreichte sie nur eine Signalstärke im fraglich-positiven Bereich. Das Untersuchungsmaterial mit 2 und 8 % ZNS-Gewebe wurde während des gesamten Untersuchungszeitraumes als positiv erkannt.

Die Konserve ohne Rinderhirn wurde in keiner Untersuchung falsch-positiv bewertet (Tabelle 25).

Die semiquantitative Auswertung zeigte, dass 28-mal der ZNS-Gehalt niedriger als der tatsächliche bewertet wurde (56 % der Untersuchungen). In 22 Fällen entsprach die semiquantitative Auswertung dem tatsächlichen ZNS-Gehalt, wobei hierzu zehn Aufbereitungen der Probe ohne ZNS und zehn Aufbereitungen der Probe mit 0,1 % ZNS, die jeweils richtig mit „ZNS-Gehalt < 0,2 %“ eingestuft wurden, zu zählen waren.

Es zeigte sich, dass das GFAP-Markerprotein während der gesamten Lagerungsdauer eine gute Stabilität aufwies.

**Tabelle 25: Ergebnisse zum Nachweis von ZNS (Rinderhirn) in
artifiziiell kontaminierten Brühwurst-Vollkonserven nach
unterschiedlichen Lagerungszeiten (bei + 2° C) mit dem
RIDASCREEN® Risk Material-Verfahren**

ZNS- Gehalt	Lagerungsdauer in Monaten				
	4	6	12	18	24
0 %	-	-	-	-	-
0 %	-	-	-	-	-
0,1 %	-	-	-	-	-
0,1 %	-	-	-	-	-
1 %	(+)	(+)	+	+	+
1 %	(+)	(+)	+	+	+
2 %	+	+	+	+	+
2 %	+	+	+	+	+
8 %	+	+	+	+	+
8 %	+	+	+	+	+

+ positiv, ZNS nachgewiesen

(+) fraglich positiv (OD der Probe \geq doppelter S1)

- negativ, kein ZNS nachgewiesen

4.2.1.2 Brainostic™

Im Gegensatz zum RIDASCREEN®-ELISA wurde beim Brainostic™-Verfahren das gleiche Testsystem für den ZNS-Nachweis in nativen wie auch in erhitzten Lebensmittelproben verwendet. Die vom Hersteller angegebene Nachweisgrenze betrug auch in hitzebehandeltem Untersuchungsmaterial 0,1 % ZNS. Die Vollkonserve mit einem ZNS-Gehalt von 0,1 % wurde jedoch nur in einer Aufbereitung zu Beginn der Lagerungsperiode eindeutig als ZNS-positiv erkannt ($>$ S1). In weiteren fünf Untersuchungen erbrachte sie eine Signalstärke in fraglich-positiven Bereich und in vier Untersuchungen blieb sie undetektiert.

Sämtliche Konserven mit einem Rinderhirn-Anteil von 1 % und mehr konnten in allen Untersuchungen als ZNS-positiv detektiert werden (Tabelle 26). Es traten keine falsch-positiven Ergebnisse auf.

Im Rahmen der semiquantitativen Auswertung wurde der ZNS-Gehalt bei 15 Proben korrekt und bei 35 Proben (70 % der Untersuchungen) zu niedrig eingeschätzt.

Tabelle 26: Ergebnisse zum Nachweis von ZNS (Rinderhirn) in artifiziell kontaminierten Brühwurst-Vollkonserven nach unterschiedlichen Lagerungszeiten (bei + 2° C) mit dem Brainostic™ -Verfahren

ZNS-Gehalt	Lagerungsdauer in Monaten				
	4	6	12	18	24
0 %	-	-	-	-	-
0 %	-	-	-	-	-
0,1 %	+	-	(+)	(+)	-
0,1 %	(+)	-	(+)	(+)	-
1 %	+	+	+	+	+
1 %	+	+	+	+	+
2 %	+	+	+	+	+
2 %	+	+	+	+	+
8 %	+	+	+	+	+
8 %	+	+	+	+	+

+ positiv, ZNS nachgewiesen

(+) fraglich positiv (OD der Probe \geq doppelter Blank)

- negativ, kein ZNS nachgewiesen

4.2.1.3 Reverse Transkriptase-Real Time-PCR

Abgesehen von einer Probe des Doppelansatzes in der Untersuchung nach 24-monatiger Lagerung wurde die 0,1%ige Vollkonserve immer als ZNS-positiv erfasst. Die falsch-negativ detektierte Probe erreichte einen Ct-Wert von 38,45 und lag damit 1,45 PCR-Zyklen über dem Cut-off des Verfahrens. In vier weiteren Untersuchungen lag der Ct-Wert der 0,1%igen Probe nur geringfügig (weniger als einen PCR-Zyklus) oberhalb des Cut off-Wertes. Diese Proben wurden als fraglich-positiv bewertet.

Die Proben mit 1 % und mehr Rinderhirn wurden mit der genotypischen Nachweismethode in sämtlichen Untersuchungen als positiv erkannt. Die Probe ohne ZNS zeigte in keinem Ansatz ein Fluoreszenzsignal. Es wurde also kein falsch-positives Resultat beobachtet (Tabelle 27).

Die zur semiquantitativen Bestimmung der ZNS-Menge herangezogenen Ct-Wert-Grenzen erwiesen sich als zu niedrig, so dass der tatsächliche ZNS-Gehalt in der überwiegenden Zahl der Untersuchungen als deutlich zu niedrig bewertet wurde. Insgesamt wurde der tatsächliche ZNS-Gehalt 35-mal unterschätzt (70 % der Untersuchungen). Der von der Vollkonserve mit 1 % Rinderhirn durchschnittlich erreichte Ct-Wert lag beispielsweise mit 34,20 Zyklen vier PCR-Zyklen über dem Cut off-Wert dieser Kategorie. Der durchschnittliche Ct-Wert der 8%igen Vollkonserve lag bei 31,65 und überstieg den für diese Kategorie angewendeten Schwellenwert um mehr als vier PCR-Zyklen.

Tabelle 27: Ergebnisse zum Nachweis von ZNS (Rinderhirn) in artifiziell kontaminierten Brühwurst-Vollkonserven nach unterschiedlichen Lagerungszeiten (bei + 2° C) mit dem Reverse Transkriptase-Real Time-PCR-Verfahren

ZNS-Gehalt	Lagerungsdauer in Monaten				
	4	6	12	18	24
0 %	-	-	-	-	-
0 %	-	-	-	-	-
0,1 %	(+)	+	(+)	+	+
0,1 %	(+)	+	(+)	+	-
1 %	+	+	+	+	+
1 %	+	+	+	+	+
2 %	+	+	+	+	+
2 %	+	+	+	+	+
8 %	+	+	+	+	+
8 %	+	+	+	+	+

+ positiv, ZNS nachgewiesen

(+) fraglich positiv (< 1 PCR-Zyklus über Schwellenwert)

- negativ, kein ZNS nachgewiesen

4.2.1.4 Zusammenfassung der Ergebnisse der Untersuchung von Brühwurst-Vollkonserven mit Zusatz von Rinderhirn

Bei den Brühwurst-Vollkonserven handelte es sich um das Untersuchungsmaterial, welches am stärksten hitzebehandelt worden war. Dennoch konnten Proben mit 1 % Hirngewebe und mehr zuverlässig mit den drei Untersuchungsmethoden nachgewiesen werden. Zur besseren Übersicht werden in Tabelle 28 die Ergebnisse der einzelnen Methoden zunächst ohne Berücksichtigung weiterer Einflussfaktoren gegenübergestellt. Die statistische Auswertung zeigte, dass obwohl das Reverse-Transkriptase-Real Time-PCR-Verfahren auch in dieser Untersuchungsreihe die wenigsten falsch-negative Ergebnisse zu verzeichnen hatte, sich die drei Nachweismethoden hier nicht signifikant unterschieden ($p = 1,000$). Auch die Lagerdauer, die in diesem Versuch immerhin 24 Monate betrug, zeigte keinen signifikanten Effekt ($p = 1,000$).

Tabelle 28: Falsch-positive, falsch-negative und fragliche Ergebnisse der unterschiedlichen Nachweisverfahren in den Untersuchungen von artifiziell mit Rinderhirn kontaminierten Lyoner-Vollkonserven

	RIDASCREEN® Risk Material	Brainostic™	Reverse Transkriptase- Real Time-PCR
Falsch-positive Ergebnisse	0 / 10	0 / 10	0 / 10
Falsch-negative Ergebnisse	10 / 40	4 / 40	1 / 40
Fraglich-positive Ergebnisse	4 / 40	5 / 40	4 / 40

Die Ergebnisse wurden in der Untersuchung von jeweils 40 ZNS-positiven und 10 ZNS-negativen Proben ermittelt.

4.3 Brühwurst-Dreiviertelkonserven mit Rinderhirn

4.3.1.1 RIDASCREEN® Risk Material

Sämtliche Konserven, die einen ZNS-Gehalt von 1 % und mehr aufwiesen, wurden während der gesamten Untersuchungsperiode als ZNS-positiv detektiert. Die 0,1%ige Probe lag unter der vom Hersteller angegebenen Nachweisgrenze dieses Tests. Dennoch wurde die 0,1%ige Probe in den ersten Aufbereitungen (Lagerungszeit vier bzw. sechs Monate) immerhin mit einer Signalstärke im fraglich-positiven Bereich erfasst. In den folgenden Aufbereitungen konnte die 0,1%ige Probe nicht mehr nachgewiesen werden. Es wurden keine falsch-positiven Ergebnisse beobachtet (Tabelle 29).

Die semiquantitative Bewertung des ZNS-Gehalts war in 25 der Untersuchungen korrekt und in 25 zu niedrig. Zu den 25 richtigen Einstufungen des ZNS-Gehalts zählten hierbei zehn Aufbereitungen der Probe ohne ZNS und zehn Aufbereitungen der 0,1%igen Probe, die mit „ZNS < 0,2 %“ richtig erfasst wurden. Ansonsten wurde der ZNS-Gehalt lediglich in fünf Aufbereitungen der 8%igen Probe richtig als „> 2 %“ bewertet. Die zu niedrigen Bewertungen der ZNS-Menge waren teilweise drastisch, so erreichte beispielsweise die 8%ige Probe in zwei Untersuchungen nicht einmal die Signalstärke, die einem ZNS-Gehalt von 1 % entsprochen hätte.

**Tabelle 29: Ergebnisse zum Nachweis von ZNS (Rinderhirn) in
artifiziiell kontaminierten Brühwurst-Dreiviertelkonserven
nach unterschiedlichen Lagerungszeiten (bei + 2° C) mit
dem RIDASCREEN® Risk Material-Verfahren**

ZNS- Gehalt	Lagerungsdauer in Monaten				
	4	6	12	18	24
0 %	-	-	-	-	-
0 %	-	-	-	-	-
0,1 %	(+)	(+)	-	-	-
0,1 %	(+)	(+)	-	-	-
1 %	+	+	+	+	+
1 %	+	+	+	+	+
2 %	+	+	+	+	+
2 %	+	+	+	+	+
8 %	+	+	+	+	+
8 %	+	+	+	+	+

+ positiv, ZNS nachgewiesen

(+) fraglich positiv (OD der Probe \geq doppelter S1)

- negativ, kein ZNS nachgewiesen

4.3.1.2 Brainostic™

In den Untersuchungen mit dem Brainostic™ gelang der eindeutige Nachweis der mit 0,1 % Hirngewebe versetzten Probe in drei von zehn Aufbereitungen. In weiteren fünf Aufbereitungen lag die OD dieser Probe im fraglich-positiven Bereich. Nach 24-monatiger Lagerungsdauer konnte kein ZNS-Gewebe bei dieser im Niedrigkonzentrationsbereich kontaminierten Probe nachgewiesen werden. Bei sämtlichen Proben mit 1 % und mehr Rinderhirn-Zusatz wurde während der Untersuchungsperiode kein falsch-negatives oder fragliches Ergebnis beobachtet (Tabelle 30). Es entstanden auch keine falsch-positiven Ergebnisse.

In der semiquantitativen Auswertung wurde der ZNS-Gehalt der einzelnen Proben in 25 der Untersuchungen richtig und in 25 der Untersuchungen zu niedrig bewertet.

**Tabelle 30: Ergebnisse zum Nachweis von ZNS (Rinderhirn) in
artifiziiell kontaminierten Brühwurst-Dreiviertelkonserven
nach unterschiedlichen Lagerungszeiten (bei + 2° C) mit
dem Brainostic™-Verfahren**

ZNS- Gehalt	Lagerungsdauer in Monaten				
	4	6	12	18	24
0 %	-	-	-	-	-
0 %	-	-	-	-	-
0,1 %	+	+	(+)	(+)	-
0,1 %	+	(+)	(+)	(+)	-
1 %	+	+	+	+	+
1 %	+	+	+	+	+
2 %	+	+	+	+	+
2 %	+	+	+	+	+
8 %	+	+	+	+	+
8 %	+	+	+	+	+

+ positiv, ZNS nachgewiesen

(+) fraglich positiv (OD der Probe \geq doppelter Blank)

- negativ, kein ZNS nachgewiesen

4.3.1.3 Reverse Transkriptase-Real Time-PCR

Sämtliche Konserven mit einem ZNS-Zusatz von 1 % und mehr konnten während der gesamten Lagerungsperiode als positiv erkannt werden. Mit dem molekulargenetisch basierten Verfahren gelang der sichere Nachweis der im Niedrigkonzentrationsbereich mit 0,1 % Rinderhirn versetzten Probe in acht von zehn Aufbereitungen. Beide Proben des Doppelansatzes der 0,1%igen Probe in Monat 6 wiesen einen Ct-Wert knapp (weniger als ein PCR-Zyklus) oberhalb des Cut off-Wertes des Verfahrens auf, was einem fraglich-positiven Ergebnis entspricht. Es wurde kein falsch-positives Ergebnis beobachtet (Tabelle 31).

Auch bei den Dreiviertelkonserven erwiesen sich die zur semiquantitativen Auswertung herangezogenen Ct-Wert-Grenzen als zu niedrig, in 32 Fällen wurde die ZNS-Menge unterschätzt, das entspricht 64 % der

Untersuchungen. Der ZNS-Gehalt der Proben wurde dabei teilweise deutlich unterbewertet. So lag durchschnittlich für die mit 1 % Rinderhirn kontaminierte Konserve ermittelte Ct-Wert beispielsweise bei 32,9 Zyklen. Der zuvor gewählte Cut off-Wert für Proben mit 1 % ZNS lag jedoch bei 30,5 Zyklen. Dieser Wert wurde von keiner 1%igen Probe erreicht.

Tabelle 31: Ergebnisse zum Nachweis von ZNS (Rinderhirn) in artifiziell kontaminierten Brühwurst-Dreiviertelkonserven nach unterschiedlichen Lagerungszeiten (bei + 2° C) mit dem Reverse Transkriptase-Real Time-PCR-Verfahren

ZNS-Gehalt	Lagerungsdauer in Monaten				
	4	6	12	18	24
0 %	-	-	-	-	-
0 %	-	-	-	-	-
0,1 %	+	(+)	+	+	+
0,1 %	+	(+)	+	+	+
1 %	+	+	+	+	+
1 %	+	+	+	+	+
2 %	+	+	+	+	+
2 %	+	+	+	+	+
8 %	+	+	+	+	+
8 %	+	+	+	+	+

+ positiv, ZNS nachgewiesen

(+) fraglich positiv (< 1 PCR-Zyklus über Schwellenwert)

- negativ, kein ZNS nachgewiesen

4.3.1.4 Zusammenfassung der Ergebnisse der Untersuchungen von Brühwurst-Dreiviertelkonserven mit Zusatz von Rinderhirn

Die einleitend in Tabelle 32 zusammengefassten Ergebnisse ohne Berücksichtigung der Lagerungsdauer und ZNS-Konzentration, lassen erkennen, dass bei Verwendung des Reversen Transkriptase-Real Time-PCR-Verfahrens im Gegensatz zu den ELISA-Verfahren keine falsch-negative bzw. falsch-positive Ergebnisse auftraten. Die statistische Auswertung ergab jedoch keinen signifikanten Einfluss der Methode ($p = 0,2251$). Erneut zeigte sich auch keinen signifikanten Effekt durch den Einflussfaktor Lagerdauer ($p = 0,6399$).

Tabelle 32: Falsch-positive, falsch-negative und fragliche Ergebnisse der unterschiedlichen Nachweisverfahren in den Untersuchungen von artifiziell mit Rinderhirn kontaminierten Lyoner-Dreiviertelkonserven

	RIDASCREEN® Risk Material	Brainostic™	Reverse Transkriptase- Real Time-PCR
Falsch-positive Ergebnisse	0 / 10	0 / 10	0 / 10
Falsch-negative Ergebnisse	6 / 40	2 / 40	0 / 40
Fraglich-positive Ergebnisse	4 / 40	5 / 40	2 / 40

Die Ergebnisse wurden in der Untersuchung von jeweils 40 ZNS-positiven und 10 ZNS-negativen Proben ermittelt.

4.4 Leberwurst-Kesselkonserven

4.4.1.1 RIDASCREEN® Risk Material

In den Untersuchungen mit dem Risk Material-ELISA konnte die Leberwurst-Kesselkonserven mit 0,1 % Rinderhirn in insgesamt 16 Aufbereitungen viermal eindeutig positiv mit einer OD größer oder gleich der OD von Standard 2 detektiert werden. In den restlichen 12 Untersuchungen erreichte sie eine Signalstärke im fraglichen Bereich. Diese Ergebnisse sind besonders bemerkenswert, da die vom Hersteller ausgelobte Nachweisgrenze in erhitzten Fleischerzeugnissen 0,2 % beträgt.

Bei sämtlichen Leberwurst-Konserven mit einem ZNS-Gehalt von 0,2 % und darüber trat während der einjährigen Lagerungsdauer kein falsch-negatives oder fragliches Ergebnis auf. Die Konserven ohne ZNS wurden in allen Untersuchungen als negativ erkannt. Eine Abnahme der Signalstärke des Markerproteins in Abhängigkeit von der Lagerungsdauer konnte nicht beobachtet werden (Tabelle 33).

Die Menge des ZNS-Gehaltes wurde in der semiquantitativen Auswertung 58-mal richtig (91 % der Untersuchungen) und sechsmal zu hoch (0,1 % in Monat 6 und 12 und 0,5 % unmittelbar nach Herstellung des Probenmaterials) eingeschätzt. Während es in anderen Versuchsreihen häufig zu einer Unterschätzung des tatsächlichen ZNS-Gehalts kam, war dies in der Versuchsreihe mit Leberwurst-Kesselkonserven kein einziges Mal der Fall.

**Tabelle 33: Ergebnisse zum Nachweis von ZNS (Rinderhirn) in
artifiziiell kontaminierten Leberwurst-Kesselkonserven
nach unterschiedlichen Lagerungszeiten (bei + 10° C) mit
dem RIDASCREEN® Risk Material-Verfahren**

ZNS-Gehalt	Lagerungsdauer in Monaten			
	0	1	6	12
0 %	-	-	-	-
0 %	-	-	-	-
0,1 %	(+)	(+)	(+)	(+)
0,1 %	(+)	(+)	(+)	+
0,1 %	(+)	(+)	+	+
0,1 %	(+)	(+)	+	(+)
0,2 %	+	+	+	+
0,2 %	+	+	+	+
0,5 %	+	+	+	+
0,5 %	+	+	+	+
1 %	+	+	+	+
1 %	+	+	+	+
2 %	+	+	+	+
2 %	+	+	+	+
8 %	+	+	+	+
8 %	+	+	+	+

+ positiv, ZNS nachgewiesen

(+) fraglich positiv (OD der Probe \geq doppelter S1)

- negativ, kein ZNS nachgewiesen

4.4.1.2 Brainostic™

Mit dem Brainostic™-ELISA gelang der Nachweis sämtlicher ZNS-positiven Proben während der gesamten Lagerungszeit (Tabelle 34). Allerdings erreichte die 0,1%ige Probe am Ende der zwölfmonatigen Lagerungszeit nur noch eine Signalstärke im fraglich-positiven Bereich. Die Konserve ohne Rinderhirn wurde in allen Untersuchungen als negativ erkannt.

Die semiquantitative Beurteilung der Höhe des ZNS-Zusatzes fiel besonders zu Beginn dieser Untersuchungsreihe oftmals deutlich zu hoch aus. Insgesamt wurde bei 15 Proben der ZNS-Gehalt höher als der tatsächliche eingeschätzt. Bei 17 Untersuchungen wurde die in der Probe enthaltene ZNS-Menge unterbewertet. Diese Unterbewertungen traten erst nach mindestens sechsmonatiger Lagerung auf. Bei immerhin der Hälfte der Untersuchungen erfolgte die Abschätzung des ZNS-Gehalts im Vergleich zu den mitgeführten Standardlösungen richtig.

**Tabelle 34: Ergebnisse zum Nachweis von ZNS (Rinderhirn) in
artifiziiell kontaminierten Leberwurst-Kesselkonserven
nach unterschiedlichen Lagerungszeiten (bei + 10° C) mit
dem Brainostic™ -Verfahren**

ZNS-Gehalt	Lagerungsdauer in Monaten			
	0	1	6	12
0 %	-	-	-	-
0 %	-	-	-	-
0,1 %	+	+	+	(+)
0,1 %	+	+	+	(+)
0,1 %	+	+	+	(+)
0,1 %	+	+	+	(+)
0,2 %	+	+	+	+
0,2 %	+	+	+	+
0,5 %	+	+	+	+
0,5 %	+	+	+	+
1 %	+	+	+	+
1 %	+	+	+	+
2 %	+	+	+	+
2 %	+	+	+	+
8 %	+	+	+	+
8 %	+	+	+	+

+ positiv, ZNS nachgewiesen

(+) fraglich positiv (OD der Probe \geq doppelter Blank)

- negativ, kein ZNS nachgewiesen

4.4.1.3 Reverse Transkriptase-Real Time-PCR

In den Untersuchungen mit der RT-Real Time-PCR konnten in 50 von 56 Untersuchungen ZNS-positiver Proben diese richtig erkannt werden (Tabelle 35). Die 0,1%ige Konserve wurde direkt nach der Herstellung des Untersuchungsmaterials und einen Monat später in acht von acht Einzeluntersuchungen als ZNS-positiv erkannt. Nach sechsmonatiger Lagerung erbrachte sie in einer von vier Untersuchungen ein falsch-negatives und in einer ein fragliches Ergebnis. Nach zwölfmonatiger Lagerungsdauer waren drei der vier Untersuchungsergebnisse dieser Probe falsch-negativ. Auch die Konserven mit 0,2 %; 0,5 % und 1 % ZNS wurden während des ersten Monats in sämtlichen Untersuchungen detektiert. Ab dem sechsten Monat traten bei der 0,2%igen Probe zwei fragliche und ein falsch-negatives, bei der 0,5%igen Probe ein falsch-negatives und bei der 1%igen Probe ein fragliches Ergebnis auf. Die Signalstärke der Leberwurstkonserven mit 2 und 5 % Rinderhirn lag während der gesamten Untersuchungen oberhalb des Cut off-Wertes. Es traten keine falsch-positiven Ergebnisse auf.

