

Nutztiere

Mikroskopische Untersuchung von Futtermitteln

Geneviève Frick, Alexandra Roetschi und Heinrich Hauswirth, Eidgenössische Forschungsanstalt für Nutztiere (RAP), CH-1725 Posieux
Auskünfte: Heinrich Hauswirth, e-mail: heinrich.hauswirth@rap.admin.ch, Fax +41 (0)26 407 73 00, Tel. +41 (0)26 407 72 38

Zusammenfassung

Im Zusammenhang mit der Rinderkrankheit BSE werden die in der Schweiz produzierten und verkauften Futtermittel für Nutztiere im Rahmen der amtlichen Futtermittelkontrolle auf tierische Bestandteile untersucht. Die angewandte Methode basiert auf Fraktionierung (sedimentieren und sieben), Färbung und Beobachtung mittels Mikroskop. Tierische Bestandteile werden an ihren charakteristischen Farben, Formen und Strukturen erkannt. Die Methode erlaubt den Nachweis von tierischem Material bis in den Spurenbereich ($< 0,1\%$) und die Trennung zwischen Fisch und Landtier, soweit Knochen- oder andere charakteristische Bruchstücke vorhanden sind. Typische Knochen- und Muskelfaserbruchstücke sowie andere Partikel von Fisch oder Landtier werden fotografisch dokumentiert. Die Zusammenstellung der Ergebnisse der Kontrollen von 1991 bis 2002 zeigt ab 2001 einen deutlichen Rückgang der positiven Fälle und eine Zunahme der analysierten Proben. Die Mikroskopie ist gegenwärtig die schnellste, kostengünstigste und genaueste Methode, um tierische Bestandteile in Futtermitteln nachzuweisen.

An der Eidgenössischen Forschungsanstalt für Nutztiere in Posieux (RAP) werden Futter-

mittel für Nutztiere kontrolliert. Zusätzlich zu den chemischen (Nährstoffe, Spurenelemente u.a.)

und mikrobiologischen Analysen, werden auch Komponenten und einzelne Partikel mikroskopisch nachgewiesen. Wie schon von Hauswirth (1988) beschrieben, ist ein Futtermittel ohne Mikroskopie kaum abschliessend zu beurteilen; nur sie zeigt uns, mit welchen Produkten wir es zu tun haben. Sie wird heute hauptsächlich in zwei Gebieten eingesetzt, einerseits um tierische Bestandteile nachzuweisen, andererseits um die Zusammensetzung von Futtermitteln zu bestimmen. Mit dieser Methode ist der Zeitaufwand relativ klein und die Nachweisgrenze recht tief.

Nachweis von tierischen Bestandteilen

Die Rinderkrankheit BSE (Bovine Spongiform Encephalopathy = Rinderwahnsinn) wurde höchstwahrscheinlich durch das Verfüttern von infiziertem Tiermehl an Wiederkäuer in verschiedenen Ländern verbreitet (Dahms *et al.* 2001). In der Schweiz ist die Verfütterung von Tiermehl an Wiederkäuer seit Dezember 1990 verboten. Weil auch nach dem Verfütterungsverbot geborene Rinder an BSE erkrankt sind, wurden die Sicherheitsmassnahmen laufend verschärft. Seit Januar 2001 dürfen Futtermittel für Nutztiere keine tierischen Produkte mehr enthalten. Ausnahmen sind Fischmehl, das zur Herstellung von Mischfuttermitteln für Schweine, Geflügel und Fische eingesetzt werden darf, sowie bestimmte tierische Fette.

Ein gut beherrschtes Mikroskop bringt allerhand ans Licht.



Glossar:

ELISA (Enzyme-Linked Immuno-Sorbent Assay): in einer Probe werden bekannte Proteine mittels Antikörper (gekoppelt mit einer Farbreaktion) markiert.

PCR (Polymerase Chain Reaction): Nucleinsäuren von bekannten Genen werden (wenn anwesend) amplifiziert und so nachgewiesen.

DNS (Desoxyribonukleinsäure): Wesentlicher Bestandteil der Chromosomen, in denen die genetischen Informationen verschlüsselt sind.

BSE-Einheit des Bundes: Arbeitsgruppe, mit zeitlich befristetem Auftrag, deren Ziel die Ausrottung der BSE-Seuche beim Tier ist, um die Sicherheit der Menschen zu gewährleisten. Die BSE-Einheit will eine konsequente und einheitliche Umsetzung der festgelegten Massnahmen zur BSE-Bekämpfung auf allen Stufen sicherstellen. Sie besteht aus Mitarbeitenden der Bundesämter für Gesundheit, Landwirtschaft und Veterinärwesen. Für weitere Informationen: www.bse-einheit.ch.

Polarisation (Beobachtung im polarisierten Licht): Belichtungsverfahren, das das Aufleuchten von gewissen Feinstrukturen mit bestimmtem lichtbrechenden Verhalten erlaubt.

Otolithe: «Gehörsteinchen» von Fischen.

Guaninkristalle: besonders häufiges Exkret von Fischgewebe, das die silberne oder irisierende Farbe hervorruft und auch nach Hitzebehandlung unverändert mit Licht interferiert.

