

Immunochemische Detektion von ZNS in Fleischerzeugnissen über den Nachweis von Myelin Proteolipid Protein (PLP)

Immunochemical detection of CNS in meat products using
Myelin Proteolipid Protein (PLP) as marker

A. HAMMON und M. GAREIS

Zusammenfassung

Als Hauptinfektionsquelle von BSE (Bovine Spongiforme Encephalopathie) werden Gewebe des zentralen Nervensystems (ZNS) angesehen. Mit hoher Wahrscheinlichkeit besteht ein kausaler Zusammenhang zwischen dem Auftreten der neuen Variante der Creutzfeldt-Jakob-Krankheit (vCJD) des Menschen und dem Verzehr von Lebensmitteln, die von BSE-infizierten Rindern stammen. Der Ausschluss infektiöser Gewebe aus der Nahrungskette gilt daher als eine der wichtigsten Maßnahmen zur Erhöhung des Verbraucherschutzes.

Myelin Proteolipid Protein (PLP) stellt ein geeignetes Markerprotein für den Nachweis von zentralem Nervengewebe in Fleischerzeugnissen dar. Mittels eines neu entwickelten Western Blot Assay, der auf dem Nachweis von PLP basiert, wurden 152 Fleischerzeugnisse aus lokalen Metzgereien und Supermärkten auf das Vorkommen von ZNS-Gewebe analysiert. Zu Vergleichszwecken wurden positiv getestete Proben zusätzlich mit einem kommerziell erhältlichen Enzymimmunoassay untersucht. Der Nachweis von ZNS-Gewebe erfolgt hierbei über die Detektion von saurem Gliafaserprotein (GFAP).

Unter Verwendung des PLP-Assay war es möglich, in Referenzwurstsorten Gehalte von $\geq 0,1$ % ZNS Gewebe (Brüh-/Rohwurst) bzw. $\geq 0,2$ (Kochwurst) nachzuweisen. Die Negativkontrollen (Proben mit 0 % ZNS-Zusatz) wurden im PLP-Assay korrekt bestimmt. Zudem wurden keine falsch positiven Ergebnisse erzielt. In 9,9 % der Handelsproben (15; n=152) wurde ZNS-Gewebe über den Nachweis von PLP detektiert. Die parallele Analyse der positiv getesteten Proben im GFAP-ELISA bestätigte die Ergebnisse in 5 Fällen. Dies dokumentiert, dass ZNS-Kontaminationen in Fleischerzeugnissen nicht ausgeschlossen werden können.

Die Ergebnisse der Studie zeigen darüber hinaus, dass das neue Testverfahren sehr gut für die empfindliche Analyse von ZNS-Material in Wurstwaren geeignet ist. Somit bietet der PLP-Assay eine geeignete diagnostische Methode für die Lebensmittelkontrolle zur Überwachung der Einhaltung einschlägiger Rechtsvorschriften sowie für den Handel zur Durchführung von Qualitätssicherungsmaßnahmen.

Schlüsselwörter Zentrales Nervensystem (ZNS) – Myelin Proteolipidprotein (PLP) – Western Blot – Fleischerzeugnisse

Key Words central nervous system (CNS) – myeline proteolipid protein (PLP) – western blotting – meat products

Summary

The main infectivity of BSE (bovine spongiform encephalopathy) is located in central nervous tissues of infected animals. Up to now, there is strong epidemiological evidence linking the transmission of BSE and the new variant creutzfeldt jakob disease (vCJD) of humans to the ingestion of infectious materials from BSE-affected cattle. As a consequence, the removal and destruction of CNS tissues are considered as the most efficient measure for preventing contamination of the food chain with BSE agents.

Myelin Proteolipid Protein (PLP) provides a suitable markerprotein for the detection of central nervous tissues in meat products. In this regard, a total of 152 different meat products (emulsion-type sausages, cooked sausages, fermented raw sausages) originating from local butchers shops and supermarkets were analysed for the presence of tissues from the central

nervous system (CNS) by a newly developed Western blot assay using PLP as a specific marker. Samples tested positive were analysed in parallel with a commercialized ELISA kit based on the detection of glial fibrillary acidic protein (GFAP).

