Zeitschrift: Mitteilungen aus dem Gebiete der Lebensmitteluntersuchung und Hygiene = Travaux de chimie alimentaire et d'hygiène

Herausgeber: Bundesamt für Gesundheit

Band: 85 (1994)

Heft: 6

Artikel: Die Polymerase-Kettenreaktion in der Lebensmittelanalytik = The polymerase chain reaction in food analysis

Autor: Candrian, Urs

DOI: https://doi.org/10.5169/seals-982780

Nutzungsbedingungen

Die ETH-Bibliothek ist die Anbieterin der digitalisierten Zeitschriften auf E-Periodica. Sie besitzt keine Urheberrechte an den Zeitschriften und ist nicht verantwortlich für deren Inhalte. Die Rechte liegen in der Regel bei den Herausgebern beziehungsweise den externen Rechteinhabern. Das Veröffentlichen von Bildern in Print- und Online-Publikationen sowie auf Social Media-Kanälen oder Webseiten ist nur mit vorheriger Genehmigung der Rechteinhaber erlaubt. Mehr erfahren

Conditions d'utilisation

L'ETH Library est le fournisseur des revues numérisées. Elle ne détient aucun droit d'auteur sur les revues et n'est pas responsable de leur contenu. En règle générale, les droits sont détenus par les éditeurs ou les détenteurs de droits externes. La reproduction d'images dans des publications imprimées ou en ligne ainsi que sur des canaux de médias sociaux ou des sites web n'est autorisée qu'avec l'accord préalable des détenteurs des droits. En savoir plus

Terms of use

The ETH Library is the provider of the digitised journals. It does not own any copyrights to the journals and is not responsible for their content. The rights usually lie with the publishers or the external rights holders. Publishing images in print and online publications, as well as on social media channels or websites, is only permitted with the prior consent of the rights holders. Find out more

Download PDF: 17.07.2025

ETH-Bibliothek Zürich, E-Periodica, https://www.e-periodica.ch

Mitt. Gebiete Lebensm. Hyg. **85**, 704–718 (1994)

Die Polymerase-Kettenreaktion in der Lebensmittelanalytik*

The Polymerase Chain Reaction in Food Analysis

Key words: Campylobacter, Listeria, Meat species identification, Molecular typing, Pig

Urs Candrian
Abteilung für Lebensmittelchemie, Institut für Biochemie, Universität Bern, Bern

Einleitung

Nukleinsäuren sind kein ernährungsphysiologisch interessanter Bestandteil von Lebensmitteln. Der Nachweis von spezifischen Nukleinsäuren erlaubt es aber, biologische «Fremdstoffe» in Lebensmitteln zu erkennen oder einzelne Bestandteile eines Produktes zu identifizieren. Als Beispiele seien das weite Gebiet der Lebensmittelmikrobiologie und die Untersuchung von Wurstwaren auf die verwendeten Fleischsorten erwähnt. Während im ersten Fall die Isolation intakter Bakterien und die Identifikation und teilweise Charakterisierung ihres Genoms im Vordergrund stehen, ist im Fall der Identifikation von Fleischsorten die direkte Extraktion der jeweiligen Nukleinsäuren wichtig. Um spezifische Desoxyribonukleinsäure (DNA)-Sequenzen, das heisst Basenpaar-Abfolgen charakteristisch für eine Art, nachweisen zu können, muss ihre Integrität während der Produktion und Lagerung eines Lebensmittels erhalten bleiben. *Ebbehoj* und *Thomson* (1) untersuchten die Qualität der DNA aus Fleisch während der Lagerung und nach Hitze- und Druckbehandlung. Der Begriff DNA-Qualität bezieht sich auf das Molekulargewicht der DNA, das heisst die Länge der einzelnen Doppelstränge ausgedrückt in der Anzahl der Basenpaare (bp). Die Degradation der DNA führt zu einer Verkürzung der einzelnen Moleküle durch Strangbrüche, ohne dass es dabei aber in der Regel zu einer Veränderung der Basenpaarsequenz kommt. Die Bestimmung der Länge der DNA-Moleküle beziehungsweise ihres Molekulargewichts kann durch Agarosegelelektrophorese und Vergleich mit Molekulargewicht-Standards

* Vortrag gehalten an der 106. Jahresversammlung der Schweiz. Gesellschaft für Lebensmittel- und Umweltchemie, Oberägeri, 9. September 1994, anlässlich der Verleihung des Preises der Gesellschaft.

bestimmt werden. Während aus frischem Fleisch DNA von guter Qualität (Molekulargewicht entsprechend 20 bis 50 kbp) isoliert wurde, führte bereits mehrtägige Lagerung zu einer merklichen Degradation auf 15 bis 20 kbp. Erhitzen des Fleisches bewirkte eine weitergehende Zerstückelung der DNA, wobei nach 10 Minuten Autoklavieren bei 121 °C die durchschnittliche Länge der DNA-Bruchstücke noch um die 300 bp betrug (1).