Wie zuvor bei den Brühwurst-Konserven beobachtet, waren die hier angewendeten Ct-Wert-Grenzen zur semiquantitativen Auswertung nicht geeignet, da der tatsächliche ZNS-Gehalt bei sämtlichen Proben mit ZNS-Beimischung Fällen zu gering eingestuft wurde.

**Tabelle 35: Ergebnisse zum Nachweis von ZNS (Rinderhirn) in
artifiziiell kontaminierten Leberwurst-Kesselkonserven
nach unterschiedlichen Lagerungszeiten (bei + 10° C) mit
dem Reverse Transkriptase-Real Time-PCR-Verfahren**

ZNS-Gehalt	Lagerungsdauer in Monaten			
	0	1	6	12
0 %	-	-	-	-
0 %	-	-	-	-
0,1 %	+	+	+	-
0,1 %	+	+	-	+
0,1 %	+	+	(+)	-
0,1 %	+	+	+	-
0,2 %	+	+	+	(+)
0,2 %	+	+	(+)	-
0,5 %	+	+	-	+
0,5 %	+	+	+	+
1 %	+	+	(+)	+
1 %	+	+	+	+
2 %	+	+	+	+
2 %	+	+	+	+
8 %	+	+	+	+
8 %	+	+	+	+

+ positiv, ZNS nachgewiesen

(+) fraglich positiv (< 1 PCR-Zyklus über Schwellenwert)

- negativ, kein ZNS nachgewiesen

4.4.1.4 Zusammenfassung der Ergebnisse der Untersuchung von Leberwurst-Kesselkonserven mit Zusatz von Rinderhirn

Die in Tabelle 36 zusammengefassten Ergebnisse ohne weitere Aufschlüsselung nach Lagerungsdauer und ZNS-Konzentration des Referenzmaterials zeigen bereits, dass in dieser Untersuchungsreihe erstmalig die Reverse Transkriptase-Real Time-PCR eine geringere Sensitivität als die ELISA-Verfahren aufwies. Die Wahl der Methode zeigte zwar bei den Untersuchungen der Leberwurstkonserven einen

signifikanten Einfluss ($p = 0,010$), jedoch sank hier die Chancenhäufigkeit des ZNS-Nachweises bei Verwendung der Reversen Transkriptase-Real Time-PCR im Vergleich zum Risk Material-ELISA ($OR = 0,75$). Im Vergleich zwischen Brainostic™-ELISA und Risk Material-ELISA zeigte sich der Brainostic™ überlegen ($OR = 4,9$).

Bei den Leberwurst-Kesselkonserven führte die Länge der Lagerungszeit zu einer Abnahme der Nachweischance ($p = 0,0006$; $OR = 0,83$).

Tabelle 36: Falsch-positive, falsch-negative und fragliche Ergebnisse der unterschiedlichen Nachweisverfahren in den Untersuchungen von artifiziell mit Rinderhirn kontaminierten Leberwurst-Kesselkonserven

	RIDASCREEN® Risk Material	Brainostic™	Reverse Transkriptase- Real Time-PCR
Falsch-positive Ergebnisse	0 / 8	0 / 8	0 / 8
Falsch-negative Ergebnisse	0 / 56	0 / 56	6 / 56
Fraglich-positive Ergebnisse*	12 / 56	4 / 56	4 / 56

Die Ergebnisse wurden in der Untersuchung von jeweils 56 ZNS-positiven und 8 ZNS-negativen Proben ermittelt.

4.5 Tupferproben von Schlachttierkörpern und –köpfen

Während in den vorherigen Untersuchungen ausschließlich artifiziell kontaminiertes Referenzmaterial untersucht wurde, sollte durch die Beprobung von Rinderhälften und Rinderköpfen am Schlachthof eine Aussage getroffen werden, ob und in welchem Ausmaß ZNS-Kontaminationen unter Praxisbedingungen zu erwarten sind. Von insgesamt 96 ausschließlich mit dem RT-Real Time-PCR-Verfahren untersuchten Tupferproben aus einem Kopffleisch-verarbeitenden Betrieb (32 Proben aus den Stirnbereich, 32 Proben von der Backenmuskulatur und 32 Proben vom Halsfett) wurde in 26 Tupfer ZNS-Gewebe nachgewiesen. Die Kontaminationsrate der Kopffleischtupfer betrug damit insgesamt 27 %. Von allen ZNS-positiven Tupfern wiesen 15 Tupferproben eine Kontamination im Niedrigkonzentrationsbereich von 0,1 bis 1 % ZNS-Gewebe auf. Elf Kopffleisch-Tupfer waren mit über 1 % ZNS-Material kontaminiert.

Von 32 Proben aus dem Bereich der Stirn erwiesen sich 23 als ZNS-negativ, während neun Tupfer eine ZNS-Kontamination nachwiesen. Dabei waren sechs Proben mit bis zu 1 % ZNS-Gewebe kontaminiert und drei Proben mit über 1 %.

Von 32 Tupfern aus dem Bereich der Backenmuskulatur (*Musculus masseter*) waren 29 ZNS-negativ und drei positiv. Zwei Backentupfer enthielten weniger und einer mehr als 1 % ZNS-Gewebe.

Bei den im Bereich des Halsfetts (Halsvene mit anhaftendem Fettgewebe) entnommenen Proben waren 18 Tupfer negativ und 14 positiv. Von den 14 positiven Proben vom Halsfett waren je sieben mit bis zu 1 % und sieben mit über 1 % ZNS kontaminiert.

Bei den 71 untersuchten Tupferproben von gespaltenen Rinder-Schlachttierkörpern wurde in 44 Proben ZNS-Gewebe nachgewiesen. Die Kontaminationsrate der Schlachttierkörperhälften betrug somit 62 %. Davon waren 34 Tupfer mit 0,1 bis 1 % ZNS-Gewebe behaftet. Zehn der untersuchten Schlachttier-Tupfer wiesen ZNS-Kontaminationen von über 1 % ZNS-Gehalt auf.

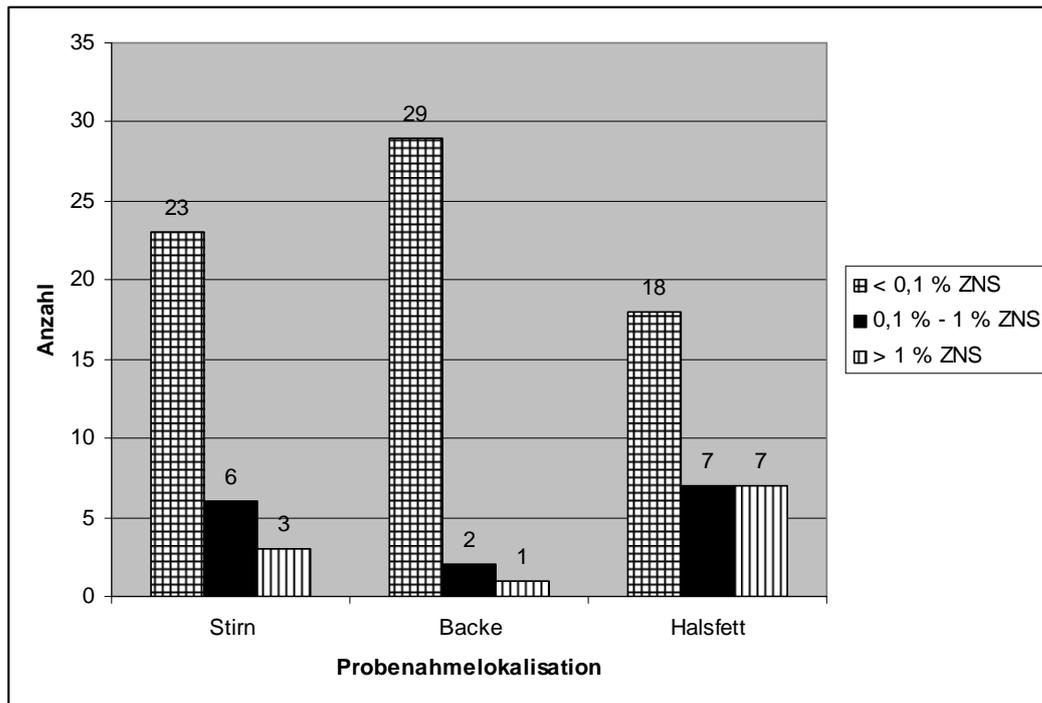


Abbildung 4: Tupferproben von Rinderköpfen

5 DISKUSSION

5.1 GFAP und GFAP-mRNA als Marker-Substanz

Das zu den Intermediärfilamenten zählende saure Gliafaserprotein (engl.: Glial fibrillary acidic protein) der neuronalen Astrogliazellen stellt eine in hohem Maße ZNS-spezifische Markersubstanz dar (SCHMIDT et al., 1999; SCHMIDT et al., 2001). Zusätzlich zeichnet sich GFAP durch eine gute Hitzestabilität aus (SCHMIDT et al., 2001). Beide derzeit am Markt befindlichen Testsysteme zum Nachweis von ZNS-Gewebe in Fleisch und Fleischerzeugnissen nutzen daher das saure Gliafaserprotein als ELISA-Antigen. Aber auch die mRNA dieses Proteins eignet sich als hochspezifischer Marker für ZNS-Gewebe. Die Halbwertszeit von mRNA beträgt im Allgemeinen nur wenige Minuten bis Stunden. Besonders die mRNA hochkonservierter Proteine liegt jedoch in einer stabilen Form vor (ROSS, 1995). Die Eignung von GFAP-mRNA zur ZNS-Detektion, auch über Lagerungsperioden von mehreren Tagen bis zu Monaten, wurde in mehreren Studien belegt (LANGE et al., 2002; SEYBOLDT et al., 2003; SCHÖNENBRÜCHER et al., 2004b; NOWAK et al. 2005; ABDULMAWJOOD et al., 2005) und in der hier vorliegenden Arbeit für Lagerungszeiten bis zu 24 Monaten bestätigt.

5.2 Auswahl der Untersuchungsmaterialien und der Nachweismethoden

Ziel der eigenen Untersuchungen war es, die Leistungsfähigkeit der drei verwendeten Nachweisverfahren unter praxisnahen Bedingungen zu vergleichen. Daher wurden möglichst unterschiedliche Fleischerzeugnisse als Referenzmaterialien ausgewählt, um den Einfluss verschiedener technologischer Parameter und Zutaten einzubeziehen. Der Untersuchungszeitraum richtete sich jeweils nach der Haltbarkeit, der empfohlenen Lagerungstemperatur und den für das jeweilige Produkt geltenden Rechtsvorschriften. Die Gruppe der nativen Fleischprodukte wurde dabei von Rinderhackfleisch repräsentiert. Die Lagerungstemperatur wurde an die Vorgaben der Verordnung über

Anforderungen an die Hygiene beim Herstellen, Behandeln und Inverkehrbringen von bestimmten Lebensmitteln tierischen Ursprungs (Tierische Lebensmittel-Hygieneverordnung, Tier-LMHV) angepasst. Kapitel II der Verordnung besagt, dass Hackfleisch bei + 2° C zu kühlen bzw. bei unter - 18° C tiefzufrieren ist. Als Untersuchungszeitraum wurde für gekühlt gelagertes Hackfleisch ein Zeitraum von 14 Tagen und für tiefgefrorenes Hackfleisch von 18 Monate ausgewählt. Diese Lagerungszeiten wurden der mittlerweile nicht mehr rechtsgültigen Anlage 2a der Fleischhygiene-Verordnung entlehnt, welche besagte, dass Rinderhack aus frischem Fleisch herzustellen war, das von Rindern stammte, die vor längstens 15 Tagen geschlachtet worden sind oder aus Fleisch, das entbeint und tiefgefroren wurde. Wobei die Lagerungszeit von tiefgefrorenem Rindfleisch hierbei nicht länger als 18 Monate betragen durfte. In der derzeit rechtsgültigen Tier-LMHV werden bezüglich des Alters des verwendeten Ausgangsmaterials keine Einschränkungen mehr aufgeführt.

Da der GFAP-Gehalt im Rückenmark (1724 ng/mg bis 2220 ng/mg) deutlich höher als der von Hirngewebe (574 ng/mg bis 710 ng/mg) ist, wurde das Hackfleisch vergleichend mit beiden ZNS-Gewebetypen artifiziell kontaminiert (SCHMIDT et al., 2001). Die erhitzten Fleischerzeugnisse wurden ausschließlich mit dem schwieriger zu detektierenden Rinderhirn versetzt.

Stellvertretend für hitzebehandelte Fleischerzeugnisse wurden Brüh- und Kochwürste ausgewählt. Dabei wurde die Brühwurst nach Lyoner Art sowohl als Dreiviertel- wie auch als Vollkonserve produziert. Dadurch war es möglich, die Auswirkung der unterschiedlich starken Hitzebehandlung beider Erzeugnisse direkt zu vergleichen. Zusätzlich wurde eine Leberwurst-Kesselkonserve als besonders fett- und enzymreiches Referenzmaterial ausgewählt. Die Lagerungsdauer und -temperatur wurden den für das jeweilige Erzeugnis gültigen Empfehlungen angeglichen (siehe Tabelle 37).

Tabelle 37: Mikrobiologische Einteilung von Kochwürsten und Kochpökelware (LEISTNER 1970, modifiziert nach MÜLLER 1989)

Bezeichnung und Lagerfähigkeit	Kerntemperatur, Hitzeeffekt (F_c)
Frischware 6 Wochen bei $< 5^\circ \text{C}$	65°C bis 75°C
Kesselkonserven 1 Jahr bei $< 10^\circ \text{C}$	1 Stunde $> 98^\circ \text{C}$ $F_c > 0,4$
Dreiviertelkonserven 1 Jahr bei $< 10^\circ \text{C}$	$F_c = 0,6 - 0,8$
Vollkonserven 4 Jahre bei $< 25^\circ \text{C}$	$F_c = 4,0 - 5,5$
Tropenkonserven 1 Jahr bei $< 40^\circ \text{C}$	$F_c = 12,0 - 15,0$

Als Nachweisverfahren wurden zwei kommerziell verfügbare und am Markt etablierte ELISA-Testkits und ein neuartiges molekularbiologisches Verfahren, welches erstmals den Nachweis von GFAP-mRNA mit einem Real Time-PCR-System nutzt, ausgewählt. Dabei war es von besonderem Interesse, eine eventuell geringere Stabilität der mRNA gegenüber dem GFAP-Protein zu untersuchen. Eine Übersicht der wesentlichen Kenngrößen der einzelnen Nachweisverfahren ist in Tabelle 38 dargestellt.

Tabelle 38: Übersicht der verwendeten ZNS-Nachweisverfahren

	RIDASCREEN® Risk Material 10/5	RIDASCREEN® Risk Material	Brainostic™	Reverse Transkriptase- Real Time-PCR
Hersteller	R-Biopharm, Darmstadt	R-Biopharm, Darmstadt	ScheBo®, Gießen	Institut für Tierärztliche Nahrungsmittel- kunde, Gießen
Test- prinzip	ELISA	ELISA	ELISA	Reverse Transkriptase- Real Time-PCR
Marker- substanz	GFAP	GFAP	GFAP	GFAP-mRNA
Nachweis- grenze*	0,1 %	0,2 %	0,1 %	0,1 %
Unter- suchungs- material	Fleisch, Fleisch- erzeugnisse, Tupfer	Hitzebehandelte Fleisch- erzeugnisse	Fleisch, Fleisch- erzeugnisse, hitzebehandelte Fleischerzeug- nisse, Tupfer	Fleisch, Fleisch- erzeugnisse, hitzebehandelte Fleischerzeug- nisse, Tupfer

* laut Herstellerangabe

5.3 Einfluss der Nachweismethoden

Für einen Vergleich der Nachweisgrenzen und der Sensitivität der drei hier verwendeten Testverfahren empfiehlt sich eine gesonderte Betrachtung der Ergebnisse aus den einzelnen Untersuchungsreihen. Nur bei einer differenzierten Betrachtungsweise werden die Einflüsse der unterschiedlichen Untersuchungsmaterialien, der unterschiedlichen Probenahmetechniken und der Lagerungszeiten ausreichend berücksichtigt. Eine ursprüngliche Fragestellung der hier vorliegenden Arbeit bestand jedoch darin, die drei Nachweismethoden hinsichtlich ihrer Leistung miteinander zu vergleichen. Daher wurde an dieser Stelle einleitend auch eine zusammenfassende Beurteilung der einzelnen Verfahren durchgeführt. In den Versuchsreihen mit nicht-hitzebehandeltem Untersuchungsmaterial zeigte sich ein signifikanter Einfluss der Nachweismethode. Die größte Sensitivität zeigte hierbei das Reverse Transkriptase-Real Time-PCR-Verfahren. Der Brainostic™-ELISA wies gegenüber dem Risk Material-ELISA eine höhere Sensitivität auf. In den Untersuchungen von hitzebehandelten Brühwurstkonserven konnte dieser Effekt nicht mehr so deutlich dargestellt werden. Obwohl auch hier

bei Verwendung des Reversen Transkriptase-Real Time-PCR-Verfahrens die wenigsten falsch-negativen Ergebnisse beobachtet wurden, blieb der Effekt statistisch nicht aussagekräftig. Weitere Untersuchungen von Brühwurstkonserven mit ZNS-Konzentrationen im kritischen Bereich zwischen 0,1 % und 1 % könnten hier Aufschluss geben, ob die bei nicht-hitzebehandeltem Referenzmaterial festgestellte höhere Empfindlichkeit der Reversen Transkriptase-Real Time-PCR in hitzebehandelten Brühwurstkonserven tatsächlich nicht vorliegt. Eine völlig andere Situation zeigte sich in den Untersuchungen von Leberwurst-Kesselkonserven. Hier war die Nachweiswahrscheinlichkeit mit dem Brainostic™-ELISA am größten, gefolgt von Risk Material-ELISA und an dritter Stelle dem Reverse Transkriptase-Real Time-PCR-Verfahren.

5.4 Fragliche Ergebnisse

Für jedes Testverfahren wurde ein fraglich-positiver Bereich definiert. Damit wurden Proben bezeichnet, die aufgrund ihrer Signalstärke verdächtig für den Zusatz von ZNS-Gewebe waren, jedoch unterhalb des Cut off-Werts des jeweiligen Tests lagen. Diese Art der Ergebnisauswertung empfiehlt sich für die wissenschaftlich motivierte Betrachtung, um auch geringste Spuren von Risikomaterial noch nachzuweisen. Da zahlreiche der im Niedrigkonzentrationsbereich mit ZNS-Gewebe versetzten Proben ansonsten unter die Nachweisgrenze der Verfahren rutschen, verschlechtert sich die Sensitivität ohne Berücksichtigung eines fraglich-positiven Bereichs besonders bei den ELISA-Verfahren und da wiederum besonders beim RIDASCREEN®-ELISA deutlich. Auch war diese Abstufung der Ergebnisse sinnvoll, um bessere Übergangsbereiche für die statistische Auswertung zu schaffen. Vergleicht man die Häufigkeit, mit der bei Proben mit geringem ZNS-Gehalt ein Ergebnis im fraglichen Bereich auftrat, damit, wie selten Proben ohne ZNS-Zusatz eine Signalstärke in diesem Bereich erzielten, so wird deutlich, dass hier ein wichtiger Indikator für Spuren von enthaltenem ZNS-Gewebe vorliegt. Sowohl mit dem Reverse Transkriptase-Real Time-PCR-Verfahren wie auch mit dem Brainostic™-ELISA wurde bei keiner Probe ohne ZNS eine Signalstärke im fraglich-positiven Bereich

beobachtet. Lediglich in den Untersuchungen mit dem Risk Material 10/5-ELISA wurden in zwei (bei Probenahme mit Einwaage) bzw. drei (bei Probenahme mit Tupfern) Aufbereitungen der Nullprobe Signalstärken im fraglichen Bereich gemessen. Unter Berücksichtigung der Tatsache, dass falsch-positive Ergebnisse zu erheblichen Auswirkungen auf die Fleischwirtschaft führen können (LÜCKER et al., 2003) und dass die Aufnahme geringer Mengen BSE-infizierten Gewebes allem Anschein nach nicht zu Infektionen des Menschen führt (LASMEZAS et al., 2005), sollte diese Form der Ergebnisinterpretation in der amtlichen Überwachung und in der Routinediagnostik jedoch nicht angewendet werden. Im Rahmen der Routinediagnostik empfiehlt es sich statt dessen, Proben mit einer Signalstärke geringfügig unterhalb der Nachweisgrenze wiederholt aufzubereiten oder gezielt weitere Proben des gleichen Herstellers zu untersuchen.

