



Methoden zur Differenzierung von Tierarten in Lebensmitteln – Status quo

*erarbeitet durch AG „Biochemische und molekularbiologische Analytik“,
mit Unterstützung von Experten der Arbeitsgruppe "Molekularbiologische Methoden zur
Pflanzen- und Tierartendifferenzierung" (§ 64 LFGB) sowie der ALTS-AG „Immunologie und
Molekularbiologie“*

Einleitung

Nicht zuletzt bedingt durch den Pferdefleischskandal im Jahr 2013 wurden in Deutschland die Aktivitäten bei der Methodenstandardisierung im Bereich der Tierarten-Differenzierung in den vergangenen Jahren intensiviert.

Wenn auch positive Befunde bei dem Nachweis von Bestandteilen aus Pferd in Lebensmitteln wie Lasagne derzeit so gut wie nicht mehr anzutreffen sind, so hat die Tierartendifferenzierung insgesamt beim Nachweis von Verfälschungen in Lebensmitteln einen hohen Stellenwert.

Die folgende Stellungnahme fasst daher den aktuellen Stand der Analytik in Deutschland mit Schwerpunkt bei der Standardisierung zusammen.

Analytische Methoden zum Nachweis von Tierarten

Derzeit werden überwiegend molekularbiologische Verfahren auf Basis der real-time Polymerase-Kettenreaktion (PCR) und von DNA-Chips sowie immunologische Verfahren (z.B. ELISA) eingesetzt.

Weiterhin wurden Anwendungen massenspektroskopischer (LC-MS) Verfahren veröffentlicht [von Barga, 2013 und 2014, Watson, 2015, Ohana, 2016].

Für proteinanalytische Methoden auf Basis der isoelektrischen Fokussierung existieren über 20 Jahre alte Methoden in der amtlichen Sammlung von Untersuchungsverfahren [ASU L 06.00-19, 1990, ASU L 01.00-39, 1995]. Diese werden nur noch vereinzelt angewendet, stellen allerdings derzeit bei der Tierartendifferenzierung in Milch und Milchprodukten die einzigen amtlichen Methoden dar. Die entsprechenden Methoden für Fleisch und Fleischzerzeugnisse können bei roher (PAGE) und erhitzter (PAGIF) Ware eingesetzt werden. Die Nachweisgrenze liegt in den meisten Fällen bei etwa 5 %, daher sind diese Methoden zur Erkennung von nicht deklarierten Beimischungen ab dieser Größenordnung geeignet.

PCR-basierende und weitere molekularbiologische Nachweisverfahren

Grundsätzlich stellt die Polymerase-Kettenreaktion (PCR), die auf DNA-Basis arbeitet, ein sensitives Verfahren zum Nachweis von Tierarten in Lebensmitteln dar.

Für den Nachweis können einerseits speziesspezifische Sequenzen des Zellkern-Genoms herangezogen werden, z.B. von Wachstumshormon-Genen [Meyer, 1995a] oder des Phospho-Diesterase-Gens [Laube, 2007] sowie weitere neuere Publikationen [Druml, 2015a und b; Rojas, 2011; Merz, 2016]. Häufig dienen jedoch konservierte Sequenzbereiche aus dem mitochondrialen (mt) Genom als Zielsequenz, insbesondere ein Abschnitt des Gens der Untereinheit I der Cytochrom c Oxidase (COI oder cox1) [Hebert, 2003] sowie das Cytochrom b-Gen [Meyer, 1995b, Matsunaga, 1999]. Aber auch chromosomal codierte Bereiche können hierfür geeignet sein, wie etwa das in Säugetieren und Geflügel vorkommende Myostatin-Gen [Laube, 2007]. Mit „Universalprimern“, die an solche konservierten Sequenzen anlagern,

können Spezies-übergreifend DNA-Sequenzen amplifiziert werden. Eine Spezifizierung der Tierart erfolgt dann durch Sequenzierung, spezifische Sonden in der real-time PCR oder Schmelzpunkt- oder Restriktionsfragment-Analyse.

Tierartendifferenzierung mittels DNA-Chip

Zum Screening auf Tierarten, z.B. Erzeugnissen unbekannter Zusammensetzung, kann auch ein kommerziell erhältliches Verfahren auf Basis eines DNA-Chips verwendet werden [Iwobi, 2011]. Neben den wichtigen Säugetier-/Nutztierarten werden auch Wild- (z.B. Rehwild, Rotwild, Känguruh) und Geflügelarten (z.B. Gans, Fasan, Strauß, Entenarten) erfasst. Die Differenzierung beruht auf artspezifischen Unterschieden in einer Sequenz des mt 16S rRNA-Gens der Tierarten. In der PCR werden biotinylierte Primer verwendet; die entsprechend biotinylierten Amplifikate binden in der anschließenden Hybridisierungsreaktion an Spezies-spezifische, auf einem Chip immobilisierte Oligonukleotid-Sonden. Die Detektion erfolgt über eine Enzym-Substrat-Kaskade unter Verwendung von an Streptavidin gekoppelter alkalischer Phosphatase und anschließender Farbreaktion. Die Auswertung erfolgt mit dem Chip-Scanner und der zugehörigen Software.

Das Verfahren ist rein qualitativ und eignet sich auch für Mischungen; die Nachweisgrenze beträgt jeweils ca. 0,1 bis 1 %.

Multiplex-Methoden

Köppel et al. haben 2008 und 2011 real-time PCR Verfahren zur simultanen Spezies-spezifischen Bestimmung jeweils vier verschiedener Tierarten vorgestellt: Rind, Schwein, Pute und Huhn („All Meat“) [Köppel, 2008] bzw. Rind, Schwein, Equiden und Schaf („All Horse“) [Köppel, 2011]. Die Methoden wurden durch die Verwendung von Kalibratoren auf DNA-Basis bzw. durch Kalibrierung mit DNA-Extrakten aus Materialien definierter Zusammensetzung auch zur Quantifizierung des Anteils der jeweiligen Tierart eingesetzt [Köppel, 2012]. Auch wurden die Methoden an (prozessierten) Fleischerzeugnissen erprobt. Voraussetzung für die Anwendung dieser Methoden im Hinblick auf prozentuale Verhältnisse ist, dass außer den jeweiligen vier Tierarten keine weiteren Tierarten vorhanden sind.