Seit Februar 1993 müssen die Fleischmehlproduzenten alle tierischen Abfälle mit hoher Hitze behandeln (133 °C; 20 Minuten, 3 bar), damit der BSE-Erreger stark reduziert wird. Diese Behandlung hat zur Folge, dass der Nachweis von tierischen Bestandteilen mit gewissen Methoden (ELISA; PCR) erschwert ist, weil die Proteine und zum Teil die DNS stark denaturiert sind (Hofmann 2000; Lahiff *et al.* 2001). Hingegen sind die für die Mikroskopie wichtigen Merkmale in diesen Proben, vor allem bei Knochenbruchstücken, nicht betroffen.

Seit November 2000 werden auch kleinste Spuren an tierischen Produkten, welche durch Kreuzkontaminationen oder Verschleppungen entstehen können, in Wiederkäuerfuttermitteln nicht mehr toleriert.

Um der BSE-Krankheit noch besser begegnen zu können, wurde die Mikroskopieuntersu-

chung von Futtermitteln im Jahre 2001 stark intensiviert und beim Bund eine BSE-Einheit ins Leben gerufen.

Beschreibung der Methode

Eine eingewogene Probe (10 bis 40 g, je nach Grösse des erwarteten Sediments) wird mittels Tetrachlorethylen (Dichte 1,62, Michard et Ziebal 1999) in Sediment und Flotat aufgetrennt. Im Sediment finden sich mineralische Komponenten zusammen mit möglichen Knochen- und Grätebruchstücken, sowie Schuppen und Zähnen. Das Flotat, auch organischer Probenanteil genannt, vereint die schwimmenden Pflanzenteile mit eventuellen Fleischfaserbruchstücken, Knorpel, Borsten und Horn von Tieren. Die zwei Fraktionen werden auf getrennten Glasplatten (in einer Kapelle) an der Luft getrocknet. Das gewogene Sediment und das Flotat werden mit Sieben in je drei

Fraktionen geteilt (> 1 mm; ≥ 0,35 mm; < 0,35 mm). Die gröberen Fraktionen werden mit dem Stereomikroskop untersucht (Vergrösserungen 10 bis 50fach). Anschliessend werden Mikroskopiepräparate hergestellt. In der Regel werden ein Präparat der mittleren und je zwei der feinen Fraktion von Sediment und Flotat analysiert. Das Sediment wird zur Aufhellung in Phenol-Glycerin-Lösung (9:1), das Flotat zur Proteinfärbung in Jodkalium-Lösung (1 g I₂, 2 g KI in 100 ml H₂O) aufgenommen. Jedes Präparat wird bei hundertfacher Vergrösserung vollständig untersucht, wobei ständig auf und ab fokussiert wird, um die Strukturen deutlich zu sehen. Bei fraglichen Bruchstücken wird 200- und 400fach vergrössert, öfters wird auch die Polarisation eingesetzt.

Optische Erkennung von tierischen Partikeln

Die angewandte Methode basiert auf Fraktionierung, Färbung und Beobachtung. Besteht das Futtermittel hauptsächlich aus pflanzlichen Komponenten, sind durch Fraktionierung mögliche Knochenbruchstücke konzentriert im Sediment leichter zu finden als in der Originalprobe. Die Trennung erlaubt auch eine differenzierte Färbung. In Phenolglycerin erscheinen die wichtigen Merkmale zur Beurteilung der Knochenstruktur deutlicher und die durch Jod rot gefärbten Muskelfasern im Flotat werden schnell geortet.

Als erstes werden die gröberen und mittleren Fraktionen des Sediments mit dem Stereomikroskop untersucht. Zwischen Salzkristallen, Kieselbruchstücken und anderen Mineralien werden die anwesenden typischen Knochenbruchstücke erkannt. Die Fischknochenbruchstücke sind eher milchig, durchsichtig, die Gräten sind typisch länglich (Abb. 1a).

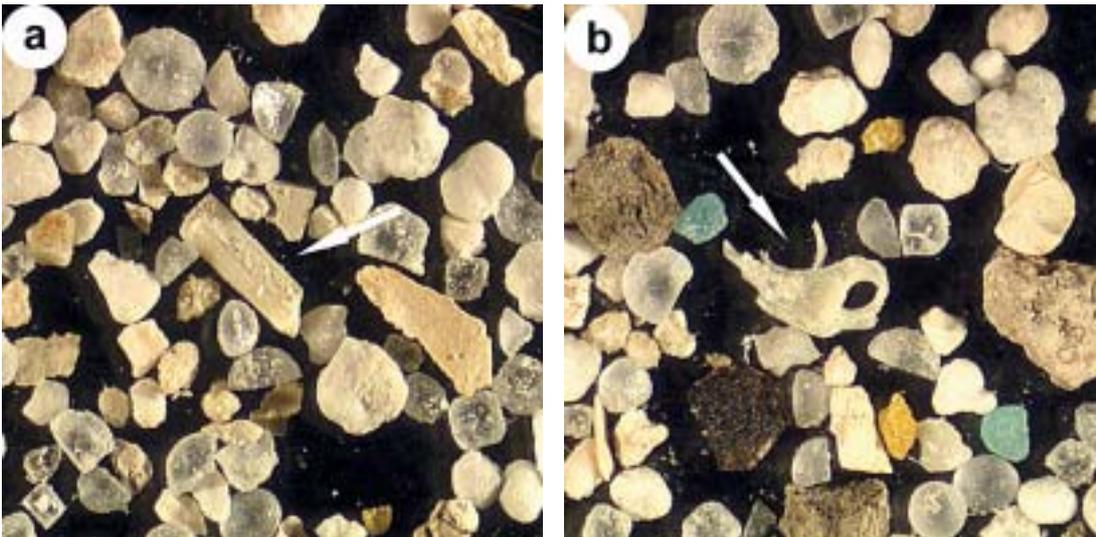


Abb. 1. Stereomikroskopische Bilder eines Sedimentes (25fach vergrössert). Ein Fischknochen- (a) und ein Geflügelknochenbruchstück (b) können unter verschiedenen Mineralien erkannt werden (Pfeile).