5.5 Einfluss der Probenahmetechnik auf die Nachweisgrenze

In den eigenen Untersuchungen mit dem RIDASCREEN® Risk Material 10/5-ELISA konnte eine deutliche Abhängigkeit der Zuverlässigkeit dieses Verfahrens von der Art der Probenahme beobachtet werden. Für die Untersuchungen des Hackfleischs mit Zusatz von Rinder-Rückenmark wurden zwei Methoden zur Probenaufbereitung, nämlich die vom Hersteller empfohlene Probenentnahme mit Hilfe von Tupfern und die modifizierte, direkte Einwaage von 50 mg Probenmaterial, vergleichend eingesetzt. Mit Hilfe der modifizierten Probenahmetechnik konnte eine Steigerung der Sensitivität dieses Verfahrens erreicht werden. Ein möglicher Erklärungsansatz für die geringere Sensitivität der Tupfer-Technik liegt darin, dass die jeweils am Tupfer haftende Probenmenge stark variiert. Dabei ist zu erwähnen, dass in der hier vorliegenden Untersuchung die Probenahme mittels Tupfer streng standardisiert erfolgte. Sowohl die Kontaktzeit zwischen Probenmaterial und Tupfer, wie auch die Anzahl der Eintauch- und Drehbewegungen waren festgelegt. Unter Praxisbedingungen ist daher davon auszugehen, dass die Absättigung der Tupfer noch deutlich unterschiedlicher ausfällt. Besonders für den ZNS-Nachweis im Niedrigkonzentrationsbereich empfiehlt sich

daher die Verwendung einer definierten Probenmenge von 50 mg. Allerdings verlängert sich durch das Abwiegen der Probenmenge die benötigte Arbeitszeit. Dies fiel besonders bei der gleichzeitigen Aufbereitung mehrerer Lebensmittelproben ins Gewicht. Die Probenahme mittels Tupfer-Technik stellte somit eine weniger sensitive, aber sehr schnell durchzuführende Alternative dar.

5.5.1 Einfluss der Untersuchungsmethode und Lagerungsdauer auf die Nachweisgrenze in Hackfleisch

Die vom Hersteller mit 0,1 % angegebene Nachweisgrenze für den RIDASCREEN® Risk Material 10/5-ELISA konnte in den Untersuchungen von Rinderhackfleisch mit Rückenmark-Zusatz größtenteils bestätigt werden. Abweichend von den Herstellerangaben wurden in der hier vorliegenden Arbeit jedoch sämtliche Proben mit einer Signalstärke oberhalb der OD des doppelten Nullstandards als „verdächtig für den Zusatz von ZNS“, also als fraglich-positiv eingestuft. Die Vorteile dieser Art der Auswertung zeigt sich bei Betrachtung der Ergebnisse der 0,1%igen Hackfleischprobe. Diese jeweils im Vierfachansatz aufbereitete Probe erbrachte unmittelbar nach Herstellung des Referenzmaterials ausschließlich eindeutig positive Ergebnisse. Auch die folgenden Untersuchungen erbrachten für die mit 0,1 % Rückenmark versetzte Probe keine falsch-negativen Ergebnisse. Allerdings lag hierbei die Signalstärke an den Tagen eins bis vierzehn überwiegend im fraglich-positiven Bereich. Eindeutig positive Ergebnisse über den gesamten Lagerungszeitraum hinweg wurden erst ab einer Rückenmarkskonzentration von 0,5 % erreicht. Mit Hilfe der modifizierten Probenahmetechnik durch Einwaage von 50 mg Probenmaterial konnte in mehr Proben das enthaltene ZNS-Gewebe nachgewiesen werden, als bei Verwendung der Tupfertechnik. Zunächst wurde das mit 0,1 % Hirngewebe versetzte Referenzmaterial in nahezu allen Untersuchungen mit dem Risk Material 10/5-ELISA bei Probenahme mit Tupfern als falsch-negativ bewertet. Durch Anwendung der modifizierten Probenaufbereitung in der Untersuchungsreihe mit tiefgefroren gelagertem Hackfleisch konnte die Sensitivität des RIDASCREEN® Risk Material 10/5 soweit verbessert werden, dass der

überwiegende Teil der 0,1%igen Hirnproben immerhin ein fraglich-positives Ergebnis erzielte. Damit decken sich die eigenen Ergebnisse weitgehend mit denen von HOSSNER et al. (2007) sowie HUGHSON et al. (2003). In beiden Studien wurde bei Verwendung des Risk Material 10/5-ELISAs eine gute Nachweisbarkeit von 0,2 bzw. 0,3 % Rückenmark in Referenzproben aus gemahlenem Fleisch beobachtet. Allerdings berichten HOSSNER et al. über stark variierende Ergebnisse des Testverfahrens. Die mit bis zu 0,5 % Hirngewebe dotierten Proben konnten in ihren Untersuchungen, die in der Auswertung keine fraglich-positiven Ergebnisse definierten, nicht detektiert werden. HUGHSON et al. wiesen Hirngewebe erst ab einer Konzentration von 1 % nach (HUGHSON et al., 2003).

Die Nachweisgrenze für den Brainostic™-ELISA wurde vom Hersteller ebenfalls mit 0,1 % ZNS-Gewebe angegeben. In den Untersuchungen von mit Rückenmark dotiertem Hackfleisch konnte dieses bestätigt werden. Sogar der Nachweis von 0,05 % Rückenmark war mit diesem Verfahren während des gesamten Untersuchungszeitraums von 14 Tagen möglich. Der Brainostic™ zeigte jedoch ebenfalls Schwächen bezüglich des Nachweises von Hirngewebe. Obwohl auch für dieses Testverfahren ein fraglich-positiver Ergebnisbereich definiert wurde, erbrachten sowohl die 0,1%ige wie auch die 0,2%ige Probe in mehreren Aufbereitungen von Hackfleisch mit Hirnzusatz falsch-negative Ergebnisse.

Mit dem Reverse Transkriptase-Real Time-PCR-Verfahren wurde in der vierzehntägigen Untersuchungsreihe von gekühlt gelagertem Hackfleisch unabhängig von der Art des ZNS-Zusatzes kein falsch-negatives Resultat beobachtet. Sowohl in den Untersuchungen von Hackfleisch mit Rückenmark wie auch in den Untersuchungen von Hackfleisch mit Hirngewebezusatz konnte mit dem Reverse Transkriptase-Real Time-PCR-Verfahren sämtliche ZNS-haltigen Proben erkannt werden. Diese Ergebnisse bestätigen die bereits von SCHÖNENBRÜCHER et al. (2004a) nachgewiesene gute Lagerungsstabilität der mRNA-Zielregion in nativem Muskelfleisch. Der Nachweis von Rinderhirn und –Rückenmark gelang auch im Niedrigkonzentrationsbereich zuverlässig. Lediglich in der Untersuchungsreihe mit tiefgefrorenem Hackfleisch kam es zu insgesamt drei falsch-negativen Ergebnissen für die Probe mit 0,1 % Hirngewebe.

Somit erwies sich das Reverse Transkriptase-Real Time-PCR-Verfahren in dieser Untersuchungsreihe den immunologischen Verfahren als deutlich überlegen.

Ein kontinuierlicher, signifikanter Einfluss der Lagerungsdauer auf die Nachweisgrenze konnte in den Untersuchungen von Hackfleisch nicht beobachtet werden. Zu falsch-negativen Ergebnissen kam es in dieser Versuchsreihe ausschließlich bei den ELISA-Verfahren. Festzuhalten bleibt, dass nur eine geringe Anzahl an falsch-negativen Ergebnissen in den Aufbereitungen unmittelbar nach Herstellung des Referenzmaterials auftrat. Im weiteren Verlauf der Untersuchungen trat aber keine kontinuierliche Abnahme der Signalstärke auf. Die Anzahl der falsch-negativen Proben stieg einen bzw. drei Tage nach Herstellung leicht an, verringerte sich jedoch am siebten Lagerungstag und stieg nach 14tägiger Lagerung wieder leicht. Die Ursachen für diese Schwankungen sind wahrscheinlich stärker in der Variationsbreite der einzelnen Verfahren, als in der Lagerungsdauer zu sehen. HOSSNER et al. (2007) berichten ebenfalls über eine starke Variation der Untersuchungsergebnisse mit einem GFAP-basiertem ELISA-Verfahren. Das Tiefrieren des Untersuchungsmaterials wirkte sich nicht nachteilig auf die Qualität des Markerproteins bzw. der mRNA aus. Auch die Untersuchungen der bei - 18° C gelagerten Proben zeigten keine signifikanten lagerungsabhängigen Unterschiede.

5.5.2 Einfluss der Untersuchungsmethode und Lagerungsdauer auf die Nachweisgrenze in Brühwurst-Voll- und Dreiviertelkonserven

In diesen Untersuchungsreihen wurde keine statistisch signifikante, höhere Nachweisempfindlichkeit des molekularbiologischen Verfahrens gegenüber den beiden ELISA-Systemen festgestellt, obwohl auch hier in den Untersuchungen mit dem Reversen Transkriptase-Real Time-PCR-Verfahren die wenigsten falsch-negativen Ergebnisse beobachtet wurden. Die von ABDULMAWJOOD et al. (2006) in einem nationalen Ringversuch und eigenen Untersuchungen (2005) beobachtete Nachweisgrenze des Reversen Transkriptase-Real Time-Verfahren von 0,1 % ZNS-Material in

stark hitzebehandeltem und moderat erhitztem Untersuchungsmaterial konnte bestätigt werden.

Bei den Untersuchungen der beiden unterschiedlich stark hitzebehandelten Konserventypen (Voll- und Dreiviertelkonserve) zeigte sich ein deutlicher Einfluss der Prozessierung auf die Qualität der Markersubstanz. Bei Verwendung des RIDASCREEN® Risk Material-ELISAs traten sechs falsch-negative Ergebnisse bei den Dreiviertelkonserven und zehn bei den Vollkonserven auf, bei Verwendung des Brainostic™-ELISAs waren es zwei falsch-positive Ergebnisse bei Dreiviertel- und vier bei Vollkonserven. Das einzige falsch-negative Ergebnis in dieser Untersuchungsreihe bei Nachweis mittels Reverser-Transkriptase-Real Time-PCR trat ebenfalls bei den Vollkonserven auf. Die Ergebnisse stimmen mit den Beobachtungen von SCHMIDT et al. (2001), AGAZZI et al. (2002) und HORLACHER et al. (2002b) überein, dass eine moderate Hitzebehandlung des Untersuchungsmaterials den GFAP-Nachweis im ELISA-Verfahren nicht nachteilig beeinträchtigt, während eine starke Hitzebehandlung von 120° C für 20 Minuten die Nachweisgrenze auf 0,5 % ZNS-Material heraufsetzt. Besonders deutlich wurde dieser Verlust an Sensitivität in Abhängigkeit von der Prozessierung des Untersuchungsmaterials bei dem RIDASCREEN® Risk Material-ELISA. Allerdings wird die Nachweisgrenze dieses Testsystems vom Hersteller für 0,2 % ZNS in erhitztem Probenmaterial angegeben. Lässt man unter diesem Gesichtspunkt die 0,1%igen Proben unberücksichtigt, so relativiert sich dieser beobachtete Sensitivitätsverlust, da Proben mit höherem ZNS-Gehalt mit diesem Nachweisverfahren sicher erfasst werden konnten.

Sowohl GFAP-Protein wie auch die entsprechende mRNA erwiesen sich in dieser Untersuchungsreihe als gegenüber Lagerungseinflüssen sehr stabile Markersubstanzen. Obwohl in der hier vorliegenden Arbeit bewusst lange Lagerungszeiten für die einzelnen Referenzmaterialien ausgewählt wurden, stellte sich der Einfluss der Lagerungsdauer, anders als erwartet, als eher unwesentlich heraus. Die Beobachtungen bei den Untersuchungen mit dem Reverse Transkriptase-Real Time-PCR-Verfahren deuten jedoch verstärkt darauf hin, dass andere äußere Einflussgrößen, wie z. B. minimale Unterschiede in der Qualität der

Reagenzien oder im Ablauf der Laboruntersuchungen, zu Schwankungen in der Signalstärke führen können. So konnte mit der 0,1%igen Dreiviertelkonserve nach sechsmonatiger Lagerung nur eine Signalstärke in fraglich-positiven Bereich erzielt werden. Auch eine Wiederholungsuntersuchung zu diesem Zeitpunkt bestätigte dieses Ergebnis. In sämtlichen früheren und späteren Aufbereitungen, war die Probe jedoch eindeutig als ZNS-positiv zu detektieren. Auch ein Vergleich der Ct-Werte der einzelnen Proben zeigt keine kontinuierliche Tendenz. Die Untersuchung der Vollkonserven zeigte sogar für einige Proben einen Anstieg der Signalstärke nach längerer Lagerung.

In den eigenen Untersuchungen zeigte sich überwiegend, dass GFAP und GFAP-mRNA auch nach monatelanger Lagerung noch zum ZNS-Nachweis in Brühwurstkonserven geeignet sind. Sämtliche beobachteten falsch-negativen Ergebnisse traten bei dem mit geringsten Konzentrationen an ZNS-Gewebe versetztem Untersuchungsmaterial auf. Proben mit einem Prozent und mehr ZNS waren während der gesamten Untersuchungszeit problemlos nachzuweisen. KÜFEN (2003) konnte in ihren Untersuchungen die Stabilität der GFAP-mRNA in Brühwusterzeugnissen über einen Untersuchungszeitraum von 30 Tagen belegen. Die eigenen Untersuchungen zeigen, dass mRNA auch nach deutlich längerer Lagerungszeit noch als Markersubstanz herangezogen werden kann.

5.5.3 Einfluss der Untersuchungsmethode und Lagerungsdauer auf die Nachweisgrenze in Leberwurst-Kesselkonserven

Bei der Untersuchung dieser nur moderat hitzebehandelten aber besonders fett- und enzymreichen Probenmatrix zeigten beide immunologischen ELISA-Verfahren bessere Ergebnisse als die Reverse Transkriptase-Real Time-PCR. Mit den ELISA-Testsystemen konnten sämtliche mit ZNS-Gewebe versetzten Proben nachgewiesen werden, während mit dem Reverse Transkriptase-Real Time-PCR-Verfahren insgesamt sechs der mit einem Prozent und weniger ZNS-Material versetzten Leberwurst-Proben nicht detektiert werden konnte.

Für die Matrix Leberwurst-Kesselkonserven zeichnete sich ein Einfluss der Lagerungsdauer auf die Signalintensität der Markersubstanz ab. Falsch-negative Ergebnisse wurden mit dem Reverse Transkriptase-Real Time-PCR-Verfahren erst nach mehr als einem Monat Lagerungszeit beobachtet. Eine mögliche Erklärung für diese Abnahme der Signalintensität kann der langsame Abbau der mRNA zum Beispiel durch Leberenzyme, welche die moderate Hitzebehandlung überstanden haben, oder durch einsetzende Verderbnisserscheinungen sein. Da zu Anfang der Untersuchungen auch der Nachweis geringer ZNS-Konzentrationen mit dem Reversen Transkriptase-Real Time-PCR-Verfahren möglich war, kann geschlossen werden, dass der hohe Fettgehalt des Referenzmaterials keine nachteilige Beeinflussung der RNA-Isolierung verursacht. Auch wirkten sich die übrigen Inhaltsstoffe der Leberwurst nicht als PCR-Inhibitoren aus. Die eigenen Ergebnisse stehen somit in keinem Widerspruch zu den von KÜFEN (2003) belegten guten Resultaten für den Nachweis von ZNS in Leberwurst mittels eines molekularbiologischen Verfahrens. Diese Autorin wählte einen 30tägigen Untersuchungszeitraum, so dass ein eventuell später einsetzender Abbau der mRNA unbeobachtet bleiben musste.

NOWAK et al. fanden in ihren Arbeiten, bei denen Leberwürste aus dem Einzelhandel vergleichend mit dem RIDASCREEN® Risk Material und einem konventionellen PCR-Verfahren untersucht wurden, vier Proben im ELISA-Test positiv während mit dem Tierarten-unspezifischen PCR-Verfahren keine positive Probe ermittelt wurde (NOWAK et al., 2005).

Die Lagerung der Leberwurst-Konserven erfolgte bei + 10° C, so dass bei diesem Material nach einiger Zeit deutliche Veränderungen in der Beschaffenheit beobachtet werden konnten. Nach sechsmonatiger Lagerung begannen sich das Leberwurstbrät teilweise zu verfärben und wies einen leicht säuerlichen Geruch auf. Offensichtlich hatten die einsetzenden Verderbnisserscheinungen auch Auswirkungen auf die Qualität der Markersubstanz mRNA. Dennoch konnten in den eigenen Untersuchungen noch geringere ZNS-Konzentrationen nachgewiesen werden als es NOWAK et al. (2005) mit einem konventionellen Reverse Transkriptase-PCR-Nachweisverfahren gelang. In den Untersuchungen von NOWAK et al. konnten 0,25 % ZNS-Zusatz in Leberwürsten, die 28

Tage gelagert wurden, nachgewiesen werden. In den eigenen Untersuchungen traten erst nach dreimonatiger und längerer Lagerungszeit zunehmend falsch-negative Ergebnisse auf. Ähnliche Beobachtungen konnten auch mit dem Brainostic™-ELISA gemacht werden. Zwar traten hier während des gesamten Lagerungszeitraumes keine falsch-negativen Ergebnisse auf, die gemessene Signalstärke der einzelnen Proben nahm jedoch zum Ende der Lagerungsperiode hin tendentiell ab. Die Signalintensität der mit dem Risk Material-ELISA untersuchten Proben variierte dagegen kaum.

5.6 Falsch-positive Ergebnisse

Die drei verglichenen Nachweisverfahren zeichneten sich durch eine sehr hohe Spezifität aus. Folgte man bei der Auswertung streng den Herstellerangaben und definierte keinen fraglich-positiven Bereich, so traten keine falsch-positiven Ergebnisse auf. Keine der Proben ohne ZNS-Zusatz erreichte eine Signalstärke oberhalb der sicheren Nachweisgrenze der einzelnen Methoden.

Um eine bessere Detektion der Proben mit geringen ZNS-Konzentrationen zu gewährleisten, wurde in den eigenen Untersuchungen jedoch ein fraglich-positiver Bereich für eine Signalstärke oberhalb des doppelten Nullstandards der ELISA-Tests bzw. weniger als einen PCR-Zyklus oberhalb des Cut off-Werts des Reverse Transkriptase-Real Time-PCR-Verfahrens definiert. Die Probe mit 0 % ZNS-Gewebe erbrachte in den Untersuchungen mit dem Reverse Transkriptase-Real Time-Verfahren und des Brainostic™-ELISA kein Ergebnis im fraglichen Bereich. Auch die insgesamt hohe Spezifität des RIDASCREEN® Risk Material-ELISAs verringerte sich durch die Festlegung eines fraglichen Ergebnisbereichs kaum. Lediglich in der Untersuchungsreihe mit frischem Hackfleisch erreicht die Probe ohne ZNS-Gewebe in zwei (Einwaage 50 mg) bzw. drei (Tupfer) Aufbereitungen eine Signalstärke oberhalb des doppelten Nullstandards.

5.7 Semiquantitative Auswertung der ELISA-Verfahren

Die semiquantitative Auswertung der ELISA-Verfahren konnte – wenn überhaupt - nur eine grobe Abschätzung des jeweiligen ZNS-Gehalts einer Probe ermöglichen. In den Untersuchungen von insgesamt 308 Proben mit ZNS-Zusatz wurde der tatsächliche ZNS-Gehalt mit dem RIDASCREEN[®]-Test 161-mal unterbewertet, mit dem Brainostic[™] -Test sogar 164-mal. Damit wurde der quantitative Anteil an zugesetztem ZNS in 52 % der Untersuchungen mit dem RIDASCREEN[®]-ELISA und 53 % der Untersuchungen mit dem Brainostic[™]-ELISA als zu niedrig bestimmt.

Eine zu hohe Bestimmung des quantitativen ZNS-Gehalts trat mit dem RIDASCREEN[®]-ELISA nur bei den Leberwurstkesselkonserven auf und betrug insgesamt 2 % bezogen auf sämtliche Untersuchungen von Proben mit ZNS. Mit dem Brainostic[™]-ELISA wurde der quantitative Hirn-Gehalt ebenfalls bei 15 Leberwurstkonserven, sowie auch bei 25 Hackfleisch-Proben zu hoch bewertet. Der Anteil der zu hoch eingestuften Proben mit diesem Verfahren betrug also 13 %.

Da insgesamt mit beiden ELISA-Verfahren mehr als die Hälfte der untersuchten Proben bezüglich der semiquantitativen Auswertung nicht richtig eingestuft wurden, ermöglichte diese Art der Auswertung keine verlässliche Aussage über den exakten ZNS-Gehalt, sondern gab lediglich eine Tendenz wieder, ob der ZNS-Gehalt der Probe sehr hoch oder sehr niedrig war. Schon allein durch die unterschiedlichen GFAP-Konzentrationen in Rückenmark und Hirngewebe sind der Aussagekraft der semiquantitativen Auswertung Grenzen gesetzt. Durch weitere Einflüsse wie zum Beispiel eine starke Hitzebehandlung des Untersuchungsmaterials kommt es zu einer zusätzlichen Reduktion der Signalintensität. Bereits HORLACHER et al. (2002b) zeigten in ihren Untersuchungen, dass die semiquantitative Auswertung des RIDASCREEN[®]-ELISAs nur eine grobe Einstufung der ZNS-Menge erlaubte.

5.8 Semiquantitative Auswertung des Reverse Transkriptase-Real Time-PCR-Verfahrens

Üblicherweise erfolgt die quantitative Auswertung einer Real Time-PCR durch das Mitführen einer endogenen Kontrolle. In der hier vorliegenden Arbeit wurden jedoch zuvor empirisch ermittelte Ct-Werte herangezogen, um den ZNS-Gehalt abschätzen zu können. Eine solche Verfahrensweise würde eine einfache und schnelle Einschätzung der enthaltenen ZNS-Menge im Rahmen der Routinediagnose erlauben. Die Grenzwerte waren im Vorfeld für natives, moderat erhitztes und stark hitzebehandeltes Untersuchungsmaterial festgelegt worden. In den eigenen Untersuchungen zeigte sich, dass die für natives Probenmaterial festgesetzten Grenzwerte tatsächlich geeignet waren, um die Menge des in der Probe vorhandenen ZNS-Gewebes zumindest grob einzugrenzen. Der bereits beschriebene Unterschied in der GFAP-Konzentration zwischen Rinderhirn und Rückenmark spiegelte sich auch hier wieder. Eine zu niedrige Einschätzung des ZNS-Gehalts erfolgte in 37 % und eine zu hohe Einschätzung lediglich in 4 % der Untersuchungen von Proben mit Hirngewebe. Bei dem mit Rückenmark dotierten Referenzmaterial wurde der tatsächliche ZNS-Gehalt bei 20 % der Analysen zu niedrig und bei 30 % zu hoch bewertet.