The PLP Western blot assay allowed the detection of CNS in reference sausages spiked with bovine spinal cord in concentrations as low as 0.1 % (fermented raw and emulsion-type sausages) and 0.2 % (cooked liver sausages). The absence of CNS tissues in control samples was correctly determined and no false-positives PLP-signals were observed. Analysing retail meat products by PLP-Assay, 9.9 % of the samples (15 out of 152) showed positive PLP responses. The positive findings were confirmed in five cases by application of the GFAP-ELISA. This documents that CNS-contaminations of retail meat products still occur. Overall, the PLP assay was confirmed to be a highly sensitive method for the detection of CNS in both heat-treated and raw fermented sausages. Thus, it offers an adequate analytical tool for regulatory agencies to clear up illegal practices and likewise for companies controlling themselves to improve quality criteria.

Einleitung

Als wichtigster Übertragungsweg der neuen Variante der Creutzfeldt-Jakob-Krankheit (vCJD) des Menschen gilt die perorale Aufnahme infektiösen Gewebes von BSE-Rindern. Da Gewebe des zentralen Nervensystems potentiell das größte Risiko aufweisen den Infektionserreger zu tragen, stellt der Ausschluss dieser Gewebe aus der Nahrungskette von Mensch und Tier eine der wichtigsten Maßnahmen zur Prophylaxe von BSE und der neuen Variante der CJD dar.

Um das humane Expositionsrisiko gegenüber dem BSE-Erreger zu minimieren, hat die Europäische Union in der Verordnung EG Nr. 999/2001 vom 22. Mai 2001 ein Verbot der Verwendung von ZNS aus Rind, Schaf und Ziege als Bestandteil spezifizierten Risikomaterials (SRM) von Tieren über 12 Monaten erlassen. In Deutschland sehen die Leitsätze für Fleisch und Fleischerzeugnisse des Deutschen Lebensmittelbuches eine Verwendung von Hirn und Rückenmark in Fleischerzeugnissen generell nicht mehr vor. Das heißt, die Leitsätze differenzieren weder die Spezies noch das Alter des Tieres, von dem das ZNS-Gewebe stammt.

Als Konsequenz bedarf es geeigneter diagnostischer Verfahren zum Nachweis zentralen Nervengewebes in Lebensmitteln. Derartige Methoden sind von großer Bedeutung für die Lebensmittelkontrolle zur Überwachung der Einhaltung

einschlägiger Rechtsvorschriften sowie für den Handel zur Durchführung von Qualitätssicherungsmaßnahmen.

Mehrere Nachweisverfahren wurden bislang in der Literatur beschrieben. Zu den derzeit bedeutendsten Verfahren zählen die immunchemischen Verfahren wie ELISA und Western Blot. Ein bereits als Testkit kommerziell erhältlicher ELISA verwendet das saure Gliafaserprotein (GFAP) als ZNS spezifisches Markerprotein (Ridascreen Risk material®, R-Biopharm AG, Darmstadt, Deutschland). Ein anderer kommerzieller Test detektiert ZNS-Gewebe über die Neuronenspezifische Enolase (NSE) im Western Blot Verfahren (Brainostic™, Giessen, Deutschland).

Kürzlich wurde Myelin Proteolipid Protein (PLP) als neues Markerprotein zum Nachweis von zentralem Nervengewebe identifiziert (3). PLP ist als eines der Hauptproteine des Myelins im zentralen Nervensystem maßgeblich am Aufbau der Myelinscheide beteiligt. Es wird hoch spezifisch im Gehirn und Rückenmark von Menschen und Säugetieren exprimiert. Zudem weist dieses Protein eine hohe Hitzebeständigkeit auf. PLP, das zur Gruppe der Proteolipide zählt, erinnert in seinen chemischen und physikalischen Eigenschaften eher an ein Lipid. So ist PLP aufgrund seiner Hydrophobizität im Gegensatz zu anderen Proteinen sehr gut für eine Extraktion in organischen Lösungsmitteln geeignet.

Im Rahmen eines Verbundprojekts der Institute für Lebensmittelchemie und Biochemie der Universität Erlangen sowie des Institutes für Mikrobiologie und Toxikologie der BfEL Kulmbach wurde ein alternatives Verfahren zum Nachweis zentralen Nervengewebes in Fleisch und Fleischerezeugnissen entwickelt, das auf der Detektion von PLP basiert (3). In der vorliegenden Studie sollte das Testverfahren durch die Analyse von Einzelhandelsproben auf seine Praxis-tauglichkeit untersucht werden.