Die Farbe der Landtierknochenbruchstücke geht von weiss über gelb bis hellbraun; sie sind nicht durchsichtig, matt und haben stumpfe (Säugetiere) oder schärfere (Vögel) Kanten (Abb. 1b). Auffallend für Landtierknochenbruchstücke sind Löcher. Diese rühren von Kanälen, die Blutgefässe enthielten, her.

In der groben und mittleren Fraktion des Flotats sind Partikel tierischen Materials zu finden, wenn auch nicht leicht un-

ter all dem pflanzlichen Material. Auch fallen die Bruchstücke, von der Farbe und Form her, nicht besonders auf. Trotzdem können Fleischmehlpartikel oder Fasern (Muskeln, Sehnen, Knorpel) erkannt werden (Abb. 2). Bei Fischmehl sind die Partikel eher matt und grau bis braun (Abb. 2a), bei Landtiermehl oft glänzend und hellbraun (Abb. 2b). In diesen Teilen der Probe wären auch Haare, Federn, Horn und Borsten zu finden.

Mikroskopische Merkmale

Verdächtige Bruchstücke aus den gröberen Fraktionen und kleine Aliquots der mittleren und feinsten Fraktionen (Sediment und Flotat) werden in die entsprechende Flüssigkeit aufgenommen und mikroskopisch analysiert. Knochenbruchstücke fallen durch Farbe und Form auf und besonders durch die in der Grundsubstanz regelmässig verteilten Lakunen, den eigentlichen Knochenzellhöhlen. Diese

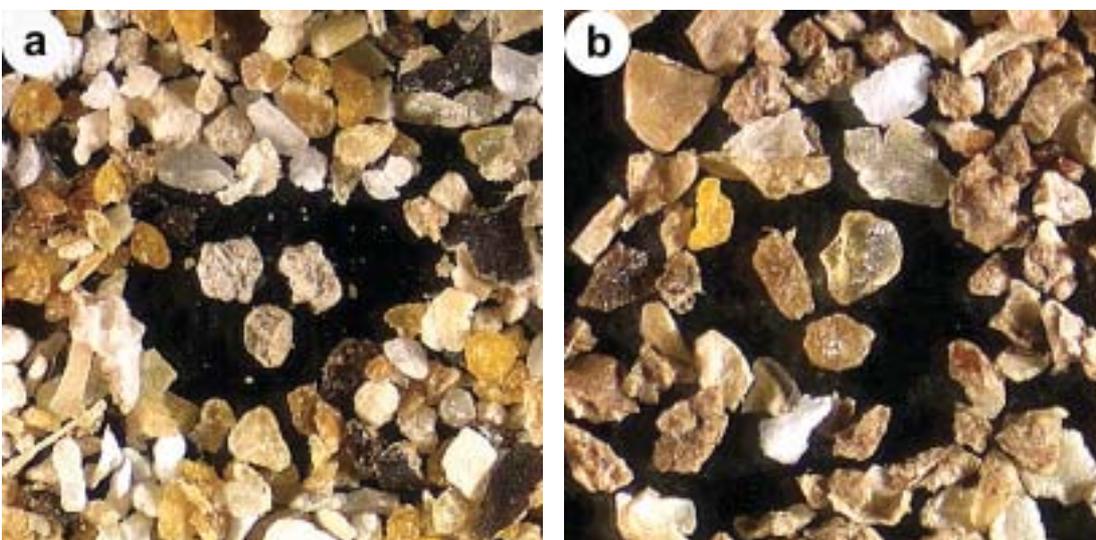


Abb. 2. Stereomikroskopische Bilder eines Flotats (25fach vergrössert). Fleischpartikel von Fisch (a) und Landtier (b) können dank ihrer Farbe und ihrem Glanz von pflanzlichen Bruchstücken aussortiert werden.

