

Morphologischer und radiologischer Nachweis von Knochen- und Knorpel- partikeln in Separatorenfleisch

Morphological and radiological detection of bone and cartilage particles
in mechanically separated meat

W. BRANSCHIED, M. JUDAS und R. HÖRETH

Zusammenfassung

In Separatorenfleisch, das mit bestimmten Techniken hergestellt wurde, kann sich analytisch ein erhöhter Kalziumgehalt ergeben. Dieser steht nur indirekt für einen höheren Knochengehalt, so dass ein direkter morphologischer Knochnachweis weiterhin von Interesse ist. Speziell bei Geflügelfleisch kann zudem ein erhöhter Knorpelgehalt für Separatorenfleisch kennzeichnend sein. In der vorliegenden Studie wird der Versuch unternommen, mit Hilfe eines gleichzeitigen Knorpel- und Knochnachweises zu methodischen Vereinfachungen zu kommen. Hierzu wurde eine Färbungsmethode nach dem Prinzip der Aufhellungspräparate aufgegriffen, wie sie z. B. in teratologischen Untersuchungen von ganzen Föten eingesetzt werden. Es wurde eine Kombination von Alizarinrot und Alcianblau in Form einer Simultanfärbung ausgewählt. Die Methode wurde mit dem radiologischen Nachweis auf der Basis von Computertomographien verglichen. Als Untersuchungsmaterial diente u. a. aus Kalbsbrust gewonnenes Separatorenfleisch. Die Ergebnisse belegen, dass die Alizarinrot/Alcianblau-Methode zum gleichzeitigen Knochen- und Knorpelnachweis in Fleischgemischen geeignet ist. Sie ist einfacher als die bisher eingesetzten Methoden und repräsentativer als die histologische Untersuchung. Die Präparate lassen sich makroskopisch beurteilen und gravimetrisch auswerten. Die gravimetrische Bestimmung mit Hilfe der Sortierung der Partikel von Hand scheint zu Unterschätzungen des Gehaltes zu führen, wenn die Partikel zu fein zermahlen sind. Mit der radiologischen Methode ist ein sicherer Nachweis lediglich für Knochenpartikel möglich. Die Auflösungsgrenze des verwendeten Gerätes (0,25 mm) scheint bereits die Sicherheit der Detektion zu beeinträchtigen.

Summary

For mechanically separated meats produced with particular techniques, elevated calcium contents can be determined. These indicate elevated bone content but indirectly. Thus, a direct morphological proof of bone material remains of interest. Especially in poultry meat, also elevated cartilage content may be characteristic of mechanically separated meat. The present paper attempts to arrive at methodological simplifications through a simultaneous proof of bone and cartilage material. For this, a staining method was taken that accords to the principle of clearing preparations, as applied e. g. in teratological investigations of entire fetuses. A simultaneous staining with Alizarin Red and Alcian Blue was chosen. This method was compared to a radiological detection based on X-ray computed tomography. Matrix material was *inter alia* mechanically separated meat from breast of veal. The results show that the Alizarin Red/Alcian Blue method is suited for the simultaneous detection of bone and cartilage material in meat mixtures. It is simpler than previously applied methods, and more representative than histological investigations. The preparations can be assessed macroscopically, and they can be evaluated gravimetrically. The gravimetrical determination, by means of manual sorting of particles, appears to underestimate the content if particles are ground too finely. The radiological method safely allows the detection of bone material only. The maximum resolution of the applied device (0.25 mm) already appears to impair the safety of detection.

Schlüsselwörter Separatorenfleisch – Knorpelnachweis – Knochnachweis – Alizarinrot – Alcianblau – Röntgen-Computertomographie

Key Words mechanically separated meat – cartilage detection – bone detection – Alizarin Red – Alcian Blue – X-ray computed tomography

Einleitung

Nicht zuletzt aufgrund der unzureichenden Definition in der EU-Verordnung 853/2004 ist der Nachweis von Separatorenfleisch weiterhin eine aktuelle Fragestellung. Insbesondere wird in der Verordnung der Kalziumnachweis als Abgrenzungskriterium unterschiedlicher Separatorenfleisch-Qualitäten zugrunde gelegt. Dessen Bestimmung fußt darauf, dass in bestimmtem Separatorenfleisch der Knochengehalt und damit auch der Kalziumgehalt gegenüber Frischfleisch erhöht sind. Auf die damit zusammenhängenden methodischen Probleme wird bereits von ARNETH (1979) und jüngst von STENZEL und HILDEBRAND (2006) und HILDEBRANDT *et al.* (2006) ausführlich eingegangen. Insbesondere aus den neueren Arbeiten lässt sich schlussfolgern, dass der in der EU-VO 853/2004 vorgegebene Kalziumnachweis gerade dort versagt, wo Separatorenfleisch so vorsichtig gewonnen bzw. eingesetzt wird, dass das Produkt nur noch wenige Knochenpartikel enthält. Dieses Problem lässt sich durch den qualitativen Knochennachweis zumindest teilweise beheben. So ist mit dem Farbstoff Siriusrot und der nachfolgenden polarisationsoptischen Darstellung der selektiven Farbstoffbindung an die Kollagenfasern ein gleichsam müheloses Auffinden selbst kleinster Knochenpartikel möglich (BRANSCHEID, 2002). Hierzu ist aber die Auswertung im Polarisationsmikroskop unerlässlich. Die Färbung kann ergänzt werden, indem ein simultaner Knorpelnachweis aufgrund der selektiven Färbung mit Alcianblau vorgenommen wird.