Material und Methodik

Handelsproben

Insgesamt wurden 152 Fleischerzeugnisse aus lokalen Metzgereien und Supermärkten auf einen eventuellen ZNS-Zusatz analysiert: 52 Kochwürste, 51 Brühwürste sowie 49 Rohwürste (Tab. 1).

Referenzmaterial

Wurstproben mit definierten Mengen an bovinem Rückenmark (0 %, 0,1 %, 0,2 %, 0,5 %, 2 % und 10 %) wurden als Standards zur Bestimmung der Sensitivität des PLP-Assays verwendet und als interne Kontrollen: „Teewurst“ (Rohwurst), „Lyoner“ (Brühwurst) und „Leberwurst“ (Koch-

wurst). Die Würste wurden im Institut für Technologie (BfEL) gemäß den Leitsätzen für Fleisch und Fleischerzeugnisse des Deutschen Lebensmittelbuches hergestellt. Die Rezepturen sind detailliert in Tabelle 2 angegeben. Das verwendete Rinderrückenmark wurde jeweils einen Tag vor der Herstellung der Referenzproben aus dem Städtischen Schlachthof Kulmbach bezogen. Nach der Homogenisierung des Gewebes mittels eines Ultra Turrax (IKA Werke GmbH und Co. KG, Staufen, Deutschland) erfolgte die Zugabe zur Wurstgrundmasse. Je Wurstsorte wurden Chargen/Referenzproben entsprechender ZNS-Gehalte hergestellt.

Probenaufbereitung

Jeweils 150 g-250 g der Proben wurden unter Verwendung eines Haushaltsmixers (Moulinette, Gießen, Deutschland) homogenisiert. Anschließend wurden 5 g-8 g der homogenisierten Probe in ein 50 ml Falcon Röhrchen (Becton Dickinson Labware Europe, Le Pont de Claix, Frankreich) eingewogen für die folgende PLP-Extraktion. Das restliche Homogenat wurde Vakuum verpackt (auto vac, Krämer & Greber KG, Wallingen, Deutschland) und für weitere Analysen bei -20°C aufbewahrt.

Tab. 1: Übersicht über die analysierten Fleischerzeugnisse in der vorliegenden Studie

Brühwürste			Kochwürste			Rohwürste		
Produktname	n_1^a	n_2^b	Produktname	n_1^a	n_2^b	Produktname	n_1^a	n_2^b
Bierschinken	1	2	Blutwurst	3	2	Katenrauchwurst	-	1
Bierwurst	1	3	Leberwurst, fein	7	12	Mettenden	-	2
Bratwurst		1	Leberwurst, grob	6	5	Mettwurst, grob	4	6
Fleischkäse	2	2	Pasteten	1	-	Mettwurst, fein	4	3
Fleischwurst	2	1	Presssack	5	1	Pfeffersäckchen	3	1
Gelbwurst	7	4	Rotwurst	2	4	Polnische Rohwurst	3	1
Göttinger	2	-	Zungenwurst	4	-	Salami	1	5
Jagdwurst	-	3				Teewurst, fein	4	7
Knacker, gebrüht	1	-				Teewurst, grob	-	4
Krakauer	-	1						
Lyoner	5	3						
Schinkenwurst	3	4						
Weißwurst	2	1						

^a n_1 , Anzahl der Proben, die in Metzgereien erworben wurden;

^b n_2 , Anzahl der Proben, die in Supermärkten erworben wurden

Tab. 2: Herstellung von Referenzwurstergeugnissen mit definierten Zusätzen an ZNS-Gewebe (bovines Rückenmark)

Wurstart	Rezept und Leitsatznummer des Produkts	
Rohwurst	2.212.1 „Teewurst“	
	ZNS- Gewebe ^a	0-10 %
	Rindfleisch, grob entseht, fettfrei	18%
	Schweinefleisch, sehnenfrei, mit geringem Fettanteil	13,5%
	fett- und sehnenfreies Einlagefleisch vom Schwein	13,5%
	fette Wammen	45-55%
	Nitritpökelsalz (NPS) [g pro kg Masse]	26g
Gewürzmischung [g pro kg Masse]	8g	
Brühwurst	2.222.1 „Lyoner“	
	ZNS- Gewebe ^a	0-10%
	sehnenhaltiges Kutterfleisch vom Schwein	40-50%
	Kutterspeck	34%
	Eis	16%
	Nitritpökelsalz (NPS) [g pro kg Masse]	20g
	Gewürzmischung [g pro kg Masse]	4g
Phosphat	5g	
Kochwurst	2.2312.1 „Feine Leberwurst“	
	ZNS-Gewebe ^a	0-10%
	Schweinefleisch, grob fettfrei	10%
	durchwachsenes Schweinefleisch, schwach durchgebrüht	10%
	Wammen, Speck, Fettgewebe, schwach durchgebrüht	35-45%
	Schweineleber	27%
	Heiße Kesselbrühe	4%
	Eis	4%
	Nitritpökelsalz (NPS) [g pro kg Masse]	18g
Gewürzmischung [g pro kg Masse]	10g	