Ein Matrix-unabhängiger Ansatz zum simultanen Nachweis verschiedener Tierarten z.B. Rind, Schwein, Equiden und Schaf wurde von Iwobi et al. (2015 sowie 2016, submitted) publiziert. In diesen Multiplex real-time PCR-Verfahren wird das Myostatin-Gen als Referenzgen in Kombination mit Tierartenspezifischen Standardreihen zur Quantifizierung des DNA-Anteils der jeweiligen Tierart eingesetzt. Dieses Verfahren hat sich bereits in Fleischerzeugnissen, Milcherzeugnissen und Futtermitteln bewährt.

Digitale PCR

Erste Anwendungen der sogenannten digitalen PCR, die auf DNA-Ebene eine Standard-unabhängige Quantifizierung erlaubt, wurden publiziert [Floren, 2015; Cai, 2014]. Die weitere Entwicklung und Erprobung der Praxistauglichkeit ist abzuwarten.

Sensitivität

PCR-basierte Methoden zum Nachweis von Tierarten erreichen in zusammengesetzten Lebensmitteln in der Regel Nachweisgrenzen im Bereich von 0,1% [Laube, 2007; Köppel, 2012]. Insbesondere bei der Verwendung universeller Primer-Systeme besteht die Möglichkeit, dass bei Mischungen verschiedener Tier- oder Fischarten die Zielfragmente Spezies-abhängig unterschiedlich effizient amplifiziert werden. Dadurch kann die Sensitivität des Nachweises in bestimmten Fällen beeinträchtigt sein [Pietsch und Waiblinger, 2010].

Quantifizierung

Insbesondere Multiplex real-time PCR Methoden erlauben unter den oben genannten Voraussetzungen eine Quantifizierung Spezies-spezifischer DNA-Sequenzen und der mengenmäßigen Verhältnisse dieser DNA-Sequenzen zueinander [Iwobi et al, 2016].

Bei der Frage, ob eine Korrelation zwischen Mengenanteilen von Tierarten in „DNA-Prozent“ zu Gewichtsprozenten besteht, sind u.a. folgende Aspekte zu berücksichtigen: Im Fettgewebe ist im Gegensatz zu Fleisch (Muskelgewebe) in der Regel nur wenig (ca. 30 %) DNA enthalten. Innereien wie Leber und Herz enthalten 10- bis 25-mal so viel DNA (aus Mitochondrien und Zellkern stammend) wie Muskulatur [Schwägele, 2003]. Bei der Verwendung von PCR-Systemen, die auf Zielsequenzen aus mtDNA beruhen ist zudem zu bedenken, dass die Anzahl der Mitochondrien in tierischen Zellen beispielsweise sehr stark in Abhängigkeit von Tierart und Gewebe schwanken kann [Schwägele, 2003]; im Rogen der Fische ist mtDNA die überwiegende DNA-Form [Rehbein, 2003].

ELISA-Methoden

In der Routine ebenfalls häufig eingesetzt werden immunochemische Verfahren, wie z. B. Sandwich ELISA (Enzyme Linked Immunosorbent Assay) oder LFA (Lateral Flow Assays; Dipsticks). In der Regel handelt es sich um Kits kommerzieller Anbieter. Erhältlich sind beispielsweise Nachweisverfahren für die Hauptnutztierarten in rohen oder erhitzten Produkten wie Schwein/Wildschwein, Rind/Bison, Schaf/Ziege oder Equiden (Pferd, Maulesel, Esel u. a.) sowie Hirsch als Wildtierart. Die Testkits weisen tierart-spezifische Proteine sowohl in unerhitzten als auch in erhitzten Fleischerzeugnissen nach.

Vorteilhaft ist die bei einigen Protokollen vorgesehene, im Vergleich z.B. zu PCR-basierten Verfahren große Probeneinwaage (i.d.R. 25 g), die eine repräsentativere Beprobung großer Probenvolumina ermöglicht.

Die vom Hersteller oder in der Literatur angegebenen Nachweisgrenzen bewegen sich im Bereich von 0,05 bis 5 %. Die erreichbare Sensitivität hängt jedoch im starken Maße von der Tierart, der Art des eingesetzten Fleischanteils (Muskulatur oder innere Organe) und dem Prozessierungsgrad des zu untersuchenden Lebensmittels ab. Bei hochehitzten Lebensmitteln steigt die Nachweisgrenze durch eine Denaturierung/Zerstörung der Zielproteine stark an, so dass falsch negative Ergebnisse bei Konserven nicht auszuschließen sind. In Roh-, Brüh- und Kochwürsten wird ein 1 %iger Fleischanteil in der Regel sicher erkannt.

Des Weiteren gibt es kommerzielle Verfahren, die nicht nur eine oder wenige Arten, sondern größere phylogenetisch verwandte Gruppen wie Geflügel oder Wiederkäuer nachweisen. Für letztgenannte werden Antikörper-basierende Kits angeboten, welche auch für extrem hoch erhitzte (bis 150 °C) und unter starkem Druck behandelte Produkte, wie z.B. Tiermehle, geeignet sein sollen. Als hitzestabile Zielproteine werden von Kitherstellern (z.B. Fa. Transia oder Neogen) oder in der Literatur beispielsweise Troponin I [Chen, 2002] oder h-Caldesmon [Kim, 2004] angegeben.

Ringversuche sind vor allem mit Kits zum Wiederkäuernachweis in hoch prozessierten Fleisch-Knochenmehlen durchgeführt worden (Fumière, 2009; van Raamsdonk, 2012]. Die erwünschte Nachweisgrenzen von 0,1 % (w/w) für auf 133 °C / 20 min / 3 bar erhitztes Wiederkäuermaterial in Mischfutter wurde mit den verfügbaren kommerziellen Kits bislang nicht erreicht.

Aufgrund unterschiedlicher Zusammensetzung der Lebensmittel und verschiedener Herstellungsverfahren sind die Tierartnachweise mittels ELISA daher als rein qualitativ einzustufen.

Tierartendifferenzierung mittels LC-MS-MS

Die Entwicklung massenspektrometrischer Methoden zur Differenzierung von Tierarten ist eine noch relativ neue Technik, die in der Forschung zunehmend Beachtung findet und vereinzelt bereits in der Routineanalytik eingesetzt wird.