Eigene Untersuchungen zur Qualität von aus Lebensmitteln extrahierten Nukleinsäuren ergaben Werte von > 20 kbp für DNA aus Blutwurst, die im Bereich der Kontroll-DNA von *Escherichia coli* und *Yersinia enterocolitica* lagen (Abb. 1). DNA aus Salami war dagegen bereits deutlich degradiert und wies ein Molekulargewicht im Bereich von 100 bp bis 15 kbp auf. Während DNA aus Morchelterrine 100 bis 1500 bp lang war, wies DNA aus sterilisierter Büchsenpâté in Übereinstimmung mit den Resultaten von *Ebbehoj* und *Thomson* (1) ein Molekulargewicht im Bereich von weniger als 100 bis 300 bp auf (Abb. 1). Derart degradierte DNA lässt sich mit Hilfe von Methoden zur Vervielfältigung von Nukleinsäuren wie der Polymerase-Kettenreaktion (PCR) auf das Vorhandensein spezifischer Sequenzen untersuchen. Die PCR wurde in dieser Zeitschrift bereits in einer früheren Arbeit ausführlich beschrieben und diskutiert (2). An dieser Stelle sei speziell darauf hingewiesen, dass das Molekulargewicht die einzige wichtige Eigenschaft der Ziel-DNA für die Durchführung der Vervielfältigungsreaktion darstellt. Sind beispielsweise die beiden Oligonukleotide, die als Primer in der Reaktion benötigt werden, 800 bp voneinander entfernt definiert, wird es nicht möglich sein, eine Sequenz aus einer DNA mit einem Molekulargewicht im Bereich von 300 bis 500 bp zu vervielfältigen. Dies deshalb, weil es jeweils bei der DNA-Neusynthese nach 300 bis 500 bp zum Strangabbruch kommen wird. Umgekehrt bedeutet dies, dass bei stark degradierter DNA, wie sie in Lebensmitteln vorkommen kann, nur PCR-Systeme, deren Primer per definitionem 100 bis etwa 300 bp auseinanderlie-

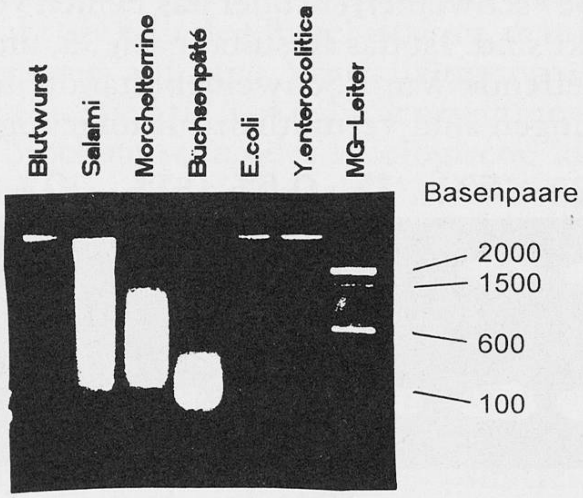

Abb. 1. Agarosegelelektrophorese von DNA-Extrakten aus Lebensmitteln und Bakterien. *Oben:* Bezeichnung der Probe, aus der die DNA isoliert wurde. MG-Leiter: Molekulargewicht-Standards (100 bp – Leiter). *Rechts:* Angabe der Länge in Basenpaaren einiger Fragmente der 100 bp – Leiter

gen, erfolgreich sein werden. In den folgenden Abschnitten werden einige Beispiele aus dem Bereich der molekularbiologischen Lebensmittelanalytik beschrieben.

Beispiel 1: Das unbeliebte Schwein

Von einem Teil der Konsumenten wird Schweinefleisch als Bestandteil der Ernährung abgelehnt, dies teilweise aus religiösen Gründen. Dementsprechend sind Produkte, speziell Wurstwaren, die kein Schweinefleisch oder Schweinefett enthalten, erhältlich. Die Schwierigkeit dabei ist, dass vom Schwein stammende Zutaten für die Schmackhaftigkeit von Würsten von entscheidender Bedeutung sind, aber gegenwärtig keine zuverlässigen Methoden zur Überprüfung der Zusammensetzung von Würsten existieren. Die Proteinanalytik versagt in der Regel bei erhitzten Fleischproben mit denaturierten Eiweissen oder ist nicht empfindlich genug.