Der für die Methode erforderliche histologische Schnitt hat jedoch mehrere Nachteile:

- Die Präparation ist technisch aufwändig.
- Die Methode bezieht sich auf einen extrem kleinen Ausschnitt einer Gesamtprobe, so dass Repräsentativität nur sehr schwer zu erzielen ist.
- Die quantitative Auswertung ist langwierig bzw. apparativ aufwändig.

In der vorliegenden Arbeit wird eine Methode vorgestellt, mit der diese Nachteile überwunden werden sollen. Um ihre Leistungsfähigkeit darstellen zu können, wurde vergleichend die Untersuchung mit einem Röntgen-Computertomographen herangezogen. Dies soll eine gleichzeitige Beurteilung der Radiologie für die entsprechenden Nachweisziele möglich machen.

Methodische Vorarbeiten

In einer vorangegangenen Untersuchung (BRANSCHEID, 2006) war eine Methode zum mikroskopischen Nachweis von Knochenpartikeln in Bodenproben erarbeitet worden. Diese Methode stützt sich auf die selektive Darstellung der Kollagenfasern im Knochengewebe mit dem Farbstoff Siriusrot. Da es für die Kollagenfasern in Bodenproben kein Pendant gibt, ist auch die Möglichkeit einer falsch positiven Färbung ausgeschlossen. Die Färbung mit Siriusrot wurde im Reagenzglas an Aufschwemmungen der Bodenproben vorgenommen, da wegen des Bestandes an unlöslichen Mineralien eine andere mikrotechnische Bearbeitung nicht möglich war. Diese Methode der Aufschwemmung lässt sich ohne weiteres auch auf Separatorenfleisch bzw. Hackfleisch übertragen, da dieses wie ein Granulat einer derartigen Aufschwemmung zugänglich ist.

Sichtet man die Methoden, die an Aufschwemmungen eingesetzt werden können, so bieten sich vor allem jene Färbungen an, die in der Teratologie zur Färbung ganzer Föten verwendet werden. Diese Färbungen werden häufig als Doppelfärbungen eingesetzt und differenzieren dann sehr scharf zwischen Knochen und Knorpel sowie dem ungefärbten Restgewebe. Sie sind färbetechnisch sehr robust, weil die Ausfärbung des Präparats bis zum Endpunkt erfolgt, die überlange Färbung aber nicht zur unspezifischen Färbung anderer Gewebekomponenten führt. Für die eigenen Untersuchungen wurde die Methode von PETERS (1977) gewählt, weil diese die Doppelfärbung mit den Farbstoffen Alizarinrot S und Alcianblau in einem Färbegrad als Simultanfärbung zusammenführt.

In einem Testlauf an einer noch unbehaarten, aber schon weitgehend ausgewachsenen Spitzmaus konnte die Einfachheit und Selektivität der Methode bestätigt werden (Abb. 1). Allerdings zeigte sich an den Gliedmaßen, die nicht ausreichend enthäutet waren, eine diffuse Blaufärbung, die zunächst als nicht ausreichende Selektivität der Alcianblau-Färbung gedeutet wurde. Von diesen Hautarealen lassen sich Stücke freipräparieren, die dann wie ein Flachschnitt der Haut ausgewertet werden können. In diesen Präparaten war festzustellen, dass die Blaufärbung den Keratohyalin-Körnchen der Zellen des *Stratum granulosum* der Epidermis zuzuordnen ist und daher durchaus als hoch selektiv anzusehen ist (Abb. 2). Der histochemische Hintergrund dieser Färbung ist unklar, da die gängige dermatologische Literatur hierauf nicht eingeht. Immerhin findet sich bei SZODORAY und NAGY-VEZEKÉNYI (1964) der Hinweis, dass die Keratohyalin-Körnchen sich in der Eisenbindungsreaktion (Ritter-Oleson) positiv anfärben, was der Färbung mit Alcianblau unter den hier gegebenen Verhältnissen direkt entsprechen würde.

Zusammengefasst ergibt sich aus diesem Färbeexperiment, dass

- die Alizarinrot-Färbung, wie zu erwarten, hoch selektiv für Knochengewebe ist,
- die Alcianblau-Färbung hoch selektiv für Knorpelgewebe sowie Keratohyalin-Körnchen der Haut ist, wobei eine Verwechslung der beiden Kompartimente dieser Färbung nicht zu erwarten ist,
- alle anderen Anteile des ausgeweideten Tierkörpers (in Entsprechung zum Schlachtkörper) ungefärbt bleiben.

Damit ist die grundsätzliche Eignung der Methode für die differenzierte und simultane Darstellung von Knorpel- und Knochengewebe in Fleischhomogenaten der unterschiedlichsten Herkunft gewährleistet.

Material und Methoden

Die morphologische Alizarinrot/Alcianblau-Methode und die Analyse mit dem Röntgen-Computertomographen wurden an zwei verschiedenen Materialien geprüft:

Separatorenfleisch aus Kalbsbrust

Das in Abbildung 3 markierte Teilstück aus der Kalbsbrust wurde mit einem Kolbenseparator separiert und nachfolgend durch einen Baader-Prozess von groben Partikeln befreit. Das so gewonnene Fleisch sollte für die Döner-Produktion geeignet sein. Es wurden insgesamt 5 Chargen beprobt. Zur Untersuchung kamen vakuumierte, tief gefrorene Probenpakete mit einem Gewicht von ca. 200 g.

Standardproben

Um Wiederfindungsraten der beiden Methoden ermitteln zu können, wurden Proben (Gewicht ca. 50 g) hergestellt, indem zu einem Schweinehack (ohne Fremdewebe) jeweils 0 % (Kontrolle), 0,5 %, 1 %, 3 % und 5 % eines Knochen- bzw. Knorpelgranulats zugegeben wurden. Die Granulate wurden aus Schweinerippen hergestellt. Dabei wurden die Knochen im letzten Schritt gekuttert, ergaben also ein relativ grobes Granulat. Die Knorpel wurden mit der Moulinex sehr fein homogenisiert.