Insbesondere *Targeted Proteomics*, also der gezielte massenspektrometrische Nachweis enzymatisch generierter Markerpeptide, etabliert sich als alternative Methode der Speziesidentifizierung. Hierzu müssen zunächst Sequenzpolymorphismen (Insertionen, Deletionen, Aminosäureaustausche) im Proteom identifiziert werden, die spezifisch für die nachzuweisende Spezies sind. Die Identifikation dieser Peptide kann grundsätzlich über Datenbanken erfolgen. Häufig sind diese Datenbanken aber nicht vollständig, sodass eine experimentelle Identifikation dieser Polymorphismen mittels hochauflösender

Massenspektrometrie erforderlich ist. Markerpeptide, die die entsprechenden Sequenzpolymorphismen enthalten, können dann sensitiv und spezifisch massenspektrometrisch auch auf Routinegeräten nachgewiesen werden. Für den Nachweis von Pferd oder Schwein in Rindfleisch gelingt dies mittlerweile mit Nachweisgrenzen bis etwa 0,1 % auch in verarbeiteten Lebensmitteln [von Bargaen, 2013, von Bargaen, 2014]. Für die relative Quantifizierung von Mischungen verschiedener Spezies können die Signalverhältnisse korrespondierender Markerpeptide aus homologen Proteinen der zu differenzierenden Spezies genutzt werden [Watson, 2015]. Alternative Ansätze der Tierartendifferenzierung nutzen den direkten Vergleich einer Vielzahl von MS/MS-Spektren (spectral matching), um ohne vorherige Identifizierung von Markerpeptiden eine Differenzierung zu erreichen [Ohana, 2016]. Hierbei entfällt die teilweise aufwendige Identifizierung spezifischer Biomarker, allerdings müssen bei jeder Messung einer unbekannt Probe mindestens 2000 MS/MS Spektren generiert und mit Spektrenbibliotheken verglichen werden, um eine Authentifizierung zu ermöglichen.

Molekularbiologische Methoden zur Differenzierung von Fischarten

Zur Differenzierung von Fischarten ist heute die PCR-Sequenzierung mit universellen Primern die Methode der Wahl [Griffith et al., 2014]. Überwiegend werden die mitochondrialen Marker Cytochrom b (cytb) und Cytochrom c Oxidase Untereinheit I (cox1) eingesetzt. Während cytb entsprechend den Publikationen zufolge noch bis 2007 bevorzugt zur Fischartendifferenzierung verwendet wurde [Teletchea, 2009], ist ein zunehmender Trend in Richtung cox1 zu verzeichnen. Dies ist nicht zuletzt der Initiative „International Barcode of Life (iBOL)“ zu verdanken [Hebert et al., 2003]. Mitochondriale Genmarker erfüllen die Voraussetzung hinsichtlich einer hohen inter- und einer niedrigen intraspezifischen Variabilität für eine zuverlässige Identifizierung [Ward et al., 2005]. In Anbetracht von ca. 33000 verschiedenen Fischarten (Fishbase) stellt die Identifizierung eine große Herausforderung dar. Verschiedene universelle M13-markierte cox1-Primercocktails wurden für das Barcoding von Fischen erstmals von der Arbeitsgruppe Ivanova et al. (2007) vorgestellt. Der cox1-Cocktail überzeugte in dieser Arbeit hinsichtlich PCR- und Sequenzierungserfolg, sodass im Rahmen des EU-Projekts „Labelfish“ eine Arbeitsanweisung / Standard-Operating-Procedure (SOP) mit diesem Cocktail entwickelt und mit Hilfe eines international durchgeführten Ringversuchs validiert wurde (Publikation steht noch aus).

Darüber hinaus werden weitere mitochondriale Marker, wie beispielsweise das als eher konserviert einzustufende 16SrRNA-Gen, zur zusätzlichen Absicherung einer unbekannt Probe [Rehbein & Oliveira, 2012] oder das variable Control-region-Gen zur eindeutigen Differenzierung von nah verwandten Fischarten wie Thunfische (*Thunnus* spp.) [Viñas & Tudela, 2009] herangezogen. Insbesondere, wenn die Zuordnung der Fischart wie bei den Thunfischarten durch Hybridisierungen, Introgressionen und wenigen SNP (Single-Nucleotide-Polymorphism)-Unterschieden erschwert wird, empfiehlt es sich, die FINS (Forensically Informative-Nucleotide-Sequencing)-Anwendung mit einem variablen mitochondrialen und einem nukleären Marker [Viñas & Tudela, 2009] durchzuführen. Der alleinigen Verwendung eines nukleären Markers, wie die des Intron-freien Rhodopsin-Gens 1 (Rh1), sind zur Speziesdifferenzierung bei Arten der gleichen Gattung, z.B. bei Aalen (*Anguilla* spp.) oder Stören (*Acipenser* spp.), Grenzen gesetzt [Rehbein, 2013].

Zum Nachweis von Muscheln und Krebstieren wird traditionell häufig die RFLP, SSCP oder die Sequenzierung eines Amplikons aus dem 16S rRNA-Gen [Marín et al., 2013; Schiefenhövel & Rehbein, 2010] durchgeführt. Jedoch setzt sich zur Differenzierung von Muscheln und Krebstieren durch Bereitstellung von geeigneten Primersystemen [Lobo et al., 2013; Geller et al., 2013] zunehmend auch das cox1-Barcoding durch.

Next-Generation-Sequencing (NGS) – Verfahren beschränkten sich bis vor kurzem noch auf den Bereich Fisch, Weich- und Krebstiere auf Biodiversitätsstudien. Zur Speziesidentifizierung auf Basis der Pyrosequenzierung erarbeiteten die Forschungsgruppen De Battisti et al. (2013) für verschiedene Fische sowie Abbadi et al. (2016) für verschiedene Muschelarten Verfahren, die jedoch nur Individuen und keine Mischungen in Betracht ziehen. Mittlerweile gibt es einige Publikationen, die das NGS Verfahren auch für die Identifizierung von Tier und Pflanzenarten in unbekannt Mischproben beschreiben. Dabei gibt es

sowohl NGS Ansätze, die eine Analyse über die klassischen Barcode-Sequenzregionen durchführen, als auch non-targeted Verfahren [Staats et al. 2016; Ripp et al. 2014].