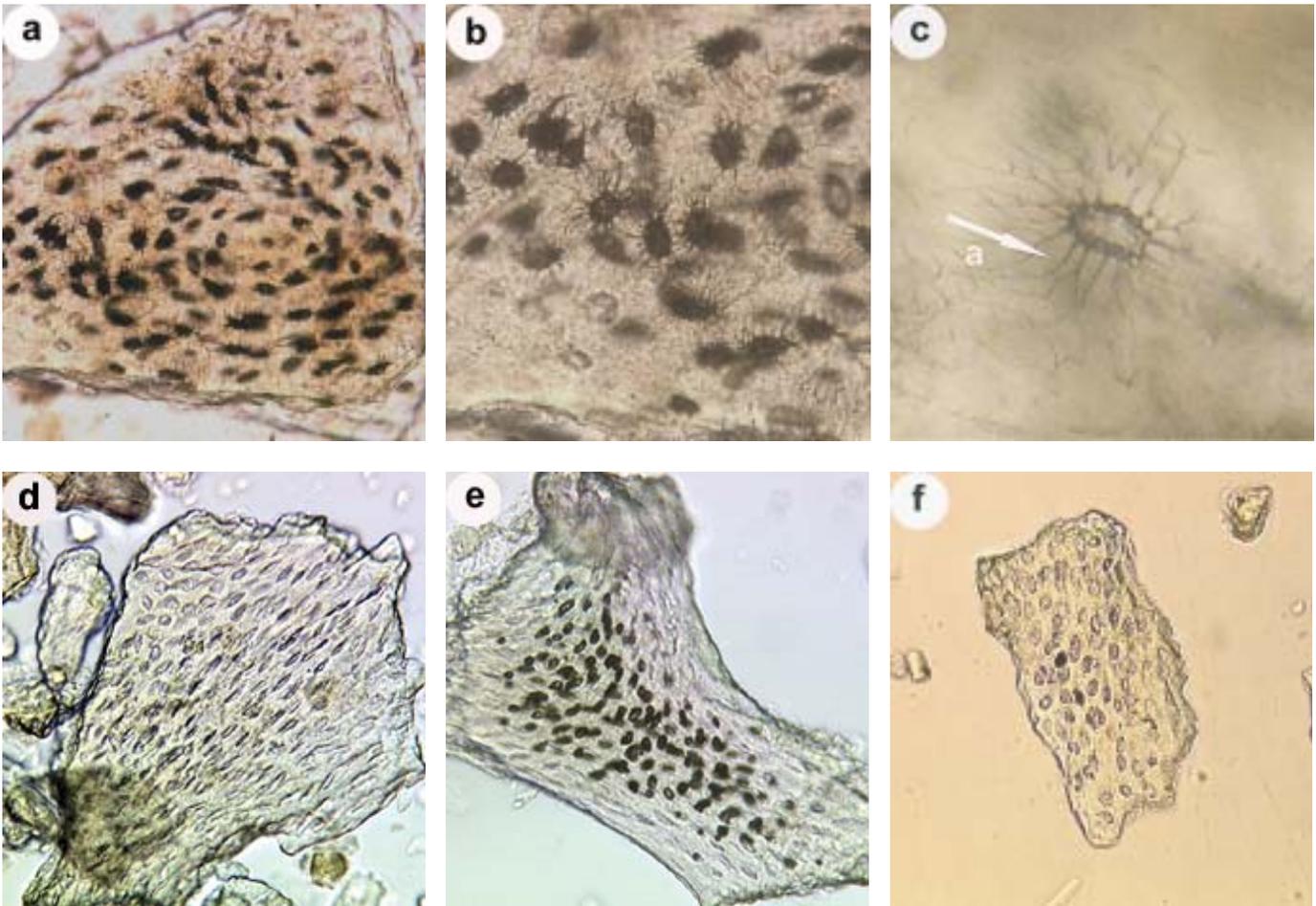


Abb. 3. Mikroskopische Bilder von Landtierknochenbruchstücken. Zahlreiche Landtierlakunen können bei 100- (a) und 200facher (b) Vergrößerung beobachtet werden; c: Typische Ausläufer (a) breiten sich von der Lakune aus (Pfeil) (400fach vergr.). Je nach Eindringen der Einbettungsflüssigkeit können die Knochenlakunen durchsichtig (d, f) oder schwarz (e) erscheinen (100fach vergr.).

Lakunen erscheinen schwarz, wenn sie mit Luft gefüllt sind und durchsichtig, wenn Flüssigkeit eingedrungen ist.

Abbildung 3 (a-c) zeigt Merkmale von Landtierknochen: runde bis elliptische Lakunen mit zahlreichen feinen, allseitig abgehenden Ausläufern, die speziell bei 200- (Abb. 3b) und 400facher (Abb. 3c) Vergrößerung sichtbar sind. Allerdings sind nicht in allen Knochen Ausläufer zu sehen (Abb. 3d-f).

Bei den Fischknochenbruchstücken sind die Lakunen öfters linsen- bis spindelförmig, manchmal von unterschiedlicher Grösse, mit wenigen gut sichtbaren Ausläufern (Abb. 4a). Manche Fisch-

knochenfragmente zeigen keine deutlichen Lakunen, sondern eine faserige, braune Oberfläche (Abb. 4b). Die Anwesenheit von Fischmehl kann auch durch andere typische Bruchstücke nachgewiesen werden: Kiemen (Abb. 4c), knorpelige Kopfteile (Abb. 4d), Schuppen (Abb. 4e), Zähne und Otolithen (Abb. 4f).

In den Flotatpräparaten, die mit Jodkalium-Reagens hergestellt werden, sind die proteinreichen Partikel rot gefärbt, Stärke wird schwarz (Abb. 5a). Die quergestreifte Muskulatur (Abb. 5b und 5c) ist von anderen proteinreichen Komponenten wegen des charakteristischen Musters von dünnen, parallelen, quer zur Faser laufenden Streifen gut zu un-

terscheiden. Auch nicht gestreifte Muskulatur (Abb. 5d) und Knorpelstücke (Abb. 5e) sind erkennbar. Bei allen diesen Partikeln ist es nicht möglich zu unterscheiden, ob ihre Herkunft von Fischen oder Landtieren ist. Eine Beobachtung in der Polarisation kann helfen, Fischpartikel zeigen polarisierende Guaninkristalle (Abb. 5f). Häufiges Vorkommen dieses Merkmals in einer Probe gilt als Hinweis für Fischmehl.