In den Untersuchungen von hitzebehandelten Fleischerzeugnissen zeigte sich, dass die verwendeten Grenzwerte insgesamt zu niedrig gewählt waren, so dass der ZNS-Gehalt in der Regel unterschätzt wurde. Dieses galt allerdings nicht für den Cut off-Wert, der negative von positiven Proben unterscheidet. Vergleicht man die Ct-Werte (Schwellenwertzyklen) der einzelnen Untersuchungstage, so wird deutlich, dass identische Proben stark variierende Ct-Werte erreichen können. Dieses stellt den entscheidenden limitierenden Faktor in der Bestimmung des ZNS-Gehalts anhand starrer Grenzwerte dar.

5.9 Felduntersuchungen mit dem Reversen Transkriptase-Real Time-PCR-Verfahren: ZNS-Nachweis an Rinder-Köpfen und Rinder-Schlachttierkörpern

Die Untersuchung von Rinder-Kopffleisch und –Schlachttierkörpern auf das tatsächliche Vorhandensein von ZNS-Gewebe erbrachte alarmierende, wenn auch nicht überraschende Ergebnisse. Es konnte gezeigt werden, dass Kopffleisch trotz der umfangreichen Vorsorgemaßnahmen bei seiner Gewinnung stark mit ZNS-Gewebe kontaminiert war. Bei fast einem Drittel (27 %) der untersuchten Kopffleisch-Tupferproben wurden Spuren von ZNS-Gewebe nachgewiesen. Am häufigsten waren ZNS-Kontaminationen im Bereich des Halsfetts nachzuweisen, danach folgten Stirn und Backe.

Demgegenüber waren jedoch die Rinder-Schlachttierkörper, deren Gewinnung weitaus weniger strenge Präventiv- und Kontrollmaßnahmen von Seiten der Gesetzgebung auferlegt werden, noch deutlich häufiger mit ZNS-Gewebe kontaminiert. Weit über die Hälfte (62 %) der Schlachtkörper wiesen entlang der gespaltenen Wirbelsäule ZNS-Kontaminationen auf.

Diese Ergebnisse bestätigen die Notwendigkeit einer routinemäßigen Kontrolle von Schlachttierkörpern auf ZNS-Kontaminationen.

6 SCHLUSSFOLGERUNG

Um die erfolgreiche Entfernung des Spezifizierten Risikomaterials (SRM) am Schlachthof bzw. in Kopffleisch-gewinnenden Betrieben überwachen zu können und um Fleisch- und Fleischerzeugnisse im Rahmen der amtlichen Überwachung und der betrieblichen Eigenkontrolle auf ZNS-Kontaminationen untersuchen zu können, werden geeignete Nachweisverfahren benötigt. Die Ergebnisse der hier vorliegenden Arbeit belegen die gute Eignung der beiden ELISA-Verfahren RIDASCREEN® Risk Material und Brainostic™ sowie der neu entwickelten Reversen Transkriptase-Real Time-PCR zum routinemäßigen Nachweis von ZNS-Risikomaterial. Dabei blieben sowohl das von den ELISA-Tests verwendete GFAP-Protein, wie auch die GFAP-mRNA über lange Lagerungsperioden stabil. Proben ab einem ZNS-Gehalt von 1 % und mehr waren mit den drei Verfahren sicher zu erfassen. Eine Herausforderung für die Nachweisverfahren stellen jedoch Proben mit ZNS-Konzentrationen unter 1 % dar. Bei diesen im Niedrigkonzentrationsbereich mit ZNS versetzten Proben wurden mehrere falsch-negative Ergebnisse beobachtet. Besonders bei den Untersuchungen von nicht-hitzebehandeltem Referenzmaterial zeichnete sich ein starker Effekt der verwendeten Methode ab. Falsch-negative Resultate traten am häufigsten bei Verwendung des RIDASCREEN®-ELISAs auf (insgesamt 27 falsch-negative Ergebnisse in 172 Untersuchungen von nicht-hitzebehandelten Proben mit ZNS). Auch mit dem zweiten immunologischen Nachweisverfahren, dem Brainostic™-ELISA, wurden mehrere falsch-negative Ergebnisse beobachtet (insgesamt 13 falsch-negative Ergebnisse in 172 Untersuchungen von nicht-hitzebehandelten Proben mit ZNS). Das molekularbiologische Reverse Transkriptase-Real Time-PCR-Verfahren erwies sich in den Untersuchungen von nicht erhitztem Probenmaterial als empfindlichstes Nachweisverfahren (3 falsch-negative Ergebnisse in 172 Untersuchungen von nicht-hitzebehandelten Proben mit ZNS). Eine ähnliche Tendenz zeichnete sich bei Voll- und Dreiviertelkonserven ab. Hier wurden mit dem Risk Material-ELISA 16, mit dem Brainostic™-ELISA sechs und mit der Reversen Transkriptase-Real Time-PCR lediglich ein falsch-negatives

Ergebnis bei der Untersuchung von jeweils 80 Proben mit ZNS beobachtet. Allerdings wirkte sich dieser Effekt in den Untersuchungsreihen mit hitzebehandelten Brühwurstkonserven nicht mehr signifikant aus. Lediglich bei der Untersuchung von Leberwurst-Kesselkonserven lag die Empfindlichkeit beider ELISA-Verfahren, die in diese Untersuchungsreihe kein falsch-negatives Ergebnis lieferten, über der Empfindlichkeit des Reversen Transkriptase-Real Time-PCR-Verfahrens, mit dem sechs der 56 ZNS-haltigen Proben nicht erfasst wurden. Die geringere Sensitivität des molekularbiologischen Nachweisverfahrens in der Versuchsreihe mit Leberwurstkonserven könnte darauf zurückzuführen sein, dass die Stabilität der GFAP-mRNA durch diese Lebensmittelmatrix nachteilig beeinflusst wurde.

Ein auch in der Routinediagnostik bekanntes Problem stellten die Proben dar, die ZNS-Beimischungen in sehr geringer Konzentration enthielten und daher eine Signalstärke zeigten, die zwar deutlich höher lag, als es bei Proben ohne ZNS-Zusatz der Fall war, aber den Schwellenwert des jeweiligen Nachweisverfahrens nicht erreichten. Hierfür empfahl sich die Definition eines fraglich-positiven Bereichs. Durch diese Art der Ergebnisinterpretation wurden in den eigenen Untersuchungen mit dem Brainostic™-ELISA und dem Reverse Transkriptase-Real Time-PCR-Verfahren nicht vermehrt falsch-positive Ergebnisse erzeugt, während vereinzelt Proben ohne ZNS in den fraglichen Bereich des Risk Material 10/5-ELISAs gerieten. Allerdings darf die praktische Bedeutung dieser mit Spuren von ZNS-Gewebe behafteten Proben in der Routinediagnostik nicht überbewertet werden. Zwar gilt für das Vorkommen von Spezifiziertem Risikomaterial in Lebensmitteln formal eine Nulltoleranz, gleichzeitig ist eine schlachttechnologisch bedingte Kontamination mit Spuren von ZNS-Gewebe nicht zu vermeiden. Um keinesfalls falsch-positive Ergebnisse zu generieren, sollten Proben mit einer Signalstärke im fraglichen Bereich im Rahmen der Routinediagnostik nicht als positiv angesehen werden. Vielmehr empfiehlt es sich, solche Proben wiederholt aufzubereiten und gegebenenfalls weitere Untersuchungen anzuschließen.

7 ZUSAMMENFASSUNG

Vor dem Hintergrund der Übertragbarkeit des BSE-Erregers vom Rind auf den Menschen müssen gemeinschaftsweit spezifizierte Risikomaterialien von Wiederkäuern aus der Nahrungsmittelkette entfernt, gekennzeichnet und unschädlich beseitigt werden. Dies wird durch die VO (EG) 999/2001 festgelegt. Aufgrund ihrer besonders hohen Infektiösität kommt dem bovinen Gehirn und Rückenmark innerhalb der spezifizierten Risikomaterialien eine besondere Bedeutung zu. Um die Einhaltung der gesetzlichen Vorgaben überwachen und zusätzlich bereits präventiv betriebliche Eigenkontrollen durchführen zu können, wird ein zuverlässiges, sensibles und anwenderfreundliches Verfahren zum Nachweis von zentralem Nervengewebe (ZNS) in Fleisch und Fleischerzeugnissen benötigt.

Im Rahmen der hier vorgestellten Arbeit wurden drei Verfahren zum Nachweis von ZNS-Gewebe in Fleisch und Fleischerzeugnissen miteinander verglichen. Dabei handelte es sich um zwei ELISA-Verfahren zum Nachweis von GFAP: den RIDASCREEN[®] Risk Material-Test von R-biopharm (Darmstadt) und den Brainostic[™] von ScheBo[®] (Gießen), sowie eine am Institut für Tierärztliche Nahrungsmittelkunde der Universität Gießen entwickelte Reverse Transkriptase-Real Time-PCR. Als Untersuchungsmaterial wurden unterschiedliche Fleischerzeugnisse artifiziell mit Rinderhirn bzw. Rinder-Rückenmark in verschiedenen Konzentrationsstufen kontaminiert und vergleichend aufbereitet. Um den Einfluss unterschiedlicher Parameter auf die Stabilität der jeweiligen Markersubstanz beobachten zu können, wurden sowohl natives Hackfleisch, tiefgefroren aufbewahrtes Hackfleisch wie auch unterschiedlich stark hitzebehandeltes Untersuchungsmaterial in den Vergleich mit einbezogen. Das Untersuchungsmaterial wurde über entsprechend ausgewählte Lagerungsperioden wiederholt aufbereitet. Die Lagerungszeiten reichten von 14 Tagen bei frischem Hackfleisch bis zu 24 Monaten bei Vollkonserven.

Insgesamt wurden jeweils 204 Hackfleischproben, 50 Vollkonserven, 50 Dreiviertelkonserven und 64 Kesselkonserven vergleichend aufbereitet. In

den Untersuchungen des nicht hitzebehandelten Probenmaterials zeigte das Reverse Transkriptase-Real Time-PCR-Verfahren die höchste Empfindlichkeit. Mit dem Brainostic™-ELISA wurden in den Untersuchungen von mit Rinderhirn versetztem Hackfleisch vereinzelte falsch-negative Ergebnisse beobachtet. Die mit Rinder-Rückenmark versetzten Hackfleischproben konnten mit diesem Verfahren ausnahmslos nachgewiesen werden. Eine etwas geringere Empfindlichkeit zeigte sich bei dem RIDASCREEN® Risk Material 10/5-ELISA. Obwohl durch eine Modifikation der Probenaufbereitung die Nachweisbarkeit mit diesem Verfahren verbessert werden konnte, blieb es doch in der Empfindlichkeit hinter den anderen Verfahren zurück.

Dieser deutliche Unterschied in der Sensitivität der verwendeten Nachweisverfahren zeichnete sich in den Untersuchungen von Brühwurstkonserven nur noch tendentiell ab und war nicht statistisch signifikant.

Die Ergebnisse der Untersuchungen von Leberwurst-Kesselkonserven deuteten darauf hin, dass die Beschaffenheit dieses Referenzmaterials einen erheblichen Einfluss auf die Empfindlichkeit der Nachweisverfahren ausübte. Hier lag die Empfindlichkeit beider ELISA-Verfahren über der des molekularbiologischen Verfahrens.

Die Analysen zur Stabilität der Markersubstanzen GFAP-mRNA und GFAP-Protein stehen in guter Übereinstimmung zur aktuellen wissenschaftlichen Literatur. Es konnte gezeigt werden, dass insbesondere die GFAP-mRNA einen in hohem Maß spezifischen und stabilen Marker zum Nachweis von ZNS-Gewebe darstellt.

Die zusätzlichen Untersuchungen von Feldproben belegte das Vorhandensein von schlachttechnologisch bedingter ZNS-Kontamination an Rinderköpfen und Rinderschlachtierkörpern.

8 SUMMARY

Bovine spongiforme encephalopathy was diagnosed in Great Britain in 1986 for the first time. The new variant of Creutzfeldt-Jakob-Disease was described in 1995 first. Today it is unquestioned that BSE can be transmitted from cattle to humans via oral intake of the infectious agent (prions). Several lines of evidence have shown that BSE-agent can be transmitted to humans via food chain, leading to the new variant CJD. Especially bovine brain and spinal cord are highly infectious because they are preferred targets for BSE-agent. Against this background European legislation prohibited specified risk material (offals, SBO) from food chain.

It is necessary to determine a reliable detection method for CNS-tissue to control the ban of SBO in food and to offer an instrument for selfcontrol to food manufacturers. In this study three different methods for the detection of CNS-tissue in meat and meat products were compared: RIDASCREEN® Risk Material-ELISA (R-biopharm, Darmstadt), Brainostic™ -ELISA (ScheBo®, Gießen) and a Reverse Transcriptase-Real Time-PCR (Institute of Food Science, University Gießen). Both ELISA-systems are based on detection of GFAP while the Reverse Transcriptase-Real Time-PCR uses a robust sequence region of GFAP-mRNA as CNS-specific marker.

As reference material different types of meat products were spiked with bovine brain or spinal cord in various concentrations. The study aimed to measure the influence of various parameters, like storing period, heat treatment or composition to the stability of GFAP respectively GFAP-mRNA. The analyses included minced meat, deep-frozen minced meat and heat treated canned meat products. Each reference material was analysed over a determined period: minced meat was stored for 14 days while canned meat products were stored for up to 24 months. A total of 204 samples of minced meat, 50 samples of canned meat products with F-value > 5, 50 canned meat products with F-value 0,84 and 56 canned meat products with F-value 0,48 were analysed with each detection method. Reverse Transcriptase-Real Time-PCR showed to be the most sensitive detection method for analysing not heat treated reference

material. In analysis of not heat treated reference material containing bovine brain with the Brainostic™-ELISA some false-negative results were found, even if this detection method was able to detect all samples spiked with bovine spinal cord. The RIDASCREEN® Risk Material 10/5-ELISA showed a lower sensitivity, although a modification in sample taking improved the sensitivity of this test. No false-positive results were observed with either test using the manufacturer's analytical protocols.

Significant differences in sensitivity were not found in analysis of boiled sausages. Results of analysing canned liver sausage pointed out that this fatty and enzyme-rich matrix had a massive influence on sensitivity of the biomolecular test system. Although this reference material was only heat treated at low temperatures, it was difficult to detect small amounts of CNS-tissue with the Reverse Transcription-Real Time-PCR. Both ELISA-systems did not have a loss of sensitivity in this matrix.

This study showed that GFAP-mRNA as well as GFAP are highly specific and stable marker substances for detection of CNS-tissue and all three detection methods were useful for routine diagnostic of CNS-tissue in meat and meat products.

9 LITERATURVERZEICHNIS

ABDULMAWJOOD, A., H. SCHÖNENBRÜCHER and M. BÜLTE (2005):
Novel molecular method for detection of bovine-specific central nervous system tissues as bovine spongiform encephalopathy risk material in meat and meat products.

J Mol Diagn 7, 368-374

ABDULMAWJOOD, A., H. SCHÖNENBRÜCHER and M. BÜLTE, (2006):
Collaborative trial for validation of a real-time reverse transcriptase-polymerase chain reaction assay for the detection of central nervous system tissue as spongiform encephalopathy risk material: part 1.

J AOAC Int 89, 1335 – 1340

AGAZZI, M.-E., J. BARRERO-MORENO, E. LÜCKER, C. v. HOLST and E. ANKLAM (2002):

Performance comparison of two analytical methods for the detection of tissues of the central nervous system in sausages: results of an interlaboratory study.

Eur Food Re Technol 215, 334 – 339

AGUZZI, A. (2002):

Die Prionhypothese und Prionenerkrankungen des Menschen.

Berl Münch Tierärztl Wschr 115, 91-98

ALMOND, J. and J. PATTISON (1997):

Human BSE.

Nature 389, 437 – 438

ALPERS, M. and D. GAJDUSEK (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, 852 – 879

ANDERSON, R. M., C. A. DONELLY and N. M. FERGUSON (1996):

Transmission dynamics and epidemiology of BSE in British cattle.

Nature 382, 779 - 788

ANDREOLETTI, O., P. BERTHON, D. MARC, J. GROSCLAUDE, L. VAN KEULEN, F. SCHELCHER, J. M. ELSESEN and F. LANTIER (2002):

Early accumulation of PrP(SC) in gut-associated lymphoid and nervous tissues of susceptible sheep from a Romanov flock with natural scrapie.

J Gen Virol 81, 3115 - 3126

ANIL, M. H., S. LOVE, S. WILLIAMS, A. SHAND, J. L. MC KINSTRY, C. R. HELPS, A. WATERMAN-PEARSON, J. SEGATCHIAN AND D. A. HARBOUR (1999):

Potential contamination of beef carcasses with brain tissue at slaughter.

Vet Rec 145, 460 - 462

ANONYMUS (1998):

Assesment of exposure to BSE infectivity in the UK sheep flock: final report fort he meat and livestock commission.

Det Norske Veritas (DNV), Oslo, Norway

ANONYMUS (2000):

Bovine spongiform encephalopathy in Great Britain, a progress report.

Ministry of Agriculture, Fisheries and Food

ANONYMUS (2001):

Die bovine spongiforme Enzephalopathie (BSE) des Rindes und deren Übertragbarkeit auf den Menschen.

Bundesgesundheitsbl Gesundheitsforsch Gesundheitsschutz 44, 421 – 431, Springer Verlag

ANONYMUS (2002a):

Variant Creutzfeldt-Jakob disease.

World Health Organisation (WHO), Fact sheet N°180,
<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs180/en>

ANONYMUS (2002b):

Testanleitung RIDASCREEN® Risk Material.

R-Biopharm, Darmstadt

ANONYMUS (2002c):

Testanleitung RIDASCREEN® Risk Material.

R-Biopharm, Darmstadt

ANONYMUS (2002d):

Liste von kritischen Hygienepunkten bei der Gewinnung von Köpfen und von Rinderbackenfleisch.

Bundesinstitut für gesundheitlichen Verbraucherschutz und Veterinärmedizin (BgVV), Stellungnahme vom 15. Mai 2002

ANONYMUS (2003a):

Anhebung der Altersgrenze für BSE-Tests bei Schlachtrindern von 24 auf 39 Monate.

Bundesinstitut für Risikoeinschätzung (BfR), Stellungnahme vom 22. Dezember 2003

ANONYMUS (2003b):

Handbuch RNeasy[®] Lipid Tissue Mini.

Qiagen, Darmstadt

ANONYMUS (2004):

Testanleitung ScheBo[®] Brainostic[™] Test.

Schebo[®], Gießen

BAKER, H., R. M. RIDLEY AND G. A. H. WELLS (1993):

Experimental transmission of BSE and scrapie to the common marmoset.

Vet Rec 132, 403 - 406

BARLOW, R. and D. MIDDLETON (1990):

Dietary transmission of bovine spongiform encephalopathy to mice.

Vet Rec 126, 111 - 112

BÄUERLE, B., B. SPERNER, S. FORSTER und A. STOLLE (2004):

ZNS-Kontamination von Schlachtierkörperhälften beim Prozessschritt Spaltung.

45. Arbeitstagung der Deutschen Veterinärmedizinischen Gesellschaft
Arbeitsgebiet Lebensmittelhygiene, 2004, Garmisch-Partenkirchen

BELAY, E. D., P. GAMBETTI, L. B. SCHONBERGER, P. PARCHI, D. R. LYON and S. CAPELLARI (2001):

Creutzfeldt-Jakob disease in unusually young patients who consumed venison.

Arch Neurol 58, 1673 – 1678.

BELT, P. B. (1995):

Identification of five allelic variants of the sheep PrP gene and their association with natural scrapie.

J Gen Virol 76, 509 - 517

BENDHEIM, P. E., H. R. BROWN, R. D. RUDELLI, L. J. SCALA, N. I. GOLLER, G. Y. WEN, R. J. KASCAK, N. R. CASHMAN and D. C. BOLTON (1992):

Nearly ubiquitous distribution of the scrapie agent precursor protein.

Neurol 42, 149 - 156

BERG, C., H. SCHOEN und J. WESTARP (2002):

Untersuchung von Fleisch und Fleischerzeugnissen auf ZNS-Gewebe.

Fleischwirtsch 82, 100 – 104

BERNOULLI, C., J. SIEGFRIED and G. BAUMGARTNER (1977):

Danger of accidental person-to-person transmission of Creutzfeldt-Jakob disease by surgery.

Lancet 346, 478 - 479

BHAKDI, S. und J. BOHL (2002):

Prionen und der Rinderwahnsinn.

Fleischwirtsch 11, 16 - 22

BORCHERS, K. (2002):

Transmissible Spongiforme Enzephalopathien (TSE): Alte Krankheiten mit neuer Brisanz.

Berl Münch Tierärztl Wschr 115, 81 - 90

BOSQUE, P. J. (2002):

Bovine spongiform encephalopathy, chronic wasting disease, scrapie and the threat to humans from prion disease epizootics.

Curr Neurol Neurosci Rep 2, 488 – 95.

BRAUN, U. (1998):

Klinische Symptome und Diagnose von BSE.

In: BSE und anderen spongiforme Enzephalopathien, Parey Verlag, Stuttgart

BREADLY, R. and J. W. WILESMITH (1993):

Epidemiology and control of bovine spongiform encephalopathy (BSE).

Brit Med Bull 49, 932 – 959

BRITTON, T. C., S. AL-SARRAJ, C. SHAW, T. CAMPBELL, J. COLLING (1995):

Sporadic Creutzfeldt-Jakob disease in a 16-year old in the U.K.

Lancet 346, 1155

BROWN, P. (1988):

The decline and fall of Creutzfeldt-Jakob disease associated with human growth hormone therapy.

Neurol 38, 1135 - 1137.

BRUCE, M.E., R. G. WILL, J. W. IRONSIDE, I. McCONNELL, D. DRUMMOND, A. SUUTLE, L. McCARDIE, A. CHREE, J. HOPE, C. BIRKETT, S. COUSENS, H. FRASER and C. J. BOSTOCK (1997):
Transmissions to mice indicate that new variant CJD is caused by the BSE agent.