Schnellmethoden

Um einen schnellen und hohen Probendurchsatz bei der Artendifferenzierung von Fischereierzeugnissen zu erreichen, werden neben der klassischen PCR-Sequenzierungs-Methode zunehmend Schnellmethoden bzw. Screening-Anwendungen entwickelt:

Real-Time PCR

Während die Entwicklungen von real-time PCR Methoden für Muscheln [Sánchez et al, 2014] und Cephalopoden [Herrero et al, 2012, Espiñeira & Vieites, 2012] bisher sehr übersichtlich sind (für Krebstiere gibt es bisher keine), wurden in den letzten Jahren verschiedene qualitativ ausgerichtete Single-, Duplex- und Multiplex-Anwendungen für relevante Fischarten publiziert. In diesem Kontext wären beispielsweise die real-time PCR-Verfahren zum Nachweis der Buttermakrelen *Lepidocybium flavobrunneum* und *Ruvettus pretiosus* [Giusti et al., 2016], des europäischen Aales (*Anguilla anguilla*) von Espiñeira & Vieites [2016] sowie der Seezunge (*Solea solea*) von Herrero et al. [2014] und der Thunfische [Chuang et al., 2012] zu nennen. Für verschiedene Salmoniden- und Gadiden-Arten, sowie für den Europäischen Seehecht (*Merluccius merluccius*) und zur Unterscheidung zwischen weißem und schwarzem Heilbutt sind bereits kommerzielle real-time PCR-Kits auf dem Markt erhältlich.

Microarray & LAMP

Hervorzuheben sei der im Rahmen des EU-Projekts „Fish & Chips“ (2004-2007) entwickelte Microarray, der die Differenzierung von Fischarten mit Hilfe von Oligonukleotidsonden, basierend auf den mt Genen *cytb*, *cox1* und der 16S-rDNA, ermöglichte [Kochzius et al., 2010]. Der Fokus lag hier auf der Selektion von Fischarten für das Monitoring der Biodiversität. In verschiedenen proof-of-concept-Studien wurden weitere DNA-Chips zur Identifizierung von verschiedenen Fischarten wie z.B. Lachse, koreanischen Rochen, Aalen und Welsen vorgestellt. Aufgrund des zum Entwicklungszeitpunkt noch relativ hohen apparativen Aufwandes der fluoreszenzbasierten Detektionssysteme und der damit verbundenen Kosten konnten sich DNA-Chips für Fischarten bisher nicht durchsetzen.

Für die vor-Ort-Untersuchung wäre der auf LAMP (loop-mediated isothermal amplification) basierende Schnelltest TwistFlow® Red Snapper der Firma TwistDx aus England zum Nachweis von *Lutjanus campechanus* zu erwähnen. Die isothermale DNA-Amplifikationsmethode läuft bei konstanten Temperaturen ab und stellt, wie kürzlich zum Nachweis vom atlantischen Kabeljau (*Gadus morhua*) beschrieben [Saul et al., 2015], eine interessante Alternative zur PCR dar.

ELISA

Vereinzelt sind kommerzielle ELISA-Tests zur Identifizierung von Fischarten erhältlich, z.B. in rohem oder auch gekochtem Pangasius. In der Produktbeschreibung wird jedoch darauf hingewiesen, dass nach Möglichkeit frisches Filet verwendet werden sollte.

Tierartendifferenzierung bei Milcherzeugnissen

Eine ältere proteinanalytische Methode auf Basis der isoelektrischen Fokussierung [ASU, 1995] kann zur Kontrolle von Schaf und Ziegenkäse auf Anteile von Rind eingesetzt werden; die gelspezifische Nachweis- und Bestimmungsgrenze liegt jeweils im Bereich von 1 bis 3 %. Die Methode eignet sich nicht bei Mischungen mit Molkenkäse, da zur Quantifizierung die Casein Bande genutzt wird.

Inzwischen wurden zur Anwendung bei Milch und Milcherzeugnissen auch Multiplex real-time PCR Verfahren veröffentlicht und in einem Ringversuch erprobt [Rentsch, 2013]. Es handelt sich um eine als „AllCheese“ bezeichnete Triplex-PCR, bei der chromosomal codierte, Spezies-spezifische Sequenzen von Rind, Schaf und Ziege amplifiziert werden; bzw. eine als „AllMilk“ bezeichnete Tetraplex-PCR, bei der mt Cytochrom b Gen Sequenzen von Rind, Schaf, Ziege und Wasserbüffel als Zielsequenz für die PCR

eingesetzt werden. Die Methode „AllMilk“ weist eine starke Kreuzreaktion zwischen Schaf und Ziege auf, hat aber eine bessere Sensitivität und kleinere Messunsicherheit als die Methode „AllCheese“. Letztere weist insbesondere zwischen Ziege und Schaf eine bessere Spezifität auf. Im Rahmen des Ringversuches wurde sowohl mit DNA-Mischungen als auch mit Matrix-Kalibratoren (Käse, hergestellt aus definierten Anteilen von Milch der genannten Tierarten) kalibriert. Bei der quantitativen Auswertung des Ringversuchs kamen die Autoren zum Schluss, dass beide Methoden zur Differenzierung von unvermeidbaren Spuren (< 1 Gew%) und Beimengungen (> 5 Gew%) geeignet sind. Insbesondere bei gereiftem Käse sei durch DNA-Abbau mit einer reduzierten Sensitivität zu rechnen [Rentsch, 2013].

Laborvergleichsuntersuchungen

Mittlerweile finden regelmäßige Laborvergleichsuntersuchungen im Bereich der Tierartendifferenzierung (einschließlich Fischarten) statt [LVU, FAPAS]. Die bisherigen Auswertungen sind rein qualitativ. Die bisherigen Erfahrungen zeigen, dass PCR- und ELISA-Verfahren grundsätzlich für die qualitative Differenzierung geeignet sind. Bei hocherhitzten Lebensmitteln steigt die Nachweisgrenze der ELISA-basierten Testsysteme allerdings stark an, so dass falsch negative Ergebnisse nicht auszuschließen sind. Bei hocherhitzten Lebensmitteln sollten daher bevorzugt PCR-basierte Verfahren angewendet werden.