Wir entwickelten ein PCR-Testsystem zum Nachweis von Schweinefleisch und -fett in Würsten (3). Die Isolierung der DNA erfolgt dabei nicht mittels traditioneller Phenol- und Chloroformextraktion, sondern mit einem DNA-bindenden Harz, das eine schnelle und einfache Arbeitsweise erlaubt. Weitgehende Standardisierung dieser Probenvorbereitung erlaubt es uns, eine grobe halbquantitative Aussage über den Gehalt einer Wurst an vom Schwein stammenden Zutaten zu machen (Abb. 2). Voraussetzung dafür ist die experimentell bestätigte Tatsache, dass Muskelfleisch, Innereien und Fett vergleichbare DNA-Gehalte aufweisen (3). Wie Abbilung 2 zeigt, kann durch die Veränderung der Anzahl Vervielfältigungszyklen eine annähernde Beurteilung des Gehalts von Würsten an Schweinebestandteilen gemacht werden. Bei einem sowohl nach 30 wie auch 35 Zyklen negativen Resultat kann davon ausgegangen werden, dass der Gehalt weniger als 0,1% beträgt und die Packungsangabe «schweinefrei» oder das Fehlen von Schwein auf der Liste der Inhaltsstoffe korrekt sind. Ist das Resultat nach 35, nicht aber nach 30 Zyklen positiv, enthält die betreffende Wurst Schweinebestandteile in Spuren (0,1 bis 1%). Derartige Verunreinigungen sind vermutlich auf ungenügend gereinigte Fabrika-

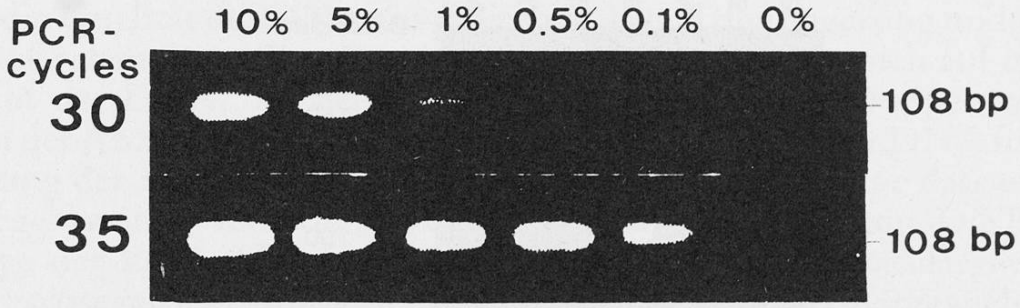

Abb. 2. Agarosegelelektrophorese von DNA-Extrakten aus Testwürsten, hergestellt aus Rind- und Schweinefleisch. *Links:* Angabe der Anzahl Vervielfältigungszyklen, die vor der Agarosegelelektrophorese durchgeführt wurden. *Oben:* Gehalt der Würste an Schweinefleisch in Prozent. *Rechts:* Länge in Basenpaaren des für Schweine-DNA spezifischen PCR-Fragments (108 bp)

tionsgeräte zurückzuführen. Wird nicht nur nach 35 Zyklen, sondern bereits nach 30 Zyklen ein positives Resultat erhalten, beträgt der Gehalt an Schweinefleisch 5% oder mehr. Eine versehentliche oder absichtliche Zugabe von Schweinefleisch oder -schwarte ist wahrscheinlich.

Diese Untersuchungsmethode verwendeten wir zur Beurteilung von Würsten, bei denen keine Schweinebestandteile als Inhaltsstoffe deklariert waren oder die gar deutlich als frei von Schweinebestandteilen gekennzeichnet waren. Dabei zeigte es sich, dass 75% aller Proben positiv für Schwein waren. Davon enthielten zwei Drittel Spuren, ein Drittel aber grössere Mengen von Schweinebestandteilen (3 und nicht veröffentlichte Resultate). Gemäss den erwähnten Beurteilungskriterien bedeutet das, dass in etwa der Hälfte aller Fälle eine ungenügende Reinigung der Produktionsgeräte erfolgte. Dies ist im Hinblick auf mögliche Kontaminationen mit pathogenen Bakterien auch in hygienischer Hinsicht bedenklich. In einem Viertel aller Fälle besteht sogar der dringende Verdacht der nicht deklarierten Zugabe von Schweinebestandteilen. Bei der Entwicklung der Methode zeigte sich, dass die Ausbeute an Nukleinsäuren aus Würsten sehr gut ist und der Ausbeute aus Frischfleisch nahe kommt. Ausserdem zeichnet sich das verwendete PCR-System durch eine ausgezeichnete Spezifität aus (3). Falsch positive Resultate sind daher sehr unwahrscheinlich. Dagegen sind falsch negative Resultate nicht ganz auszuschliessen. Zwar lässt sich DNA wie bereits erwähnt aus Muskelfleisch, Fett (einschliesslich Schwarte) und Innereien in ähnlichen Mengen extrahieren, doch ist nicht auszuschliessen, dass andere Zutaten tierischer Herkunft zur Verwendung in Würsten mehr oder weniger frei von DNA sind.