Nature 389, 498 - 501.

BUDKA, H., J. A. HAINFELLNER, G. ALMER, T. BROCKE, O. WINDL, H. A. KRETZSCHMAR, A. HILL and J. COLLINGE (1997):

A new Austrian family with Fatal Familial Insomnia: Brain pathology without detectable PrP^{RES}.

Brain Pathol 7, 1267

BUDKA, H. (2001):

Portrait der Creutzfeld-Jakob-Krankheit (CJD) und Portrait des Gerstmann-Sträussler-Scheinker-Syndroms.

In: Hörnlimann, B., D. Riesner, H. Kretzschmar, Prionen und Prionerkrankungen, de Gruyter Verlag, 1. Auflage

BUTLER D. (1999):

Primate study may yield new CJD clues.

Nature 398, 449

CAUGHEY, B. W., A. DONG, K. S. BHAT, D. ERNST, S. F. HAYES and W. S. CAUGHEY (1991):

Secondary structure analysis of the scrapie-associated prion protein PrP 27-30 in water by infrared spectroscopy.

Biochem 30, 7672 - 7680

CHAKRABORTY, C., S. NANDI and S. JANA (2005):

Prion disease: A Deadly Disease for Protein Misfolding.

Current Pharmaceutical Biotechnology 6, 167 - 177

COLLEE J. and R. BRADLEY (1997):

BSE: a decade on - part 1.

Lancet 349, 636 - 641

COLLING, J., K. C. L. SIDLE, J. MEADS, J. IRONSIDE and A. F. HILL
(1996):

Molecular analysis of prion strain variation and the aetiology of "new variant" CJD.

Nature 383, 685 - 690

COLLINS, S. J., V. A. LAWSON and C. L. MASTERS (2004):

Transmissible spongiform encephalopathies.

Lancet 313, 51 - 61

COMOY, E. E., M. SIMONET, F. AUVRE, S. FREIRE, F. LETESSIER, C.
DUVAL, M. MARCEAU and J. P. DESLYS (2005) :

Increased susceptibility to oral contamination by BSE due to bacterial enteric disease.

Proceeding Prionenkongress 2005, Düsseldorf

CREUTZFELDT, H.G. (1920):

Über eine eigenartige herdförmige Erkrankung des Zentralnervensystems.

Z Ges Neurol Psychiat 57, 1 - 18.

DALY, D. J., D. M. PRENDERGAST, J. J. SHERIDAN, I. S. BLAIR and D. A. MCDOWELL (2002):

Use of a marker organism to model the spread of central nervous system tissue in cattle and the abattoir environment during commercial stunning and carcass dressing.

Appl Environ Microbiol 68, 791 – 798

DAWSON, M., G. A. H. WELLS, B. N. J. PARKER and A. C. SCOTT (1990):

Primary parenteral transmission of bovine spongiform encephalopathy to the pig.

Vet Rec 127, 338

DEALLER, J. P., LANCEY, R. W. (1990):

Transmissible spongiform encephalopathies: The threat of BSE to man.

Food Microbiol 7, 253 – 279

DESLYS, J., C. LASMÉZAS, N. STREICHENBERGER, A. HILL, J. COLLINGE, D. DORMONT and N. KOPP (1997):

New variant Creutzfeldt-Jakob disease in France.

Lancet 349, 30 – 31

DIXON, W. J. (1998)

BMDP Statistical Software Manual, Volume 1 and 2.

University of California Press, Berkeley, Los Angeles, London

DODELET, V. C. and N. R. CASHMAN (1998):

Prion Protein Expression in human leukocyte differentiation.

Proc Nat Acad Sci USA 94, 13452 - 13457

DORMONT, D. (2002):

Prions, BSE and Food.

Int J Food Microbiol 78, 181 - 189.

DUFFY P., J. WOLF, G. COLLINS, A. DEVOE, B. STREETEN and D. COWEN (1974):

Possible person-to-person transmission of Creutzfeldt-Jakob disease.

N Engl J Med 290, 692 – 693

EGGERS, T., K. PISKE und R. FRIES (2003):

BSE- Risikogewebe und die Zerlegung.

Fleischwirtsch. 7, 109 - 110

ELIOT, M., K. ADJOU, M. COULPIER, J. J. FONTAINE, R. HAMEL, T. LILIN, S. MESSIAEN, O. ADREOLETTI, T. BARON, A. BENCSIK, A. G. BIACABE, V. BERINGUE, H. LAUDE, A. LE DUR, J. L. VILOTTE, E. COMOY, J. P. DESLYS, J. GRASSI, S. SIMON, F. LANTIER and P. SARRADIN (2005):

BSE agent signatures in a goat.

Vet Rec 156, 523 - 524

ELSEN, J. M., Y. AMIGUES, F. SCHELCHER, V. DUCROCQ, O. ANDREOLETTI, F. EYCHENNE, J. V. KHANG, J. P. POIVEY, F. LANTIER and J. L. LAPLANCE (1999):

Genetic susceptibility and transmission factors in scrapie: detailed analysis of an epidemic in a closed flock of Romanov.

Arch Virol 144, 431 - 445

ENG, L. F. (1985):

Glial Fibrillary Acidic Protein (GFAP): the major protein of glial intermediate filaments in differentiated astrocytes.

J Neuroimmun 8, 203 – 214

ENG, L. F. and S. J. DEARMOND (1983):

Immunohistochemistry of the glial fibrillary acidic protein.

In: H. M. Zimmermann, Raven Press N. Y., Progress in Neuropathology 5, 19 – 40

EU (2001)

2001/999/EG Verordnung des Europäischen Parlaments und des Rates vom 22. Mai 2001 mit Vorschriften zur Verhütung, Kontrolle und Tilgung bestimmter transmissibler spongiformer Enzephalopathien.

ABI EG Nr. L 147, S. 1

FEIDEN, W. (1998):

Creutzfeldt-Jakob-Krankheit (CJD): sporadische und neue variante Form (vCJD). Ist der Mensch durch BSE gefährdet?

In: Braun, U., BSE und andere spongiforme Enzephalopathien, Parey Verlag

FERGUSON, N. M., C. ADONELLY, M. E. J. WOOLHOUSE and R. M. ANDERSON (1999):

Estimation of the basic reproduction number of BSE: the intensity of transmission in British cattle.

Proc R Soc Lond 266, 23 - 32

FOOTE, W., W. CLARK, A. MACIULIS, J. CALL, J. HOURRIGAN, E. EVANS, M. MARSHALL and M. DE CAMP (1993):

Prevention of scrapie transmission in sheep, using embryo transfer.

Am J Vet Res 54, 1863 - 1868.

FOSTER, J. D. (2001):

Clinical signs, histopathology and genetics of experimental transmission of BSE and natural scrapie to sheep.

Vet Rec 148, 165 - 171

FLI (Friedrich Löffler Institut) (2005):

BSE-Lebendtest: Friedrich Löffler Institut warnt vor übertriebenen Hoffnungen.

Veröffentlicht am 13.07.2005, www.fli.bund.de

FOSTER J., J. HOPE and H. FRASER (1993):

Transmission of bovine spongiform encephalopathy to sheep and goats.

Vet Rec 133, 339 - 341.

FRASER, H., I. MCCONNELL, G. A. H. WELLS and M. DAWSON (1988):

Transmission of bovine spongiform encephalopathy to mice.

Vet Rec 123, 472

GAHNI, A. C., N. M. FERGUSON, C. A. DONELLY and R. M. ANDERSON (2000):

Predicted vCJD mortality in Great Britain.

Nature 406, 583 - 584

GAHNI, A. C., C. A. DONELLY, N. M. FERGUSON and R. M. ANDERSON (2002):

The transmission dynamics of BSE and vCJD

C R Biol 325, 37 - 47

GAJDUSEK, D.C. (1977):

Unconventional Viruses and the Origin and Disappearance of Kuru.

Science 197, 943 - 960.

GAJDUSEK, D.C. and V. ZIGAS (1957):

Degenerative Disease Of The Central Nervous System In New Guinea.

N Engl J Med 257, 974 - 978

GERSTMANN, J. (1928):

Über ein noch nicht beschriebenes Reflexphänomen bei einer Erkrankung des zerebellären Systems.

Wien Med Wochenschr 78, 906 - 908

GRIESSBACH, M., E. LÜCKER, W. BIEDERMANN und U. TRUYEN (2005):

Erfassung von zentralnervösem Gewebe in Fleischerzeugnissen mittels Gaschromatographie-Massenspektrometrie – Ergebnisse eines Blindversuches.

Proceeding 45. Arbeitstagung der Deutschen Veterinärmedizinischen Gesellschaft Arbeitsgebiet Lebensmittelhygiene, 2004, Garmisch-Partenkirchen

GROSCHUP, M. H. und A. STOLZE (2002):

BSE- und Scrapie-Diagnostik in Deutschland.

Berl Münch Tierärztl Wschr 115, 106 - 110

GRUNDMANN, C., E. LÜCKER, M. HARDT und M. GROSCHUP (2004):

Direkter Nachweis von PrP^{C/SC} in Fleischerzeugnissen.

Proceeding 45. Arbeitstagung der Deutschen Veterinärmedizinischen Gesellschaft Arbeitsgebiet Lebensmittelhygiene, 2004, Garmisch-Partenkirchen

HAMBÜCHEN, T. (1998):

Agrarmärkte in Zahlen.

Europäische Union 1998, Zentrale Markt- und Preisberichtsstelle, Bonn

HARRIS, D. A. (1999):

Cellular Biology of Prion Diseases.

Clin Microbiol Rev, 429 - 444

HARTSOUGH, W. J. and D. BURGER (1965):

Encephalopathy of mink. I. Epizootologic and clinical observations.

J Inf Dis 115, 387 – 392

HELPS, C., R. P. HINDELL, T. J. HILLMAN, A. V. FISCHER, H. ANIL, A. C. KNIGHT, R. T. WHYITE, D. H. O'NEILL, T. G., KNOWLES and D. A. HARBOUR (2001):

Contamination of beef carcasses by spinal cord tissue during splitting.

Food Control 13, 415 – 417

HERDE, K., M. BERGMANN, C. LANG, R. LEISER und S. WENISCH (2004):

Glial Fibrillary Acidic Protein and Myelin Basic Protein as Markers for the Immunohistochemical Detection of Bovine Central Nervous Tissue in Heat-Treated Meat Products.

J Food Prot 68, 823 - 827

HEWICKER-TRAUTWEIN, M. (2001):

Portrait der übertragbaren spongiformen Hirndegeneration der Katzen.

In: Hörnlimann, B., D. Riesner, H. Kretzschmar, de Gruyter Verlag, Prionen und Prionerkrankungen, 1. Auflage

HILDEBRANDT, G., E. LÜCKER und K. Rauscher (2001):

BSE-Risiko der Lebensmittel Fleisch und Milch.

Bundesgesundheitsbl – Gesundheitsforsch – Gesundheitsschutz 44, 437 - 449

HILDEBRANDT, G. und K. RAUSCHER (2002):

Eradikations- und Präventivmaßnahmen inklusive Rechtsverfahren.

Fleischwirtsch 9, 137 - 140

HILL, A. F., R. J. BUTTERWORTH and S. JOINER (1999):

Investigation of variant Creutzfeldt-Jakob disease and other human prion diseases with tonsil biopsy samples.

Lancet 353, 183 – 189

HORLACHER, S., P. SIMON und M. BÜLTE (2001):

Bestimmung des ZNS-Gehalts und der Tierart in Fleischerzeugnissen.

Fleischwirtsch 12, 107 - 108

HORLACHER, S., E. LÜCKER, E. EIGENBRODT und S. WENISCH (2002a):

ZNS-Emboli in der Rinderlunge.

Berl Münch Tierärztl Wschr, 115, 1 - 5

HORLACHER, S., P. SIMON und M. BÜLTE (2002b):

Vergleich zweier ZNS-Nachweisverfahren in Lebensmitteln.

Fleischwirtsch 1, 91 - 93

HOSSNER, K. L., R. S. YEMM, S. E. SONNENSCHNEIN, G. L. MASON, B. A. CUMMINGS, M. C. REDDY, J. N. SOFOS, J. A. SCANGA, J. D. TATUM, G. C. SMITH and K. E. BELK (2007):

Comparison of immunological (enzyme-linked immunosorbent assay) and immunochemical methods for the detection of central nervous system tissue in meat products.

J Food Prot 70, 644 - 650

HSIAO, K. and S. B. PRUSINER (1990):

Inherited human prion diseases.

Neurol 40, 1820 - 1827

HUGHSON, E., P. REECE, M. J. DENNIS and S. OELSCHLAGER (2003):

Comparative evaluation of the performance of two commercial kits for the detection of central nervous system tissue in meat.

Food Addit Contam 20, 1034 - 1043

IRONSIDE, J. W. and M. W. HEAD (2003):

Variant Creutzfeldt-Jakob disease and its transmission by blood.

J Thromb Haemost 1, 1479 - 1486

JAKOB, A.M. (1921):

Über eigenartige Erkrankungen des Zentralnervensystems mit bemerkenswerten anatomischen Befunden.

Z Ges Neurol Psychiat 64, 147 - 228

JONAS, E. und P. LACHMANN (1999):

BSE und andere verwandte Erkrankungen.

Verlag Hans Huber, Bern, 1. Auflage

KATO, K., Y. ISHIGURO, F. SUZUKI, A. ITO and R. SEMBA (1982):

Distribution of nervous system-specific forms of enolase in peripheral tissues.

Brain Res 237, 441 - 448.

KELLY, L. C., S. HAFFNER, P. C. McCASKEY, M. T. SUTTON and K. A. LANGHEINRICH (2000):

An evaluation of methods for the detection of spinal cord in product derived from advanced meat recovery systems.

J Food Prot 63, 1107 – 1112

KIRKWOOD, J. K. and A. A. CUNNINGHAM (1994):

Epidemiological observations on spongiform encephalopathies in captive wild animals in the british isle.

Vet Rec 135, 296 - 303

KÜFEN, A. (2003):

Spezies- und gewebespezifischer Nachweis von bovinem ZNS – Gewebe in Fleischerzeugnissen mittels RT-PCR.

Inaugural Dissertation, Tierärztliche Hochschule Hannover

KUNATH, O., E. LÜCKER, K. TRÖGER und C. GRUNDMANN (2004):

Weiterführende Untersuchungen zur analytischen Qualität der Erfassung von ZNS-Kontaminationen mittels GFAP-ELISA.

Proceeding 45. Arbeitstagung der Deutschen Veterinärmedizinischen Gesellschaft Arbeitsgebiet Lebensmittelhygiene, 2004, Garmisch-Partenkirchen

LANGE, B., A. FROEB, M. OVERHOFF, T. ALTER und E. LÜCKER (2002):

Molekularbiologische Untersuchungen zur Gewebe- und tierartspezifischen Erfassung von spezifizierten Risikomaterialien (SRM) in Fleischerzeugnissen.

Proceeding 43. Arbeitstagung der Deutschen Veterinärmedizinischen Gesellschaft Arbeitsgebiet Lebensmittelhygiene, 2002, Garmisch-Partenkirchen

LASMÉZAS, C., J. P. DESLYS, R. DEMAIMAY, K. T. ADJOU, F. LAMOURY and D. DORMONT (1996):

BSE transmission to macaques.

Nature 381, 743 - 744

LASMÉZAS, C., E. COMOY, S. HAWKINS, C. HERZOG, F. MOUTHAN, T. KONOLD, F. AUVRÈ, E. CORREIA, N. LESCOUTRA-ETCHEGARAY, N. SALÈS, G. WELLS, P. BROWN and J. P. DESLYS (2005):

Risk of oral infection with bovine spongiform encephalopathy agent in primates.

Lancet 365, 781 - 783

LEGETT, M. M., J. DUKES and H. M. PIRIE (1990):

A spongiform encephalopathie in a cat.

Vet Rec 127, 586 - 588

LEHMANN, S., O. MILHAVET and A. MANGÉ (1999):

Trafficking of the cellular isoform of the prion protein.

Biomedicine & Pharmacotherapy 53, 39 - 46

LÜCKER, E., E. EIGENBRODT, S. WENISCH, K. FAILING, R. LEISER
und M. BÜLTE (1999):

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 Prot 62, 268 - 276

LÜCKER, E., E. EIGENBRODT, S. WENISCH, R. LEISER und M. BÜLTE
(2000):

Identification of Central Nervous System Tissue in Retail Meat Products.

J Food Prot 63, 258 - 263

LÜCKER, E., S. HORLACHER und E. EIGENBRODT (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.

Brit J Nutrition 86, Suppl. 1, 115 - 119

LÜCKER, E., W. BIEDERMANN, S. LACHHAB und A. HENSEL (2002):

Verfahren zum Nachweis von im Hinblick auf die BSE unerwünschten Zutaten in Fleischerzeugnissen.

Fleischwirtsch 10, 123 - 126

LÜCKER, E., T. ALTER, W. BIEDERMANN, H. AUPPERLE, M. HARDT, B. SCHLOTTERMÜLLER, B. LANGE, J. MORENO, M. AGAZZI, M. OVERHOFF, A. HENSEL, E. ANKLAM, H. A. SCHOON und M. GROSCHUP (2003):

Nachweisverfahren von SRM in Fleischerzeugnissen: Möglichkeiten und Grenzen.

Proceeding 44. Arbeitstagung der Deutschen Veterinärmedizinischen Gesellschaft Arbeitsgebiet Lebensmittelhygiene, 2003, Garmisch-Partenkirchen

LÜCKER, E., W. BIEDERMANN, S. LACHHAB, U. TRUYEN and A. HENSEL (2004):

CS-MS detection of central nervous tissues as TSE risk material in meat products: analytical quality and strategy.

Anal Bioanal Chem 380, 866 - 870

LUGARESÍ, E., R. MEDORI, P. MONTAGNA, A. BARUZZI, P. CORTELLI, A. LUGARESÍ, P. TINUPER, M. ZUCCONI and P. GAMBETTI (1986):

Fatal familial insomnia and dysautonomia with selective degeneration in thalamic nuclei.

N Engl J Med 315, 997 - 1003

MARANGOS, P., D. SCHMECHEL, A. PARMA, R. CLARK and F. GOODWIN (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., B. SCHLOTTERMÜLLER und E. LÜCKER (2001):

Untersuchungen zur Problematik der Kontamination mit Gewebe des ZNS in Abhängigkeit von der Schlachttechnologie.

Proceeding 42. Tagung der Deutschen Veterinärmedizinischen Gesellschaft Arbeitsgebiet Lebensmittelhygiene, 2001, Garmisch-Partenkirchen

MASTERS, C. L., D. C. GAJDUSEK and C. J. GIBBS (1981):

The familial occurrence of Creutzfeldt-Jakob disease and Alzheimer's disease.

Brain 104, 535 – 558

MATTHEWS, D. and B. C. COOKE (2003):

The potential for transmissible spongiform encephalopathies in non-ruminant livestock and fish.

Rev Sci Tech Off int Epiz 22, 283 - 296

McARTHUR, A. J., M. U. GILLETTE and R. A. PROSSER (1991):

Melatonin directly resets the rat suprachiasmatic circadian clock in vitro.

Brain Res 565, 158 - 161

McDIARMID, S. C. (1996):

Scrapie: the risk of its introduction and effects on trade.

Aust Vet J 73, 161 - 164

McGOWAN (1922):

Scrapie in sheep.

J Agric 5, 365 - 375

MEYER R., M. McKINLEY, K. BOWMAN, M. BRAUNFELD, R. BARRY
and S. B. PRUSINER (1986):

Separation and properties of cellular and scrapie prion proteins.

Proc Natl Acad Sci USA 83, 2310 - 2314

MOJE, M., A. HOFFMANN, K. TROEGER, H. JANKOWITSCH und R.
KOLB (2001):

Nachweis von Gewebe des zentralen Nervensystems auf enthäuteten
Rinderköpfen und in der rechten Herzkammer nach
Bolzenschussbetäubung.

Jahresbericht 2001 BAFF Kulmbach, 34 – 35

MÖSTL, K. UND E. MÖSTL (1998):

Mögliche Ursachen der spongiformen Enzephalopathien.

In Braun, U., BSE und andere spongiforme Enzephalopathien, Parey
Verlag, Stuttgart

NAGEL, E. und T. Miersch (2002):

ZNS-Nachweis in hochoverhitzten Lebensmitteln.

Proceedingband 43. Arbeitstagung der Deutschen Veterinärmedizinischen Gesellschaft Arbeitsgebiet Lebensmittelhygiene, 2002, Garmisch-Partenkirchen

NOWAK, B., K. GANSEFORTH, T. MUEFFLING und C. SEYBOLD (2004):

Untersuchungen zum Nachweis von ZNS-Gewebe in Kochwürsten.

Proceedingband 45. Arbeitstagung der Deutschen Veterinärmedizinischen Gesellschaft Arbeitsgebiet Lebensmittelhygiene, 2005, Garmisch-Partenkirchen

NIEDERER, M. and R. BOLLHALDER (2001):

Identification of species-specific central nervous system tissue by gaschromatography-mass spectrometry (GC-MS) – a possible method for supervision of meat products and cosmetics.

Mitt Lebensm Hyg 92, 133 - 144

NIETSCH, P. und G. WACHSMANN (2001):

Nachweis von Hirngewebs- und Rückenmarksanteilen in Fleischmengen.

Fleischwirtsch 3, 76 - 78

NOWAK, B., T. MUEFFLING, A. KUEFEN, K. GANSEFORTH, K. and C. SEYBOLD (2005):

Detection of bovine central nervous system tissue in liver sausages using a reverse transcriptase PCR technique and a commercial enzyme-linked immunosorbent assay.

J Food Prot 68, 2178 - 2183

PATTISON, I., M. HOARE, J. JEBBET and W. WATSON (1972):

Spread of scrapie to sheep and goats by oral dosing with foetal membranes from scrapie-affected sheep.

Vet Rec 90, 465 - 467

POSER, S. und M. MIELKE (2003):

BSE und die Variante der Creutzfeld-Jakob-Krankheit (vCJK).

Dtsch Ärztebl 100, 578 - 582

PRUISNER, S. B. (1982):

Novel proteinaceous infectious particles cause scrapie.