Referenzmaterialien

Kommerziell werden von der Firma LGC (GB) Referenzmaterialien für die Tierarten Pute, Huhn, Schaf, Pferd, Rind und Schwein sowie Mischungen von 5 % und 1 % Rind, Pute oder Huhn in Schaffleisch angeboten. Weiterhin stehen Laboratorien Materialien definierter Zusammensetzung aus Laborvergleichsuntersuchungen und Ringversuchen zur Verfügung (z.B. Arbeitsgruppe ERFA (CH), Fa. LVUs, FAPAS).

Methodenstandardisierung, aktueller Stand

Tabelle 1 beschreibt die bisher im Rahmen der Amtlichen Sammlung von Untersuchungsverfahren nach § 64 LFGB veröffentlichten verfügbaren Standardverfahren zur Tierartendifferenzierung mittels molekularbiologischen Methoden oder mittels ELISA.

Säugetiere/Nutztiere

Beschrieben in der amtlichen Sammlung ist eine Methode aus 2002 zur Tierartenbestimmung mittels ELISA (ASU L 06.00-47, 2002). ELISA-Systeme zum Nachweis von Schwein, Rind, Schaf und Geflügel wurden erprobt. Die Methode ist als qualitatives Verfahren beschrieben, eine quantitative Auswertung liegt nicht vor. Die Nachweisgrenzen betragen je nach Tierart und Prozessierungsgrad zwischen 0,2 % und mehr als 2 %. Seitdem erfolgte keine weitere Standardisierung von Methoden zur Tierartendifferenzierung mittels ELISA mehr.

Ein auf der qualitativen, Gel-basierten PCR mit anschließendem Restriktionsverdau beruhendes Verfahren zum Nachweis von Pferd wurde 2007 in der amtlichen Sammlung veröffentlicht. Die Methode ist spezifisch für Tierart Pferd; die Nachweisgrenze beträgt 0,1 %.

Kürzlich wurden in der Amtlichen Sammlung zwei Multiplex real-time PCR Verfahren zur Tierartenbestimmung veröffentlicht, die auf den von Köppel et al. 2008 und 2011 publizierten Verfahren beruhen. Das Verfahren „AllMeat“ wurde auch in der Schweiz in einem Ringversuch geprüft [Eugster et al, 2009]. Bei dem Verfahren „All Horse“ ist anzumerken, dass der Nachweis außer Pferd auch andere Equiden wie Esel oder Zebra erfasst. Nach der quantitativen Ringversuchs-Auswertung für die Systeme „All Meat“ (ASU L 08.00-61, 2016) bzw. „All Horse“ (ASU L 08.00-62, 2016) sind die Schwankungsbereiche jeweils relativ breit: so ergibt sich bei einem DNA-Anteil von 50 % ein Schwankungsbereich von 31,8 % bis 68,2 % (All Meat) bzw. von 32,9 % bis 67,1 % (AllHorse). Liegt der ermittelte DNA-Anteil z. B. bei 10 %, resultiert ein Messunsicherheitsintervall von 4,3 % bis 19,7 % (AllMeat) bzw. von 4,8 % bis 18,7 % (AllHorse). Dies bedeutet, dass die Verfahren in erster Linie zum qualitativen Nachweis verwendet

werden können. Mit Einschränkungen können sie nach den Validierungsberichten zu den Methoden auch als halbquantitatives Screeningverfahren verwendet werden.

Fische/Krebstiere

Bereits 2002 wurde ein PCR-RFLP Verfahren zur Differenzierung von Fischarten in die amtliche Sammlung aufgenommen. Amplifiziert und anschließend mittels Restriktionsanalyse differenziert wird eine Sequenz des Cytochrom b Gens. Nicht zuletzt durch die zunehmende Vielfalt der zu differenzierenden Fischarten und die begrenzten Differenzierungsmöglichkeiten der Gel-basierten Restriktionsanalyse wurde eine Modifikation des Verfahrens mit Differenzierung der Cytochrom b Amplifikate über Sequenzierungsanalyse und Identifizierung der Tierart über Datenbankabgleich veröffentlicht. Dadurch ist eine weitreichende Differenzierung von Fischarten möglich. Ein ähnliches Verfahren, welches anstelle einer Sequenz des mt Cytochrom b Gens eine mt Cytochrom C Oxidase Sequenz amplifiziert und mittels Sequenzanalyse differenziert, wurde kürzlich in einem internationalen Ringversuch im Rahmen des Labelfish-Projekts (European Union INTERREG Atlantic Area Program-Project 2011-1/163) erprobt (bisher unveröffentlichte Ergebnisse).

Zur Differenzierung von Krebstieren ist seit 2012 ebenfalls ein PCR/Sequenzierungsverfahren, beruhend auf der Amplifikation und Sequenzanalyse eines 16S rRNA Gen-Abschnittes verfügbar.

Die Verfahren haben jeweils qualitativen Charakter und sind bei Materialien, die aus einer Fisch- bzw. Krebstierart bestehen, anwendbar.

Zusammenfassung / Ausblick

Für die Differenzierung von Säugetier-, Fisch- und Krebstierarten stehen standardisierte Verfahren zur Verfügung. Die Verfahren haben in erster Linie qualitativen Charakter; die Nachweisgrenzen betragen bei Mischungen ca. 0,1 bis 1 %.

Methoden, die eine Differenzierung mittels klassischer Sequenzanalyse einschließen, erlauben eine weitreichende Spezies-Differenzierung. Allerdings eignen sich diese Methoden weniger für die Differenzierung in Mischungen. Hier hat es in den letzten Jahren auf dem Gebiet der NGS einige Entwicklungen gegeben, die den Einsatz von NGS-Methoden für die Analyse von Mischproben zukünftig auch in der Routine ermöglichen werden. So bieten einige Dienstleistungslaboratorien diese Analytik bereits an.

Zum Screening auf ein breiteres Spektrum an Tierarten eignet sich auch ein kommerzielles System auf Basis eines DNA-Chips.

Noch nicht in der Routine Fuß gefasst, aber durchaus Potenzial hierfür haben LC-MS/MS Methoden zur Tierartendifferenzierung; hier bleibt die weitere Entwicklung abzuwarten, ebenfalls bei der sogenannten Digitalen PCR (ddPCR).