Intensivere Kontrolltätigkeit

Nach dieser Methode wurden an der RAP seit Jahren Futtermittelproben untersucht und bewertet. Die Zusammenstellung der Ergebnisse der durchgeführten

Kontrollen von 1991 bis 2000 in Wiederkäuerfuttermitteln (Abb. 6) zeigt eine geringe Schwankung der Landtierknochen positiven Fälle (Spuren = $< 0,1$ % und Kontaminationen = $\geq 0,1$ %); dies trotz einer Zunahme der analysierten Proben in den Jahren 1999 und 2000. Die Anzahl der Kontaminationen ist tief; der höchste Wert lag im Jahr 1996 bei 6 Proben (4,5 %). Spuren und Kontaminationen zusammen erreichten 1995 ein Maximum von 45,5 % der analysierten Proben. Diese Zahl sank 1999 und 2000 auf 22,6 % respektive 15,8 %.

In den Jahren 2001 und 2002 wurden wesentlich mehr Proben, auch vermehrt Futtermittel für andere Nutztiere als Wiederkäuer analysiert (Tabelle 1). Der

Anteil Landtierknochen positiver Proben ist aber deutlich gesunken: 3,4 % im Jahr 2001 und auf 2,4 % in den ersten sieben Monaten 2002. Kontaminationen gab es im laufenden und letzten Jahr nur je zwei; keine betraf Wiederkäuerfuttermittel.

Was in dieser Tabelle nicht erscheint, sind Proben mit Spuren von Fischmehl. Solches wird in Proben von Mischfutterherstellern, die die Bewilligung haben, Fischmehl zu verwenden, regelmässig entdeckt, sowohl in Wiederkäuerfuttermitteln als auch in andern.

Stand der Mikroskopie heute

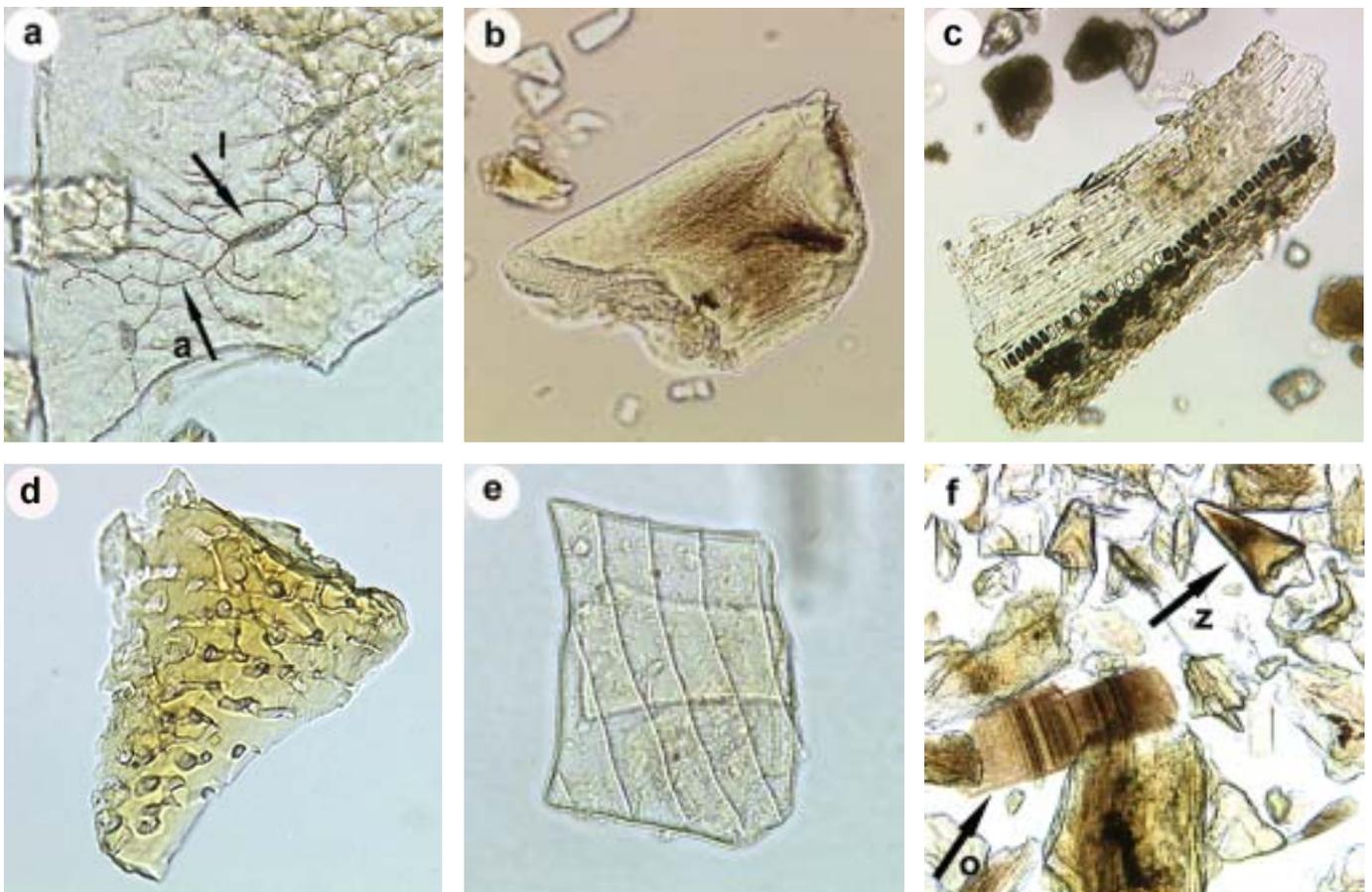
Mit der Mikroskopie können Futtermittelproben innert weni-