Morphologische Färbung Alizarinrot/Alcianblau

Die Färbung wurde in folgenden Schritten durchgeführt:

- Entnahme von 2 x 6 Stenzen mit der umgedrehten Pasteur-Pipette
- Herstellung von 2 Mischproben 1 bis 6 bzw. 7 bis 12
- Daraus Auswiegen von 2,0 g
- Einbringen in Reagenzglas; Wechsel der folgenden Lösungen jeweils durch Abdekantieren nach Zentrifugation (Tischzentrifuge, 2 Min.)
- 95 % Äthanol 30 Min.
- 100 % Aceton 1 Std.
- Eventuell überstehendes Fettgewebe mit der Pinzette entfernen und werfen
- Spülen in Alkohol/Eisessig (Lösung 4) 2 x 2 Min.
- Farbgemisch Alizarinrot/Alcianblau (Lösung 3) 24 h
- 1 % KOH bei 40 °C 5 h
- Einlegen in 70 % Alkohol, in diesem Zustand unbegrenzt haltbar
- Gravimetrische Bestimmung aus dem 70%igen Alkohol: Knochen- (rot) und Knorpelpartikel (blau) von Hand grob auf Filterpapier aussortieren, wiegen, gefärbte

Partikel sorgfältig isolieren und entfernen, Ungefärbtes bleibt auf dem Filterpapier; Rückwaage

- Einbringen der isolierten Partikel in hochprozentiges Glycerin zur Dokumentation bzw. Mikroskopie

Farbstoffe und Lösungen:

- Lösung 1 (*Alizarinrot*):
0,1 g Alizarinrot S (C.I. 58005, Chroma) in 100 ml 95%igem Äthanol
- Lösung 2 (*Alcianblau*):
0,3 g Alcianblau 8GS (C.I. 74240, Serva) in 100 ml 70%igem Äthanol
- Lösung 3 (*Färbepad Alizarinrot/ Alcianblau*):
[10 ml Lösung 1] + [10 ml Lösung 2] + [10 ml Eisessig] + [170 ml 70%iges Äthanol]
- Lösung 4 (Alkohol/Eisessig):
[100 ml 70%iges Äthanol] + [5 ml Eisessig]

Röntgen-Computertomographie (CT)

Die Röntgen-Computertomographie erzeugt virtuelle Schnittbilder durch ein Untersuchungsobjekt (KALENDER, 2006), in diesem Falle durch Hackfleisch-Proben. Die erzeugten Bilder haben eine Auflösung von 512x512 Pixeln, die absolute Größe der Pixel ist damit von der Größe des quadratischen Bildrahmens (Field of View) abhängig. Zusätzlich hat jedes Bild eine Schichtdicke, so dass jedes Pixel tatsächlich ein Volumenelement darstellt (Voxel). In dieser Untersuchung wurden Voxel von 0,25x0,25x0,5 mm³ erzeugt. Jedes Bild-Voxel wird mit einem Grauton dargestellt, der die berechnete Röntgen-Abschwächung eben dieses Voxels wiedergibt. Die Röntgen-Abschwächung ist abhängig von der Dichte des durchstrahlten Gewebes und wird in Hounsfield Units (HU) gemessen: Luft hat -1000 HU, Wasser 0 HU, Knochen mehrere hundert HU. Für biologisches Gewebe lässt sich aus dem HU-Wert eines Voxels sein Gewicht bestimmen.

Die CT-Untersuchungen erfolgten mit einem *Siemens Somatom Plus 4*. Für die Aufnahmen wurden folgende Einstellungen verwendet:

- Röhrenspannung 140 kV
- Röhrenstrom 146 mA
- Rotationszeit 1,5 s (Pitch = 1)

- Schichtdicke 1 mm
(Rekonstruktion = 0,5 mm)
- Field of View 128 mm
(Pixelauflösung = 0,25 mm)

Von den Chargen des Separatorenfleisches wurden jeweils 3 cm breite Streifen gescannt, was 60 Schnittbilder à 0,5 mm ergab. Diese Probengröße erscheint für eine quantitative Auswertung ausreichend; auf ein vollständiges Scannen der Chargen wurde verzichtet, um die Röhrenbelastung zu minimieren. Die wesentlich kleineren Standardproben wurden vollständig gescannt. Die Analyse der CT-Messungen erfolgte durch eine Interpretation der HU-Spektren (Voxel-Anzahl pro HU-Wert).

Ergebnisse

Separatorenfleisch aus Kalbsbrust

Mit der morphologischen Methode stellen sich Knorpel und Knochen als leuchtend gefärbte Partikel im übrigen, ungefärbten Gewebe dar (Abb. 4). Diese Partikel lassen sich zur Dokumentation in Glycerin auf Objektträger montieren (Abb. 5a) und in Zweifelsfällen mikroskopieren (Abb. 5b). Es wurden mit der Methode in den 5 Chargen sehr unterschiedlich hohe Gehalte an Knorpel- und Knochengewebe gefunden (Tab. 1 und 2). Dabei hielten sich die Gehalte des Knochengewebes trotz der Schwankungen stets im Bereich unter 1 %. Für das Knorpelgewebe ergab sich in einer Probe der überraschend hohe Gehalt von 6 %.