Die jetzt in die amtliche Sammlung aufgenommenen Verfahren zur Tierartenbestimmung mittels Multiplex real-time PCR können, besonders mit geeigneten Matrix-Kalibratoren, auch halbquantitativ und damit zur Abgrenzung unvermeidbare Spurenkontamination (<< 1 % Gew%) und echten Beimischungen (z.B. über 5 Gew%) eingesetzt werden. Allerdings ist bei bestimmten Matrices, etwa mit Innereien oder hohem Fettanteil, Vorsicht geboten. Im Rahmen der Kontrolle sollten Laboruntersuchungen und vor-Ort Überprüfungen der Rezepturen daher Hand in Hand gehen.

Derzeit gibt es noch keine oder wenige Erfahrungen aus Laborvergleichsuntersuchungen über die Eignung der genannten Verfahren bei der Quantifizierung der Tierarten in Mischungen bzw. verarbeiteten Fleischerzeugnissen. Entsprechende Aktivitäten bzw. Angebote mit (halb)quantitativer Auswertung wären daher sehr wünschenswert.

Literatur:

- Abbadì M, Marciano S, Tosi F, De Battisti C, Panzarin C, Arcangeli G, Cattoli G (2016) Species identification of bivalve molluscs by pyrosequencing. *J. Agric. Food. Chem.*, DOI 10.1002/jsfa.7754
- Amtliche Sammlung von Untersuchungsverfahren (ASU) nach § 64 LMBG Untersuchung von Lebensmitteln (2002) Nachweis der Tierart bei erhitztem Fleisch und erhitzten Fleischerzeugnissen. Enzymimmunologisches Verfahren (ELISA), Methode L 06.00-47
- ASU nach § 35 LMBG Untersuchung von Lebensmitteln (1990) Nachweis der Tierart bei erhitztem Muskelfleisch mit Hilfe der isoelektrischen Fokussierung (PAGIF). Methode L 06.00-19
- ASU nach § 35 LMBG Untersuchung von Lebensmitteln (1995) Nachweis der Tierart bei Milch, Milchprodukten und Käse mit Hilfe der isoelektrischen Fokussierung (PAGIF). Methode L 01.00-39
- ASU nach § 35 LMBG Untersuchung von Lebensmitteln (2002) Identifizierung der Fischart in rohen und erhitzten Erzeugnissen. Methode L 11.00-7
- ASU nach § 64 LFBG Untersuchung von Lebensmitteln (2007) Nachweis Pferd-spezifischer DNA-Sequenzen in Fleisch-Vollkonserven mit der PCR und Bestätigung durch Restriktionsanalyse. Methode L 06.26/27-2
- ASU nach § 64 LFBG Untersuchung von Lebensmitteln (2012) Fischartbestimmung in rohen Fischen und Fischerzeugnissen durch Sequenzanalyse von Cytochrom-b-Sequenzen. Methode L 10.00-12
- ASU nach § 64 LFBG Untersuchung von Lebensmitteln (2012) Krebstierartbestimmung in rohen Krebstieren und Krebstiererzeugnissen durch Sequenzanalyse von 16S rRNA-Sequenzen. Methode L 12.01-3
- ASU nach § 64 LFBG Untersuchung von Lebensmitteln (2016) Nachweis der Tierarten Rind, Schwein, Pute und Huhn in Wurstwaren durch Multiplex-real-time PCR. Methode L 08.00-61
- ASU nach § 64 LFBG Untersuchung von Lebensmitteln (2016) Nachweis der Tierarten Rind, Schwein, Schaf und Equiden in Wurstwaren durch Multiplex-real-time PCR. Methode L 08.00-62
- Cai Y, Li X, Lv R, Yang J, Li J, He Y, Pan L (2014) Quantitative Analysis of Pork and Chicken Products by Droplet Digital PCR. *BioMed Research International* 2014, Article ID 810209
- Chen, FC, Hsieh YH, Bridgman RC (2002) Monoclonal antibodies against troponin I for the detection of rendered muscle tissues in animal feedstuffs. *Meat Science* 62: 405–412
- Chuang PS, Chen MI, Shiao JC (2012) Identification of tuna species by real-time polymerase chain reaction technique. *Food Chemistry* 133: 1055-1061
- De Battisti C, Marciano S, Magnabosco C, Busato S, Arcangeli G, Cattoli G (2013) Pyrosequencing as a tool for rapid fish species identification and commercial fraud detection. *J. Agric. Food. Chem.* 62:198-205
- Druml B, Mayer W, Cichna-Markl M, Hochegger R (2015) Development and validation of a TaqMan real-time PCR assay for the identification and quantification of roe deer (*Capreolus capreolus*) in food to detect food adulteration. *Food Chemistry* 178: 319–326
- Druml B, Hochegger R, Cichna-Markl M (2015) Duplex real-time PCR assay for the simultaneous determination of the roe deer (*Capreolus capreolus*) and deer (sum of fallow deer, red deer and sika deer) content in game meat products. *Food Control* 57: 370-376
- FAPAS. The Food and Environment Research Agency. YORK (UK).
<http://www.fapas.com/proficiency-testing-schemes/fapas/>
- Espiñeira M & Vieites JM (2016) Genetic system for an integral traceability of European eel (*Anguilla anguilla*) in aquaculture and seafood products: authentication by fast real-time PCR. *Eur. Food Res. Technol.* 242: 25-31
- Eugster A, Ruf J, Rentsch J und Köppel R (2009) Quantification of beef, pork, chicken and turkey proportions in sausages: use of matrix-adapted standards and comparison of single versus multiplex PCR in an interlaboratory trial. *Eur. Food Res. Technol.* 230: 55-61.

