

MIKROSKOPSKA IDENTIFIKACIJA ŽIVOTINJSKIH TKIVA U KRMIVIMA I KRMNIM SMJESAMA

THE MICROSCOPIC DETECTION OF ANIMAL PROTEINS IN FEEDS

Manuela Zadavec, Vesna Jaki, M. Mitak, D. Majnarić

Stručni članak
Prilježeno: 30. ožujak 2009.

SAŽETAK

Životinjske bjelančevine, dobiveni od termički obrađenih životinjskih nusproizvoda podrijetlom od kopnenih sisavaca, peradi ili riba, zbog svoje hranjive vrijednosti, često se koriste kao dodatak krmnim smjesama.

Sitne strukture nekih organa vidljive su mikroskopski pod različitim povećanjima. Mikroskopski u krmivima možemo identificirati dijelove kosti, mišića, hrskavice, dlake, perje, ljuske od jaja, riblje ljuske i ligamente. Dijelove mekih tkiva i kože najčešće ne možemo identificirati zbog termičke obrade u kafilerijama.

Uvođenje mikroskopske metode u rutinsku laboratorijsku pretragu za identifikaciju životinjskih tkiva u krmivima, nužna je zbog bolesti goveđe spongiformne encefalopatije (GSE) i njene povezanosti s uporabom i hranidbom životinja životinjskim bjelančevinama.

Ključne riječi: životinjske bjelančevine, krmiva, mikroskopska pretraga, GSE

UVOD

Uvođenje metode za identifikaciju životinjskih sastojaka u krmivima potrebna je zbog pojave BSE-a i njene povezanosti s hranidbom životinjskim bjelančevinama. Prije pojave BSE-a, upotreba životinjskih bjelančevina u hranidbi životinja bila je široko rasprostranjena, pogotovo u intenzivnom uzgoju. Mesno brašno, mesno-koštano brašno, brašna peradi, brašna perja, krvno brašno, životinjske masti, riblje brašno, riblje ulje, mlijeko u prahu, sirutka u prahu lako su dostupne sirovine s velikom količinom kvalitetnih bjelančevina koje su se umješavale u hranu za životinje.

Stoga je bilo potrebno uspostaviti nadzor u obliku zabrane upotrebe životinjskih bjelančevina za

hranidbu životinja (NN 129/1997). Upotreba određenih prerađenih bjelančevina (npr. riblje brašno koje se kontrolira s posebnim nadzorom – svaka serija ribljeg brašna koja dolazi iz „trećih“ zemalja mora biti zasebno uzorkovana i pregledana na prisutnost mesno-koštanog brašna (Rješenje o dozvoli uvoza od MPRRR), a mješaonice hrane za životinje koje umješavaju riblje brašno ne smiju proizvoditi hranu za preživače. Nadziru se također transport i uporaba hrane koja sadrži riblje brašno i dikalcijev fosfat.

Manuela Zadavec, dr. vet. med., dr. sc. M. Mitak, dr. vet. med., Hrvatski veterinarski institut Zagreb, 10000 Zagreb, Savska 143, Vesna Jaki, dr. vet. med., dr. sc. D. Majnarić, dr. vet. med., HVI - Veterinarski zavod Križevci, 48260 Križevci, Zakmardijeva 10, Hrvatska.

Zabrana hranjenja životinjskim bjelančevinama vrijedi i za divlje životinje, životinje u zoološkim vrtovima i eksperimentalne životinje (ako pripadaju podvrsti preživača).

Od 1994. godine zabranjena je uporaba bjelančevina porijeklom od sisavaca i za ostale vrste životinja koje se koriste za prehranu ljudi. (Ingravalle i sur., 2007)

BSE je subakutna degenerativna bolest središnjeg živčanog sustava odraslih goveda. Spada u skupinu zaraznih spongiformnih encefalopatija ili prijonskih bolesti.

Bolest je prvi put opisana u Velikoj Britaniji 1986. godine.

Oboljele životinje postaju plahe, preosjetljive na vanjske podražaje (dodir, svjetlost, zvuk), nesigurno se kreću i posrću pri hodu, ne dozvoljavaju mužnju, postaju agresivne prema drugim životinjama i ljudima, glavu drže nisko, često se oblizuju, prisutan je tremor podkožnih mišića, gube na težini, smanjena je proizvodnja mlijeka. Prema epizotološkim podacima infekcija nastupa kada se uzročnika unese peroralno s hranom koja sadrži životinjske bjelančevine dobivene od oboljele životinje. Eksperimentalno se uspjela dokazati peroralna i parenteralna infekcija tkivom oboljelog goveda (M.J. Prince i sur., 2003).