Die CT-Messungen wurden spektralanalytisch ausgewertet. Da bisher keine Kalibrierungen für die Abgrenzung von Knorpel- und Knochenpartikeln existierten, wurden die Grenzwerte aus den HU-Spektren empirisch durch einen Vergleich mit Referenzproben zugeordnet (Abb. 6). Die Ergebnisse (Tab. 1 und 2) zeigen, dass mit diesem Verfahren der Partikelanteil ganz offensichtlich unterschätzt wird. Die CT ermittelt um eine 10er-Potenz niedrigere Gehalte als die gravimetrische Methode. Immerhin spiegelt die CT bei den Knorpelproben den Anstieg von sehr niedrigen zu sehr hohen Gehalten wider.

Standardproben

Mit der morphologischen Methode wurden 60-140 % der Standards wiedergefunden (Abb. 7, 8). Die Überschätzungen treten ausschließlich bei den niedrigen Gehalten (1 % und darunter) auf. Die Differenzen zwischen den Wiederholungen sind beim Knochen größer als beim Knorpel.

Mit der CT konnte nur für die Knochenpartikel eine Kalibrierung auf Basis der Grauwertspektren berechnet werden (Abb. 9). Bei den Knorpelpartikeln war die Abgrenzung zwischen partikelfreiem Hack und dem Knorpelgewebe nicht abzusichern (Abb. 10). Die Kalibrierung für die Knochenpartikel am vorliegenden Material führte naturgemäß zu einer vollständigen Übereinstimmung der Schätzung mit den vorgegebenen Standardwerten der Knochengehalte (Abb. 7). Die ermittelte Grenze für Knochengewebe (280 HU) weicht stark von der empirisch ermittelten Grenze (200 HU) ab (vgl. Abb. 6).

Diskussion

Die in der vorliegenden Studie vorgestellte Methode zum simultanen Nachweis von Knochen- und Knorpelpartikeln ist für die Untersuchung unterschiedlicher Fleischhomogenate (Hackfleisch, Brät) geeignet. Sie kann vor allem zur Untersuchung bei Verdachtsfällen von nicht ausreichend deklariertem Separatorenfleisch (Rohware) eingesetzt werden. Auch an erhitzten Fleischwaren wäre die Methode einsetzbar (Ergebnisse nicht dargestellt). Die Untersuchung der Endprodukte hat jedoch nur begrenzt Sinn, weil der Anteil von Separatorenfleisch in Wurstbrät gezielt gesteuert werden kann, der Nachweis in der Regel daher kaum möglich ist (STENZEL und HILDEBRANDT, 2006).

Die eigene Methode hat prinzipielle Ähnlichkeit mit dem von SOMMER und MÜLDER (1975) und NEGATU *et al.* (2006) vorgeschlagenen Vorgehen. Bei diesen werden aber die gesuchten Knochenteilchen nicht visuell, sondern durch enzymatische Digestion vom Binde- und Muskelgewebe getrennt und nachfolgend mit einer Kalziumanalyse (SOMMER und MÜLDER, 1975)

oder wie bei uns einfach durch Auswägung der Partikel (NEGATU *et al.*, 2006) quantitativ bestimmt. Nachteil dieser Methoden ist jedoch, dass Knorpelpartikel nicht mit erfasst bzw. abgegrenzt werden können. Diese sind aber u. a. bei Separatorenfleisch aus Geflügel diagnostisch bedeutsam (HILDEBRANDT *et al.*, 2006).

An den Standardproben zeigte sich für die morphologische Methode namentlich bei Gehalten über 1 % für die Partikelbestimmung eine relativ niedrige Wiederfindungsrate von im Einzelfall ca. 60 %. Möglicherweise ist die Feinheit der Körnung für die teilweise geringe Wiederfindung verantwortlich. Wir gehen davon aus, dass zumindest ein Teil des Knorpelmaterials in der Moulinex so fein gemahlen worden war, dass es für die Färbung und vor allem die gravimetrische Auswertung nicht mehr vollständig verfügbar war. Andererseits geben die morphologischen Befunde teilweise sogar Anlass zu der Annahme, dass die Knorpelbestimmung bei gekuttertem Material zu einer Überschätzung führen kann: Im Einzelfall wurden randständig blaufärbte Partikel gefunden, die neben dem Knorpelgewebe zu einem größeren Anteil aus straffem Bindegewebe bestanden (Abb. 5).

Die Ergebnisse der CT-Analysen weisen aus, dass der Knorpelnachweis mit der radiologischen Methode nicht ausreichend sicher möglich ist. Obwohl dieses Gewebe strukturell sehr dicht ist, ist es hinsichtlich seiner Röntgendichte nicht deutlich genug von Muskulatur abzugrenzen (vgl. Abb. 10). Die Ermittlung von Knochenpartikeln ist prinzipiell möglich, stößt aber an die Grenze der Auflösung des jeweiligen Röntgengerätes. Partikel, die kleiner als 0,25 mm in der Dicke und 0,5 mm in der Tiefe sind, werden mit dem verwendeten CT nur unsicher erfasst. Ein Grund für diese Unsicherheit ist das Vorkommen „gemischter“ Voxel, das umso mehr zu einer Unterschätzung der Knochenpartikel führen kann, je kleiner die gesuchten Partikel sind. Diese Materialverluste könnten geeignet sein, die Dimensionsverschiebung der CT-Schätzung im Vergleich zu den morphologisch erhobenen Werten teilweise zu erklären.

