

## Περιοδικό της Ελληνικής Κτηνιατρικής Εταιρείας

Τόμ. 62, Αρ. 1 (2011)



**Απαγόρευση χρήσης ζωοτροφών (Feed Ban) και BSE: ανίχνευση και ταυτοποίηση μεταποιημένης ζωικής πρωτεΐνης σε συνθέτες ζωοτροφές**

*P. ΖΟΙΟΠΟΥΛΟΣ (Π. ΖΩΙΟΠΟΥΛΟΣ)*

doi: [10.12681/jhvms.14838](https://doi.org/10.12681/jhvms.14838)

### Βιβλιογραφική αναφορά:

ΖΟΙΟΠΟΥΛΟΣ (Π. ΖΩΙΟΠΟΥΛΟΣ) P. (2017). Απαγόρευση χρήσης ζωοτροφών (Feed Ban) και BSE: ανίχνευση και ταυτοποίηση μεταποιημένης ζωικής πρωτεΐνης σε συνθέτες ζωοτροφές. *Περιοδικό της Ελληνικής Κτηνιατρικής Εταιρείας*, 62(1), 71–81. <https://doi.org/10.12681/jhvms.14838>

## ■ Feed Ban and BSE: the detection and identification of processed animal proteins in compound feeds

Zoiopoulos P., MSc, PhD

Laboratory of Animal Science, School of Management of Natural Resources and Enterprises, University of Ioannina

## ■ Απαγόρευση χρήσης ζωοτροφών (Feed Ban) και BSE: ανίχνευση και ταυτοποίηση μεταποιημένης ζωικής πρωτεΐνης σε σύνθετες ζωοτροφές

Π. Η. Ζωϊόπουλος, MSc, PhD

Εργαστήριο Ζωικής Παραγωγής, Σχολή Διαχείρισης Φυσικών Πόρων και Επιχειρήσεων, Πανεπιστήμιο Ιωαννίνων

**ABSTRACT.** Reference is made initially to the incidence of BSE within the EU territory and the reasons of the appearance of the disease i.e. the use of meat and bone meal in ruminant diets. In turn, the evolution of Community legislation in the sector of marketing of feeds of animal origin is described. Furthermore, the banning of feeding of mammalian protein to ruminants and the extension of prohibition to further animal proteins such as from other vertebrates and how this banning affects the feeding of the various animal species is reviewed. Finally, the importance of detecting and identifying the presence and amount of processed animal proteins in compound feed as well as feed materials is stressed and methods such as feed microscopy, immunoassay techniques, PCR, NIR and HPLC are discussed.

**Keywords:** BSE, processed animal proteins, feed ban, microscopy, PCR, immunoassay

**ΠΕΡΙΛΗΨΗ.** Στο άρθρο αυτό γίνεται κατ' αρχήν αναφορά στο συμβάν της Σπογγιόμορφης Εγκεφαλοπάθειας των Βοοειδών (BSE), καθώς και στις αιτίες που γέννησαν την εν λόγω ασθένεια, δηλαδή τη χρήση κρεαταλεύρων στα σιτηρέσια των μηρυκαστικών. Στη συνέχεια παρατίθεται η εξέλιξη της Κοινοτικής Νομοθεσίας στον τομέα της εμπορίας και χρήσης των ζωοτροφών ζωικής προέλευσης. Περαιτέρω εξηγείται το μείζον θέμα της απαγόρευσης χορήγησης στα μηρυκαστικά ζώα μεταποιημένης πρωτεΐνης εκ σώματος θηλαστικών και στη συνέχεια η επέκταση αυτής της απαγόρευσης σε άλλα είδη ζώων και σε άλλες ζωικές πρωτεΐνες, όπως αυτές από άλλα σπονδυλωτά. Επιπλέον, γίνεται μια κριτική επισκόπηση πάνω στο πως αυτή η απαγόρευση επιδρά στη διατροφή διαφόρων ειδών αγροτικών ζώων. Τέλος, επισημαίνεται η σπουδαιότητα του ζητήματος της ανίχνευσης και ταυτοποίησης της παρουσίας, αλλά και του προσδιορισμού της ποσότητας μεταποιημένης ζωικής πρωτεΐνης μέσα σε σύνθετες ζωοτροφές, και συζητείται η σημασία μεθόδων όπως η μικροσκοπία, τεχνικές ανοσοδοκιμών, PCR, NIR και HPLC για την αποτελεσματική λειτουργία των ελέγχων.

**Λέξεις ευρετηρίασης:** BSE, μεταποιημένες ζωικές πρωτεΐνες, feed ban, μικροσκοπία, PCR, ανοσοδοκιμή

*Correspondence:* Zoiopoulos P.  
Laboratory of Animal Science, School of Management of Natural Resources and Enterprises,  
University of Ioannina, 2, Seferi str., 301 00 Agrinio, Greece  
Tel.: 6974862680, Fax: 2641074179, E-mail: pzoiopul@cc.uoi.gr

*Αλληλογραφία:* Π. Η. Ζωϊόπουλος  
Εργαστήριο Ζωικής Παραγωγής, Σχολή Διαχείρισης Φυσικών Πόρων και Επιχειρήσεων,  
Πανεπιστήμιο Ιωαννίνων, Σεφέρη 2, 301 00 Αγρίνιο  
Τηλ.: 6974862680, Fax: 2641074179, E-mail: pzoiopul@cc.uoi.gr

*Submission date:* 05.01.2011  
*Approval date:* 15.04.2011

*Ημερομηνία υποβολής:* 05.01.2011  
*Ημερομηνία εγκρίσεως:* 15.04.2011

## ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Οι πρωτεϊνούχες ζωοτροφές, φυτικής ή ζωικής προέλευσης, κατέχουν ξεχωριστή θέση ως συστατικά των σιτηρεσίων των αγροτικών ζώων. Εάν κάποιος θέλει να ικανοποιήσει τις ανάγκες των ζώων σε πρωτεΐνη, με σκοπό την κατάρτιση σιτηρεσίων, θα πρέπει να αναμίξει ορισμένες ζωοτροφές που χρησιμοποιούνται ως πηγές ενέργειας, ιδιαίτερα δημητριακούς καρπούς, με ζωοτροφές φυτικής ή ζωικής προέλευσης πλούσιες σε πρωτεΐνη. Οι τελευταίες, κυρίως κρεατάλευρα και ιχθυάλευρα, έχοντας ένα καλύτερο προφίλ σε απαραίτητα αμινοξέα, ταιριάζουν περισσότερο για τα παμφάγα αγροτικά ζώα, στην ουσία χοίρους και πτηνά, αλλά επίσης για τις ιχθυοκαλλιέργειες.

Ποιος, όμως, ήταν ο λόγος για τη χορήγηση ζωικής πρωτεΐνης στο μηρυκαστικό ζώο, ένα φυτοφάγο; Ενάντια στη γνώμη που επικρατούσε παλιότερα, ότι τα μηρυκαστικά είναι ανεξάρτητα από την ποιότητα της πρωτεΐνης του σιτηρεσίου, λόγω της μικροβιακής σύνθεσης πρωτεΐνης από Μη Πρωτεϊνικό Άζωτο (ΜΠΑ) στους προστομάχους, η χορήγηση ζωικής πρωτεΐνης στις υψιπαραγωγές αγελάδες, ιδιαίτερα στο πρώτο τρίτο της γαλακτικής περιόδου, θεωρήθηκε ως επίτευγμα της επιστήμης της θρέψης των ζώων. Η εξήγηση γι' αυτό ήταν ότι η υψιπαραγωγός αγελάδα εκκρίνει ημερησίως μια σημαντική ποσότητα του δισακχαρίτου «λακτόζη» στο γάλα (κάτι περισσότερο από 1 Kg), η οποία στο μόριό της περιέχει γλυκόζη και γαλακτόζη. Η υψιπαραγωγός αγελάδα, εξαντλώντας τις δυνατότητες πρόσληψης τροφής, δεδομένης της ογκώδους φύσεως του σιτηρεσίου της, αδυνατεί να προσλάβει την ενέργεια που απαιτείται για τη συντήρηση και παραγωγή. Έτσι, η αγελάδα για την παραγωγή της απαιτούμενης γλυκόζης για το σχηματισμό λακτόζης στο γάλα βασίζεται σε άλλες πηγές πέραν του γλυκογόνου, στην ουσία διάσπαση του σωματικού λίπους και πρωτεΐνης, μέσω της διαδικασίας της γλυκονογένεσης, με ταυτόχρονη απώλεια σωματικού βάρους (Zoiopoulos & Drosinos, 2010).