Epidemiološka istraživanja su pokazala da postoji rizik za vertikalnu infekciju (majka-mladunče), koji ne bi predstavljao veću opasnost za nastanak endemske infekcije u populaciji goveda. Horizontalno širenje bolesti među govedima nije dokazano.

Primljive životinjske vrste su: domaće govedo, divlje vrste goveda (bizon, oriks), domaće i divlje mačke (gepard, puma, tigar, lav), a eksperimentalno (peroralno i parenteralno): miševi, goveda, ovce, koze i kune (Ramantanis, 2006).

Kod prasadi je tek kod višekratnih parenteralnih infekcija homogeniziranim zaraženim tkivom uspjelo izazvati bolest, dok se peroralnom infekcijom nije izazvala bolest (Gerald i sur., 2003).

Kod peradi bolest nije eksperimentalno izazvana ni peroralnom ni parenteralnom aplikacijom zaraženog materijala (Matthews i sur., 2003).

Psi i konji: do sada nije bilo opisanih primjera.

Primati: eksperimentalno je dokazana primljivost za BSE kod više vrsta primata.

Kod ljudi opisana je CJB i BSE. (Marković i sur., 2004)

Karakteristika ovih bolesti je duga inkubacija i neurodegenerativne promjene u centralnom živčanom sustavu.

Direktiva Europske unije 2003/126/EC definira osnovna pravila za identifikaciju dijelova životinjskih tkiva u hrani za životinje. Potreba za ovom identifikacijom temelji se na zabrani dodavanja životinjskih bjelančevina u hranu za farmske životinje, osim ribljih bjelančevina, u posebnim okolnostima. Životinjske bjelančevine dobivaju se termičkom obradom klaoničkog otpada, te se u okviru mikroskopske pretrage generalno označuju kao mesno brašno i mesno-koštano brašno. Veći dio Direktive 2003/126/EU opisuje reagense, opremu i način obrade uzorka (prosijavanje i sedimentaciju), bojanje, izračun količine i ocjenu hrane.

Metoda mikroskopske pretrage ušla je u zakonodavstvo EU 1988, kao smjernica 98/88/EC, u kojoj je bio opisan postupak pretrage, koja se temeljila na metodi koju je primjenjivala IAG (International Assosation of Feedstaf Analysis). Međutim kako je 98/88/EC bila samo smjernica, dopuštala je primjenu različitih varijacija metode, pa su tako bile primjenjivane Austrijska i Francuska metoda. U međuvremenu se pokazala potreba za optimiziranjem pojedinih koraka u metodi. Zbog toga je u sklopu projekta Europske unije pokrenut istraživački projekt STRATFEED za identifikaciju životinjskih bjelančevina u hrani za životinje, uz pomoć kojeg se definirala metoda. U potpunosti su opisane karakteristike koštanih fragmenata, dlake, mišića, perja i škrge i način njihove interpretacije. Cijelokupna metoda identifikacije i potpun opis životinjskih fragmenata koji se traže u stočnoj hrani opisani su u softveru ARIES (Animal Remains Identification and Evaluation System), koji u mnogočemu pomaže pri identifikaciji.

Alternativni testovi, kao ELISA, PCR (lančana reakcija polimerazom) i NIR (near infrared) spektrofotometrija, koriste se kao skrining ili konfirmirajuće metode (van Raamsdonk i sur., 2007).

MATERIJAL I METODE

Uzorci za pretragu pripremljeni su u laboratoriju. Tijekom validacije mikroskopske metode identifikacije životinjskih bjelančevina pretraženo je 10 uzoraka koji su sadržavali mesno - koštano, riblje brašno i brašno perja umiješano u različite vrste krmnih smjesa u različitim omjerima i u različitim koncentracijama (tablica 1).