ger Stunden und mit relativ einfachen Mitteln auf das Vorhandensein von tierischen Bestandteilen geprüft werden. Wie gezeigt, erfolgt der Nachweis durch erfahrene Mikroskopiker bis in den Spurenbereich ($< 0,1$ %). Eine Quantifizierung der Kontamination durch Wiegen und Zählen ist bei genügend grossen Anteilen auch durchaus möglich.

Werden Muskelfasern - aber keine Knochenbruchstücke - in einer Probe entdeckt, ist es nicht möglich zu unterscheiden, ob es sich um Fischmehl oder anderes Tiermehl handelt. Dann wird abgeklärt, ob der Futtermittelhersteller Fischmehl in Mischfuttermitteln verwendet. Wenn ja, wird entschieden, dass die

Abb. 4. Mikroskopische Bilder von Fischbruchstücken.

- a: Heringsgräte mit Lakunen (l) und deren charakteristischen Ausläufer (a) (200fach vergrössert);
- b: Faserige braune Oberfläche eines Bruchstückes (100fach vergr.);
- c: Fischkiemen (100fach vergr.);
- d: Bruchstück eines Heringkopfes (100fach vergr.);
- e: Dorschschuppe (200fach vergr.);
- f: Dorschzahn (z) und Otolithe (o) (40fach vergr.).