Η χορήγηση ζωικής πρωτεΐνης, κυρίως κρεατάλευρων, στην υψιπαραγωγό αγελάδα χρησιμοποιήθηκε ως μέσο για την πρόληψη αποδόμησης σωματικής πρωτεΐνης, με την αποφυγή απαμίνωσης των αμινοξέων για παραγωγή ενέργειας. Επιπλέον, χρησιμοποιήθηκε και το ιχθυάλευρο στα σιτηρέσια των μηρυκαστικών αφού, έχοντας μικρότερη ζυμωτικότητα στη μεγάλη κοιλία απ' ό,τι η πρωτεΐνη του σογιάλευρου, διαφεύγει τη ζύμωση στους προστομάχους. Επίσης, η πρωτεΐνη

του ιχθυάλευρου είναι υψηλότερης ποιότητας απ' ό,τι η μικροβιακή πρωτεΐνη που συντίθεται στη μεγάλη κοιλία και όταν φθάνει στο δωδεκαδάκτυλο εφοδιάζει το ζώο με ένα καλύτερο μίγμα αμινοξέων (McDonald et al. 2002). Στο σημείο αυτό πρέπει να τονιστεί ότι τα προβλήματα στον εν λόγω τομέα δεν προέκυψαν από το γεγονός της χρήσης ζωικής πρωτεΐνης, αυτής καθ' εαυτής, στα μηρυκαστικά, αλλά από τη χρησιμοποίηση μολυσμένων ζωοτροφών με τον παράγοντα BSE (prion πρωτεΐνη). Αυτό προέκυψε από ελλιπή εφαρμογή των κτηνιατρικών κανόνων κατά την επεξεργασία σωματικών ιστών για την παραγωγή κρεατάλευρων, δηλαδή συμπίεση κόστους μέσω μείωσης θερμοκρασίας, πίεσης και χρόνου αποστείρωσης.

Στην παρούσα εργασία γίνεται καταρχήν μια επισκόπηση της Κοινοτικής Νομοθεσίας στον τομέα, δίνοντας παράλληλα το ιστορικό υπόβαθρο και τους λόγους για τους οποίους εξεδόθησαν τα σχετικά νομοθετήματα σε χρονολογική σειρά. Όμως, θα πρέπει να τονιστεί ότι η αναφορά σε διατάξεις της Κοινοτικής Νομοθεσίας στο παρόν άρθρο σε καμιά περίπτωση δεν υποκαθιστά την ίδια την νομοθεσία όπως αυτή διατυπώνεται στην Επίσημη Εφημερίδα της Ευρωπαϊκής Ένωσης (Off. J. Eur. Union).

## Η ΕΜΦΑΝΙΣΗ ΤΗΣ BSE ΣΤΗΝ ΕΥΡΩΠΗ

Όπως αναφέρει στο «αιτιολογικό» τμήμα ο βασικός Κανονισμός 999/2001 (EU, 2001), διακριτές περιπτώσεις Μεταδοτικών Σπογγιόμορφων Εγκεφαλοπαθειών (Transmissible Spongiform Encephalopathy – TSE) έχουν αναγνωριστεί για αρκετά χρόνια ως ξεχωριστά συμβάντα σε ανθρώπους και ζώα. Η BSE αναγνωρίστηκε αρχικά σε βοοειδή το 1986 και στα επόμενα χρόνια αναγνωρίστηκε ως συμβάν σε άλλα είδη ζώων. Η εμφάνιση της Σπογγιόμορφης Εγκεφαλοπάθειας των Βοοειδών (Bovine Spongiform Encephalopathy – BSE) στο Ηνωμένο Βασίλειο έχει πλήρως τεκμηριωθεί (Ford, 1996). Ο συγγραφέας αυτός αναφέρει, επίσης, ότι το πρώτο ανθρώπινο θύμα στη Βρετανία συνέβη το 1993. Στις 20 Μαρτίου 1996, το βάρος των δεδομένων ήταν πάρα πολύ για να καθυστερήσει κανείς. Εξεδόθη ένα επίσημο ανακοινωθέν, ότι για τις αναφερόμενες στις Αρχές περιπτώσεις Σπογγιόμορφης Εγκεφαλοπάθειας, πιστεύεται ότι η αιτία μπορεί να ήταν βοδινό κρέας μολυσμένο με BSE. Από την άλλη πλευρά, ο Knock (2002) γράφει ότι η ασθένεια στη Βρετανία είχε μειωθεί σημαντικά με την πάροδο του χρόνου και ότι ο αριθμός περιπτώσεων

BSE στα βοοειδή, επιβεβαιωμένων με κλινικά συμπτώματα, έφθασε στην κορυφή και συγκεκριμένα τις 36.680 το 1992 και μειώθηκε σε περίπου 730 το 2001.

Οι Flackowsky και Danicke (2005) αναφέρουν ότι η πρώτη περίπτωση BSE στη Γερμανία, που κατεγράφη το Νοέμβριο του 2000, επέφερε πολλές αλλαγές στη γεωργική πολιτική, αλλά και στη στάση των καταναλωτών. Η χρήση οστεοκρεαταλεύρων και ζωικών λιπών απαγορεύτηκε τελείως στη διατροφή των ζώων. Οι ίδιοι συγγραφείς αναφέρουν ότι μέχρι τον Αύγουστο του 2004 κατεγράφησαν στη Γερμανία 340 περιπτώσεις BSE και προτείνουν λεπτομερή έρευνα των ζωοτροφών ζωικής προέλευσης όσον αφορά στους ειδικούς κινδύνους για την ασθένεια. Το 2001 κατεγράφησαν στη Γερμανία 125 περιπτώσεις BSE, 106 το 2002, 54 το 2003 και 40 το 2004. Η μέση ηλικία των αγελάδων με BSE αυξήθηκε από 64 σε 76 μήνες, από το 2001 στο 2002. Αυτό σημαίνει ότι η πρόσληψη του prion θα πρέπει να είχε λάβει χώρα στα έτη 1995/1996. Οι περισσότερες αγελάδες με BSE που ταυτοποιήθηκαν τα έτη 2003/2004 είχαν γεννηθεί το 1999 και συμπέραναν ότι χρειάζονται περισσότερο λεπτομερείς αναλύσεις για να διαφοροποιήσει κανείς μεταξύ του έτους γέννησης, ειδικών συνθηκών του έτους και ταυτοποίησης σε BSE.

Περαιτέρω, οι Flachowsky και Danicke (2005) αναφέρονται σε επιδημιολογική μελέτη που διεξήχθη στη Γερμανία το 2002, όπου η αιτία μετάδοσης της BSE αποδόθηκε στις διάφορες ζωοτροφές ζωικής προέλευσης με τα ακόλουθα ποσοστά: ζωικό λίπος (68.8) στη διατροφή των βοοειδών ως μέρος μιγμάτων ζωοτροφών και ειδικότερα (i) (57.8) ως ζωικό λίπος σε υποκατάστατα γάλακτος, (ii) (4.7) ως ζωικό λίπος σε συμπυκνώματα για μόσχους και (iii) (6.3%) ως ζωικό λίπος σε συμπυκνώματα για αγελάδες. Για άλλα συστατικά ζωικής προέλευσης σε συμπυκνώματα (κυρίως μεταποιημένα οστεοκρεατάλευρα) ήταν (31.1), το οποίο κατανέμεται σε: (i) (10.4) συμπυκνώματα για μόσχους και (ii) (20.7%) συμπυκνώματα για αγελάδες.

Οι ίδιοι συγγραφείς συμπεραίνουν ότι αυτά τα δεδομένα δείχνουν ότι το ζωικό λίπος θα μπορούσε να είναι ένας σπουδαίος παράγοντας για τη μετάδοση της BSE λόγω της ρύπανσης με πρωτεϊνικό υλικό από τον εγκέφαλο και το νωτιαίο μυελό κατά τη διάρκεια της μεταποίησης. Προσέθεσαν ότι η σχετική σημασία ζωοτροφών που περιέχουν βόειο λίπος, στην ουσία υποκατάστατα γάλακτος, ήταν μεγαλύτερη στη Γερ-

μανία συγκρινόμενη με εκείνη της Βρετανίας. Στην τελευταία τα οστεοκρεατάλευρα παράγονταν υπό διαφορετικές συνθήκες, δηλαδή σε χαμηλότερη θερμοκρασία επεξεργασίας απ' ό,τι στη Γερμανία και συχνά χρησιμοποιούνταν σε υψηλότερη αναλογία ως συστατικά σύνθετων ζωοτροφών για μηρυκαστικά, γεγονός το οποίο αποτελούσε τότε την πρακτική στη Γερμανία.

Μια θεώρηση του συμβάντος της BSE στην Ευρώπη, με διεισδυτική ματιά, παρουσιάστηκε από τους Louloudis et al. (2000). Οι συγγραφείς αυτοί συζητούν την πολιτική διαχείριση του προβλήματος στα πλαίσια των περιπεπλεγμένων σχέσεων μεταξύ επιστήμης, οικονομίας, πολιτικής και διοίκησης, οι οποίες οδήγησαν στο θάνατο αθώων ανθρώπων, και συμπεραίνουν ότι η κρίση αυτή αποτέλεσε μια ευκαιρία για έναρξη διεξαγωγής μιας ενδιαφέρουσας συζήτησης. Η εργασία των παραπάνω επιστημόνων αποτελεί μια στοχαστική προσέγγιση στο θέμα της διαφοράς στις συλλήψεις (έννοιες) μεταξύ «κινδύνου» (hazard) και «διακινδύνευσης» (risk) στο χειρισμό του συμβάντος.