^a ZNS-Gewebe wird in den Leitsätzen für Fleisch und Fleischerzeugnisse des Deutschen Lebensmittelbuches nicht genannt

PLP-Extraktion

Die PLP-Extraktion erfolgte nach dem von Sandmeier *et al.* (3) beschriebenen Verfahren. Jeweils 5 g-8 g Homogenat wurden dreimal in n-Hexan unter wiederholtem Suspensionieren mittels eines Ultra Turrax (IKA Werke GmbH und Co. KG, Staufen, Deutschland) extrahiert. Nach jedem Extraktionsschritt wurde die Suspension filtriert (Faltenfilter, MN 615¼, Macherey-Nagel, Düren, Deutschland). Anschließend wurde das Lösungsmittel aus den Filtraten unter dem Rotationsverdampfer (Rotavapor-EL, Büchi Labor-technik GmbH, Essen, Deutschland) bei <30 °C abgezogen. Im nächsten Schritt erfolgte eine Entfettung der Hexanextrakte

durch eine Resuspension der Rückstände in 5 ml Diethyl-Ether und Zentrifugation bei 2600 xg für 10 min bei 4 °C. Nach Verwerfen des Überstandes wurde das zurückbleibende Pellet in 1 ml Diethyl-Ether resuspendiert und bei 10 000 xg für 10 min bei Raumtemperatur zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet anschließend luftgetrocknet.

Immunochemische Detektion von PLP

Der immunochemische Nachweis von PLP wurde nach Sandmeier *et al.* (3) durchgeführt. Hierzu wurde das luftgetrocknete Pellet in Laemmli-Probenpuffer (2) bis zu einer Endkonzentration von 5 µg/µl resuspendiert. Nach einem Denaturierungs-

schritt im Wasserbad bei 75 °C für 25 min wurden die Proteine in einer SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese aufgetrennt (140 V; 75 min) und im Western Blot auf eine Nitrocellulosemembran übertragen. Anschließend erfolgte die Detektion von PLP mittels polyklonaler Antikörper. Die gebundenen Antikörper wurden unter Verwendung von 4-Nitroblau-tetrazolium-chlorid 5-Bromo-4-chloro-3-indolylphosphat (NBIT-BCIP) als chromogenes Substrat nach Herstellerangaben visualisiert (Roche Diagnostics, Mannheim, Deutschland).

Enzyme-linked immunosorbent assay

Proben, die im oben beschriebenen Verfahren (PLP-Assay) positiv getestet wurden, wurden parallel unter Verwendung des kommerziell erhältlichen ELISA Testkit "Ridascreen Risk material" (R-Biopharm AG, Darmstadt, Deutschland) untersucht. Die Aufbereitung und Analyse der Proben wurden nach Angaben des Herstellers durchgeführt. Für eine standardisierte Auswertung der Ergebnisse mittels linearer Regression wurde die Software RIDA SOFT Win der Firma R-Biopharm AG (Darmstadt, Deutschland) verwendet.

Ergebnisse

Sensitivität

Die Empfindlichkeit des PLP-Assays wurde für drei Produktgruppen geprüft:

Brüh-, Koch- und Rohwurst. Hierfür wurden Referenzwürste mit verschiedenen bovinen Rückenmarksgehalten (0 %, 0,1 %, 0,2 %, 0,5 %, 1 %, 2 % und 10 %) in Doppelbestimmung analysiert. Die Negativkontrollen (Proben mit 0 % ZNS-Zusatz) wurden im PLP-Assay korrekt bestimmt. Zudem wurden keine falsch positiven Ergebnisse erzielt. Über den Nachweis von PLP wurden in Brüh- und Rohwürsten ZNS-Konzentrationen $\geq 0,1$ % und in Kochwürsten $\geq 0,2$ % sicher detektiert (Abb. 1).