Tablica 1. Priprema uzoraka za mikroskopsku pretragu

Table 1. Components for preparing samples for microscopic examination

Umješavane komponente - Added components
Negativan uzorak A - Negative sample A
Negativan uzorak B (Peleti) - Negative sample B (pellets)
0.1% mesno-koštano brašno - Meat-bone meal 0.1%
0.5% brašno perja - Feathers meal 0.5%
1% mesno brašno - Meat meal 1%
Riblje brašno + 0.5% mesno-koštano brašno Fish meal + 0.5% meat-bone meal
Peleti+ 0.1% MBM - Pellets + 0.1% MBM

Postupak:

Od uzorka se odvaže najmanje 5 g te se melje (ako je potrebno, na sito promjera 2 mm), a zatim prosije kroz sito promjera otvora 0,5 mm. Ta prosijana frakcija promatra se mikroskopski pod različitim povećanjima, a „tražimo“ dlaku, mišićne fragmente i perje. Kao pomoć u pretraživanju možemo uzorak obojiti lužinom, kloral-hidratom, Lugolovom otopinom

ili reagensom cistina. Frakciju koja je veća od 0,5 mm promatra se pod stereomikroskopom. Treba pregledati najmanje 1 slajd prosijane frakcije. Ako su uočeni fragmenti ribe, moraju se pregledati još 2 dodatna slajda.

Da bi se dobio koncentrirani sediment potrebno je najmanje 5 g samljevenog uzorka sedimentirati u separacijskom lijevku s 50 ml tetrakloretilena. Nakon protresanja i sedimentacije u trajanju od najmanje 3 minute, sediment se odvoji. Zatim se mješavina još jednom promiješa i ostavi najmanje 3 minute sedimentirati, tada se odvoji sediment i ostavi se sušiti. Ako sediment sadrži velike dijelove, treba ga prosijati.

Sediment se promatra pod stereo mikroskopom i složenim mikroskopom (40-400x). Za lakše promatranje pod složenim mikroskopom upotrebljava se glicerol ili parafinsko ulje. Za lakšu identifikaciju djelica kostiju, sediment se može obojiti alizarinskim crvenilom.

Ova metoda može biti kvalitativna i semikvantitativna. Kvalitativno određivanje temelji se na detekciji tkiva životinjskog podrijetla, bilo kopnenih ili vodenih životinja.

Metodom se ne može odrediti od koje vrste životinja potječu nađeni dijelovi.

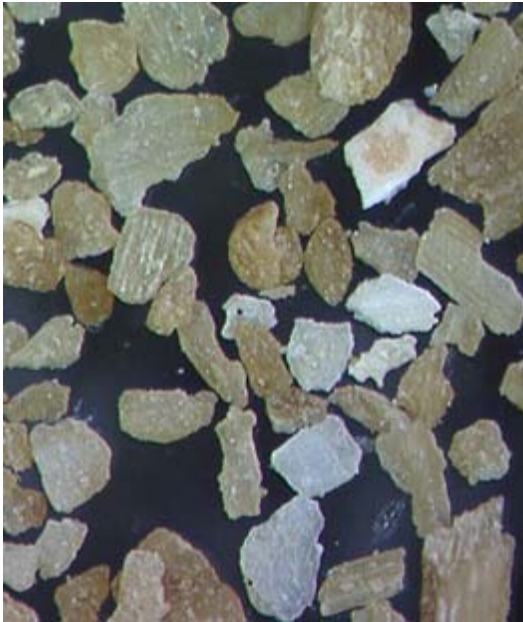
Za određivanje količine dodanog mesno-koštanog brašna, sediment se treba izvagati i iz formule se izračunava postotak dodanog mesno-koštanog brašna.

Životinjske komponente su najčešće „uklopljene“ u biljnu ili mineralnu matricu.

REZULTATI I RASPRAVA

Pretragom uzoraka u svima je određena vrsta životinjskih bjelančevina, međutim nije se izračunavala količina.

Mikroskopske slike dijelova životinjskih tkiva - (Fotografije iz ARIES-a)



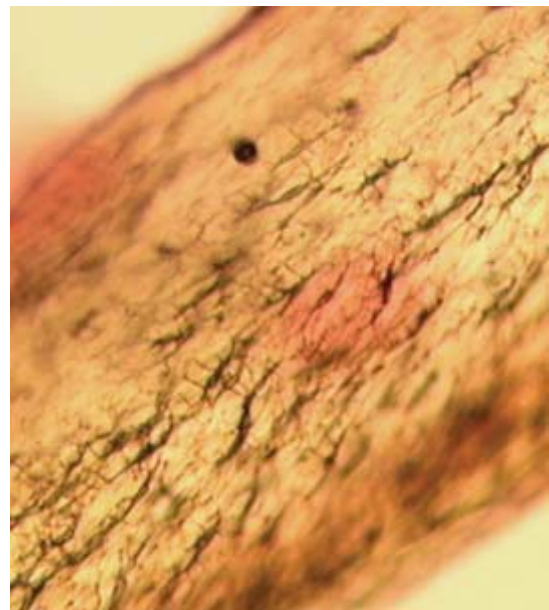
Slika 1. Fragmenti kosti pod stereomikroskopom
Fig. 1. Bone fragmets under stereomicroscope