#### **ΔΗΦΘΕΝΤΑ ΜΕΤΡΑ ΑΠΟ ΤΗΝ Ε.Ε. ΓΙΑ ΤΗΝ ΑΠΑΓΟΡΕΥΣΗ ΤΩΝ ΖΩΟΤΡΟΦΩΝ ΖΩΙΚΗΣ ΠΡΟΕΛΕΥΣΗΣ (FEED BAN)**

Η Κοινότητα από το 1990 υιοθέτησε μέτρα για την προστασία της ανθρώπινης υγείας και της υγείας των ζώων από τον κίνδυνο της BSE. Τα μέτρα που λαμβάνονται από την ΕΕ για την αντιμετώπιση του προβλήματος της BSE απασχολούν τόσο τον τομέα της κτηνιατρικής νομοθεσίας – Μόνιμη Κτηνιατρική Επιτροπή (Standing Veterinary Committee), όσο και τον τομέα της νομοθεσίας για τις ζωοτροφές – Μόνιμη Επιτροπή Θρέψης των Ζώων (Standing Committee for Animal Nutrition). Όσον αφορά στην κτηνιατρική νομοθεσία, που φέρει και τον κύριο όγκο των ρυθμίσεων για θέματα προστασίας της υγείας των ζώων και της δημόσιας υγείας, βασικό νομοθέτημα αποτελεί η Οδηγία του Συμβουλίου 90/667/ΕΟΚ (EEC, 1990) που περιλαμβάνει κτηνιατρικούς κανόνες για τη διάθεση και επεξεργασία των ζωικών αποβλήτων, τη διάθεσή τους στην αγορά και την αποφυγή παθογόνων στις ζωοτροφές ζωικής προέλευσης. Όπως αναφέρεται στο «αιτιολογικό» της Απόφασης του Συμβουλίου 2000/766/ΕΚ (EU, 2000), τα πρώτα Κοινοτικά μέτρα για τον έλεγχο ορισμένων μεταποιημένων ζωικών πρωτεϊνών στη διατροφή των μηρυκαστικών τέθηκαν σε ισχύ τον Ιούλιο του 1994. Παράλληλα, στον τομέα της νομοθεσίας της διατροφής των ζώων και της εμπο-

ρίας των ζωοτροφών και προκειμένου να διασφαλιστεί ότι τηρούνται οι βασικές προϋποθέσεις παραγωγής και εμπορίας τους – ότι δηλαδή είναι υγιεινές, ανόθευτες, κατάλληλες για το ζώο που προορίζονται και ασφαλείς για την υγεία των ζώων – εκδόθηκαν οι παρακάτω Οδηγίες και Αποφάσεις.

Η Οδηγία 97/47/EK (EU, 1997a) τροποποίησε τόσο την Οδηγία 77/101/EOK που αφορά στις απλές ζωοτροφές όσο και στην Οδηγία 79/373/EOK που αφορά στις σύνθετες ζωοτροφές, ως προς τη σημασία τους και τη χρήση τους, ούτως ώστε οι Οδηγίες αυτές να ευθυγραμμιστούν ως προς την απαγόρευση της χρήσης πρωτεΐνης θηλαστικών για τα μηρυκαστικά. Ταυτόχρονα, την ίδια περίπου εποχή, και για λόγους σαφήνειας της Κοινοτικής Νομοθεσίας των ζωοτροφών, η Απόφαση της Επιτροπής 91/516/EOK (EEC, 1991) που καθιερώνει έναν κατάλογο απαγορευμένων συστατικών (negative list) που χρησιμοποιούνται στις σύνθετες ζωοτροφές (για λόγους υγείας των ζώων και δημόσιας υγείας), συμπληρώνεται με την Απόφαση 97/582/EK (EU, 1997b) με ένα επιπλέον συστατικό, το ένατο κατά σειρά, και συγκεκριμένα την «πρωτεΐνη θηλαστικών για διατροφή μηρυκαστικών», με την εξαίρεση του γάλακτος και προϊόντων γάλακτος, καθώς και της ζελατίνης.

Σε αυτές τις εξαιρέσεις με την Απόφαση της Επιτροπής 1999/420/EK (EU, 1999a) προστέθηκαν επίσης οι «υδρολυθείσες πρωτεΐνες με μοριακό βάρος κάτω των 10.000 Daltons, οι οποίες προέρχονται από δορές και δέρματα ζώων...» παραγόμενες κάτω από ορισμένες συνθήκες. Το 1998 η ΕΕ, με σκοπό να ελέγξει επίσημα την παρουσία στις ζωοτροφές συστατικών ζωικής προέλευσης, υιοθέτησε την Οδηγία 98/88/EEC (EEC, 1998), με την οποία καθιέρωνε κατευθυντήριες γραμμές για τον επίσημο μικροσκοπικό έλεγχο των ζωοτροφών.

Περαιτέρω, στον κτηνιατρικό τομέα, η Κατευθυντήρια Επιστημονική Επιτροπή (Scientific Steering Committee – SSC) υιοθέτησε μια γνώμη, αμέσως μετά τη συνάντησή της, στις 27-28 Νοεμβρίου 2000, με την οποία συστήνει την προσωρινή απαγόρευση της χορήγησης μεταποιημένης ζωικής πρωτεΐνης σε ζώα τα οποία διατηρούνται, παχύνονται ή αναπαράγονται για την παραγωγή τροφίμων. Το σκεπτικό ήταν ότι δεν μπορεί να αποκλειστεί ο κίνδυνος της επιμόλυνσης της ζωοτροφής των μηρυκαστικών με ζωοτροφές άλλων ζώων που περιέχουν ζωικές πρωτεΐνες, οι οποίες πιθανόν να έχουν επιμολυνθεί με τον παράγοντα της BSE.

Η Απόφαση του Συμβουλίου 2000/766/EEC, η οποία υιοθετήθηκε από το Συμβούλιο Υπουργών Γεωργίας το Δεκέμβριο του 2000, αμέσως μετά τη συζήτηση της γνώμης της SSC, όρισε ότι η «Μεταποιημένη Ζωική Πρωτεΐνη» (Processed Animal Protein – PAP) περιλαμβάνει: οστεοκρεατάλευρο, κρεατάλευρο, οστεάλευρο, αιματάλευρο, αφυδατωμένο πλάσμα και άλλα προϊόντα αίματος, υδρολυμένη πρωτεΐνη, άλευρο χηλών, άλευρο κεράτων, πτηνάλευρο, πτεράλευρο, αφυδατωμένα ινώδη υπολείμματα επεξεργασίας ζωικού λίπους, ιχθυάλευρο, φωσφορικό διασβέστιο, ζελατίνη και κάθε άλλο παρόμοιο προϊόν συμπεριλαμβανομένων μιγμάτων, ζωοτροφών, προσθέτων και προμιγμάτων που περιέχουν αυτά τα προϊόντα, και απαγορεύει τη χρησιμοποίηση των προϊόντων αυτών σε ζώα τα οποία διατηρούνται, παχύνονται ή αναπαράγονται για την παραγωγή τροφίμων. Εξαιρέσεις αποτέλεσαν: (i) χορήγηση ιχθυάλευρων σε ζώα άλλα πλην των μηρυκαστικών, (ii) χορήγηση στα μη-μηρυκαστικά ζελατίνης για χρήση ως περιβλήμα (coating) στα πρόσθετα ζωοτροφών, (iii) φωσφορικό διασβέστιο και υδρολυθείσα πρωτεΐνη για χορήγηση στα μη-μηρυκαστικά και (iv) γάλα και προϊόντα γάλακτος, αυγά και προϊόντα αυγών. Θα πρέπει να υπογραμμιστεί ότι οι εξαιρέσεις εφαρμόζονται μόνο όπου η σχετική βιομηχανία λειτουργεί σύμφωνα με συνθήκες που έχουν θεσπιστεί στην Απόφαση της Επιτροπής 2001/9/EEC (EEC, 2001). Ο Knock (2002) σχολίασε την εφαρμογή των απαραίτητων διαδικασιών ελέγχου για την περίπτωση του Ηνωμένου Βασιλείου.

Επιπλέον, η ΕΕ την 1 Ιουλίου 2001 υιοθέτησε τον Κανονισμό (EC) No 999/2001 (EU, 2001), ο οποίος αποσκοπεί στην παροχή μιας διασφάλισης, για νομική βάση στην Κοινοτική επικράτεια, μέτρων κατά της TSE. Ο Κανονισμός αυτός προβλέπει κανόνες για τη χορήγηση πρωτεϊνών που προέρχονται από ιστούς ζώων, προκειμένου να προληφθεί η εξάπλωση των TSE, και ουσιαστικά θεσπίζει τη μηδενική ανοχή για τα απαγορευμένα συστατικά στις ζωοτροφές. Αυτός ο Κανονισμός είναι γνωστός ως «Γενικός Κανονισμός για τις TSE».