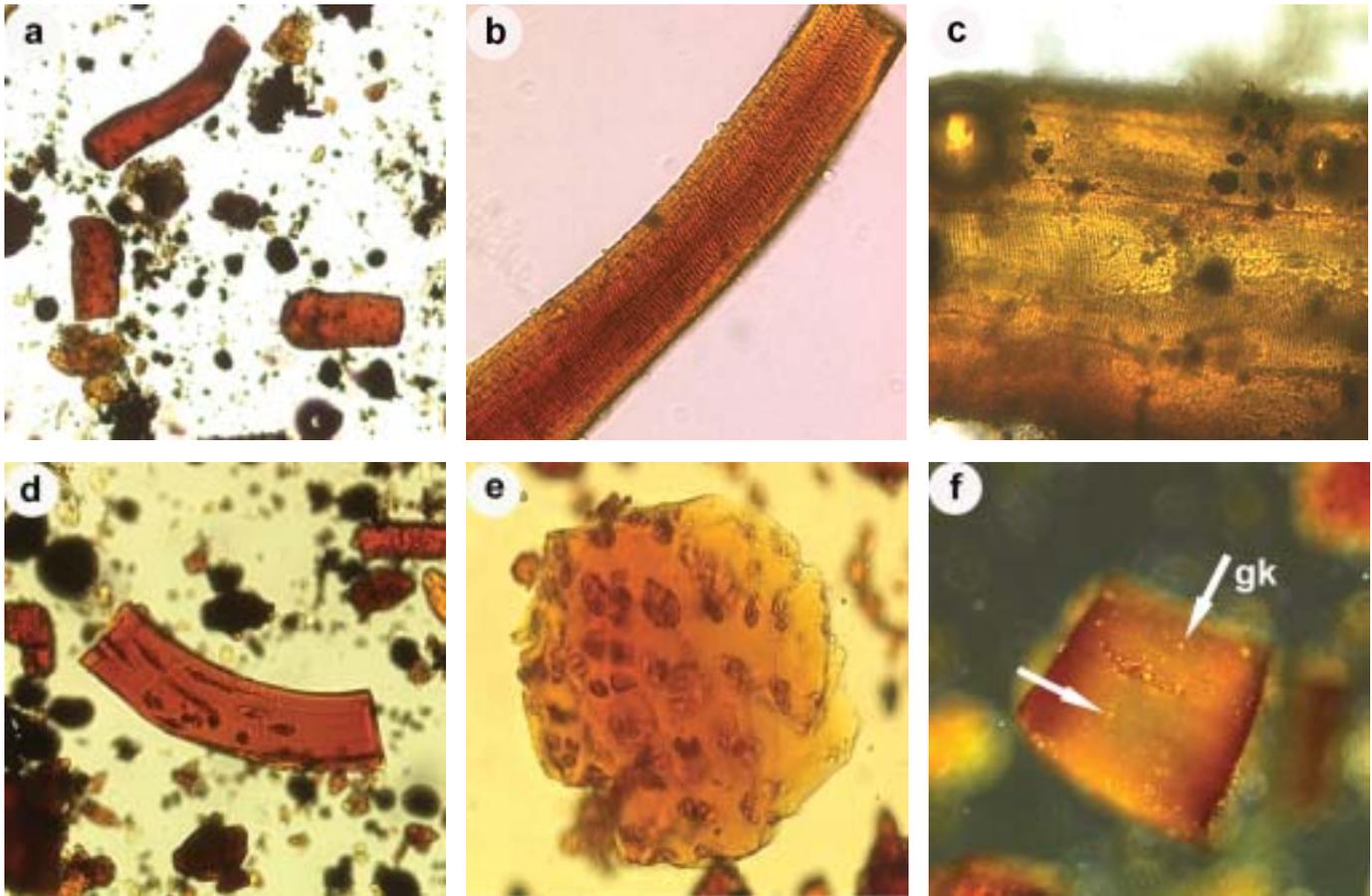


Abb. 5. Mikroskopische Bilder tierischer Produkte im Flotat. a: Drei Muskelfasern umgeben von Stärkepartikeln können bei grober Vergrößerung (40fach) beobachtet werden; b und c: Muskelfasern mit einer typischen Querstreifung (200- resp. 400fach vergr.); d: Muskelfaser ohne Querstreifung (100fach vergr.); e: Geflügelknorpelbruchstück (200fach vergr.); f: Guaninkristalle (gk) in einer Muskelfaser können in der Polarisation beobachtet werden (100fach vergr.).

Bruchstücke als Spuren von Fischmehl toleriert werden.

Wenn Knochenbruchstücke anwesend sind, wird unterschieden zwischen Fisch- und Landtierknochen. Spuren von Fischknochenbruchstücken werden geduldet. Fischmehlbeimischung ist aber im Futter für Wiederkäuer verboten. Ein Nachweis von verbotenem Landtiermehl oder ein unerklärbarer Muskelfaserbefund, auch in Spuren und unabhängig vom Futtermittel, wird beanstandet.

Die Ergebnisse der Kontrollen zeigen, dass die Vorschriften generell eingehalten werden. Die positiven Befunde, abgesehen von einzelnen seltenen Fällen, sind lediglich auf nicht beab-

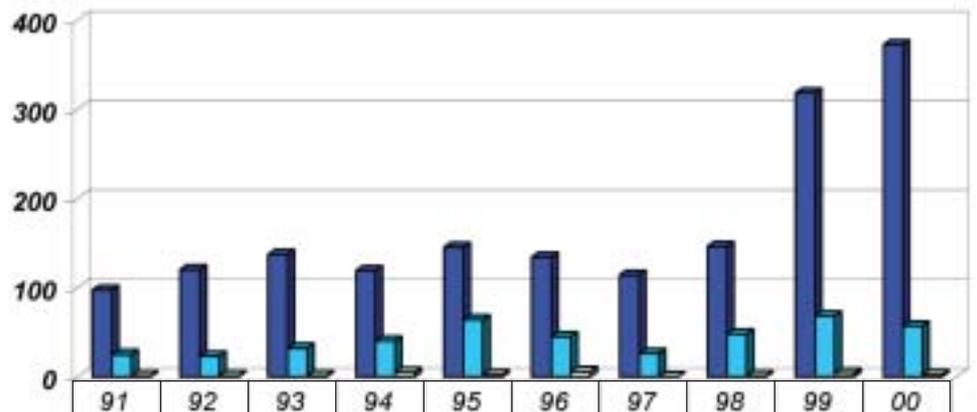
sichtigte Verschleppungen zurückzuführen. Wichtig ist abzuklären, woher die Verunreinigungen kommen können. Dies ist die Aufgabe der BSE Einheit des Bundes und in diesem Sinne werden vermehrt auch Ausgangsprodukte und Mühlenreinigungsabgänge geprüft.

Grenzen und Perspektiven

Die Grenzen der Mikroskopie sind auf zwei Ebenen zu sehen. Erstens wird das Erkennen kleinster Anteile an tierischem Gewebe ohne typische Merkmale wie erhitzte Innereien praktisch unmöglich: In Proben mit 2 % Innereien wurden in verschiedenen Labors keine typischen tierischen Bestandteile erkannt. Die PCR-Methodik, die mit DNS-

Amplifizierung arbeitet, hat in diesem Fall vielleicht die grösseren Chancen. Allerdings ist eine Kontamination durch Innereien allein eher unwahrscheinlich.

Zweitens geht die artspezifische Beurteilung bei Spurenkontamination nicht weiter als Fisch versus Landtier; ob Geflügel-, Schwein- oder Rindpartikel ist bei vereinzelt Bruchstücken nicht sicher zu beurteilen. Die aktuellen Gesetze verlangen diese Trennung zwar nicht, es könnte sich aber in Zukunft ändern. Diese verschiedenen Punkte und die wesentlichen Fortschritte in der PCR Methodik (Bellagamba *et al.* 2001) werden möglicherweise zu einer engeren Zusammenarbeit dieser zwei Analysenmethoden führen.