Science 216, 136 - 144

PRUSINER, S. B. (1991):

Molecular biology of prion diseases.

Science 252, 1515 - 1522

PRUSINER, S. B. (1993):

Genetic and infectious prion diseases.

Arch Neurol 50, 1129 – 1153

PRUISNER, S. B. (1995):

Prionen Erkrankungen.

Spektrum der Wissenschaften 95, 44 - 52

PRUISNER, S. B., M. FÜZI, M. SCOTT, D. SERBAN, A. TARABOULUS, J. M. GABRIEL, G. A. WELLS, W. J. WILESMITH, R. BREADLEY, S. J. DeARMOND and K. KRISTENSSON (1993):

Immunologic and molecular biologic studies of prion proteins in bovine spongiform encephalopathy.

J Infect Dis 167, 602 - 613

RKI (Robert Koch Institut) (2001):

Epid Bull, 6. Februar 2001, Sonderdruck

ROBINSON, M. M., W. J. HADLOW, T. P. HUFF, G. A. H. WELLS, M. DAWSON, R. F. MARSH and J. R. GORHAM (1994):

Experimental infection of mink with bovine spongiform encephalopathy.

J Gen Virol 75, 2151 - 2155

SCHETTLER, F., T. STEINBACH, K. BLASCHE, I. GERST, K. KAPS, K. RISCH, W. J. STREICH and K. FRÖLICH (2005):

Surveillance of TSE in cervides from Germany and analysis of rapid tests for detection of cervid PrP.

Proceeding Prionenkongress 2005, Düsseldorf

SCHLOTTERMÜLLER, B., E. LÜCKER, M. HARDT und M. H. GROSCHUP (2002):

Direkter Nachweis von PrP^{SC} in Fleischerzeugnissen und Vergleich mit ZNS-Nachweisverfahren.

Proceedingband 43. Tagung der Deutschen Veterinärmedizinischen Gesellschaft Arbeitsgebiet Lebensmittelhygiene, 2002, Garmisch-Partenkirchen

SCHMIDT, G. R., K. L. HOSSNER, R. S. YEMM, D. H. GOULD and J. P. O'CALLAGHAN (1999):

An enzyme-linked immunosorbent assay for glial fibrillary acidic protein as an indicator of the presence of brain or spinal cord in meat.

J Food Prot 62, 394 - 397

SCHMIDT, G. R., R. S. YEMM, K. D. CHILDS, J. P. O'CALLAGHAN and K. L. HOSSNER (2001):

The detection of central nervous system tissue on beef carcasses and in comminuted beef.

J Food Prot 64, 2047 – 2052

SCHÖNENBRÜCHER, H., A. ABDULMAWJOOD and M. BÜLTE (2004a):

ZNS-Nachweis aus Lebensmitteln: Untersuchungen zur Gewebespezifität und Lagerungsstabilität der mRNA-Zielregion.

Proceedingband 45. Tagung der Deutschen Veterinärmedizinischen Gesellschaft Arbeitsgebietes Lebensmittelhygiene, 2004, Garmisch-Partenkirchen

SCHÖNENBRÜCHER, H., A. ABDULMAWJOOD and M. BÜLTE (2004b):

Neuartiger tierartsspezifischer Nachweis von GFAP in prozessierten Lebensmitteln mit einem Real Time-PCR-Verfahren.

Fleischwirtsch 6, 114 - 117

SCHÖNENBRÜCHER, H., A. ABDULMAWJOOD und M. BÜLTE (2004c):

Nachweis von GFAP.

Fleischwirtsch 8, 90 - 92

SCHOON, H. A., D. BRUNCKHORST und J. POHLENZ (1991):

Spongiforme Enzephalopathie beim Rothalsstrauss (*Struthio camelus*) – ein kasuistischer Beitrag.

Tierärztl Praxis 19, 263 - 265

SCHUH, H. (2006):

Irrsinn BSE.

Die Zeit 6

SCHURR, B., E. LÜCKER und K. TRÖGER (2003):

Untersuchungen zur analytischen Qualität der Erfassung von ZNS-Kontamination im Schlachtprozess.

Proceedingband 44. Tagung der Deutschen Veterinärmedizinischen Gesellschaft Arbeitsgebiet Lebensmittelhygiene, 2003, Garmisch-Partenkirchen

SCHWÄGELE, F., E. MÜLLER, K. FISCHER, R. KOLB, M. MOJE und K. TROEGER (2002):

Nachweis von ZNS auf Rinderschlachttierkörpern nach Absaugen des Rückenmarks.

Fleischwirtsch 82, 118 – 120

SEUBERLICH, T., C. BOTTERON, S. BENESTAD, H. BRÜNISHOLZ, R. WYSS, U. KHIM, H. SCHWERMER, M. FRIESS, A. NICOLIER, D. HEIM and S. ZURBRIGGEN (2007):

Atypical scrapie in a swiss goat and implications for transmissible spongiform encephalopathy surveillance.

J Vet Diag Invest 19, 2 - 8

SSC (Scientific Steering Committee) (1998):

Listing of specified risk materials: a scheme for assessing relative risk to man.

http://europa.eu.int/comm/food/fs/sc/ssc/out22_en.html

SSC (Scientific Steering Committee) (2002):

Opinion on stunning methods and BSE risk.

http://europa.eu.int/fs/sc/ssc/out245_en.pdf

SEYBOLD, C., A. JOHN, T. MÜFFLING, B. NOVAK, S. WENZEL (2003):

A reverse Transcription-Polymerase chain reaction assay for species specific detection of bovine central nervous system tissue in meat and meat products.

J Food Prot 66, 644 – 651

SOUCI, S., W. FACHMANN und H. KRAUT (1994):

Die Zusammensetzung der Lebensmittel – Nährwert-Tabellen.

5. Aufl., Medpharm Scientific Publishers, Stuttgart

STAUFENBIEL, R. und M. HÄMÄLÄINEN (2002):

Zur klinischen Diagnose der BSE.

Berl Münch Tierärztl Wschr 115, 99 – 105

STÖCKLIN, W.H. (1967):

Kuru - the laughing death. Medizinische und ethnologische Aspekte einer rätselhaften Krankheit im Hochland Neuguineas.

Acta Tropica 24, 193 - 224

STOLTENBURG-DIDINGER, G. (2002):

Durch Prionen verursachte Krankheiten.

Fleischwirtsch 7, 107 – 110

TOBLER, I., S. E. GAUS, T. DEBOER, P. ACHERMANN, M. FISCHER, T. RÜLICHE, M. MOSER, B. OESCH, P. A. McBRIDE and J. C. MANSON (1996):

Altered circadian activity rhythms and sleep in mice devoid of prion protein.

Nature 380, 639 – 642

TROEGER, K., B.SCHURR, G. WACHSMANN, R. KOLB und M. BEHRSCHEMIDT (2002):

Vorbeugende Maßnahmen gegen eine mögliche BSE-Gefährdung. Alternative Methoden zur medianen Längsspaltung bei der Schlachtung von Rindern.

Fleischwirtsch 10, 129 - 135

VALLERON, A. J., P. Y. BOELLE, R. WILL, J. Y. CESBRON (2001):

Estimation of epidemic size and incubation time based on age characteristics of vCJD in the United Kingdom.

Science 294, 1726 - 1728

VANDEVELDE, M., A. ZURBRIGGEN und R. FATZER (1992):

Die spongiformen Enzephalopathien mit besonderer Berücksichtigung der bovinen spongiformen Enzephalopathie.

Schweiz Med Wochenschr 122, 887 - 892

VEITH, N., J. ALTEN, A. KUES, F. J. KAUP, I. ZERR and W. BODEMER (2005):

Alpha-Hemoglobin-Stabilizing-Protein (AHSP) as surrogate marker for the preclinical diagnosis of sporadic CJD in blood.

Proceedingband Prionenkongress 2005, Düsseldorf

WELLS G., A. SCOTT, C. JOHNSON, R. GUNNING, R. HANCOCK, M. JEFFREY, M. DAWSON and R. BRADLEY (1987):

A novel progressive spongiform encephalopathy in cattle.

Vet Rec 121, 419 - 420.

WELLS, G., S. A. C. HAWKINS, A. R. AUSTIN, S. J. RYDER, S. H. DONE, R. B. GREEN, I. DEXTER, M. DAWSON and R. H. KIMBERLIN (2003):

Studies of the transmissibility of the agent of bovine spongiform encephalopathy to pigs.

J Gen Virol 84, 1021 - 1031

WADSWORTH, J. D. F., S. JOINER, A. F. HILL, T. A. CAMPBELL, M. DESBRUSLAIS, P. LUTHERT and J. COLLINGE (2001):

Tissue distribution of proteinase resistant prion protein in variant Creutzfeldt-Jakob disease using a highly sensitive immunoblotting assay.

Lancet 358, 171 - 180

WIEMER, U. (2002):

Veterinärrechtliche Schutzmaßnahmen im Hinblick auf BSE.

Berl Münch Tierärztl Wschr 115, 134 - 139

WILL, R. G.(2001):

Portrait der neune Variante der Creutzfeld -Jakob-Krankheit.

In: Hörnlimann, B., D. Riesner, H. Kretzschmar, Prionen und Prionerkrankungen, de Gruyter Verlag, 1. Auflage

WILL, R. and M. ZEIDLER (1996):

Diagnosing Creutzfeldt-Jakob disease.

BMJ 313, 833 - 834.

WILL, R. and J. IRONSIDE (1999):

Oral infection by bovine spongiform encephalopathy prion.

Proc Natl Acad Sci 96, 4738 – 4739

WILL, R., J. IRONSIDE, M. ZEIDLER, S. COUSENS, K. ESTIBEIRO, A. ALPEROVITCH, S. POSER, M. POCCHIARI and A. HOFMAN (1996):

A new variant of Creutzfeldt-Jakob-Disease in the UK.

Lancet 347, 921 – 925

WILLIAMS, E. S. and S. YOUNG (1992):

Spongiform Encephalopathies in cervidae.

Rev Sci Tech Off Int Epiz 11, 551-567

WILLOUGHBY, K., D. F. KELLY, D. G. LYON, G. A. H. WELLS (1992):

Spongiform encephalopathy in a captive puma (felis concolor).

Vet Rec 131, 431 – 434

ZEIDLER, M. and J. W. IRONSIDE (2000):

The new variant of Creutzfeldt-Jakob disease.

Rev Sic Tech 109, 43-51

10 ANHANG

Anhangstabelle 1: Zusammengefasste Ergebnisse zum Nachweis von Rinderhirn in artifiziell kontaminierten Hackfleischproben nach unterschiedlichen Lagerungszeiten (bei + 2° C) mit dem RIDASCREEN® Risk Material 10/5

ZNS-Gehalt	Lagerungs-dauer [Tage]	OD > S1 (0 %)	OD > S2 (0,1 %)	OD > S3 (0,2 %)	OD > S4 (0,4 %)
0 %	0	+	-	-	-
		+	-	-	-
	1	=	-	-	-
		=	-	-	-
	3	+	-	-	-
		+	-	-	-
7	+	-	-	-	
	+	-	-	-	
14	-	-	-	-	
	+	-	-	-	
0,1 %	0	+	-	-	-
		+	-	-	-
		+	-	-	-
		+	(+)	-	-
	1	+	-	-	-
		+	-	-	-
		+	-	-	-
		+	-	-	-
	3	+	-	-	-
		+	(+)	-	-
		+	-	-	-
		+	-	-	-
7	+	-	-	-	
	+	-	-	-	
	+	-	-	-	
	+	-	-	-	
14	+	-	-	-	
	+	-	-	-	
	+	-	-	-	
	+	-	-	-	
0,2 %	0	+	(+)	-	-
		+	(+)	-	-
	1	+	+	-	-
		+	(+)	-	-
	3	+	(+)	-	-
		+	(+)	-	-
	7	+	(+)	-	-
		+	(+)	-	-
14	+	(+)	-	-	
	+	-	-	-	
0,5 %	0	+	+	-	-
		+	+	-	-
	1	+	+	-	-
		+	+	+	-
	3	+	+	-	-
		+	+	-	-
	7	+	(+)	-	-
		+	(+)	-	-
	14	+	(+)	-	-
		+	+	-	-

Fortsetzung Anhangstabelle 1:

ZNS-Gehalt	Lagerungs-dauer [Tage]	OD > S1 (0 %)	OD > S2 (0,1 %)	OD > S3 (0,2 %)	OD > S4 (0,4 %)
1 %	0	+	+	+	-
		+	+	+	-
	1	+	+	+	+
		+	+	+	-
	3	+	+	+	+
		+	+	+	-
7	+	+	-	-	
	+	+	+	-	
14	+	+	+	-	
	+	+	-	-	
5 %	0	+	+	+	+
		+	+	+	+
	1	+	+	+	+
		+	+	+	+
	3	+	+	+	+
		+	+	+	+
7	+	+	+	+	
	+	+	+	+	
14	+	+	+	+	
	+	+	+	+	

+ größer als

- kleiner als

= $\pm 0,005$ und weniger OD Unterschied

(+) erreicht eine OD entsprechend der doppelten OD des Nullstandards (S1) oder höher, aber kleiner S2, fraglich-positives Ergebnis

Anhangstabelle 2: Zusammengefasste Ergebnisse zum Nachweis von Rinderhirn in artifiziell kontaminierten Hackfleischproben nach unterschiedlichen Lagerungszeiten (bei + 2° C) mit dem Brainostic™

ZNS-Gehalt	Lagerungs-dauer [Tage]	OD > Blank (0 %)	OD > S1 (0,1 %)	OD > S2 (0,2 %)	OD > S3 (0,4 %)	OD > S4 (1 %)	
0 %	0	+	-	-	-	-	
		+	-	-	-	-	
	1	+	-	-	-	-	
		+	-	-	-	-	
	3	+	-	-	-	-	
		+	-	-	-	-	
7	+	-	-	-	-		
	+	-	-	-	-		
14	+	-	-	-	-		
	=	-	-	-	-		
0,1 %	0	+	-	-	-	-	
		+	(+)	-	-	-	
		+	(+)	-	-	-	
	1	+	-	-	-	-	
		+	+	-	-	-	
		+	-	-	-	-	
	3	+	+	-	-	-	
		+	+	-	-	-	
		+	-	-	-	-	
	7	+	+	+	-	-	
		+	+	+	-	-	
		+	+	+	+	-	
	14	+	+	=	-	-	
		+	+	-	-	-	
		+	-	-	-	-	
	0,2 %	0	+	(+)	-	-	-
			+	+	-	-	-
			+	+	-	-	-
1		+	+	-	-	-	
		+	-	-	-	-	
		+	-	-	-	-	
3		+	+	+	-	-	
		+	-	-	-	-	
		+	-	-	-	-	
7		+	+	-	-	-	
		+	+	+	-	-	
		+	+	+	-	-	
14		+	=	-	-	-	
		+	+	+	+	-	
		+	+	+	+	-	
0,5 %		0	+	+	+	-	-
			+	+	+	-	-
		1	+	+	=	-	-
	+		+	+	-	-	
	3	+	+	+	-	-	
		+	+	+	+	-	
	7	+	+	+	+	-	
		+	+	+	+	-	
	14	+	+	+	-	-	
		+	+	+	-	-	

Fortsetzung Anhangstabelle 2:

ZNS-Gehalt	Lagerungs- dauer [Tage]	OD > Blank (0%)	OD > S1 (0,1%)	OD > S2 (0,2%)	OD > S3 (0,4%)	OD > S4 (1%)
1 %	0	+	+	+	+	-
	1	+	+	+	-	-
		+	+	+	-	-
	3	+	+	+	+	-
		+	+	+	+	-
	7	+	+	+	+	-
+		+	+	+	-	
14	+	+	+	+	-	
	+	+	+	+	-	
5 %	0	+	+	+	+	+
	1	+	+	+	+	-
		+	+	+	+	-
	3	+	+	+	+	+
		+	+	+	+	+
	7	+	+	+	+	+
+		+	+	+	+	
14	+	+	+	+	+	
	+	+	+	+	+	

+ größer als

- kleiner als

= 0,005 und weniger OD Unterschied

(+) erreicht eine OD entsprechend der doppelten OD des Nullstandards (Blank) oder höher, aber kleiner S1

Anhangstabelle 3: Zusammengefasste Ergebnisse zum Nachweis von Rinderhirn in artifiziell kontaminierten Hackfleischproben nach unterschiedlichen Lagerungszeiten (bei + 2° C) mit dem RT-Real Time-PCR-Verfahren

ZNS-Gehalt	Lagerungs-dauer [Tage]	Ct-Wert < 33,20 (0,01 %)	Ct-Wert < 31,10 (0,1 %)	Ct-Wert < 28,60 (1 %)	Ct-Wert < 23,30 (8 %)	Ct-Wert < 20,20 (20 %)
0 %	0	-	-	-	-	-
	1	-	-	-	-	-
	3	-	-	-	-	-
	7	-	-	-	-	-
	14	-	-	-	-	-
	14	-	-	-	-	-
0,1 %	0	+	+	-	-	-
	1	+	+	-	-	-
		+	+	-	-	-
		+	+	-	-	-
		+	+	-	-	-
	3	+	+	-	-	-
		+	+	-	-	-
		+	+	-	-	-
		+	+	-	-	-
	7	+	-	-	-	-
		+	-	-	-	-
		+	-	-	-	-
+		-	-	-	-	
14	+	-	-	-	-	
	+	-	-	-	-	
	+	-	-	-	-	
	+	-	-	-	-	
0,2 %	0	+	+	-	-	-
	1	+	+	-	-	-
		+	+	-	-	-
	3	+	+	-	-	-
		+	+	-	-	-
	7	+	+	-	-	-
		+	-	-	-	-
	14	+	-	-	-	-
+		=	-	-	-	
0,5 %	0	+	+	+	-	-
	1	+	+	-	-	-
		+	+	-	-	-
	3	+	+	+	-	-
		+	+	=	-	-
	7	+	+	-	-	-
		+	+	-	-	-
	14	+	+	-	-	-
		+	+	-	-	-

Fortsetzung Anhangstabelle 3:

ZNS-Gehalt	Lagerungs- dauer [Tage]	Ct-Wert < 33,20 (0,01 %)	Ct-Wert < 31,10 (0,1 %)	Ct-Wert < 28,60 (1 %)	Ct-Wert < 23,30 (8 %)	Ct-Wert < 20,20 (20 %)
1 %	0	+	+	+	-	-
		+	+	+	-	-
	1	+	+	-	-	-
		+	+	-	-	-
	3	+	+	+	-	-
		+	+	+	-	-
	7	+	+	-	-	-
		+	+	-	-	-
	14	+	+	-	-	-
		+	+	-	-	-
5 %	0	+	+	+	-	-
		+	+	+	-	-
	1	+	+	+	-	-
		+	+	+	-	-
	3	+	+	+	-	-
		+	+	+	-	-
	7	+	+	+	-	-
		+	+	+	-	-
	14	+	+	+	-	-
		+	+	+	-	-

* undetektiert (kein Fluoreszenzsignal)

+ größer als

- kleiner als

= $\pm 0,05$ und weniger Zyklen Unterschied

Anhangstabelle 4: Zusammengefasste Ergebnisse zum Nachweis von Rinderhirn in artifiziell kontaminierten Hackfleischproben nach unterschiedlichen Lagerungszeiten (bei + 2° C) mit dem RIDASCREEN® Risk Material 10/5

ZNS-Gehalt	Lagerungsdauer [Tage]	OD > S1 (0 %)	OD > S2 (0,1 %)	OD > S3 (0,2 %)	OD > S4 (0,4 %)	
0 %	1 (Tupfer)*	+	-	-	-	
	1 (50 mg)	+	-	-	-	
	1 (50 mg, Wdh.)	=	-	-	-	
	3 (50 mg)	-	-	-	-	
	7 (50 mg)	-	-	-	-	
	10 (50 mg)	-	-	-	-	
	0,025 %	1 (Tupfer)	+	-	-	-
		1 (50 mg)	+	-	-	-
		1 (50 mg, Wdh.)	+	-	-	-
		3 (50 mg)	+	-	-	-
7 (50 mg)		+	-	-	-	
10 (50 mg)		+	-	-	-	
0,05 %		1 (Tupfer)	+	-	-	-
		1 (50 mg)	+	-	-	-
	1 (50 mg, Wdh.)	+	-	-	-	
	3 (50 mg)	+	-	-	-	
	7 (50 mg)	+	+	-	-	
	10 (50 mg)	+	-	-	-	
	0,1 %	1 (Tupfer)	+	-	-	-
		1 (50 mg)	+	+	-	-
1 (50 mg, Wdh.)		+	+	-	-	
3 (50 mg)		+	+	-	-	
7 (50 mg)		+	+	-	-	
10 (50 mg)		+	+	-	-	
0,1 % IFTN**		1 (Tupfer)	+	-	-	-
		1 (50 mg)	+	-	-	-
	1 (50 mg, Wdh.)	+	-	-	-	

Fortsetzung Anhangstabelle 4:

ZNS-Gehalt	Lagerungsdauer [Tage]	OD > S1 (0 %)	OD > S2 (0,1 %)	OD > S3 (0,2 %)	OD > S4 (0,4 %)
0,25 %	1 (Tupfer)	+	-	-	-
	1 (50 mg)	+	+	+	-
	1 (50 mg, Wdh.)	+	+	+	-
	3 (50 mg)	+	+	+	+
	7 (50 mg)	+	+	+	=
	10 (50 mg)	+	+	+	+
	1 (Tupfer)	+	+	+	-
	1 (50 mg)	+	+	+	+
0,5 %	1 (50 mg, Wdh.)	+	+	+	+
	3 (50 mg)	+	+	+	+
	7 (50 mg)	+	+	+	+
	10 (50 mg)	+	+	+	+
	1 (Tupfer)	+	+	+	-
	1 (50 mg)	+	+	+	+
	1 (50 mg, Wdh.)	+	+	+	+
	3 (50 mg)	+	+	+	+
1 %	7 (50 mg)	+	+	+	+
	10 (50 mg)	+	+	+	+
	1 (Tupfer)	+	+	+	-
	1 (50 mg)	+	+	+	+
	1 (50 mg, Wdh.)	+	+	+	+
	3 (50 mg)	+	+	+	+
	7 (50 mg)	+	+	+	+
	10 (50 mg)	+	+	+	+

+ größer als

- kleiner als

= ± 0,005 und weniger OD Unterschied

(+) erreicht eine OD entsprechend der doppelten OD des Nullstandards (S1) oder höher, aber kleiner S2, fraglich-positives Ergebnis

* Die erste Probenahme erfolgte gemäß den Herstellerangaben mit Tupfern.