- Floren C, Wiedemann I, Brenig B, Schütz E, Beck J (2015) Species identification and quantification in meat and meat products using Droplet Digital PCR (ddPCR) *Food Chemistry* 173:1054-1058
- Fumière O, Veys P, Boix A, von Holst C, Baeten V, Berben G (2009) Methods of detection, species identification and quantification of processed animal proteins in feedingstuffs. *Biotechnol. Agron. Soc. Environ.* 13 (S): 59-70
- Geller J, Meyer C, Parker M, Hawk H (2013) Redesign of PCR primers for mitochondrial cytochrome c oxidase subunit I for marine invertebrates and application in all-taxa biotic surveys. *Molecular Ecology Resources* 13: 851-861
- Giusti A, Castigliero L, Rubino R, Gianfaldoni G, Guigi A, Armani A (2016) A Conventional Multiplex PCR Assay for the detection of toxic gemfish species (*Ruvettus pretiosus* and *Lepidocybium flavobrunneum*): a simple method to combat health frauds. *J. Agric. Food Chem* 64: 960-968
- Griffiths AM, Sotelo CG, Mendes R, Pérez-Martín RI, Schröder U, Shorten M, Silva HA, Verrez-Bagnis V, Mariani S (2014) Current methods for seafood authenticity testing in Europe: Is there a need for harmonisation? *Food Control* 45: 95-100
- Hebert PDN, Cywinska A, Ball SL, deWaard JR (2003) Biological identifications through DNA barcodes. *Proceedings of the Royal Society B.* 270: 313–321.
- Herrero B, Lago FC, Vieites JM, Espiñeira M (2014) Real-time PCR method applied to seafood products for authentication of European sole (*Solea solea*) and differentiation of common substitute species. *Food Additives & Contaminants: Part A* 29, 1: 12-18
- Ivanova N V, Zemlak T S, Hanner R H, Hebert P D N (2007) Universal primer cocktails for fish DNA barcoding. *Molecular Ecology Notes* 7: 544-548
- Iwobi AN et al (2011) Biochip Technology for the Detection of Animal Species in Meat Products. *Food Anal. Methods* 4: 389-398
- Iwobi A, Sebah D, Kraemer I, Losher C, Fischer G, Busch U, Huber I (2015) A multiplex real-time PCR method for the quantification of beef and pork fractions in minced meat. *Food Chem.* 169:305-13
- Iwobi, A, Sebah D, Spielmann G, Maggipinto M, Schrempp M, Kraemer I, Gerdes L, Busch U, Huber I (2016) A multiplex real-time PCR method for the quantitative determination of equine (horse) fractions in meat products, *Food Control*, submitted
- Kim SH et al. (2004) Production of Monoclonal Antibody for the Detection of Meat and Bone Meal in Animal Feed. *J. Agric. Food Chem.* 52: 7580-7585
- Köppel R, Ruf J und Rentsch J (2011) Multiplex real-time PCR for the detection and quantification of DNA from beef, pork, horse and sheep. *Eur Food Res Technol* 232: 151-155
- Köppel R, Ruf J, Zimmerli F und Breitenmoser A (2008) Multiplex real-time PCR for the detection and quantification of DNA from beef, pork, chicken and turkey. *Eur Food Res Technol* 227: 1199-1203
- Kochzius M, Seidel C, Antoniou A, Botla SK, Campo D, Cariani A, Vazquez EG, Hauschild J, Hervet C, Hjörleifsdóttir S, Hreggvidsson G, Kappel K, Landi M, Magoulas M, Marteinson V, Nölte M, Planes S, Tinti F, Turan C, Venugopal MN, Weber H and Blohm (2010) Identifying Fishes through DNA Barcodes and Microarrays. *Plos One*, 5(9)
- Köppel R, Eugster A, Ruf J, Rentsch J (2012) Quantification of meat proportions by measuring DNA contents in raw and boiled sausages using matrix adapted calibrators and multiplex real time PCR. *J AOAC Intern.* 95 (2): 494-499
- Laube I, Zagon J, Spiegelberg A, Butschke A, Kroh LW, Broll H (2007) Development and design of a «ready to use» reaction plate for a PCR-based simultaneous detection of animal species used in foods. *International Journal of Food Science and Technology* 42, 9-17.
- Lobo J, Costa PM, Teixeira MA, Ferreira MS, Costa MH, Costa FO (2013) Enhanced primers for amplification of DNA barcodes from a broad range of marine metazoans. *BMC Ecology* 2013: 13:34
- Lvu GbR, Durchführung von Laborvergleichsuntersuchungen. Herbolzheim, D.
<http://www.lvus.de/html/home.htm>

- Marín A, Fujimoto T, Arai K (2013) Rapid identification of fresh and processed scallops by multiplex PCR. *Food Control* 32: 472-476
- Matsunaga T, Chikuni K, Tanabe R, Muroya S, Shibata K, Yamada J, Shinmura Y. (1999). A quick and simple method for the identification of meat species and meat products by PCR assay. *Meat Science* 51: 143–148.
- Merz A, Pälchen K, Sebah D, Busch U, Huber I (2016) Matrix-unabhängige Quantifizierung von Rind- und Wasserbüffel-DNA-Anteilen mittels real-time-PCR in Fleischerzeugnissen und Milcherzeugnissen. *Lebensmittelchemie* 70 (81): 112
- Meyer R, Candrian U, Luthy J (1994) Detection of pork in heated meat products by the polymerase chain reaction. *Journal of AOAC International*, 77: 617–622.
- Meyer R, Höfelein C, Lüthy J, Candrian U (1995) Polymerase chain reaction—restriction fragment length polymorphism analysis: a simple method for species identification in foods. *Journal of AOAC International*, 78: 1542–1551.
- Ohana D, Dalebout H, Marissen RJ, Wulff T, Bergquist J, Deelder AM, Palmblad M (2016) Identification of meat products by shotgun spectral matching. *Food Chem* 203: 28-34
- Pietsch K und Waiblinger HU (2010). Polymerase Chain Reaction - Restriction Fragment Length Polymorphism Analysis. *Molecular Biological and Immunological Techniques and Application for Food Chemists*. Edited by B. Popping et al., Wiley-Verlag New York.
- Rehbein, H., Horstkotte, B. (2003) Proceedings of the TAFT 2003 conference, Reykjavik, Island, 190-192 (www.rf.is/TAFT2003).
- Rehbein H (2013) Differentiation of fish species by PCR-based DNA analysis of nuclear genes. *Eur Food Res Technol* 236: 979-990.
- Rentsch J, Weibel S, Ruf J, Eugster A, Beck K, Köppel R (2013) Interlaboratory validation of two multiplex quantitative real-time PCR methods to determine species DNA of cow, sheep and goat as a measure of milk proportions in cheese. *Eur Food Res Technol* 236: 217–227
- Ripp F, Krombholz CF, Liu Y, Weber M, Schäfer A, Schmidt B, Köppel R, Hankeln T (2014) All-Food-Seq (AFS): a quantifiable screen for species in biological samples by deep DNA sequencing. *BMC Genomics* 15: 639
- Rojas M, González I, Pavón MA, Pegels N, Hernández PE, García T, Martín R (2011) Application of a real-time PCR assay for the detection of ostrich (*Struthio camelus*) mislabelling in meat products from the retail market. *Food Control* 22 (3-4): 523–531 sowie Corrigendum: *Food Control* (2013) 32: 736
- Sánchez A, Quinteiro J, Rey-Méndez M, Perez-Martín RI, Sotelo CG (2014): Identification and quantification of two species of oyster larvae using real-time PCR. *Aquat. Living Resour* 27: 135-145
- Saull J, Duggan C, Hobbs, Edwards T (2016) The detection of Atlantic cod (*Gadus morhua*) using loop mediated isothermal amplification in conjunction with simplified DNA extraction process. *Food Control* 59: 306-313
- Schwägele, F. (2003) *Fleischwirtschaft* 83 (9): 78
- Staats M, Arulandhu AJ, Gravendeel B, Holst-Jensen A, Scholtens I, Peelen T, Prins TW, Kok E (2016) Advances in DNA metabarcoding for food and wildlife forensic species identification. *Anal Bioanal Chem* 408 (17): 4615-30
- Tillmar A, Dell'Amico B, Welander J, Holmlund G (2013) A Universal Method for Species Identification of Mammals Utilizing Next Generation Sequencing for the Analysis of DNA Mixtures. *PLOS one* 8 (12), e83761
- Van Raamsdonk, LWD, Margy, RJCF, van Kaathoven, RGC. Bremer, MGEC (2012) Detection of animal proteins in aqua feed. RIKILT Report 2012.014, online: <http://edepot.wur.nl/239044>.
- Viñas J & Tudela S (2009) A validated methodology for genetic identification of tuna species (Genus *Thynnus*). *PLoS ONE* 4 (10):e7606. Doi:10.1371/journal.pone.0007606