Σε ένα περαιτέρω βήμα, ο Κανονισμός No 1774/2002 (EU, 2002) θέτει κανόνες υγιεινής που αφορούν σε υποπροϊόντα ζωικής προέλευσης που δεν προορίζονται για ανθρώπινη κατανάλωση. Αυτό το κομμάτι της νομοθεσίας, γνωστό ως Νομοθεσία για τα Ζωικά Υποπροϊόντα (Animal By-product – ABP), θέτει κανόνες για υποπροϊόντα ζωικής προέλευσης, τέτοια όπως

ζωοτροφές για ζώα συντροφιάς και οστεοκρεατάλευρα, τα οποία παράγονται από ζωικά υποπροϊόντα. Ο Κανονισμός αυτός, επίσης, λαμβάνει υπ' όψιν του τις γνώμες που δίνει η SSC, η οποία προτείνει ότι οι ζωοτροφές θα πρέπει να προέρχονται μόνο από υλικά τα οποία είναι κατάλληλα για ανθρώπινη κατανάλωση. Επομένως, ο Κανονισμός απαγορεύει τη χρήση στη διατροφή των ζώων υλικών υψηλού κινδύνου. Ο Κανονισμός για τα Ζωικά Υποπροϊόντα απαγορεύει στη διατροφή των αγροτικών ζώων τη χρήση ζωικής πρωτεΐνης που προέρχεται από το ίδιο είδος ζώου, δηλαδή τον «κανιβαλισμό», με άλλα λόγια εμποδίζει την κατανάλωση πρωτεΐνης ενός ζώου από ζώο του αυτού είδους. Ο Knock (2003) σχολιάζει την εφαρμογή του Κανονισμού 1774/2002 στο Ηνωμένο Βασίλειο.

Αργότερα, το Παράρτημα IV του Κανονισμού 999/2001/EK τροποποιείται εκ νέου από τον Κανονισμό (ΕΚ) Νο 1234/2003 (ΕΥ, 2003a) για τη θέσπιση κανόνων πρόληψης, καταπολέμησης και εξάλειψης ορισμένων ΤSE. Αυτό έγινε μετά από υιοθέτηση νέας γνώμης της SSC για την ασφάλεια του όξινου φωσφορικού ασβεστίου, καθώς και του φωσφορικού ασβεστίου, προερχόμενων από οστά βοοειδών. Ο Κανονισμός αυτός καταργεί τις Αποφάσεις 2000/766/EK και 2001/9/EK. Στο «αιτιολογικό» τμήμα του ίδιου Κανονισμού η Επιτροπή δηλώνει ότι η απαγόρευση της χρησιμοποίησης του ιχθυάλευρου στα μηρυκαστικά, καθώς και της πρωτεΐνης από ιστούς πτηνών και χοίρων για εκτρεφόμενα ζώα πλην των μηρυκαστικών, θα πρέπει να αναθεωρηθεί όταν και εφόσον τα εργαλεία ελέγχου και το επίπεδο εφαρμογής των ισχυουσών διατάξεων σε όλα τα Κράτη-Μέλη καταστούν ικανοποιητικά.

Το 2003 η Επιτροπή, προκειμένου να ελεγχθεί η εφαρμογή των απαγορευτικών διατάξεων που αφορούσαν στις ζωοτροφές, υιοθέτησε την Οδηγία 2003/126/ΕΟΚ (ΕΥ, 2003b), η οποία καθιερώνει αναλυτική μέθοδο για το μικροσκοπικό προσδιορισμό συστατικών ζωικής προέλευσης κατά τον επίσημο έλεγχο των ζωοτροφών και αντικαθιστά τη σχετική Οδηγία 98/88/ΕΚ. Η μικροσκοπική μέθοδος της Οδηγίας 98/88/ΕΚ την εποχή εκείνη ήταν η μόνη μέθοδος που είχε επικυρωθεί για τον έλεγχο της παρουσίας ζωικών πρωτεϊνών στις ζωοτροφές, συμπεριλαμβανομένων και των πρωτεϊνών που είχαν υποστεί θερμική επεξεργασία στους 133 °C/3 Bar/20 min. Η ανάγκη για την αντικατάσταση της Οδηγίας 98/88/ΕΚ με την 2003/126/ΕΚ προέκυψε από μια συγκριτική μελέτη

για τον προσδιορισμό PAP, η οποία κατέδειξε ότι οι παραλλαγές κατά την εφαρμογή των μικροσκοπικών δοκιμών που θέτει η Οδηγία 98/88/ΕΚ οδήγησαν σε σημαντικές διαφορές μεταξύ των Κρατών-Μελών όσον αφορά στην ευαισθησία, εξειδίκευση και ακρίβεια της μεθόδου. Το συμπέρασμα που εξήχθη ήταν ότι, με σκοπό την εναρμόνιση και βελτίωση του προσδιορισμού της PAP, οι διατάξεις που αφορούν στη μικροσκοπική μέθοδο θα πρέπει να γίνουν πιο εξειδικευμένες και υποχρεωτικές. Ήταν απαραίτητο να διασφαλιστεί ότι οι αναλυτές που εκτελούν τη μέθοδο είναι επαρκώς εκπαιδευμένοι, αφού η επίδοση της μεθόδου εξαρτάται από τη δεξιότητα του αναλυτή. Μετά την έκδοση της Οδηγίας, αυτή είναι πλέον η επίσημη μέθοδος για τον έλεγχο της παρουσίας της PAP στα πλαίσια του προγράμματος των συντονισμένων επιθεωρήσεων στο πεδίο της θρέψης των ζώων. Επιπλέον, τα εργαστήρια που διεξάγουν επίσημους ελέγχους για την παρουσία συστατικών ζωικής προέλευσης στις ζωοτροφές, θα πρέπει να συμμετέχουν περιοδικά σε δοκιμές επάρκειας εκτέλεσης αυτής της αναλυτικής μεθόδου, ενώ πρέπει το προσωπικό των εργαστηρίων που διεξάγει αυτήν την ανάλυση να λαμβάνει επαρκή εκπαίδευση.

Ο Κανονισμός (ΕΚ) 1292/2005 (ΕΥ, 2005) τροποποίησε το Παράρτημα IV του Κανονισμού (ΕΚ) Νο 999/2001 σχετικά με τις εξαιρέσεις από την απαγόρευση ζωικών συστατικών στη διατροφή των ζώων. Στην πραγματικότητα, εισάγει νέες εξαιρέσεις που περιλαμβάνουν μεταξύ των άλλων: 1) τη διατροφή μηρυκαστικών με προϊόντα υδρόλυσης πρωτεϊνών από δορές και δέρματα μηρυκαστικών και 2) τη χορήγηση σε εκτρεφόμενα ζώα κονδυλωδών και ριζωματωδών φυτών στα οποία ανιχνεύθηκαν ίχνη θραυσμάτων οστών. Οι περιπτώσεις 1 και 2 εφαρμόζονται υπό ορισμένες προϋποθέσεις. Η τελευταία εξαίρεση προέκυψε ως αποτέλεσμα της σημαντικής βελτίωσης της ικανότητας των επίσημων μεθόδων (Οδηγία 2003/126/ΕΚ) και της ανίχνευσης τυχαίας παρουσίας θραυσμάτων οστών, ιδίως σε καλλιέργειες κονδυλωδών και ριζωματωδών φυτών (τυχαία παρουσία στο έδαφος).

Επιπλέον, με τον Κανονισμό (ΕΚ) 956/2008 (ΕΥ, 2008) η χρήση ιχθυάλευρου για τη διατροφή των νεαρών μηρυκαστικών εγκρίνεται μόνο για την παραγωγή υποκατάστατων γάλακτος, τα οποία κυκλοφορούν σε ξηρή μορφή και χορηγούνται κατόπιν διάλυσης σε μια ορισμένη ποσότητα υγρού και προορίζονται για τη διατροφή θηλαζόντων μηρυκαστικών, ως συμπλή-

ρωμα ή υποκατάστατο για την περίοδο μετά το πρωτόγαλα και προ του απογαλακτισμού.

Μετά την τροποποίηση του Παραρτήματος IV του Κανονισμού (ΕΚ) 999/2001, που αφορά στην εξαίρεση από τη γενική απαγόρευση της διατροφής του ζώου των κονδυλωδών και ριζωματωδών καλλιιεργειών στις οποίες βρέθηκαν ασήμαντες ποσότητες οστών (Κανονισμός της Επιτροπής 1252/2005), εξεδόθη νέος Κανονισμός της Επιτροπής 163/2009 (ΕΥ, 2009a) με τον οποίο επεκτάθηκε αυτή η εξαίρεση σε κάθε πρώτη ύλη ζωοτροφών φυτικής προέλευσης, καθώς και στις σύνθετες ζωοτροφές που τις περιέχουν, κάτω από ορισμένες ρητές προϋποθέσεις. Οι εξαιρέσεις αυτές αφορούν καθαρά σε περιβαλλοντικές επιμολύνσεις και ουσιαστικά αίρουν τη μηδενική ανοχή (zero tolerance) στην παρουσία ζωικών συστατικών, που είχε αρχικά θεσπιστεί για τις ζωοτροφές.