Handelsprobenstudie

Insgesamt wurde in 15 (9,9 %) der 152 untersuchten Produkte ZNS-Gewebe unter Verwendung des PLP-Assay nachgewiesen (Tab. 3). Hierbei handelte es sich zum überwiegenden Teil um Brühwürste (60 %) und zu jeweils 20 % um Koch- und Rohwürste. Die parallele Analyse der positiv getesteten Proben im GFAP-ELISA bestätigten diese Ergebnisse in 5 Fällen (Tab. 3). Zwei der positiv getesteten Feldproben (Gelbwurst, Lab.Nr. 63 und Weißwurst, Lab.Nr. 54) zeigten im PLP-Assay die stärksten Signale sowie im GFAP-ELISA die höchsten quantitativen Werte (Tab.3; Abb. 2). Da beide Proben in derselben Metzgerei erworben wurden, wurden zusätzliche Proben dieser Wurstsorten im PLP-Assay und GFAP-EIA analysiert. Wie Tabelle 4 zeigt, wurden die ersten Ergebnisse in beiden Fällen bestätigt.

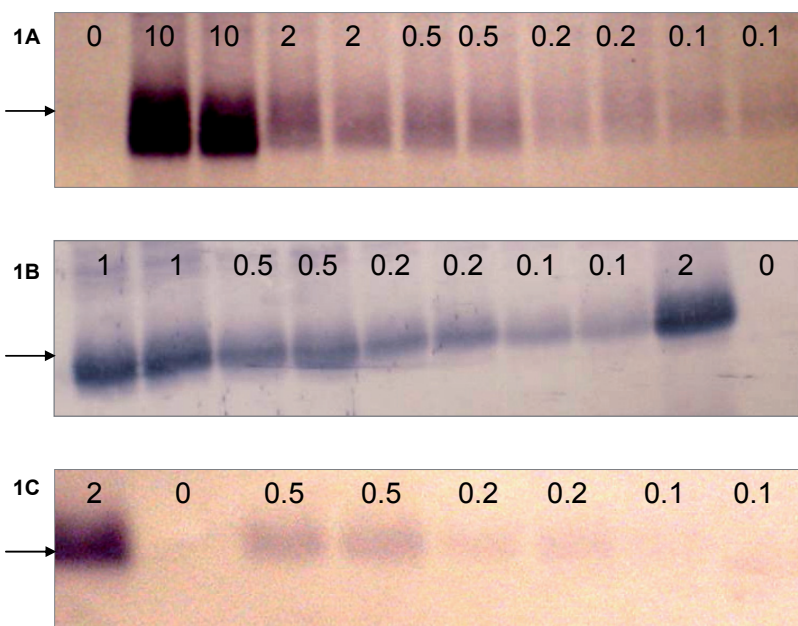


Abb. 1: PLP-Western Blot-Analyse von Referenzwurstherzeugnissen mit verschiedenen Gehalten an bovinem Rückenmark. (A) Immunoblot von Teewurst mit ZNS Gehalten von 0 bis 10 %; (B) Immunoblot von Lyoner verschiedener ZNS Gehalte (0 % bis 2 %). (C) Immunoblot einer Leberwurst mit ZNS-Gehalten von 0 % bis 2 %. Der Pfeil markiert die für PLP spezifische Proteinbande bei einem adäquaten Molekulargewicht von 29 kDa

Tab. 3: Nachweis von zentralem Nervengewebe in Wursterzeugnissen aus dem Einzelhandel (positiv getestete Proben)

Produktgruppe	Wurstsorte	Herkunft ^a	Nachweis von ZNS Gewebe über:	
			PLP- Assay ^b	GFAP-ELISA ^c
Brühwurst	Schinkenwurst	M	+	neg
	Gelbwurst	M	++	0,953
	Bierschinken	S	+	neg
	Gelbwurst	M	+	0,149
	Gelbwurst	S	+	neg
	Bierwurst	S	+	0,154
	Lyoner	S	+	0,166
	Gelbwurst	M	+	neg
	Weißwurst	M	++	1,028
Kochwurst	Fleischrotwurst	S	+	neg
	Rotwurst	M	+	neg
	Presssack, rot	S	+	neg
Rohwurst	Mettwurst	S	+	neg
	Salami	S	+	neg
	Mettenden	S	+	neg