Neben einer Unterschätzung können gemischte Voxel auch zu einer Überschätzung von Knochenpartikeln führen (Abb. 11). Eine Unterschätzung tritt vor allem auf, wenn relativ leichte Partikel (Knorpel) Grenzflächen zu leichterem Material, z. B. Hackfleisch, haben, oder wenn schwerere Knochenpartikel Grenzflächen zu sehr leichtem Material haben, im Extremfall zu Luft. Im Beispiel (Abb. 11, links) hat ein gemischtes Voxel aus Knochen und Luft einen rechnerischen HU-Wert von -300, welcher keine Zuordnung zur Knochenfraktion erlaubt. An Grenzflächen zu Material wie Hackfleisch kommt es zu einer anderen Interpretation: rechnerisch ergibt sich ein relativ hoher HU-Wert, der nur bei Knochen auftritt (Abb. 11, rechts), der damit aber den Hack-Anteil dieser gemischten Voxel als Knochen fehlinterpretiert. Dies ist die Erklärung dafür, dass für Knochengranulat ein höherer Grenzwert als empirisch ermittelt festgelegt werden musste (vgl. Abb. 9 vs. Abb. 6): Knochen mit 200-280 HU, der nicht gewertet wird, kompensiert für fehlklassifiziertes Hack in gemischten Voxeln >280 HU.

Die Untersuchung macht deutlich, dass die Leistungsfähigkeit der Methoden sehr unterschiedlich ist (Tab. 3). So ist es bei der Untersuchung mit dem CT zwar möglich, sehr große Proben als ganzes auszuwerten und dabei auch mit geringstem Arbeitsaufwand zu quantifizieren, jedoch werden kleinere Knochenpartikel nicht sicher detektiert. Die Erfassung von Knorpelpartikeln ist zudem generell nicht ausreichend zuverlässig. Die von uns vorgeschlagene Alizarinrot/Alcianblau-Färbung hat demgegenüber entscheidende Vorteile. Insbesondere die leichte Durchführbarkeit und die gute Quantifizierbarkeit sind wesentliche Argumente. Auch die Größe der Probe, die letztlich mit der Methode untersucht wird, lässt eine gute Repräsentativität für das Gesamtmaterial erwarten. Von uns wurden 2 g aus der angelieferten Probe von 200 g gefärbt und ausgewertet, die Färbung wäre aber auch mit weitaus größeren Materialmengen durchführbar, sofern die Wiederholungen zu stark voneinander abweichen. Da dies am vorliegenden Material vor allem beim Knorpel der Fall war, könnte es sinnvoll

sein, die Färbung an größeren Proben durchzuführen. Lediglich die Auswertung würde dann einen größeren Zeitaufwand erfordern. Ein entscheidender Vorteil ist weiter, dass die gesuchten Partikel in den Farben Rot/Blau leicht gegeneinander und gegen das übrige ungefärbte Gewebe abgegrenzt werden können. Selbst sehr kleine Partikel lassen sich mit dem bloßen Auge erkennen. Die hohe Selektivität beider Färbungen für ihr jeweiliges Zielgewebe ist unter den gegebenen Verhältnissen des Färbebades gesichert.

Auch die histologische Methode eignet sich zur sicheren Auffindung von Knochen- und Knorpelpartikeln. Insbesondere mit der Siriusrotfärbung und nachfolgender polarisationsoptischer Auswertung (BRANSCHIED, 2002) lassen sich feinste Knochenstäube bis hinunter zu Durchmessern von <5 μm mühelos auffinden. Vorteil dieser Methode ist übrigens, dass sie auf dem Nachweis dicht gepackter Kollagenfasern beruht und somit an entkalkten Proben durchgeführt werden kann. Dies erleichtert die Schnitt-Technik. Die extrem hohe Sensibilität der Methode ist allerdings zur Diagnostik von Separatorenfleisch in der Regel gar nicht erwünscht, so dass hier die Nachteile mit geringer Repräsentativität der untersuchten Probenmengen und dem sehr hohen Arbeitsaufwand stärker zum Tragen kommen. Daher bleibt der Einsatz selbst dieser attraktiven Methode auf spezielle Fragestellungen beschränkt.

Zusammengefasst haben die Untersuchungen ergeben:

- Der vorgeschlagene simultane Knochen/Knorpel-Nachweis mit Alizarinrot/Alcianblau ist leicht durchführbar und stellt eine methodische Verbesserung der bisherigen Methoden dar. Er gelingt an frischen Fleischgemengen, aber auch an erhitzten Wurstwaren. Die Präparate lassen sich makroskopisch auswerten und durch die gravimetrische Bestimmung der Partikel ergänzen. Der zeitliche und apparative Aufwand sind gering. Die Methode ist als Ersatz der histologischen Untersuchung zu empfehlen, die mikroskopische Auswertung der Partikel ist

aber bei zweifelhaften Ergebnissen möglich. Eine Verbesserung der Wiederfindungsraten ist anzustreben. Sie könnte durch Auswertung unter der Stereolupe erreicht werden.

- Die Auswertung mit dem Röntgen-CT zeigt, dass hiermit nur die Bestimmung von Knochenpartikeln möglich ist. Die Auflösungsgrenze des verwendeten Gerätes (0,25 mm Dicke der Partikel) scheint aber bereits die Sicherheit der Detektion zu beeinträchtigen. Beim Einsatz von Röntgengeräten sollten also wesentlich höhere Auflösungen angestrebt werden.