** Intern am Institut für Tierärztliche Nahrungsmittelkunde hergestelltes Untersuchungsmaterial, tiefgefroren bei - 18° C seit 6 Wochen gelagert.

Anhangstabelle 5: Zusammengefasste Ergebnisse zum Nachweis von Rinder-Rückenmark in artifiziell kontaminierten Hackfleischproben nach unterschiedlichen Lagerungszeiten (bei + 2° C) mit dem RIDASCREEN® Risk Material 10/5, Probenaufbereitung mit 50 mg

ZNS-Gehalt	Lagerungs-dauer [Tage]	OD > S1 (0 %)	OD > S2 (0,1 %)	OD > S3 (0,2 %)	OD > S4 (0,4 %)
0 %	0	+	(+)	-	-
		+	(+)	-	-
	1	-	-	-	-
		-	-	-	-
	3	=	-	-	-
		=	-	-	-
7	+	-	-	-	
14	-	-	-	-	
0,05 %	0	+	(+)	-	-
		+	(+)	-	-
	1	+	(+)	-	-
		+	(+)	-	-
	3	+	-	-	-
		+	(+)	-	-
7	+	(+)	-	-	
14	+	(+)	-	-	
0,1 %	0	+	+	-	-
		+	+	-	-
	1	+	(+)	-	-
		+	+	-	-
	3	+	(+)	-	-
		+	(+)	-	-
7	+	(+)	-	-	
14	+	(+)	-	-	
0,2 %	0	+	+	-	-
		+	+	-	-
	1	+	+	-	-
		+	+	-	-
	3	+	(+)	-	-
		+	+	-	-
7	+	(+)	-	-	
14	+	+	-	-	
0,5 %	0	+	+	+	-
		+	+	+	-
	1	+	+	+	-
		+	+	+	-
	3	+	+	-	-
		+	+	+	-
7	+	+	-	-	
14	+	+	+	-	
		+	+	+	+

+ größer als

- kleiner als

= 0,005 und weniger OD Unterschied

(+) erreicht eine OD entsprechend der doppelten OD des Nullstandards (S1) oder höher, aber kleiner S2, fraglich-positives Ergebnis

Anhangstabelle 6: Zusammengefasste Ergebnisse zum Nachweis von Rinder-Rückenmark in artifiziell kontaminierten Hackfleischproben nach unterschiedlichen Lagerungszeiten (bei + 2° C) mit dem RIDASCREEN® Risk Material 10/5, Probenaufbereitung mit Tupfern

ZNS-Gehalt	Lagerungs-dauer [Tage]	OD > S1 (0 %)	OD > S2 (0,1 %)	OD > S3 (0,2 %)	OD > S4 (0,4 %)
0 %	0	+	-	-	-
		+	(+)	-	-
	1	+	-	-	-
		+	-	-	-
	3	+	(+)	-	-
		+	(+)	-	-
7	+	-	-	-	
	+	-	-	-	
14	-	-	-	-	
	-	-	-	-	
0,05 %	0	+	(+)	-	-
		+	(+)	-	-
	1	+	(+)	-	-
		+	-	-	-
	3	+	(+)	-	-
		+	-	-	-
7	+	-	-	-	
	+	-	-	-	
14	+	-	-	-	
	+	-	-	-	
0,1 %	0	+	(+)	-	-
		+	(+)	-	-
	1	+	+	-	-
		+	(+)	-	-
	3	+	(+)	-	-
		+	(+)	-	-
7	+	(+)	-	-	
	+	(+)	-	-	
14	+	(+)	-	-	
	+	(+)	-	-	
0,2 %	0	+	+	-	-
		+	+	-	-
	1	+	+	-	-
		+	+	-	-
	3	+	-	-	-
		+	-	-	-
7	+	(+)	-	-	
	+	(+)	-	-	
14	+	+	-	-	
	+	+	-	-	
0,5 %	0	+	+	-	-
		+	+	+	-
	1	+	+	+	-
		+	+	+	-
	3	+	+	-	-
		+	+	+	-
7	+	+	-	-	
	+	+	-	-	
14	+	+	+	-	
	+	+	-	-	

+ größer als

- kleiner als

= ± 0,005 und weniger OD Unterschied

(+) erreicht eine OD entsprechend der doppelten OD des Nullstandards (S1) oder höher, aber kleiner S2, fraglich-positives Ergebnis

Anhangstabelle 7: Zusammengefasste Ergebnisse zum Nachweis von Rinder-Rückenmark in artifiziell kontaminierten Hackfleischproben nach unterschiedlichen Lagerungszeiten (bei + 2° C) mit dem Brainostic™

ZNS-Gehalt	Lagerungs-dauer [Tage]	> Blank (0 %)	> S1 (0,1 %)	> S2 (0,2 %)	> S3 (0,4%)	> S4 (1%)
0 %	0	-	-	-	-	-
		+	-	-	-	-
	1	+	-	-	-	-
		+	-	-	-	-
	3	+	-	-	-	-
	7	=	-	-	-	-
	14	Daten der 0 % Probe von Tag 14 liegen nicht vor				
0,05 %	0	+	+	-	-	-
		+	+	-	-	-
	1	+	+	-	-	-
		+	+	-	-	-
	3	+	+	+	-	-
	7	+	+	+	-	-
	14	+	+	+	-	-
0,1 %	0	+	+	+	-	-
		+	+	+	-	-
	1	+	+	-	-	-
		+	+	+	-	-
	3	+	+	+	+	-
	7	+	+	+	-	-
	14	+	+	+	+	-
0,2 %	0	+	+	+	+	-
		+	+	+	+	+
	1	+	+	+	+	-
		+	+	+	+	-
	3	+	+	+	+	+
	7	+	+	+	=	-
	14	+	+	+	+	-
0,5 %	0	+	+	+	+	+
		+	+	+	+	+
	1	+	+	+	+	+
		+	+	+	+	+
	3	+	+	+	+	+
	7	+	+	+	+	+
	14	+	+	+	+	+

+ größer als

- kleiner als

= 0,005 und weniger OD Unterschied

(+) erreicht eine OD entsprechend der doppelten OD des Nullstandards (Blank) oder höher, aber kleiner S1

Anhangstabelle 8: Zusammengefasste Ergebnisse zum Nachweis von Rinder-Rückenmark in artifiziell kontaminierten Hackfleischproben nach unterschiedlichen Lagerungszeiten (bei + 2° C) mit dem RT-Real Time-PCR-Verfahren

ZNS-Gehalt	Lagerungs-dauer [Tage]	Ct-Wert < 32,20 (0,01 %)	Ct-Wert < 30,10 (0,1 %)	Ct-Wert < 28,60 (1 %)	Ct-Wert < 23,30 (8 %)	Ct-Wert < 20,20 (20 %)
0 %	0	-	-	-	-	-
	1	-	-	-	-	-
	3	-	-	-	-	-
	7	-	-	-	-	-
	14	-	-	-	-	-
0,05 %	0	+	-	-	-	-
	1	+	-	-	-	-
	3	+	-	-	-	-
	7	+	+	-	-	-
	14	+	-	-	-	-
0,1 %	0	+	+	-	-	-
	1	+	-	-	-	-
	3	+	-	-	-	-
	7	+	+	-	-	-
	14	+	-	-	-	-
0,2 %	0	+	+	-	-	-
	1	+	+	-	-	-
	3	+	-	-	-	-
	7	+	+	=	-	-
	14	+	+	-	-	-
0,5 %	0	+	+	+	-	-
	1	+	+	+	-	-
	3	+	+	=	-	-
	7	+	+	+	-	-
	14	+	+	+	-	-

+ größer als

- kleiner als

= bedeutet ein Ct-Wert von $\pm 0,05$ oder weniger Unterschied

Anhangstabelle 9: Zusammengefasste Ergebnisse zum Nachweis von Rinderhirn in artifiziell kontaminierten Hackfleischproben nach unterschiedlichen Lagerungszeiten (bei - 18° C) mit dem RIDASCREEN® Risk Material 10/5

ZNS-Gehalt	Lagerungszeit [Monat]	OD > S1 (0 %)	OD > S2 (0,1 %)	OD > S3 (0,2 %)	OD > S4 (0,4 %)
0 %	0	+	-	-	-
	(Tupfer)	+	-	-	-
	1	-	-	-	-
	(Tupfer)	-	-	-	-
	3	-	-	-	-
	(50 mg)	-	-	-	-
	6	-	-	-	-
	(50 mg)	=	-	-	-
9	=	-	-	-	
(50 mg)	+	-	-	-	
12	=	-	-	-	
(50 mg)	+	-	-	-	
0,1 %	0	+	-	-	-
	(Tupfer)	+	-	-	-
		+	-	-	-
		+	(+)	-	-
	1	-	-	-	-
	(Tupfer)	+	(+)	-	-
		-	-	-	-
	3	+	+	-	-
	(50 mg)	+	-	-	-
		+	(+)	-	-
		+	(+)	-	-
	6	+	+	-	-
(50 mg)	+	(+)	-	-	
	+	+	-	-	
	+	(+)	-	-	
9	+	(+)	-	-	
(50 mg)	+	(+)	-	-	
	+	=	-	-	
	+	+	-	-	
12	+	=	-	-	
(50 mg)	+	(+)	-	-	
	+	(+)	-	-	
	+	+	-	-	
0,2 %	0	+	(+)	-	-
	(Tupfer)	+	(+)	-	-
	1	+	(+)	-	-
	(Tupfer)	+	(+)	-	-
	3	+	+	-	-
	(50 mg)	+	+	-	-
	6	+	+	+	-
	(50 mg)	+	+	+	-
9	+	+	-	-	
(50 mg)	+	+	-	-	
12	+	+	+	-	
(50 mg)	+	+	+	-	
0,5 %	0	+	+	-	-
	(Tupfer)	+	+	-	-
	1	+	+	+	-
	(Tupfer)	+	+	-	-
	3	+	+	+	-
	(50 mg)	+	+	+	-
	6	+	+	+	+
	(50 mg)	+	+	+	+
9	+	+	+	-	
(50 mg)	+	+	+	+	
12	+	+	+	+	
(50 mg)	+	+	+	+	

Fortsetzung Anhangstabelle 9:

ZNS-Gehalt	Lagerungszeit [Monat]	OD > S1 (0 %)	OD > S2 (0,1 %)	OD > S3 (0,2 %)	OD > S4 (0,4 %)
1 %	0	+	+	+	-
	(Tupfer)	+	+	+	-
	1	+	+	+	-
	(Tupfer)	+	+	+	-
	3	+	+	+	+
	(50 mg)	+	+	+	+
	6	+	+	+	+
	(50 mg)	+	+	+	+
5 %	9	+	+	+	+
	(50 mg)	+	+	+	+
	12	+	+	+	+
	(50 mg)	+	+	+	+
	0	+	+	+	+
	(Tupfer)	+	+	+	+
	1	+	+	+	+
	(Tupfer)	+	+	+	+
5 %	3	+	+	+	+
	(50 mg)	+	+	+	+
	6	+	+	+	+
	(50 mg)	+	+	+	+
	9	+	+	+	+
	(50 mg)	+	+	+	+
	12	+	+	+	+
	(50 mg)	+	+	+	+

+ größer als

- kleiner als

= ± 0,005 und weniger OD Unterschied

(+) erreicht eine OD entsprechend der doppelten OD des Nullstandards (S1) oder höher, aber kleiner S2

Anhangstabelle 10: Zusammengefasste Ergebnisse zum Nachweis von Rinderhirn in artifiziiell kontaminierten Hackfleischproben nach unterschiedlichen Lagerungszeiten (bei - 18° C) mit dem Brainostic™

ZNS-Gehalt	Lagerungszeit [Monat]	OD > Blank (0 %)	OD > S1 (0,1 %)	OD > S2 (0,2 %)	OD > S3 (0,4 %)	OD > S4 (1 %)
0 %	0	+	-	-	-	-
	1	-	-	-	-	-
	3	+	-	-	-	-
	6	-	-	-	-	-
	9	-	-	-	-	-
	12	=	-	-	-	-
			=	-	-	-
0,1 %	0	+	-	-	-	-
		+	(+)	-	-	-
		+	(+)	-	-	-
		+	(+)	-	-	-
	1	+	+	-	-	-
		+	+	-	-	-
		+	+	-	-	-
	3	+	+	-	-	-
		+	+	-	-	-
		+	-	-	-	-
		+	(+)	-	-	-
	6	+	(+)	-	-	-
		+	(+)	-	-	-
	+	(+)	-	-	-	
	+	(+)	-	-	-	
9	+	-	-	-	-	
	+	+	-	-	-	
	+	+	-	-	-	
	+	-	-	-	-	
12	+	=	-	-	-	
	+	+	-	-	-	
	+	+	-	-	-	
	+	+	-	-	-	
0,2 %	0	+	(+)	-	-	-
		+	+	-	-	-
	1	+	+	-	-	-
		+	+	-	-	-
	3	+	+	-	-	-
		+	+	-	-	-
	6	+	+	-	-	-
	+	+	-	-	-	
9	+	+	+	-	-	
	+	+	-	-	-	
12	+	+	-	-	-	
	+	+	-	-	-	
0,5 %	0	+	+	+	-	-
		+	+	+	-	-
	1	+	+	+	-	-
		+	+	+	-	-
	3	+	+	+	+	-
		+	+	+	+	-
	6	+	+	+	-	-
	+	+	-	-	-	
9	+	+	+	-	-	
	+	+	+	-	-	
12	+	+	-	-	-	
	+	+	-	-	-	

Fortsetzung Anhangstabelle 10:

ZNS-Gehalt	Lagerungszeit [Monat]	OD > Blank (0 %)	OD > S1 (0,1 %)	OD > S2 (0,2 %)	OD > S3 (0,4 %)	OD > S4 (1 %)
1 %	0	+	+	+	+	-
	1	+	+	+	+	-
	3	+	+	+	+	+
	6	+	+	+	+	-
	9	+	+	+	+	-
	12	+	+	+	+	-
	0	+	+	+	+	+
5 %	1	+	+	+	+	-
	3	+	+	+	+	+
	6	+	+	+	+	-
	9	+	+	+	+	-
	12	+	+	+	+	+
	0	+	+	+	+	+
	12	+	+	+	+	+

+ größer als

- kleiner als

= ± 0,005 und weniger OD Unterschied

(+) erreicht eine OD entsprechend der doppelten OD des Nullstandards (Blank) oder höher, aber kleiner S1

Anhangstabelle 11: Zusammengefasste Ergebnisse zum Nachweis von Rinderhirn in artifiziiell kontaminierten Hackfleischproben nach unterschiedlichen Lagerungszeiten (bei - 18° C) mit dem Reverse Transkriptase-Real Time-PCR-Verfahren

ZNS-Gehalt	Lagerungszeit [Monat]	Ct-Wert < 33,20 (0,01 %)	Ct-Wert < 31,10 (0,1 %)	Ct-Wert < 28,60 (1 %)	Ct-Wert < 23,30 (8 %)	Ct-Wert < 20,20 (20 %)
0 %	0	-	-	-	-	-
	1	-	-	-	-	-
	3	-	-	-	-	-
	6	-	-	-	-	-
	9	-	-	-	-	-
	12	-	-	-	-	-
	0	-	-	-	-	-
0, 1%	0	+	+	-	-	-
		+	+	-	-	-
		+	+	-	-	-
	1	+	+	-	-	-
		+	+	-	-	-
		+	+	-	-	-
	3	+	+	-	-	-
		+	+	-	-	-
		-	-	-	-	-
	6	+	+	-	-	-
		+	+	+	-	-
		+	+	-	-	-
		+	+	-	-	-
	9	+	+	-	-	-
	+	+	-	-	-	
	+	+	-	-	-	
12	+	-	-	-	-	
	-	-	-	-	-	
	+	-	-	-	-	
0,2 %	0	+	+	-	-	-
		+	+	-	-	-
	1	+	-	-	-	-
		+	-	-	-	-
	3	+	+	+	-	-
		+	+	-	-	-
	6	+	+	-	-	-
	+	+	-	-	-	
9	+	+	-	-	-	
	+	+	-	-	-	
12	+	-	-	-	-	
	+	=	-	-	-	

Fortsetzung Anhangstabelle 11:

ZNS-Gehalt	Lagerungszeit [Monat]	Ct-Wert < 33,20 (0,01 %)	Ct-Wert < 31,10 (0,1 %)	Ct-Wert < 28,60 (1 %)	Ct-Wert < 23,30 (8 %)	Ct-Wert < 20,20 (20 %)
0,5 %	0	+	+	+	-	-
		+	+	+	-	-
	1	+	+	-	-	-
		+	+	-	-	-
	3	+	+	+	-	-
		+	+	+	-	-
	6	+	+	+	-	-
	+	+	-	-	-	
1 %	9	+	+	+	-	-
		+	-	-	-	-
	12	+	+	-	-	-
		+	+	-	-	-
	0	+	+	+	-	-
		+	+	+	-	-
	1	+	+	-	-	-
	+	+	-	-	-	
5 %	3	+	+	+	-	-
		+	+	+	-	-
	6	+	+	+	-	-
		+	+	+	-	-
	9	+	+	+	-	-
		+	+	+	-	-
	12	+	+	+	-	-
	+	+	+	-	-	

+ größer als

- kleiner als

= bedeutet ein Ct-Wert von $\pm 0,05$ oder weniger Unterschied

Anhangstabelle 12: Zusammengefasste Ergebnisse zum Nachweis von Rinderhirn in artifiziiell kontaminierten Brühwurst-Vollkonserven nach unterschiedlichen Lagerungszeiten (bei + 2° C) mit dem RIDASCREEN® Risk Material

ZNS-Gehalt	Lagerungszeit [Monat]	OD > S1 (0 %)	OD > S2 (0,2 %)	OD > S3 (1 %)	OD > S4 (2 %)
0 %	4	+	-	-	-
		+	-	-	-
	6	-	-	-	-
		+	-	-	-
	12	+	-	-	-
		+	-	-	-
18	-	-	-	-	
	-	-	-	-	
0,1 %	4	+	-	-	-
		+	-	-	-
	6	+	-	-	-
		+	-	-	-
	12	+	-	-	-
		+	-	-	-
18	+	-	-	-	
	+	-	-	-	
1 %	4	+	(+)	-	-
		+	(+)	-	-
	6	+	(+)	-	-
		+	(+)	-	-
	12	+	+	-	-
		+	+	-	-
18	+	+	-	-	
	+	+	-	-	
2 %	4	+	+	-	-
		+	+	-	-
	6	+	+	-	-
		+	+	-	-
	12	+	+	+	-
		+	+	-	-
18	+	+	-	-	
	+	+	-	-	
8 %	4	+	+	+	-
		+	+	+	-
	6	+	+	+	-
		+	+	+	-
	12	+	+	+	+
		+	+	+	+
18	+	+	-	-	
	+	+	-	-	
24	+	+	-	-	
	+	+	+	-	

+ größer als

- kleiner als

= 0,005 und weniger OD Unterschied

(+) erreicht eine OD entsprechend der doppelten OD des Nullstandards (S1) oder höher, aber kleiner S2

Anhangstabelle 13: Zusammengefasste Ergebnisse zum Nachweis von Rinderhirn in artifiziell kontaminierten Brühwurst-Vollkonserven nach unterschiedlichen Lagerungszeiten (bei + 2° C) mit dem Brainostic™

ZNS-Gehalt	Lagerungszeit [Monat]	OD > Blank (0 %)	OD > S1 (0,1 %)	OD > S2 (0,2 %)	OD > S3 (0,4 %)	OD > S4 (1 %)
0 %	4	+	-	-	-	-
		=	-	-	-	-
	6	=	-	-	-	-
		-	-	-	-	-
	12	-	-	-	-	-
		-	-	-	-	-
18	-	-	-	-	-	
	-	-	-	-	-	
24	-	-	-	-	-	
	=	-	-	-	-	
0,1 %	4	+	=	-	-	-
		+	(+)	-	-	-
	6	+	-	-	-	-
		+	-	-	-	-
	12	+	(+)	-	-	-
		+	(+)	-	-	-
18	+	(+)	-	-	-	
	+	(+)	-	-	-	
24	+	-	-	-	-	
	+	-	-	-	-	
1 %	4	+	+	+	+	-
		+	+	+	+	-
	6	+	+	+	-	-
		+	+	+	-	-
	12	+	+	+	-	-
		+	+	+	-	-
18	+	+	-	-	-	
	+	+	-	-	-	
24	+	+	-	-	-	
	+	+	-	-	-	
2 %	4	+	+	+	+	-
		+	+	+	+	-
	6	+	+	+	+	-
		+	+	+	=	-
	12	+	+	+	+	-
		+	+	+	+	-
18	+	+	+	+	-	
	+	+	+	+	-	
24	+	+	+	-	-	
	+	+	+	-	-	
8 %	4	+	+	+	+	+
		+	+	+	+	+
	6	+	+	+	+	-
		+	+	+	+	-
	12	+	+	+	+	-
		+	+	+	+	-
18	+	+	+	+	+	
	+	+	+	+	+	
24	+	+	+	-	-	
	+	+	+	-	-	

+ größer als

- kleiner als

= ± 0,005 und weniger OD Unterschied

(+) erreicht eine OD entsprechend der doppelten OD des Nullstandards (Blank) oder höher, aber kleiner S1

Anhangstabelle 14: Zusammengefasste Ergebnisse zum Nachweis von Rinderhirn in artifiziell kontaminierten Brühwurst-Vollkonserven nach unterschiedlichen Lagerungszeiten (bei + 2° C) mit dem Reverse Transkriptase-Real Time-PCR-Verfahren