Τελικά, η χρήση του ιχθυάλευρου επιτρέπεται στη διατροφή των μη-μηρυκαστικών ζώων, καθώς και στα θηλάζοντα μηρυκαστικά προ του απογαλακτισμού, ως συστατικό των υποκατάστατων γάλακτος. Στο σημείο αυτό θα πρέπει να αναφερθούν δυο θέματα τα οποία τη στιγμή αυτή τελούν υπό συζήτηση και των οποίων η υιοθέτηση ακόμη εκκρεμεί. Το ένα αφορά στη χρήση του βοείου λίπους και το άλλο στην εξαίρεση από τη γενική απαγόρευση της ζωικής πρωτεΐνης εκείνων των πρώτων υλών ώστε να ισχύσει η χρησιμοποίηση ζωικής προέλευσης ζωοτροφών για τη διατροφή μεταξύ διαφορετικών ειδών μη-μηρυκαστικών αγροτικών ζώων (species to species). Σχετικά με το τελευταίο, στο «αιτιολογικό» του Κανονισμού της Επιτροπής 1292/2005 αναφέρεται ότι η γνώμη της SSC της 27 & 28 Νοεμβρίου 2000 συνίσταται στο ότι δεν υπάρχει μαρτυρία για τη φυσική εκδήλωση της TSE σε μη-μηρυκαστικά εκτρεφόμενα ζώα για την παραγωγή τροφίμων, όπως οι χοίροι και τα πτηνά.

## Η ΑΝΙΧΝΕΥΣΗ ΚΑΙ ΤΑΥΤΟΠΟΙΗΣΗ ΖΩΙΚΗΣ ΠΡΩΤΕΪΝΗΣ ΣΤΙΣ ΖΩΟΤΡΟΦΕΣ

Η Κοινοτική απαγόρευση ζωικής πρωτεΐνης στις ζωοτροφές προϋποθέτει ότι θα πρέπει να υπάρχει μέθοδος για την ανίχνευση των PAP σε ζωοτροφές, είτε σύνθετες είτε απλές. Μια τέτοια μέθοδος για σκοπούς «ρουτίνας» θα πρέπει να έχει ορισμένα χαρακτηριστικά, δηλαδή να είναι ευθνή, ταχεία, αλλά επίσης ακριβής. Επιπλέον, όταν θα δοκιμασθεί σε διάφορα εργαστήρια (ring test), θα πρέπει να έχει επαρκή αποτελεσματικότητα ώστε να ικανοποιεί στατιστικά τις

ανάγκες για επαναληψιμότητα (repeatability) και αναπαραγωγιμότητα (reproducibility). Εν τούτοις, εμφανίζεται ότι είναι δύσκολο να συνδυαστούν σε μια μέθοδο ταυτόχρονα όλα τα παραπάνω πλεονεκτήματα, γιατί υπάρχουν προβλήματα που συνδέονται με τη διεξαγωγή κάθε μιας από τις διαθέσιμες μεθόδους για την ανίχνευση της PAP, καθώς και με την ταυτοποίησή της. Τέτοια προβλήματα περιλαμβάνουν την ταυτόχρονη παρουσία δυο τύπων ζωικής πρωτεΐνης, θηλαστικών με ιχθυάλευρο, την απαίτηση για μηδενική ανοχή ή το να είναι κανείς πιο γενναιόδωρος, με όρια ανοχής όταν απαιτούνται, την ανάγκη για ποσοτικοποίηση κ.λπ. Κατωτέρω πρόκειται να προβούμε σε μια παρουσίαση των υπαρχουσών μεθόδων ανίχνευσης και ταυτοποίησης της PAP σε ζωοτροφές.

### Μικροσκοπία

Η κλασική μικροσκοπία, όπως αποκαλείται, χρησιμοποιείται από παλιά ως εργαλείο για την ταυτοποίηση των ζωοτροφών είτε ως απλές είτε ως συστατικά σύνθετων ζωοτροφών (AAFMM, 1978). Η ΕΟΚ στο παρελθόν είχε επιχειρήσει τη μελέτη της μικροσκοπίας των ζωοτροφών ως ένα μέσο για τον έλεγχο της προταθείσας την εποχή εκείνη «ανοικτής δήλωσης» (open declaration ή open formula), δηλαδή το να δώσει κανείς στην ετικέτα της σήμανσης των σύνθετων ζωοτροφών (μίγμάτων) την ακριβή εκατοστιαία αναλογία των περιεχόμενων συστατικών ζωοτροφών του μίγματος και όχι μόνο τα συστατικά σε φθίνουσα τάξη αναλογίας στο μίγμα, ή κατηγορίες συστατικών (δημητριακοί καρποί, ελαιούχοι σπόροι κ.λπ.). Στο τέλος της δεκαετίας του '80 διεξήχθη μια μελέτη μεταξύ των Κρατών-Μελών της Κοινότητας συντονισμένη από την Επιτροπή πάνω στη μικροσκοπία των ζωοτροφών, αλλά τα αποτελέσματα αυτής της μελέτης υπήρξαν απογοητευτικά (Zoiopoulos & Drosinos, 2010). Στην πραγματικότητα, αν και η ποσοτική εκτίμηση των συστατικών ήταν πέρα κάθε προσεγγίσεως, ακόμη και στην ποιοτική πλευρά, συστατικά όπως το άλευρο ελαιοκράμβης ή το άλευρο αποξηραμένων στεμφύλων εσπεριδοειδών, απεδείχθησαν πολύ δύσκολα για να ταυτοποιηθούν από τα Νότια και Βόρεια Κράτη-Μέλη της Κοινότητας, αντίστοιχα, ενώ το λινάλευρο απεδείχθη πολύ δύσκολο για την πλειονότητα των εμπλεκόμενων στη μελέτη χωρών. Μόνο δύο Κράτη-Μέλη, η Γερμανία και η Δανία, οι οποίες παραδοσιακά ήταν υποστηρικτές της «ανοικτής δήλωσης» – του πιο κατατοπιστικού και επομένως πιο δίκαιου συστήματος σήμανσης για τον εκτροφέα –

είχαν καλή επίδοση στην παραπάνω μελέτη. Αυτή η μελέτη έδειξε ότι η εμπειρία του αναλυτού της μικροσκοπίας ζωοτροφών ήταν πολύ κρίσιμη στη συνολική επίδοση του εμπλεκόμενου εργαστηρίου.

Ήταν, μετά το συμβάν με τη BSE στο δεύτερο μισό της δεκαετίας του '90, όταν η Γερμανική Προεδρία του Συμβουλίου της ΕΕ ζήτησε από το CO.RE.PER. (Επιτροπή των Μονίμων Αντιπροσώπων) να αναλάβει την πρωτοβουλία να εξετάσει τρόπους βελτίωσης της πληροφόρησης που δίνεται στους εκτροφείς, μέσω της υποχρεωτικής σήμανσης των σύνθετων ζωοτροφών. Παράλληλα, το Ευρωπαϊκό Κοινοβούλιο συνέστησε και το Συμβούλιο διέταξε την Ευρωπαϊκή Επιτροπή, μετά το επεισόδιο των διοξινών το 1999 στο Βέλγιο, ώστε η Επιτροπή επείγεται να προτείνει μέτρα για την αύξηση της διαφάνειας και της ασφάλειας στη χρήση ζωοτροφών. Μεταξύ των προταθέντων μέτρων, η Επιτροπή πρότεινε την τροποποίηση της σχετικής Οδηγίας 79/373/ΕΟΚ (EEC, 1979) όσον αφορά στη σήμανση, ώστε η «ανοικτή δήλωση» να καταστεί υποχρεωτική. Την εποχή εκείνη, η υποστήριξη της «ανοικτής δήλωσης» μέσα στην Κοινότητα απείχε πολύ από το να κερδίσει την πλειοψηφία, αφού, αν και είναι το πιο δίκαιο σύστημα σήμανσης, εν τούτοις το έργο των αρμοδίων ελεγκτικών υπηρεσιών για την επαλήθευση της σήμανσης στην περίπτωση αυτή και σε Κοινοτικό επίπεδο, ήταν πολύ δύσκολο λόγω της έλλειψης μιας αξιόπιστης μεθόδου για τον ποσοτικό προσδιορισμό των διαφορών συστατικών των ζωοτροφών. Επιπλέον, η «ανοικτή δήλωση» δημιούργησε σημαντικά προβλήματα στη βιομηχανία ζωοτροφών, η οποία αντιμετώπιζε την ανάγκη για ταχεία αλλαγή σήμανσης κάθε φορά που συνέβαιναν αλλαγές στη διαθεσιμότητα πρώτων υλών στην πράξη. Σημειωτέον ότι η «ανοικτή δήλωση» είναι άμεσα συνδεδεμένη με τη μικροσκοπία των ζωοτροφών, συμπεριλαμβανομένων των συστατικών ζωικής προέλευσης, αλλά, παρά τις προσπάθειες για το αντίθετο, παραμένει ακόμη ως προαιρετική διάταξη (optional provision) στην Κοινοτική Νομοθεσία της εμπορίας των ζωοτροφών (EU, 2009b).