Von Bargaen C, Dojahn J, Waidelich D, Humpf HU, Brockmeyer J (2013) New sensitive high-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry method for the detection of horse and pork in halal beef. *J. Agric. Food Chem* 61: 11986–11994

Von Bargaen C, Brockmeyer J, Humpf HU (2014) Meat authentication: a new HPLC-MS/MS based method for the fast and sensitive detection of horse and pork in highly processed food. *J. Agric. Food Chem* 62: 9428–9435

Watson AD, Gunning Y, Rigby NM, Philo M, Kemsley EK (2015) Meat Authentication via Multiple Reaction Monitoring Mass Spectrometry of Myoglobin Peptides. *Anal. Chem.* 87: 10315-10322

Tabelle: Übersicht zum Stand der Tierartenanalytik; Standardisierung (außer isoelektrische Fokussierung)

Bezeichnung	Methode	Matrix	Tierart	Bemerkungen/Kenndaten/Ergebnisse
§35 L 06.00-47	ELISA	erhitzte Fleischerzeugnisse	Rind	NG = 2 %; keine quantitativen Daten
§64 L 08.00-61	Multiplex real-time PCR	Wurstwaren	Rind	Qualitatives bis halbquantitatives Verfahren: > 1 % (DNA%) sicher überschritten bei 2,3 Gew%; > 5 % (DNA%) bei 12,2 Gew%
			Schwein	Qualitatives bis halbquantitatives Verfahren: > 1 % (DNA%) sicher überschritten bei 0,2 Gew %; > 5 % (DNA%) bei 1 Gew%
			Huhn	qualitatives bis halbquantitatives Verfahren: > 1 % (DNA%) sicher überschritten bei 1,5 Gew%; > 5 % (DNA%) bei 7,8 Gew%
			Pute	Qualitatives bis halbquantitatives Verfahren: > 1 % (DNA%) sicher überschritten bei 1,9 Gew%; > 5 % (DNA%) bei 7,8 Gew%
§64 L 08.00-62	Multiplex real-time PCR	Wurstwaren	Rind	Qualitatives bis halbquantitatives Verfahren: > 1 % (DNA%) sicher überschritten bei 3,2 Gew%; > 5 % (DNA%) bei 6,8 Gew%
			Schwein	Qualitatives bis halbquantitatives Verfahren: > 1 % (DNA%) sicher überschritten bei 0,9 Gew
			Schaf	Qualitatives bis halbquantitatives Verfahren: > 1 % (DNA%) sicher überschritten bei 1,1 Gew%; > 5 % (DNA%) bei 5,3 Gew%
			Equiden	Qualitatives bis halbquantitatives Verfahren: > 1 % (DNA%) sicher überschritten bei 4,6 Gew%; > 5 % (DNA%) bei 8,5 Gew% (Tierart Pferd)
§35 L 06.00-47	ELISA	erhitzte Fleischerzeugnisse	Schwein	NG = 0,2 bis 0,5 %; keine quantitativen Daten
§35 L 06.00-47	ELISA	erhitzte Fleischerzeugnisse	Geflügel	NG = 0,2 bis 0,5%; keine quantitativen Daten
§64 L 06.26/27-2	PCR-RFLP	Fleisch-Vollkonserven	Pferd	qualitatives Verfahren, spezifisch für Tierart Pferd; NG 1 Gew%
§35 L 11.00-7	PCR (cytb) – RFLP	Fisch (roh/erhitzt)	Fische	36 Fischarten aus den Familien der Seehechte, Aale, Sardinen, Lachse/Forellen und Plattfische getestet
§64 L 10.00-12	PCR (cytb) - Sequenzierung	Fisch (roh/erhitzt)	Fische	6 codierte Proben von Scholle, Seezunge, Rotzunge, Steinbutt, Kliesche sowie Pazifische Kliesche getestet
§64 L 10.00-12	PCR (16S rRNA) – Sequenzierung	Krebstierzeugnisse	Krebstiere	6 codierte Proben von Black Tiger Garnele, Scampi/Kaisergranat, Knieper/Taschenkrebs, Rosenberg Garnele, Eismeergarnele sowie White Tiger Garnele getestet

Legende: § 64 / § 35 = Methode in Amtlicher Sammlung von Untersuchungsverfahren.