^a M = Metzgerei; S = Supermarkt; ^b Intensität der positiven PLP Immunoantwort: ++ stark, + schwach; ^c Risikomaterial-Gehalte in %; neg = negativ

Tab. 4: Wiederholter Nachweis von ZNS-Gewebe in Brühwurstprodukten einer Metzgerei

Wurstprobe	Zeitpunkt des wiederholten Erwerbs und der Analyse	Nachweis von ZNS-Gewebe über:	
		PLP-Assay ^a	GFAP-ELISA ^b
Gelbwurst	März 2005	++	1,62
	August 2005	++	0,73
	November 2005	++	> Standard 2 %
	Dezember 2005	++	1,24
	Januar 2006	++	0,765
Weißwurst	November 2005	++	1,57
	Dezember 2005	++	0,69
	Januar 2006	++	1,64

^a Intensität der positiven PLP Immunoantwort: ++, stark; +, schwach; ^b Risikomaterial Gehalte in %



Abb. 2: Detektion von zentralem Nervengewebe in Wursterzeugnissen. Lane 1, Negativkontrolle (TW); Lane 2, Positivkontrolle (TW + 0,5 % ZNS); Lanes 3 und 4, Mettenden; Lanes 5 und 6, Gelbwurst; Lanes 7 und 8, Weißwurst. Der Pfeil zeigt die Position des Molekulargewichtsmarkers bei 29 kDa an

Diskussion

Die Empfindlichkeit des PLP-Assay von 0,1 % ZNS-Gewebe für Brüh- und Rohwürste sowie 0,2 % für Kochwürste stimmt sehr gut mit der von Sandmeier *et al.* (3) ermittelten Nachweisgrenze von 0,1 % (alle Wursttypen) überein. Diese Ergebnisse bestätigen den PLP-Assay daher als ein sehr sensibles Nachweisverfahren für ZNS-Gewebe in Fleischerzeugnissen. In 15 (9,9 %) der 152 untersuchten Wurstprodukte wurde ZNS-Gewebe nachgewiesen. Die parallele Analyse dieser positiv getesteten Proben mittels GFAP-ELISA bestätigte die Ergebnisse in 5 Fällen. Dies dokumentiert deutlich, dass ZNS-Kontaminationen in Fleischerzeugnissen nicht ausgeschlossen werden können. Lücker *et al.* (2) detektierten ZNS-Gewebe in 4 % untersuchter Handelsproben.

Da 86,7 % der positiv getesteten Proben (PLP-Assay) weniger als 0,2 % ZNS aufwiesen, ist in diesen Produkten als Ursache für den ZNS-Nachweis eine unbewusste Kontamination während des Herstellungsprozesses zu vermuten. Zwei der untersuchten Einzelhandelsproben, die in derselben Metzgerei erworben wurden, zeigten sowohl im PLP-Verfahren als auch im GFAP-EIA ein sehr starkes Signal. Durch wiederholten Erwerb und Analyse dieser Wursterzeugnisse aus der gleichen Metzgerei über einen längeren Zeitraum wurden die ersten Ergebnisse abgesichert. Dies lässt auf eine systematische ZNS-Kontamination dieser Produkte, vermutlich durch die Verwendung von Schweinehirn, schließen.

Während spezifizierte Risikomaterialien durch die Europäische Union über die Tierspezies und das Tieralter bestimmt werden, sieht das Deutsche Lebensmittelbuch hingegen die Verwendung von ZNS-Material in Fleischerzeugnissen in Deutschland generell nicht mehr vor. Vor diesem Hintergrund eignet sich der PLP-Assay sehr gut als Screening-Methode zum Nachweis von ZNS-Gewebe in Fleischerzeugnissen, da er gemäß den Leitsätzen des Deutschen Lebensmittelbuches diese Gewebe unabhängig von Tierspezies und -alter detektiert.

Literatur

1. Laemmli, U. K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227: 680-685.
2. Lücker, E., S. Horlacher, and 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. *Br. J. Nutr.* 86 (1): 115-119.
3. Sandmeier, B., C. Villmann, R. Bäuerlein, T. DÜthorn, M. Gareis, C. M. Becker, and M. Pischetsrieder. Detection of central nervous system tissue in meat and meat products with a newly developed immunoassay selective for myelin proteolipid protein. *Food Chem.*, in press.