Technische Mitarbeit: Monika Korpilla und Anneliese Bittermann

Literatur

- ARNETH, W. (1979): Analytische Gesichtspunkte der Trennung von Fleisch und Knochen. *Deutsche Lebensmittel-Rundschau* 75, 379-389
- BRANSCHIED, W. (2002): Polarisationsoptischer Nachweis von Knochenpartikeln in Separatorenfleisch. *Fleischwirtschaft* 82 (7), 92-95
- BRANSCHIED, W. (2006): Nachweis von Knochen in Ackerböden nach Düngung mit Tiermehl. *Fleischwirtschaft* 86 (11), 118-120
- HILDEBRAND, G., K. RAUCHER und W.-R. STENZEL (2006): Analysenmerkmale zum Nachweis von Separatorenfleisch. 2. Mikroskopische Untersuchung. *Fleischwirtschaft* 86 (6), 111-114
- KALENDER, W.A. (2006): Computertomographie. 2. Aufl. Erlangen: Publicis Corporate Publishing
- NEGATU, Z., J.I. McNITT und K.W. McMILLIN (2006): Determination of small bone fragments in mechanically separated rabbit meat. *Journal of Muscle Foods* 17, 185-197
- PETERS, P.W.J. (1977): Double staining of fetal skeletons for cartilage and bone. In: *Methods in prenatal toxicology*. Ed.: D. Neubert et al.; Stuttgart: Georg Thieme Publ., p. 153-154
- SOMMER, H. und U. MÜLDER (1975): Eine Methode zur Bestimmung von Knochenteilchen in Wursterzeugnissen aus Separatorfleisch. *Fleischwirtschaft* 55, 1730-1732
- SZODORAY, L. und C. NAGY-VEZEKÉNYI (1964): Histochemical studies of keratohyalin in human epidermis. *J. Invest. Dermatol.* 42, 157-159
- STENZEL, W.-R. und G. HILDEBRAND (2006). Analysenmerkmale zum Nachweis von Separatorenfleisch. 1. Ergebnisse einer Datenerhebung zum Calcium-Gehalt von Hackfleisch. *Fleischwirtschaft* 86 (5), 96-98



Abb. 1: Spitzmaus (unbehaart). Das Präparat zeigt die distinkte Färbung der Knochen und Knorpel (Rippenknorpel, Wachstumsfugen in den Röhrenknochen und Schwanzwirbeln). An der mit Pfeil markierten Stelle ist die scheinbar diffuse Färbung der an der Gliedmaße verbliebenen Haut erkennbar

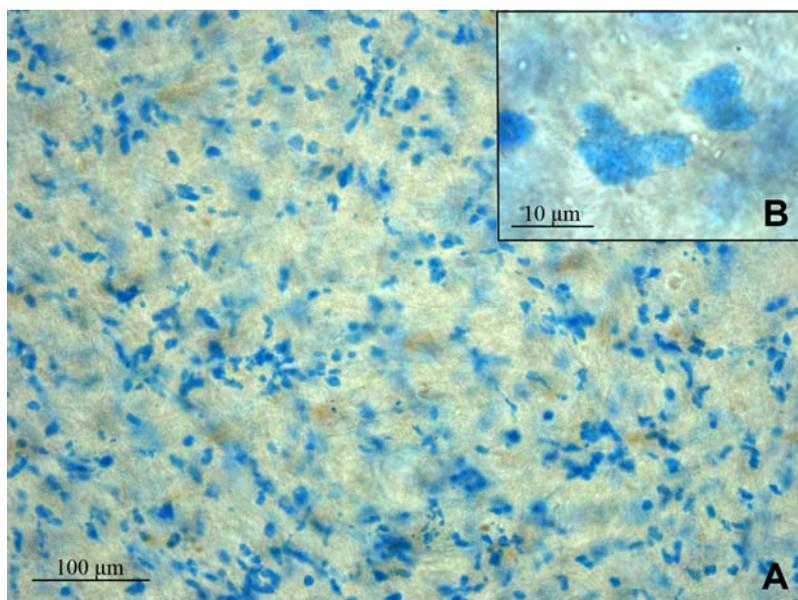


Abb. 2: Aufsicht auf die abpräparierte Haut aus Abb. 1. A: Zahlreiche, in der Blaufärbung gut abgegrenzte Zellen der oberen Epidermis sind erkennbar. Die diffus bräunlichen Areale entsprechen Melanozyten, die ca. 5 Zellschichten unterhalb der Sichtebeine liegen. B: Bei stärkerer Vergrößerung wird deutlich, dass die Blaufärbung in kleinen Granula konzentriert ist



Abb. 3: Aus dem markierten oberen und linken Anteil der Kalbsbrust wurde das untersuchte Separatorenfleisch gewonnen



Abb. 4: Präparat nach Alizarinrot/Alcianblau-Färbung in 70%igem Alkohol. Neben den größeren Partikeln finden sich zahlreiche staubartige Partikel, die nur mikroskopisch auszuwerten wären