Εν τω μεταξύ η Επιτροπή εξέδωσε την Οδηγία 98/88 για την καθιέρωση κατευθυντήριων γραμμών για τη μικροσκοπική ταυτοποίηση και εκτίμηση των συστατικών ζωικής προέλευσης για τον επίσημο έλεγχο των ζωοτροφών (EU, 1998). Στο «αιτιολογικό» της Οδηγίας αυτής, η Επιτροπή εξηγεί ότι αυτό έγινε σε σχέση με τη λήψη μέτρων για την αντιμετώπιση

της BSE και τη σήμανση των ζωοτροφών. Επιπλέον, προσέθεσε ότι η παρουσία συστατικών ζωικής προέλευσης μπορεί να ευρεθεί με τη χρήση μικροσκοπικών εξετάσεων, όπως επίσης και η παρουσία θραυσμάτων οστών χερσαίων ζώων και οστών ιχθύων μπορεί να διακριθούν μεταξύ τους με μικροσκοπικό έλεγχο. Εντούτοις, η δυνατότητα διάκρισης, με μικροσκοπικό έλεγχο, μεταξύ οστών θηλαστικών και οστών πτηνών εξαρτάται από την εμπειρία του αναλυτή, όπως και η δυνατότητα εκτίμησης της περιεχόμενης ποσότητας των συστατικών ζωικής προέλευσης. Η Επιτροπή κατέληξε ότι θα ήταν κατάλληλο, και σύμφωνα με την πρόοδο της επιστημονικής και τεχνολογικής γνώσης, να συνδυάσει κανείς τη μικροσκοπική εξέταση με άλλες μεθόδους ανάλυσης. Η καθιέρωση κατευθυντήριων γραμμών για τη μικροσκοπική εξέταση δεν αποκλείει τη χρήση πρόσθετων ή εναλλακτικών μεθόδων ανάλυσης άλλων από τη μικροσκοπική εξέταση, η οποία έχει αποδειχθεί να είναι επιστημονικά αξιόπιστη, όπως ELISA, PCR, NIR.

Το Ευρωπαϊκό Κοινοβούλιο συνέστησε στην Επιτροπή το σχηματισμό μιας Ερευνητικής Επιτροπής για τη BSE για πιο αποτελεσματική σήμανση των σύνθετων ζωοτροφών (ανοικτή δήλωση). Έτσι, διεξήχθη μια μελέτη με τη συνεργασία πολλών εργαστηρίων (collaborative study) για την αξιολόγηση της μικροσκοπικής μεθόδου για την ποιοτική και ποσοτική ταυτοποίηση των οστεοκρεαταλευρών σε σύνθετες ζωοτροφές. Μια τέτοια υποχρέωση προϋποθέτει τη δυνατότητα των αρμόδιων αρχών να επαληθεύσουν τη συμμόρφωση της πληροφορίας που δίνεται στη σήμανση με την ακριβή σύνθεση του μίγματος. Τα αποτελέσματα αυτής της μελέτης τόνισαν τη δυνατότητα της ταυτοποίησης των συστατικών ζωικής προέλευσης σε σύνθετες ζωοτροφές με τη χρήση μικροσκοπικής εξέτασης, ακόμη και σε χαμηλές συγκεντρώσεις. Εν τούτοις, οι ποσοτικές εκτιμήσεις εξαρτώνται από την εμπειρία του αναλυτή, χωρίς να μπορούν πάντοτε να πετυχαίνουν καλή αναπαραγωγικότητα των αποτελεσμάτων. Έτσι, συνιστάται ο συνδυασμός με άλλες μεθόδους.

Τελικά, η Επιτροπή εξέδωσε την Οδηγία 2003/126/EK για την αναλυτική μέθοδο προσδιορισμού των συστατικών ζωικής προέλευσης για τον επίσημο έλεγχο των ζωοτροφών (EU, 2003). Στο «αιτιολογικό» της παραπάνω Οδηγίας, η Επιτροπή εξηγεί ότι η μέθοδος που περιγράφεται στην Οδηγία 98/88 είναι προς το παρόν η μόνη μέθοδος που έχει αξιολογηθεί για τον έλεγχο της παρουσίας ζωικής πρωτεΐνης σε

ζωοτροφές, συμπεριλαμβανομένων και εκείνων των πρωτεϊνών που έχουν υποστεί θερμοκή επεξεργασία στους 133 °C/3 Bar/20 min. Μια συγκριτική μελέτη για τον προσδιορισμό επεξεργασμένης ζωικής πρωτεΐνης έδειξε ότι η ποικιλία στην εφαρμογή των μικροσκοπικών δοκιμών που έχουν τεθεί στην Οδηγία 98/88, κατέληξε σε σημαντικές διαφορές στην ευαισθησία, εξειδίκευση και ακρίβεια των μεθόδων. Με σκοπό την εναρμόνιση και τη βελτίωση των προσδιορισμών των PAP, οι διατάξεις που αφορούν στη μικροσκοπική μέθοδο θα πρέπει να εξειδικευτούν περαιτέρω και να γίνουν υποχρεωτικές. Είναι αναγκαίο να διασφαλιστεί ότι οι αναλυτές που εκτελούν τη μέθοδο είναι επαρκώς εκπαιδευμένοι, αφού η επίδοσή τους εξαρτάται από τη δεξιότητα του αναλυτή.

Στο τμήμα της Οδηγίας 2003/126 με τίτλο «Αντικειμενικός σκοπός και πεδίο εφαρμογής» τονίζεται ότι μια δεύτερη δοκιμή μπορεί επίσης να διεξαχθεί χρησιμοποιώντας εναλλακτικές μεθόδους, με σκοπό τη βελτίωση της ανίχνευσης ορισμένων τύπων ζωικών συστατικών ή περαιτέρω εξειδίκευση της προέλευσης των ζωικών συστατικών. Επιπλέον, θα μπορεί να χρησιμοποιηθεί ένα πρωτόκολλο με παραλλαγές κατά την εξέταση ζωικών συστατικών τέτοιων όπως το πλάσμα αίματος ή θραυσμάτων οστών σε βόειο λίπος. Στο τμήμα της Οδηγίας με τίτλο «Αρχή» αναφέρεται ότι ειδικές ζωοτροφές ή πρώτες ύλες (π.χ. λίπη ή έλαια) απαιτούν ειδική μεταχείριση. Τα συστατικά ζωικής προέλευσης ταυτοποιούνται βάσει των τυπικών και μικροσκοπικά ταυτοποιούμενων συστατικών, δηλαδή μυϊκές ίνες και άλλα σωματίδια των κρεαταλεύρων, τένοντες, οστά, κέρατα, τρίχες, αίμα, πτερά, κελύφη ωών, ψαροκόκαλα, λέπια κ.λπ.

Η μικροσκοπική εξέταση είναι προς το παρόν η μόνη αποδεκτή μέθοδος για την ανίχνευση και χαρακτηρισμό των PAPs για τις ζωοτροφές στην ΕΕ, αφού με τη μέθοδο αυτή είναι δυνατό να ανιχνεύσει κανείς ρύπανση της τάξεως του 1g/kg με πρακτικά καθόλου εσφαλμένα αποτελέσματα, αρνητικής ή θετικής φύσης. Έχουν αναφερθεί επίπεδα ανίχνευσης χαμηλά της τάξεως των 0.2g/Kg οστεοκρεατάλευρων (Engling et al., 2000). Η μέθοδος αυτή εστιάζει κυρίως στην παρουσία και τα χαρακτηριστικά των θραυσμάτων οστών, αν και άλλες δομές, τέτοιες όπως των μυϊκών ινών, μπορούν να παράσχουν, κατά περίπτωση για το αντίστοιχο ζωικό είδος. Η μελλοντική χρήση της κλασικής μικροσκοπίας θα πρέπει να εστιάσει στην οργάνωση τμημάτων εκπαίδευσης και δοκιμές επαγ-

γελματικής επάρκειας των αναλυτών.