	91	92	93	94	95	96	97	98	99	00
■ <i>Untersuchte Proben für Wiederkäuer</i>	97	120	137	119	145	134	114	146	318	372
■ <i>Positive Befunde (Spuren Tiermehl)</i>	25	23	32	40	64	45	26	48	68	57
□ <i>Positive Befunde (Kontaminationen Tiermehl)</i>	1	1	1	5	2	6	0	1	4	2

Abb. 6. Statistik der analysierten Wiederkäuerfuttermittelproben in den Jahren 1991 bis 2000. Es wird unterschieden zwischen Spuren (< 0,1 %) und Kontaminationen (≥ 0,1 %) von Landtierknochenbruchstücken.

Tab. 1. Untersuchte Proben seit dem Fütterungsverbot von Tiermehlen an alle Nutztiere

	2001			Januar - Juli 2002		
	Anzahl Proben	Positive Befunde*		Anzahl Proben	Positive Befunde*	
		Spuren (< 0,1%)	Kontam.** (> 0,1%)		Spuren (< 0,1%)	Kontam.** (> 0,1%)
Mischfutter für						
Wiederkäuer	281	6	-	216	3	-
Schweine	173	3	2	154	1	-
Geflügel	63	3	-	67	-	2
Pferde	35	3	-	30	2	-
Kaninchen	4	-	-	8	1	-
Fische	1	-	-	5	-	-
Andere						
Einzelfutter	103	9	-	125	9	-
Fischmehle	4	-	-	1	-	-
Mineralstoffe	26	-	-	43	-	-
Vormischungen	17	-	-	5	-	-
TOTAL	707	24	2	639	16	2

* bezogen auf Landtierknochenbruchstücke

** Kontam. = Kontaminationen

Literatur

- Bellagamba F., Moretti V. M., Comincini S. and Valfrè F., 2001. Identification of species in animal feedstuffs by Polymerase Chain Reaction - Restriction fragment length polymorphism analysis of mitochondrial DNA. *J. Agric. Food Chem.* **49**, 3775-3781.
- Dahms S., Hörnlimann B. und Wilesmith J. W., 2001. Die Ursache der BSE-Epidemie. In: Prionen und Prionkrankheiten (Hrsg. B. Hörnlimann, D. Riesner und H. Kretzschmar). Walter de Gruyter, Berlin, 330-336.
- Hauswirth H., 1988. Futtermittelmikroskopie bringt die Qualität von Futtermitteln ans Tageslicht. *Landwirtschaft Schweiz* **1** (7), 419-421.
- Hofmann K., 2000. BSE-Prophylaxe durch Tiermehlkontrolle. *Fleischwirtschaft* **4**, 140-143.
- Lahiff S., Glennon M., O'Brien L., Lyng J., Smith T., Maher M. and Shilton N., 2001. Species-specific PCR for the identification of ovine, porcine and chicken species in meat and bone meal (MBM). *Molecular and Cellular Probes* **15**, 27-35.
- Michard J. et Ziebal R., 1999. Mise au point d'une méthode microscopique de détection des farines de viande, d'os et de poisson dans les aliments pour animaux. *Ann. Fals. Exp. Chim.* **92** (947), 209-223.

RÉSUMÉ

Analyse des aliments pour animaux au moyen de la microscopie

Les aliments pour animaux de rente produits ou vendus en Suisse sont régulièrement contrôlés pour en assurer la qualité. L'étude des farines animales fait partie des critères importants, particulièrement depuis l'apparition de la maladie de la vache folle (ESB). La méthode utilisée pour la détection de composants d'origine animale se base sur un fractionnement de l'échantillon (sédimentation et tamisage), suivi d'une coloration et de son observation au microscope. Les particules d'origine animale sont reconnaissables à leur couleur, leur forme et leur structure caractéristiques. Cette méthode permet la détection de traces (< 0,1%) de matériel animal ainsi que la distinction entre poissons et animaux terrestres, si des fragments d'os sont présents. Des fragments typiques d'os ou de fibres musculaires ainsi que d'autres particules de poissons et d'animaux terrestres sont alors documentés photographiquement. La mise en valeur des résultats des contrôles effectués entre 1991 et 2002 montre, dès l'année 2001, une nette diminution des cas contrôlés positifs en ce qui concerne la présence de fragments d'os d'animaux terrestres et une augmentation du nombre d'échantillons analysés.

La microscopie est actuellement la méthode la plus rapide, la plus précise et la moins coûteuse pour détecter la présence de composants d'origine animale dans les aliments pour animaux.

SUMMARY

Animal feed analysis using microscopy

Since the appearance of „mad cow disease“ (BSE), most of the animal feeds sold or produced in Switzerland are officially and systematically tested for contamination with animal by-products. The method of analysis consists in fractionating (sedimenting and sieving), followed by coloration and observation under the microscope. Particles of animal origin are recognized by their color, form and characteristic structures. This method makes it possible to detect traces (< 0,1 %) of animal compounds and to distinguish between fish and land animal matter if fragments of bones or other mineralized particles are present. Micrographs are made to demonstrate the presence of bone and muscle fiber particles as well as other typical parts of fish or other vertebrates. Results of controls from 1991 to 2002 show that the proportion of positively tested samples for fragments of land animal bones has markedly decreased; at the same time, the number of analyzed samples has increased, particularly since 2001.

At present, microscopy is the fastest, cheapest and most accurate method to analyze the presence of animal by-products in animal feeds.

Key words: animal feeds, microscopy, BSE, animal by-products, fishmeal, micrographs.