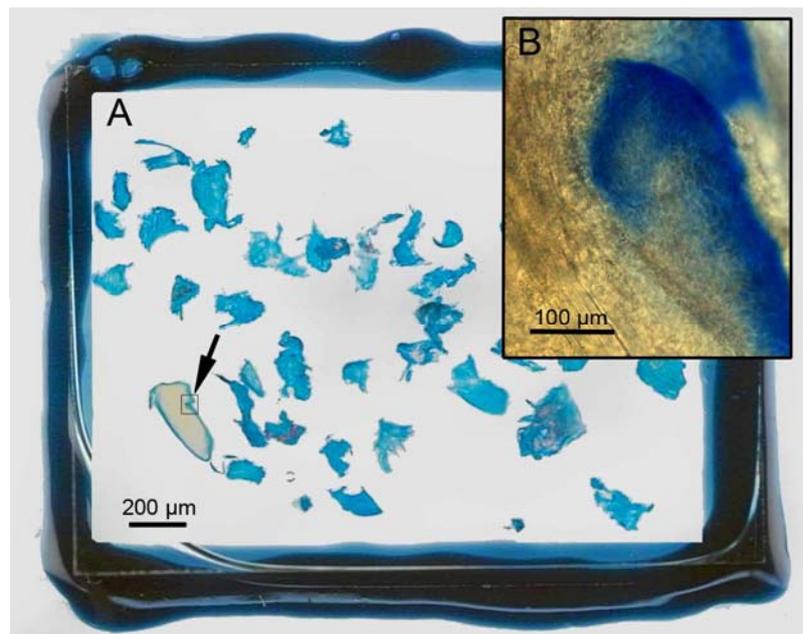


Abb. 5: Dokumentation von Knorpelpartikeln nach der gravimetrischen Erfassung (Eindecken in Glycerin). A: Übersicht. B: Detail einer Partikel mit randständiger Blaufärbung und zentral ungefärbtem Bereich (Markierung in A); die Blaufärbung weist den Knorpel aus, zentral befindet sich straffes Sehngewebe

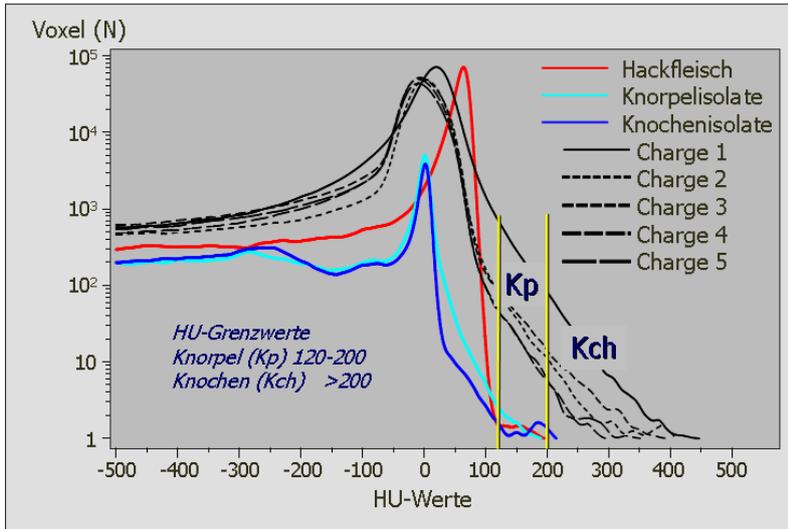


Abb. 6: Röntgenspektren von handelsüblichem Hackfleisch und von Separatorenfleisch (Kalbsbrust) aus 5 verschiedenen Chargen. Zusätzlich wurden Spektren von Knorpel (Kp) und Knochenisolaten (Kch) aus der morphologischen Untersuchung aufgenommen. Aufgrund der Spektren der Knorpel- und Knochenisolaten kann für beide Gewebetypen empirisch ein plausibler Grenzwert festgelegt werden

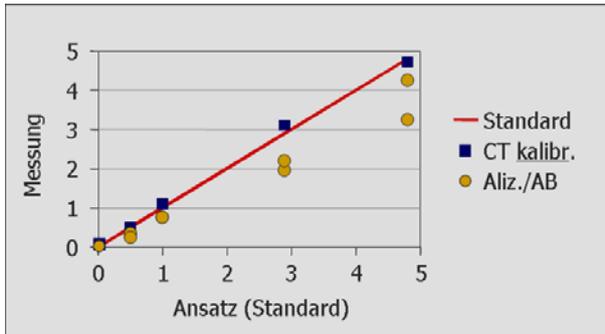


Abb. 7: Knochennachweis an Standardproben (Anteil Knochenpartikel in %)

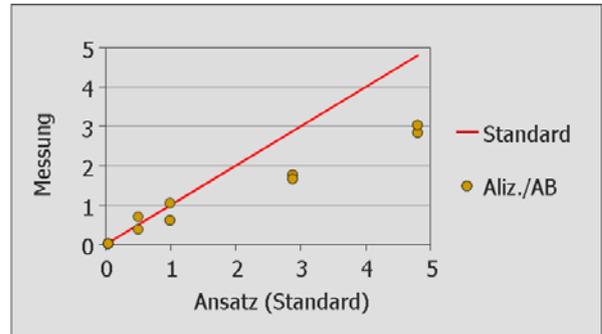


Abb. 8: Knorpelnachweis an Standardproben (Anteil Knorpelpartikel in %)

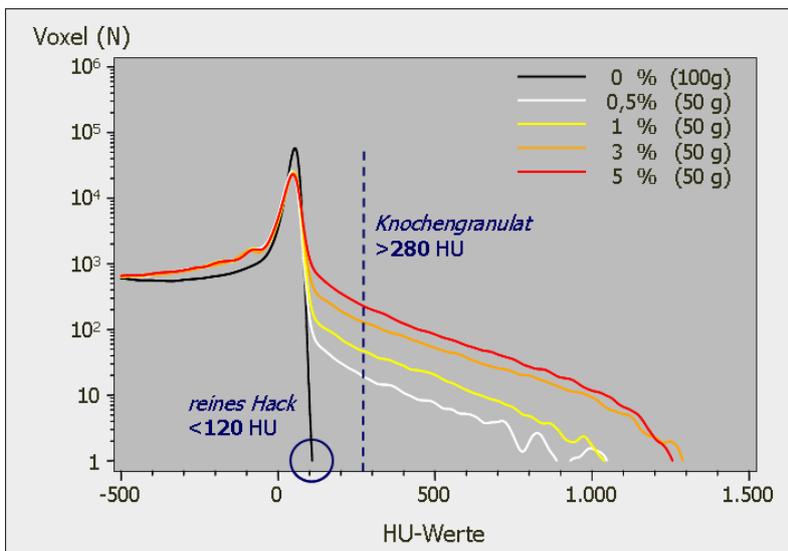


Abb. 9: Röntgenspektren von handelsüblichem Hackfleisch und von Hackfleisch mit standardisiert zugesetztem Knochengranulat. Die unterschiedlichen Gehalte an Knochengranulat werden durch gut abgegrenzte Spektrellinien repräsentiert. Hieraus ist die Berechnung einer Kalibrierung für die Ermittlung des Knochenanteils mit dem CT möglich. Zur Abgrenzung des Knochens ergibt sich hier ein Grenzwert von 280 HU