Slika 3. Ljuska ribe
Fig. 3. Fish scale



Slika 2. Škrge
Fig. 2. Gills



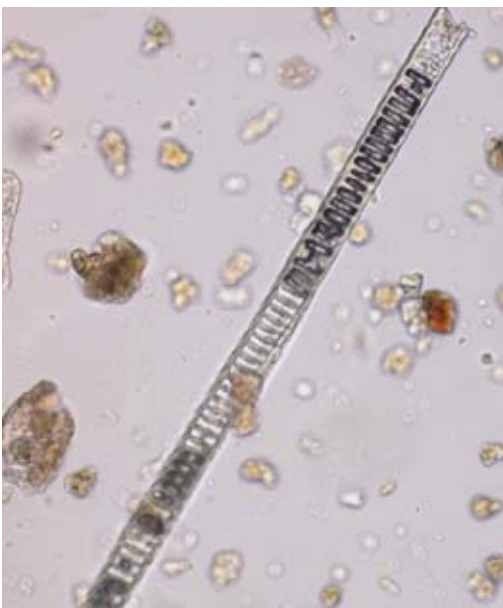
Slika 4. Kost ribe
Fig. 4. Fish bone



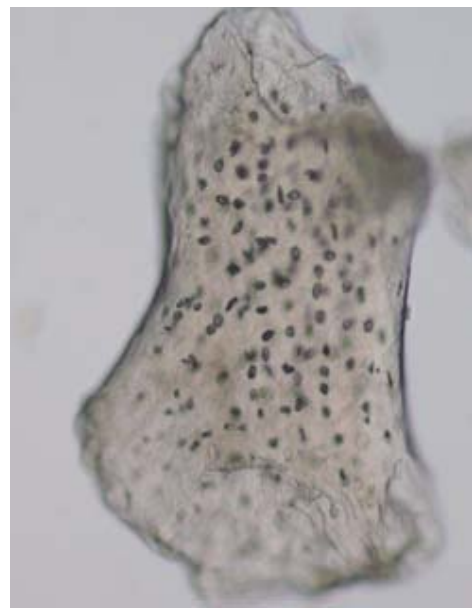
Slika 5. Mišićno tkivo
Fig. 5. Muscle tissue



Slika 7. Perje
Fig. 7. Feathers



Slika 6. Dlaka štakora
Fig. 6. Rat hair



Slika 8. Fragment kosti
Fig. 8. Bone fragment

Dobiveni rezultati prikazani su na tablici 2.

Tablica 2. Rezultati pretrage na prisutnost životinjskih bjelančevina**Table 2. Results of examination of animal protein presence**

Broj uzorka Sample	Umiješani materijal - Added material	Nađeno mikroskopskom pretragom Found by microscopic examination	
		Kopnene životinje (sisavci/ptice) Land animals (mammals/birds)	Riba - Fish
1	0.5% brašno perja - Feather meal 0.5%	+	-
2	Negativan uzorak A (peleti) - Negative sample A (pellets)	-	-
3	Riblje brašno+0.5% MKB* - Fish meal + 0.5% MKB*	+	+
4	0.1% MKB - MKB 0.1%	+	-
5	Negativan uzorak B - Negative sample B	-	-
6	1% mesno brašno - Meat meal 1%	+	-
7	0.1% MKB - MKB 0.1%	+	-
8	1% mesno brašno - Meat meal 1%	+	-
9	0.5% brašno perja - Feather meal 0.5%	+	-
10	Riblje brašno+0.5% MKB* - Fish meal + 0.5% MKB	+	+

*Mesno koštano brašno

*Meat-bone meal

ZAKLJUČAK

Pravilnom izvedbom metode točno se može detektirati 0.2 g/kg MKB u hrani za životinje. (Engling i sur., 2000).