### **Μέθοδοι ανοσοδοκιμής (Immunoassays) και ανίχνευσης DNA**

Μια διαφορετική σύλληψη συγκρινόμενη με τη μικροσκοπία βασίζεται στην ανάλυση ειδικών πρωτεϊνών στις ζωοτροφές, επιτρέποντας κατ' αυτόν τον τρόπο την ανίχνευση των απαγορευμένων PAPs. Η πιο κοινή προσέγγιση για την ανάλυση αυτών των πρωτεϊνών είναι η ανάπτυξη ανοσοδοκιμών, κάνοντας χρήση της εξειδικευμένης αντίδρασης αντισώματος-αντιγόνου (Hitchcock & Crimes, 1985). Μολονότι η μέθοδος Enzyme-Linked Immuno-absorbent Assay (ELISA) έχει ευρείες εφαρμογές στην ανάλυση των τροφίμων και των ζωοτροφών, είναι σημαντικό να αντιληφθεί κανείς ότι η θετική αντίδραση που αφορά στην παρουσία ειδικών PAPs που λαμβάνονται με μια ανοσοδοκιμή έχει κυρίως ενδεικτικό μόνο χαρακτήρα και είναι ανάγκη να επιβεβαιωθεί με άλλες μεθόδους. Οι ανοσοδοκιμές αναμένεται να παίξουν ένα σπουδαίο ρόλο στην ανίχνευση των PAPs που είναι παρούσες σε επίπεδα ιχνών στις ζωοτροφές. Θεωρώντας τις περίπλοκες απαιτήσεις των ελέγχων, δηλαδή την ολική απαγόρευση των οστεο-κρεατάλευρων έναντι της ταυτοποίησης του είδους, η μέθοδος αυτή πρέπει να ενσωματωθεί σε μια συνολική στρατηγική ελέγχου, που να συνδυάζει τα ειδικά της πλεονεκτήματα με αυτά των άλλων μεθόδων. Σημαντικές βελτιώσεις, επίσης, επιτεύχθηκαν στην τεχνική της ανοσοδοκιμής (Bellorini et al., 2005) και δεν υπάρχει αμφιβολία ότι κάποιες προσεγγίσεις είναι έτοιμες για τελικές μελέτες αξιολόγησης. Δεδομένης της απλότητας αυτών των δοκιμών, της δυνατότητας ανάλυσης μεγάλου αριθμού δειγμάτων, της αποδεδειγμένης ευαισθησίας και εκλεκτικότητας, οι ανοσοδοκιμές θα παίξουν ένα πολύ σπουδαίο ρόλο σε μια μελλοντική στρατηγική για την ασφάλεια των ζωοτροφών.

Η ιδέα της εφαρμογής μεθόδων ανίχνευσης DNA ως ένα αναλυτικό εργαλείο για να δείξει κανείς την παρουσία οστεο-κρεατάλευρων στις ζωοτροφές εισήχθη από τον Tartaglia et al. (1998). Έχουν δημοσιευθεί πολλά άρθρα γύρω από πιθανούς στόχους της Polymerase Chain Reaction (PCR) ή της real-time PCR πάνω στην ανίχνευση οστεοκρεατάλευρων στις ζωοτροφές (Chiappini et al., 2005; Fumierre et al., 2006; Mendoza-Romero et al., 2004). Η μέθοδος PCR, επί της αρχής, θα μπορούσε να είναι ο μελλοντικός «ακρογωνιαίος λίθος» της ανάλυσης των ζωοτροφών, αφού συνδυάζει τόσο τις απαιτήσεις μιας υψηλής εξειδί-

κευσης ως προς το είδος του ζώου όσο και της υψηλής της αξιοπιστίας για περιπτώσεις κατά τις οποίες κινείται η δικαστική διαδικασία. Αρκετές ερευνητικές εξελίξεις οδήγησαν σε μια σημαντική βελτίωση ενός ειδικού πρωτοκόλλου PCR που ακόμη χρειάζεται να επιβεβαιωθεί σε συγκριτικές μελέτες.

### Άλλες μέθοδοι

Η Near Infrared (NIR) μικροσκοπία, αλλά και προωθημένα όργανα όπως η IR camera ή άλλες μη-καταστρεπτικές μέθοδοι (non-destructive) συμπεριλαμβανομένης της μεθόδου NIR imaging spectroscopy (Fernandes-Pierna et al., 2004), έχουν δείξει το δυνατό τους στην ανάλυση των ζωοτροφών με τη δυνατότητα χειρισμού πολύ μεγάλου αριθμού δειγμάτων με αποδεδειγμένα χαρακτηριστικά καλής απόδοσης (Beaten et al., 2005). Εντούτοις, αυτή η προσέγγιση χρειάζεται ακόμη να αξιολογηθεί καθ' ολοκληρίαν πριν η εφαρμογή της μπορεί να θεωρηθεί και από άλλα εργαστήρια. Η μέθοδος HPLC-διπεπτιδίων ιστιδίνης (Conception Aristoy & Toldra, 2004) και οι Ολφατομετρικές μέθοδοι, που βασίζονται στην ανίχνευση διαφόρων πτητικών ενώσεων στις PAP (Carnagnoli et al., 2004), στηρίζονται και οι δυο σε πολύ γενικούς ή μη-εξειδικευμένους δείκτες για το είδος του ζώου. Αν και μπορεί να επιτευχθεί ένα επαρκές επίπεδο ανίχνευσης, η ανίχνευση των PAPs από χερσαία ζώα στην παρουσία υλικού από ιχθείς είναι στην ουσία αδύνατη λόγω της μη-εξειδίκευσης των, προς το παρόν, επιλεγόμενων δεικτών. Επίσης, έχει αναφερθεί η ανίχνευση πεπτιδίων προερχόμενων από ζελατίνη στις ζωοτροφές με Φασματομετρία Μάζης (Fernandes-Ocana et al., 2004). Συνολικά, οι Gizzi et al. (2004) ανέφεραν τα αποτελέσματα μιας συγκριτικής μελέτης για τον προσδιορισμό της παρουσίας των PAPs, συμπεριλαμβανομένου και του κρεατάλευρου από διάφορα είδη ζώων. Στη μελέτη αυτή συγκρίθηκε η επίδοση διαφόρων μεθόδων, όπως η μικροσκοπία, PCR, ανοσοδοκιμές και ένα πρωτόκολλο αναφερόμενο στην υγρή χρωματογραφία (LC). Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι ο αξιόπιστος προσδιορισμός οστεοκρεατάλευρων από μηρυκαστικά ζώα δεν έχει ακόμη επιλυθεί, ιδιαίτερα για χαμηλές συγκεντρώσεις οστεοκρεατάλευρων στις ζωοτροφές. Η σύγκριση των αποτελεσμάτων για κρεατάλευρα από θηλαστικά για όλες τις μεθόδους έδειξε ότι, για ελεγκτικούς σκοπούς, η μέθοδος ανοσοδοκιμής θα μπορούσε να χρησιμοποιηθεί ως μια ταχεία μέθοδος ποιοτικής ανίχνευσης (screening) συνδυαζόμενη με τη μικροσκοπία για επι-

βεβαίωση των θετικών δειγμάτων.

Μια λεπτομερής ανασκόπηση στο αντικείμενο αυτό έχει δημοσιευθεί από τους van Raamsdonk et al. (2007). Οι ερευνητές αυτοί παρουσιάζουν τα αποτελέσματα 5 διαφορετικών Κοινοτικών μελετών επάρκειας εργαστηρίων (ring-tests) που οργανώθηκαν από το 2003 και εντεύθεν. Η εργαστηριακή μελέτη έδειξε ότι μια μικροσκοπική ανίχνευση της τάξεως των 0.98% μπορεί να επιτευχθεί, υπό την προϋπόθεση ότι το εφαρμοζόμενο πρωτόκολλο και η επάρκεια του επιπέδου εμπειρίας του αναλυτή θα είναι άριστα. Πιο πρόσφατες μελέτες έδειξαν ότι η εκπαίδευση, η εφαρμογή ενός συστήματος αποφασιστικής υποστήριξης και η χρήση ενός βελτιωμένου πρωτοκόλλου μικροσκοπίας, είχαν ως αποτέλεσμα την υψηλότερη ευαισθησία της μεθόδου. Μια ελκυστική προσέγγιση αποτελεί ο συνδυασμός της μικροσκοπίας για την ανίχνευση χαμηλών επιπέδων ρύπανσης, με την ταυτοποίηση από άλλες μεθόδους. Επίσης, έχουν προταθεί αρκετές στρατηγικές για τον συνδυασμό μεθόδων ποιοτικής ανίχνευσης και επιβεβαίωσης. Οι εξελίξεις στη μεθοδολογία θα υποστηρίξουν την τρέχουσα ή μια μελλοντική νομοθεσία.

### ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑ

Το συμβάν με τη BSE, το οποίο έλαβε χώρα στο δεύτερο μισό της δεκαετίας του '90, «τράνταξε» την Ευρωπαϊκή Κοινότητα. Η αιτία απεδόθη στην κατάλυση από μηρυκαστικά μολυσμένης πρωτεΐνης θηλαστικών. Οι αρχές της ΕΕ έλαβαν μια σειρά νομοθετικών μέτρων για την απαγόρευση χρήσης διαφόρων τύπων ζωικής πρωτεΐνης στη διατροφή των αγροτικών ζώων. Επιπλέον, δημοσίευσαν κατευθυντήριες γραμμές (1998) και τελικά μια υποχρεωτική μικροσκοπική μέθοδο για την ταυτοποίηση της ζωικής πρωτεΐνης στις ζωοτροφές (2003), ώστε να ελεγχθεί η κατάσταση στην πράξη της διατροφής των ζώων. Οι επιθεωρήσεις στην Κοινοτική Επικράτεια δείχνουν ότι τα μέτρα που παίρνονται για την αντιμετώπιση της BSE είναι αποτελεσματικά και στη σωστή κατεύθυνση. Οι νέες εξελίξεις για μεθόδους τόσο ποιοτικής ανίχνευσης όσο και ταυτοποίησης για ζωικές πρωτεΐνες στις ζωοτροφές υπόσχονται ότι μπορεί να αναμένεται μια κατάλληλη και επαρκής υποστήριξη για τη νομοθεσία, συμπεριλαμβανομένης και της υπερνίκησης των προβλημάτων που πηγάζουν από την εισαγωγή των νέων εξαιρέσεων.