ZNS-Gehalt	Lagerungszeit [Monat]	Ct-Wert < 37,00 (0,1 %)	Ct-Wert < 30,50 (1 %)	Ct-Wert < 26,90 (8 %)
0 %	4	-	-	-
	6	-	-	-
	12	-	-	-
	18	-	-	-
	24	-	-	-
0,1 %	4	(+)	-	-
	6	(+)	-	-
	12	+	-	-
	18	+	-	-
	24	+	-	-
1 %	4	+	-	-
	6	+	-	-
	12	+	-	-
	18	+	-	-
	24	+	-	-
2 %	4	+	-	-
	6	+	-	-
	12	+	-	-
	18	+	-	-
	24	+	-	-
8 %	4	+	-	-
	6	+	+	-
	12	+	-	-
	18	+	-	-
	24	+	+	-

+ größer als

- kleiner als

(+) weniger als ein PCR-Zyklus oberhalb des Cut off-Werts, fraglich-positives Ergebnis

= bedeutet ein Ct-Wert von $\pm 0,05$ oder weniger Unterschied

Anhangstabelle 15: Zusammengefasste Ergebnisse zum Nachweis von Rinderhirn in artifiziell kontaminierten Brühwurst-Dreiviertelkonserven nach unterschiedlichen Lagerungszeiten (bei + 2° C) mit dem RIDASCREEN® Risk Material

ZNS-Gehalt	Lagerungszeit [Monat]	OD > S1 (0 %)	OD > S2 (0,2 %)	OD > S3 (1 %)	OD > S4 (2 %)
0 %	4	-	-	-	-
	6	=	-	-	-
	12	=	-	-	-
	18	-	-	-	-
	24	-	-	-	-
	24	-	-	-	-
0,1 %	4	+	(+)	-	-
	6	+	(+)	-	-
	12	+	-	-	-
	18	+	-	-	-
	24	+	-	-	-
	24	+	-	-	-
1 %	4	+	+	-	-
	6	+	+	-	-
	12	+	+	-	-
	18	+	+	-	-
	24	+	+	-	-
	24	+	+	-	-
2 %	4	+	+	-	-
	6	+	+	=	-
	12	+	+	+	-
	18	+	+	-	-
	24	+	+	-	-
	24	+	+	-	-
8 %	4	+	+	+	+
	6	+	+	+	+
	12	+	+	+	+
	18	+	+	-	-
	24	+	+	+	-
	24	+	+	+	-

+ größer als

- kleiner als

= ± 0,005 und weniger OD Unterschied

(+) erreicht eine OD entsprechend der doppelten OD des Nullstandards (S1) oder höher, aber kleiner S2

Anhangstabelle 16: Zusammengefasste Ergebnisse zum Nachweis von Rinderhirn in artifiziell kontaminierten Brühwurst-Dreiviertelkonserven nach unterschiedlichen Lagerungszeiten (bei + 2° C) mit dem Brainostic™

ZNS-Gehalt	Lagerungszeit [Monat]	OD > Blank (0 %)	OD > S1 (0,1 %)	OD > S2 (0,2 %)	OD > S3 (0,4 %)	OD > S4 (1 %)
0 %	4	+	-	-	-	-
		+	-	-	-	-
	6	-	-	-	-	-
		-	-	-	-	-
	12	-	-	-	-	-
		-	-	-	-	-
0,1 %	18	-	-	-	-	-
		-	-	-	-	-
	24	-	-	-	-	-
		-	-	-	-	-
	4	+	=	-	-	-
		+	=	-	-	-
0,1 %	6	+	=	-	-	-
		+	(+)	-	-	-
	12	+	(+)	-	-	-
		+	(+)	-	-	-
	18	+	(+)	-	-	-
		+	(+)	-	-	-
1 %	24	+	-	-	-	-
		+	-	-	-	-
	4	+	+	+	+	-
		+	+	+	+	-
	6	+	+	+	+	-
		+	+	+	+	-
1 %	12	+	+	+	-	-
		+	+	+	-	-
	18	+	+	+	+	-
		+	+	+	+	-
	24	+	+	+	-	-
		+	+	+	-	-
2 %	4	+	+	+	+	-
		+	+	+	+	+
	6	+	+	+	+	-
		+	+	+	+	-
	12	+	+	+	+	-
		+	+	+	+	-
2 %	18	+	+	+	+	+
		+	+	+	+	-
	24	+	+	+	-	-
		+	+	+	-	-
	4	+	+	+	+	+
		+	+	+	+	+
8 %	6	+	+	+	+	+
		+	+	+	+	+
	12	+	+	+	+	+
		+	+	+	+	+
	18	+	+	+	+	+
		+	+	+	+	+
8 %	24	+	+	+	+	+
		+	+	+	+	+

+ größer als

- kleiner als

= ± 0,005 und weniger OD Unterschied

(+) erreicht eine OD entsprechend der doppelten OD des Nullstandards (Blank) oder höher, aber kleiner S1, fraglich-positives Ergebnis

Anhangstabelle 17: Zusammengefasste Ergebnisse zum Nachweis von Rinderhirn in artifiziell kontaminierten Brühwurst-Dreiviertelkonserven nach unterschiedlichen Lagerungszeiten (bei + 2° C) mit dem Reverse Transkriptase-Real Time-PCR-Verfahren

ZNS-Gehalt	Lagerungszeit [Monat]	Ct-Wert < 37,00 (0,1 %)	Ct-Wert < 30,50 (1 %)	Ct-Wert < 26,90 (8 %)
0 %	4	-	-	-
	6	-	-	-
	12	-	-	-
	18	-	-	-
	24	-	-	-
0,1 %	4	+	-	-
	6	(+)	-	-
	6 Wdh.	(+)	-	-
	12	+	-	-
	18	+	-	-
	24	+	-	-
1 %	4	+	-	-
	6	+	-	-
	12	+	-	-
	18	+	-	-
	24	+	-	-
2 %	4	+	-	-
	6	+	-	-
	12	+	-	-
	18	+	-	-
	24	+	-	-
8 %	4	+	-	-
	6	+	-	-
	12	+	+	-
	18	+	-	-
	24	+	-	-

* undetektiert (kein Fluoreszenzsignal)

+ größer als

- kleiner als

(+) weniger als ein PCR-Zyklus oberhalb des Cut off, fraglich-positives Ergebnis

Anhangstabelle 18: Zusammengefasste Ergebnisse zum Nachweis von Rinderhirn in artifiziiell kontaminierten Leberwurst-Kesselkonserven nach unterschiedlichen Lagerungszeiten (bei + 10° C) mit dem RIDASCREEN Risk Material

ZNS-Gehalt	Lagerungszeit [Monat]	OD > S1 (0 %)	OD > S2 (0,2 %)	OD > S3 (1 %)	OD > S4 (2 %)
0 %	0	-	-	-	-
	1	-	-	-	-
	6	+	-	-	-
	12	+	-	-	-
		+	-	-	-
0,1 %	0	+	(+)	-	-
		+	(+)	-	-
		+	(+)	-	-
		+	(+)	-	-
	1	+	(+)	-	-
		+	(+)	-	-
		+	(+)	-	-
	6	+	(+)	-	-
		+	=	-	-
		+	=	-	-
	12	+	(+)	-	-
		+	=	-	-
	+	(+)	-	-	
0,2 %	0	+	+	-	-
		+	+	-	-
	1	+	+	-	-
		+	+	-	-
	6	+	+	-	-
	+	+	-	-	
12	+	+	-	-	
	+	+	-	-	
0,5 %	0	+	+	+	-
		+	+	+	-
	1	+	+	-	-
		+	+	-	-
	6	+	+	-	-
	+	+	-	-	
12	+	+	-	-	
	+	+	-	-	
1 %	0	+	+	+	-
		+	+	+	-
	1	+	+	+	-
		+	+	+	-
	6	+	+	+	-
	+	+	+	-	
12	+	+	+	-	
	+	+	+	-	

Fortsetzung Anhangstabelle 18:

ZNS-Gehalt	Lagerungszeit [Monat]	OD > S1 (0 %)	OD > S2 (0,2 %)	OD > S3 (1 %)	OD > S4 (2 %)
2 %	0	+	+	+	+
		+	+	+	+
	1	+	+	+	+
		+	+	+	+
	6	+	+	+	+
		+	+	+	+
12	+	+	+	+	
	+	+	+	+	
8 %	0	+	+	+	+
		+	+	+	+
	1	+	+	+	+
		+	+	+	+
	6	+	+	+	+
		+	+	+	+
	12	+	+	+	+
		+	+	+	+

+ größer als

- kleiner als

= ± 0,005 und weniger OD Unterschied

(+) erreicht eine OD entsprechend der doppelten OD des Nullstandards (S1) oder höher, aber kleiner S2, fraglich-positives Ergebnis

Anhangstabelle 19: Zusammengefasste Ergebnisse zum Nachweis von Rinderhirn in artifiziiell kontaminierten Leberwurst-Kesselkonserven nach unterschiedlichen Lagerungszeiten (bei + 10° C) mit dem Brainostic™

ZNS-Gehalt	Lagerungszeit [Monat]	OD > Blank (0 %)	OD > S1 (0,1 %)	OD > S2 (0,2 %)	OD > S3 (0,4 %)	OD > S4 (1 %)
0 %	0	+	-	-	-	-
		+	-	-	-	-
	1	-	-	-	-	-
		-	-	-	-	-
	6	+	-	-	-	-
		+	-	-	-	-
	12	+	-	-	-	-
		+	-	-	-	-
0,1 %	0	+	+	+	-	-
		+	+	+	-	-
		+	+	+	-	-
		+	+	+	+	-
	1	+	+	+	-	-
		+	+	+	-	-
		+	+	+	-	-
		+	+	+	+	-
	6	+	+	-	-	-
		+	+	+	-	-
		+	+	+	-	-
		+	+	-	-	-
	12	+	(+)	-	-	-
		+	(+)	-	-	-
		+	(+)	-	-	-
		+	(+)	-	-	-
0,2 %	0	+	+	+	+	-
		+	+	+	+	-
	1	+	+	+	+	-
		+	+	+	+	-
	6	+	+	-	-	-
		+	+	+	-	-
	12	+	+	-	-	-
		+	+	-	-	-
0,5 %	0	+	+	+	+	-
		+	+	+	+	-
	1	+	+	+	+	-
		+	+	+	+	+
	6	+	+	+	-	-
		+	+	+	-	-
	12	+	+	+	+	-
		+	+	+	+	-

Fortsetzung Anhangstabelle 19:

ZNS-Gehalt	Lagerungszeit [Monat]	OD > Blank (0 %)	OD > S1 (0,1 %)	OD > S2 (0,2 %)	OD > S3 (0,4 %)	OD > S4 (1 %)
1 %	0	+	+	+	+	-
		+	+	+	+	-
	1	+	+	+	+	+
		+	+	+	+	+
	6	+	+	+	+	-
		+	+	+	+	-
12	+	+	+	+	-	
2 %	0	+	+	+	+	+
		+	+	+	+	+
	1	+	+	+	+	+
		+	+	+	+	+
	6	+	+	+	+	-
		+	+	+	+	-
12	+	+	+	+	+	
8 %	0	+	+	+	+	+
		+	+	+	+	+
	1	+	+	+	+	+
		+	+	+	+	+
	6	+	+	+	+	+
		+	+	+	+	+
12	+	+	+	+	+	
		+	+	+	+	+

+ größer als

- kleiner als

= ± 0,005 und weniger OD Unterschied

(+) erreicht eine OD entsprechend der doppelten OD des Nullstandards (Blank) oder höher, aber kleiner S1, fraglich-positives Ergebnis

Anhangstabelle 20: Zusammengefasste Ergebnisse zum Nachweis von Rinderhirn in artifiziiell kontaminierten Leberwurst-Kesselkonserven nach unterschiedlichen Lagerungszeiten (bei + 10° C) mit dem Reverse Transkriptase-Real Time-PCR-Verfahren

ZNS-Gehalt	Lagerungszeit [Monat]	Ct-Wert < 37,00 (0,01 %)	Ct-Wert < 30,09 (0,1 %)	Ct-Wert < 28,58 (1 %)	Ct-Wert < 23,45 (8 %)	Ct-Wert < 20,18 (20 %)
0 %	0	-	-	-	-	-
	1	-	-	-	-	-
	6	-	-	-	-	-
	12	-	-	-	-	-
0,1 %	0	+	-	-	-	-
		+	-	-	-	-
		+	-	-	-	-
	1	+	-	-	-	-
		+	-	-	-	-
		+	-	-	-	-
	6	(+)	-	-	-	-
		+	-	-	-	-
	12	+	-	-	-	-
		-	-	-	-	-
0,2 %	0	+	-	-	-	-
		+	-	-	-	-
	1	+	-	-	-	-
		+	-	-	-	-
	6	(+)	-	-	-	-
12	(+)	-	-	-	-	
0,5 %	0	+	-	-	-	-
		+	-	-	-	-
	1	+	-	-	-	-
		+	-	-	-	-
	6	-	-	-	-	-
12	+	-	-	-	-	
1 %	0	+	-	-	-	-
		+	-	-	-	-
	1	+	-	-	-	-
		+	-	-	-	-
	6	(+)	-	-	-	-
12	+	-	-	-	-	
	+	-	-	-	-	

Fortsetzung Anhangstabelle 20:

ZNS-Gehalt	Lagerungszeit [Monat]	Ct-Wert < 37,00 (0,01 %)	Ct-Wert < 30,09 (0,1 %)	Ct-Wert < 28,58 (1 %)	Ct-Wert < 23,45 (8 %)	Ct-Wert < 20,18 (20 %)	
2 %	0	+	-	-	-	-	
		+	-	-	-	-	
	1	+	-	-	-	-	
		+	-	-	-	-	
	6	+	-	-	-	-	
		+	-	-	-	-	
	12	+	-	-	-	-	
		+	-	-	-	-	
	8 %	0	+	+	-	-	-
			+	+	-	-	-
1		+	+	-	-	-	
		+	+	+	-	-	
6		+	+	-	-	-	
		+	-	-	-	-	
12		+	+	-	-	-	
		+	+	-	-	-	

+ größer als

- kleiner als

(+) weniger als ein PCR-Zyklus über Cut off, fraglich-positives Ergebnis

= ± 0,05 und weniger Zyklen Unterschied

Anhangstabelle 21: Deskriptive statistische Auswertung der Untersuchungreihe Hackfleisch mit Rinderhirnzusatz, Lagerdauer 14 Tage bei + 2° C

Stichprobenumfang (n) = 210

Variable	OR	95%iger Vertrauensintervall		p
		Min	Max	
Lagerdauer	1,0	0,92	1,1	0,7075
Lg ZNS-Konz.	0,21E+04	0,25E+03	0,18E+05	< 0,0001
Methode (1)	18	5,4	61	< 0,0001
Methode (2)	0,11E+04	86	0,13E+05	

Methode (1): Vergleich Brainostic™-ELISA/RIDASCREEN®-ELISA

Methode (2): Vergleich Reverse Transkriptase-Real Time-PCR/RIDASCREEN®-ELISA

Anhangstabelle 22: Deskriptive statistische Auswertung der Untersuchungreihe Hackfleisch mit Rinder-Rückenmarkszusatz, Lagerdauer 14 Tage bei + 2° C

Stichprobenumfang (n) = 150

Variable	OR	95%iger Vertrauensintervall		p
		Min	Max	
Lagerdauer	0,97	0,86	1,1	0,5390
Lg ZNS-Konz.	0,12E+05	0,51E+03	0,26E+06	< 0,0001
Methode (1)	77	10	0,58E+03	< 0,0001
Methode (2)	70	9,4	0,51E+03	

Methode (1): Vergleich Brainostic™-ELISA/RIDASCREEN®-ELISA

Methode (2): Vergleich Reverse Transkriptase-Real Time-PCR/RIDASCREEN®-ELISA

Anhangstabelle 23: Deskriptive statistische Auswertung der Untersuchungsreihe Hackfleisch mit Rinderhirnzusatz, Lagerdauer 18 Monate bei – 18° C

Stichprobenumfang (n) = 252

Variable	OR	95%iger Vertrauensintervall		p
		Min	Max	
Lagerdauer	1,2	1,1	1,3	0,0022
Lg ZNS-Konz.	0,39E+04	0,21E+03	0,72E+05	< 0,0001
Methode (1)	2,8	1,0	7,6	< 0,0001
Methode (2)	20	4,7	84	

Methode (1): Vergleich Brainostic™-ELISA/RIDASCREEN®-ELISA

Methode (2): Vergleich Reverse Transkriptase-Real Time-PCR/RIDASCREEN®-ELISA

Anhangstabelle 24: Deskriptive statistische Auswertung der Untersuchungsreihe Brühwurst-Vollkonserven mit Rinderhirnzusatz, Lagerdauer 24 Monate bei + 2° C

Stichprobenumfang (n) = 150

Variable	OR	95%iger Vertrauensintervall		p
		Min	Max	
Lagerdauer	1,0	0,96	1,1	0,7809
Lg ZNS-Konz.	-	-	-	1,0000
Methode (1)	1,6	0,72	3,4	1,0000
Methode (2)	2,2	0,99	5,0	

Methode (1): Vergleich Brainostic™-ELISA/RIDASCREEN®-ELISA

Methode (2): Vergleich Reverse Transkriptase-Real Time-PCR/RIDASCREEN®-ELISA

Anhangstabelle 25: Deskriptive Statistische Auswertung der Untersuchungsreihe Brühwurst-Dreiviertelkonserven mit Rinderhirnzusatz, Lagerdauer 24 Monate bei + 2° C

Stichprobenumfang (n) = 150

Variable	OR	95%iger Vertrauensintervall		p
		Min	Max	
Lagerdauer	0,99	0,95	1,0	0,6399
Lg ZNS-Konz.	-	-	-	1,0000
Methode (1)	1,4	0,65	3,2	1,0000
Methode (2)	2,1	0,89	5,0	

Methode (1): Vergleich Brainostic™-ELISA/RIDASCREEN®-ELISA

Methode (2): Vergleich Reverse Transkriptase-Real Time-PCR/RIDASCREEN®-ELISA

Anhangstabelle 24: Deskriptive Statistische Auswertung der Untersuchungsreihe Leberwurst-Kesselkonserven mit Rinderhirnzusatz, Lagerdauer 12 Monate bei + 10° C

Stichprobenumfang (n) = 192

Variable	OR	95%iger Vertrauensintervall		p
		Min	Max	
Lagerdauer	0,83	0,74	0,93	0,0006
Lg ZNS-Konz.	0,41E+03	63	0,27E+04	< 0,0001
Methode (1)	4,9	1,3	19	< 0,0001
Methode (2)	0,75	0,24	2,4	

Methode (1): Vergleich Brainostic™-ELISA/RIDASCREEN®-ELISA

Methode (2): Vergleich Reverse Transkriptase-Real Time-PCR/RIDASCREEN®-ELISA

DANKSAGUNG

An dieser Stelle möchte ich allen, die zum Gelingen meiner Dissertation beigetragen haben, meinen herzlichen Dank aussprechen.

Herrn Prof. Dr. M. Bülte bin ich für die Überlassung des Themas, für die gewährte Unterstützung und für die Möglichkeit zur wissenschaftlichen Weiterbildung am IFTN zu Dank verpflichtet.

Herrn Dr. Amir Abdulmawjood und Herrn Dr. Holger Schönenbrücher danke ich für die stetige Unterstützung und Beratung.

Den technischen Mitarbeitern des IFTN, insbesondere Frau Claudia Walter und Frau Karin Simon, danke ich für die praktische Hilfestellung. Herrn Frank Schmitt möchte ich für die Herstellung des Referenzmaterials danken.

Herrn Dr. Klaus Failing von der Arbeitsgruppe Biomathematik und Datenverarbeitung danke ich für die Hilfe bei der statistischen Auswertung der Ergebnisse.

Ich bedanke mich bei Herrn Dr. W. Lübbe von R-Biopharm in Darmstadt sowie bei Firma Schebo in Gießen für die Bereitstellung der ELISA-Testkits.

Bei meinen Freunden und insbesondere meiner ehemaligen Kollegin Dr. Regina Füllgrabe bedanke ich mich für die moralische Unterstützung während der langen Zeit der Anfertigung meiner Dissertation.

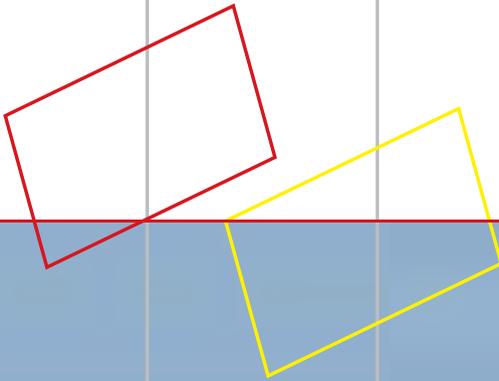
Herrn Christoph Hegler danke ich für die liebevolle Unterstützung und Geduld in dieser Zeit sowie die Hilfe bei Korrekturlesen und Formatierung.

Meiner gesamten Familie danke ich für die Unterstützung und Geduld während des langen Zeitraums.

Mein größter Dank gilt jedoch meinen Eltern, die mich immer voller Liebe unterstützt und mir das Studium ermöglicht haben.

**ERKLÄRUNG GEMÄß § 10 ABS. 5 DER PROMOTIONSORDNUNG DES
FACHBEREICHES VETERINÄRMEDIZIN DER JUSTUS-LIEBIG-UNIVERSITÄT GIEßEN**

„Ich erkläre: Ich habe die vorgelegte Dissertation selbständig und ohne unerlaubte fremde Hilfe und nur mit den Hilfen angefertigt, die ich in der Dissertation angegeben habe. Alle Textstellen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten oder nicht veröffentlichten Schriften entnommen sind, und alle Angaben, die auf mündlichen Auskünften beruhen, sind als solche kenntlich gemacht. Bei den von mir durchgeführten und in der Dissertation erwähnten Untersuchungen habe ich die Grundsätze guter wissenschaftlicher Praxis, wie sie in der „Satzung der Justus-Liebig-Universität Gießen zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis“ niedergelegt sind, eingehalten.“



édition scientifique
VVB LAUFERSWEILER VERLAG

VVB LAUFERSWEILER VERLAG
STAUFENBERGRING 15
D-35396 GIESSEN

Tel: 0641-5599888 Fax: -5599890
redaktion@doktorverlag.de
www.doktorverlag.de

ISBN: 978-3-8359-5518-9