Abb. 10: Röntgenspektren von handelsüblichem Hackfleisch und von Knorpel- und Knochengranulat in vakuumierter Packung. Selbst in dieser verdichteten Form unterscheidet sich das Spektrum des Knorpels nicht hinreichend von dem des Hackfleischs. Der Knochen dagegen weist ein gut abgrenzbares Spektrum auf

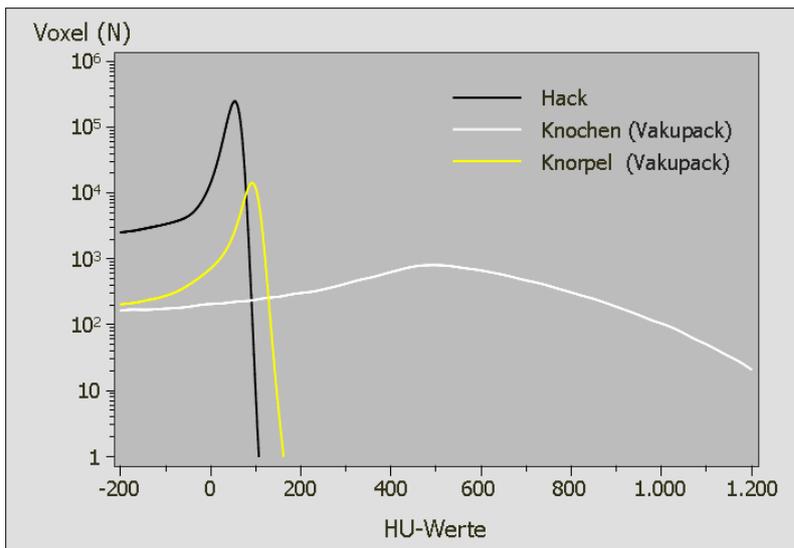
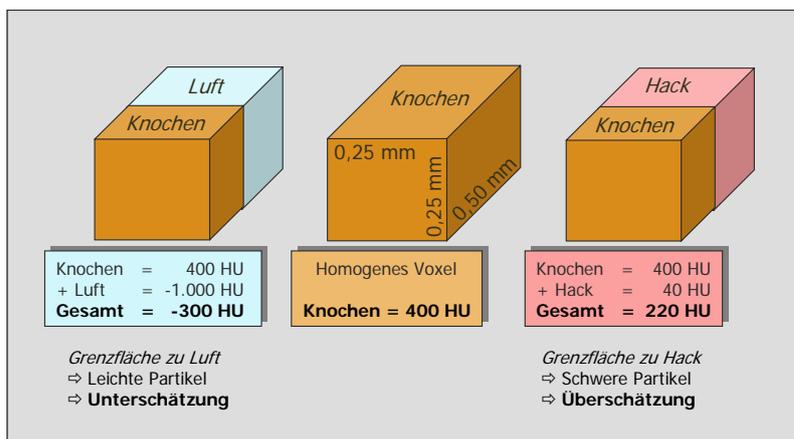


Abb. 11: Gemischte Voxel als Ursache für Unter- und Überschätzungen in der CT-Analyse



Tab. 1: Detektion der Knochenpartikel in Separatorenfleisch aus Kalbsbrust mit dem Röntgen-Computertomographen (CT) und der Alizarinrot/Alcianblau-Färbung (Gewichtsanteil in %)

Probe	CT	AzR/AcB	CT (% v. AzR/AcB)
Probe 1	0,08	0,4	18
Probe 2	0,02	0,6	3
Probe 3	0,02	0,6	4
Probe 4	0,01	0,3	3
Probe 5	0,01	0,6	1
Vergleichsprobe ¹	(0,0003)	0	-

¹ Hack, handelsüblich

Tab. 2: Detektion der Knorpelpartikel in Separatorenfleisch aus Kalbsbrust mit dem Röntgen-Computertomographen (CT) und der Alizarinrot/Alcianblau-Färbung (Gewichtsanteil in %)

Probe	CT	AzR/AcB	CT (% v. AzR/AcB)
Probe 1	0,48	6,4	8
Probe 2	0,09	3,2	3
Probe 3	0,09	0,9	7
Probe 4	0,05	1,1	5
Probe 5	0,06	1,7	4
Vergleichsprobe ¹	(0,004)	0	-

¹ Hack, handelsüblich

Tab. 3: Leistungsfähigkeit der beiden geprüften Methoden sowie der Histologie

	CT-Messung	AzR/AcB	Histologie
Probengröße	+ kg-Bereich	± repräsentativ	-- extrem klein
Objektivierbarkeit	- Kalibrierung notwendig	+ eindeutig	+ eindeutig
Abgrenzung Knorpel/Knochen	-- Knorpel unsicher - Knochen je nach Größe	+ eindeutig	+ eindeutig
Quant. Bestimmung	+ möglich (?)	++ leicht	- aufwändig
Arbeitsaufwand	+ gering	± mittel	-- sehr hoch
Apparativer Aufwand	-- sehr hoch	+ gering	- hoch