## REFERENCES - ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- AAFM (1978) Manual of microscopic analysis of feedingstuffs. (2nd Edition). USA: American Association of Feed Microscopists.
- Beaten V, von Holst C, Carrido A, Vancutsem J, Michotte Renier A, Dardenne P. (2005) Detection of banned meat and bone meal in feedstuffs by near infrared microscopic analysis of the dense sediment fraction. *Anal. Bioanal. Chem.* 382: 149-157.
- Bellorini S, Strathmann S, Beaten V, Fumiere O, Berben G, Tirendi S, von Holst C (2005) Discriminative animal fats and their origins: assessing the potential of Fourier transform infrared spectroscopy, gas chromatography, immunoassay and polymerase chain reaction techniques. *Anal. Bioanal. Chem.* 282: 1073-1083.
- Campagnoli A, Pinotti L, Tognon G, Cheli F, Baldi A, Dell Orto V (2004) Potential application of electronic nose in processed animal proteins (PAP) detection in feedingstuffs. *Biotechnol. Agron. Soc. Environ.* 8: 253-255.
- Chiappini B, Brambilla G, Agrimi U, Vacceri G, Aaarts, HJM, Berben G, Frezza D Giamba V (2005) Real-time polymerase chain reaction approach for quantification of ruminant-specific DNA to indicate a correlation between DNA amount and meat and bone meal heat treatments. *J. AOAC Int.*, 88: 1399-1403.
- Conception Aristoy M, Toldra F (2004). Histidine dipeptides HPLC-based test for the detection of mammalian origin proteins in feeds for ruminants. *Meat Sci.* 67: 211-217.
- Engling FP, Jorgenson JJ, Paradies-Severin I, Hahn H (2000) Evidence of animal meal in feeds. *Kraftfutter Feed Mag.* 1: 14-17.
- EEC (1979) Council Directive 79/373/EEC of 23 November 1977 on the marketing of straight feedingstuffs. *Off. J. Eur. Comm.*, L.32, 3.2.1979, p.1.
- EEC (1990) Council Directive 90/667/EEC of 27 November 1990 laying down the veterinary rules for the disposal and processing of animal waste for its placing on the market and for the prevention of pathogens in feedstuffs of fish origin. *Off. J. Eur. Comm.*, L.363, 27.12.1990, p.31.
- EEC (1991) Commission Decision 91/516/EEC of 9 September 1991 establishing a list of ingredients whose use is prohibited in compound feedingstuffs. *Off. J. Eur. Comm.*, L.281, 9.10.1991, p.23.
- EU (1997a) Commission Directive 97/47/EC amending Council Directive 77/101/EEC, 79/373/EEC and 91/357/EEC. *Off. J. Eur. Union*, L.211, 5.8.1997, p.45.
- EU (1997b) Commission Decision 97/582/EC of 28 July 1997 amending Commission Decision 91/516/EC. *Off. J. Eur. Union*, L.234, 28.8.1997, p.39.
- EU (1998) Commission Directive 98/88/EC of 13 November 1998 establishing guidelines for the microscopic identification and estimation of constituents of animal origin for the official control of feedingstuffs, (2000/766/EC). *Off. J. Eur. Union*, L.318, 27.11.1998, p.45.
- EU (1999a) Commission Decision 999/420/EC of 18 June 1999 amending Commission Decision 91/516/EEC. *Off. J. Eur. Union*, L.162, 26.6.1999, p.69.
- EU (1999b) Council Decision 1999/534/EC of 19 July 1999 on measures applying to the processing of certain animal waste to protect against TSEs and amending Commission Directive 97/735/EC. *Off. J. Eur. Union*, L.204, 4.8.1999, p.37.
- EU (2000) Council Decision 2000/766/EC of 4 December 2000 concerning certain protection measures with regard to transmissible spongiform encephalopathies and the feeding of animal protein. *Off. J. Eur. Union*, L.306, 7.12.2000, p.32.
- EU (2001) Regulation (EC) No 999/2001 of the European Parliament and of the Council of 22 May 2001 laying down rules for the prevention, control and eradication of certain transmissible spongiform encephalopathies, *Off. J. Eur. Union*, L.147, 31.5.2001, p.1.
- EU (2002) Regulation (EC) No 1774/2002 of the European Parliament and of the Council of 3 October 2002 laying down health rules concerning animal by-products not intended for human consumption. *Off. J. Eur. Union*, L.273, 10.10.2002, p.1.
- EU (2003a) Commission Regulation (EC) No 1234/2003 of 10 July 2003 amending Annexes I and IX of Regulation 999/2001. *Off. J. Eur. Union*, L.173, 11.7.2003, p.6.
- EU (2003b) Commission Directive 2003/126/EC of 23 December 2003 on the analytical method for the determination of constituents of animal origin for the official control of feedingstuffs. *Off. J. Eur. Union*, L.339, 24.12.2003, p.78.
- EU (2005) Commission Regulation (EC) No 1292/2005 of 5 August 2005 amending Annex IV of Regulation (EC) No 999/2001. *Off. J. Eur. Union*, L.205, 6.8.2005, p.3.
- EU (2008) Commission Regulation (EC) No 956/2008 of 29 September 2008 amending Annex IV of Regulation (EC) No 999/2001. *Off. J. Eur. Union*, L.260, 30.9.2008, p.8.
- EU (2009a) Commission Regulation (EC) No 163/2009 of 26 February 2009 amending Annex IV of Regulation (EC) 999/2001. *Off. J. Eur. Union*, L.55, p.17.
- EU (2009b) Commission Regulation (EC) No 787/2009 of the European Parliament and of the Council of 13 July 2009 on the placing on the market and use of feed. *Off. J. Eur. Union*, L.229, 1.9.2009, p.1.
- Fernandez-Pierna JA, Beaten V, Michotte-Renier A, Cogdill RP, Dardenne P (2004) Combination of support vector machines (SVM) and near infrared (NIR) imaging spectroscopy for the detection of meat and bone meal (MBM) in compound feeds. *J. Chemom.* 18: 341-349.
- Flachowsky G, Danicke S (2005) From feed to safe food-Contribution of animal nutrition to the safety of food. In: Riley AP (Ed.), *Food Policy, Control and Research*. Nova Science Publishers, New York: pp. 65-95.
- Ford BJ (1996) BSE the facts: Mad cow disease and the risk to mankind. London, Corgi Books.
- Fumiere O, Dubeis M, Baeten V, von Holst C, Berben G (2006) Effective PCR detection of animal species in highly processed animal by-products and compound feeds. *Anal. Bioanal. Chem.* 385: 1045-1054.
- Gizzi G, von Holst C, Baeten V, Berben G, van Raamstonk L (2004) Determination of processed animal proteins, including meat and bone meal in animal feed. *J. AOAC Int.* 87: 1334-1341.
- Hitchcock CHS, Crimes AA (1985) Methodology for meat species identification: a review. *Meat Sci.* 15: 215-224.
- Knock WD (2002) Animal feed legislation-including the influence of the EU Food safety concerns. In: Garnsworthy PC, Wiseman J (Eds.), *Recent Advances in Animal Nutrition*. Nottingham University Press, Nottingham: pp 12-30.
- Knock WD (2003) Animal feed legislation 2002. In: Garnsworthy PC, Wiseman J (Eds.), *Recent Advances in Animal Nutrition*. Nottingham University Press, Nottingham: pp 21-35.
- Louloudis L, Georgiadou B, Stavrakakis I (2000) *Nature, Society and Science in the era of mad cows: Risk and uncertainty*. Athens:

Nepheli Publishers (In Greek).

Mendoza-Romero L, Verkaar ELC, Savelkoul RJM, Catsburg A, Aaarts HJM, Buntjer JB, Lenstra JA (2004) Real-time PCR detection of ruminant DNA. J. Food Prot. 67: 550-554.

Ocana MF, Neubert H, Przyborowska A, Parker R, Branley P, Halketa J, Patel R (2004) BSE control: detection of gelatine-derived peptides in animal feed by mass spectrometry. Analyst 129: 111-115.

Tartaglia M, Sanlle E, Pestalozza S, Morelli L, Antonneci G, Battaglia PA (1998) Detection of bovine mitochondrial DNA in ruminant

feeds: a molecular approach to test for the presence of bovine-derived materials. J. Food Prot. 61: 513-518.

Van Raamsdonk LWD, von 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. Anim. Feed Sci. Technol. 133: 63-83.

Zoiopoulos PE, Drosinos EH (2010). The animal feed question in the shadow of contemporary food crises: The European challenge. New York: Nova Science Publishers.