Prednosti ove metode su da je za izvedbu potrebna jednostavna laboratorijska oprema, jednom nabavljena oprema je dugotrajna, a nije ju potrebno posebno održavati. Metodom se brzo dolazi do rezultata, reagensi i kemikalije nisu skupi i lako su dostupni.

Nedostaci su što je za izvođenje metode potrebno veliko iskustvo analitičara u identifikaciji životinjskih dijelova, što podrazumijeva neprekidno obrazovanje i usavršavanje.

Mikroskopska pretraga uspješno se može obavljati u mnogo laboratorija, međutim, problem određivanja vrste životinjskog tkiva predstavlja potrebu za veoma dobrim poznavateljem područja dobrog obrazovanja i bogatog iskustva. U budućnosti bi svakako trebalo poraditi na jednoj metodi koja bi isključila subjektivnost analitičara.

LITERATURA

1. ARIES (2004): Animal remains identification and evaluation system, Version1.0. In STRATFEED Consortium, RIKILT. Wageningen, The Netherlands.
2. Engling, F. P., Jörgenson, J. S., Paradies-Severin, I., Hahn, H. (2000): Evidence of animal meal in feeds. *KraftfutterFeed Mag.* 1, 14-17.
3. European Union (1998): Commission Directive EC/88/98 establishing guidelines for microscopic-identification and estimation of constituents of animal origin for the official control of feeding stuffs. *Off. J. Eur.Comm.* L318, 45-50.
4. European Union (2003): Commission Directive EC/126/2003 on the analytical method for determination of constituents of animal origin for the official control of feeding stuffs. *Off.J.Eur.Comm.* L339, 78-84.
5. Ingravalle, F., Aberte, M. C., Crescio, M., Ru, G.(2007): Detection of animal –derived proteins in feedingstuffs in Italy: a reproducibility study. *Jurnal of Food Protection.* 70(4), 986-990.
6. Marković, M., Marković, M. (2004): Prioni i prionske bolesti. *Glas. pul.boln.* 1, 5-11.

7. Matthews, D., Cooke, B. C. (2003): The Potential for transmissible spongiform encephalopathies in non-ruminant livestock and fish. *Revue Scientifique at Technique*. 22(1), 283-296.
8. Narodne novine (2006): Pravilnik o načinu postupanja s nusproizvodima životinjskog podrijetla koji nisu za prehranu ljudi. *Narodne novine* 56/2006.
9. Prince, M. J., Bailey, J. A., Barrowman, P. R., Bishop, K. J., Campbell, G. R., Wood, J. M. (2003): Bovine spongiform encephalopathy. *Rev. Sci. tech. Off. int. Epiz.* 22, 37-60.
10. Prusiner, S. B. (1995): The Prion Diseases. *Scientific American*, 48-57.
11. Ramantanis, S. B. (2006): Alternative cattle slaughtering technologies and/or measures reducing dissemination of central nervous system tissue during head handling, harvesting of cheek meat and tongue and carcass splitting – a review. *Veterinarski arhiv*. 76, 19-36.
12. Van Raamsdonk, L. W. D., van Holst, C., Baeten, V., Berben, G., Boix, A., de Jong, J. (2007): New developments in the detection and identification of processed animal proteins in feeds. *Animal Feed Science and Technology*. 133, 63-83.
13. Wells, G. A. H., Hawkins, S. A. C., Austin, A. R., Ryder, S. J., Done, S. H., Green, R. B., Dexter, I., Dawson, M., Kimberlin, R. H. (2003): Studies of the transmissibility of the agent of bovine spongiform encephalopathy to pigs. *Journal of General Virology*. 84, 1021-1031.

SUMMARY

Additional animal proteins in feeds because of their edibility, is by adding ground slaughter by-products originating either from ruminants, poultry or fish.

This means that fine structures are visible after microscopic inspection at different magnification. The principal particles of animal origin that might be present in feeds are bones, muscle fibres, cartilage, hairs, feather filaments, egg shells, fish scales and ligaments. Parts from organs, skin and other soft tissues are generally absent, because of their denaturation after sterilisation. The need of this identification is based on the prohibition on adding animal proteins to feeds intended for farm animals therefore a connection between appearance of Bovine spongiform encephalopathy (BSE) and feeding animals with animal proteins.

Key words: animal proteins, feeds, microscopic detection, BSE