Beispiel 2: Die Stecknadel im Heuhaufen

Der Nachweis von Bakterien in Lebensmitteln mittels der PCR hat sich in zahlreichen Fällen bewährt (4). In der Regel verlässt man sich dabei aber wie bei der klassischen Kultivierung auf eine Vervielfältigung der Bakterien während Anreicherungsschritten (2). Die DNA-Analytik ersetzt in diesen Untersuchungen eigentlich lediglich die biochemische oder serologische Identifikation der Bakterien; dies allerdings verbunden mit einem erheblichen Zeitgewinn. Demgegenüber sollte ein wirklich analytisch-biotechnologischer Ansatz auf sämtliche klassischen Anreicherungsschritte verzichten und die Bakterien direkt im Lebensmittel nachweisen. Dadurch sollte es möglich werden, pathogene Mikroorganismen innerhalb eines Arbeitstages nachzuweisen.

Das hauptsächliche Problem bei der Entwicklung derartiger Methoden ist die vom Gesetzgeber verlangte hohe Sensitivität, dass pathogene Bakterien wie zum Beispiel *Listeria monocytogenes* in 10–25 g Lebensmittel (Menge je nach Land) «nicht nachweisbar» sein dürfen. Diese dehnbare, unpräzise Ausdrucksweise muss in Zusammenhang mit der gegenwärtig zur Verfügung stehenden Methodik, der Kultivierung, die lediglich Wachstum feststellt oder eben nicht nachweist, gesehen werden. Bei dieser Methode ist weder eine brauchbare Quantifizierung noch die

präzise Angabe einer Nachweisgrenze möglich, da positive Proben nur nach flüssiger Kultivierung mehr oder weniger zuverlässig erkannt werden können. Dies erlaubt aber nur eine qualitative Aussage, weil das Zählen von Bakterienkolonien nach Kultivierung in flüssigen Medien nicht möglich ist. Ein Ausweg aus dieser Situation ist das direkte Ausstreichen von Lebensmittel-Homogenaten auf feste, selektive, das heisst die zur Untersuchung stehende Bakterienart bevorzugende Medien. Da Bakterienzellen in Lebensmitteln oft in einem Ruhezustand vorliegen und selbst in flüssigen, nichtselektiven Medien nur schlecht wachsen, ist diese Methode wie auch andere Ansätze, die auf flüssiger Anreicherung von Verdünnungsreihen von Lebensmittel-Homogenaten beruhen, unzuverlässig. Was «nicht nachweisbar» bezüglich der Anzahl der in einem Gramm Lebensmittel anwesenden Bakterienzellen bedeutet, kann zurzeit nicht gesagt werden.

In unserer Arbeit beabsichtigten wir zu untersuchen, ob mit Hilfe der analytischen Biotechnologie eine präzisere Aussage möglich ist. Sensitive Methoden zur Vervielfältigung von Nukleinsäuren stehen wohl zur Verfügung, die zuverlässige Quantifizierung ist aber noch sehr aufwendig und steht erst am Anfang (3). Dagegen ist die Nachweisgrenze beispielsweise der PCR ausgedrückt in der Anzahl der Ziel-DNA-Moleküle messbar, ja sie beträgt sogar ein einzelnes Molekül (2). Dies stellt aber auf dem Gebiet der Lebensmittelanalytik nicht die eigentliche Herausforderung dar. Vielmehr stellt sich hier das Problem, wie aus 10 g einer komplexen Matrix die DNA einer einzelnen Bakterienzelle zuverlässig und reproduzierbar in das PCR-Volumen von üblicherweise 0,05 bis 0,1 ml gebracht werden kann. Die einfache Extraktion der gesamten DNA, wie im ersten Beispiel beschrieben, wird hier nicht zum Ziel führen, da die oft grosse Menge Gesamt-DNA aus einer 10-g-Probe die nachfolgende Vervielfältigungsreaktion unspezifisch hemmen wird. Wir entwickelten daher die spezifische DNA-Extraktion mittels paramagnetischer Partikel, wie sie in der Abbildung 3 dargestellt ist (5). Dabei wird in einem ersten Schritt die gesamte Bakterienpopulation einer in einem geeigneten Puffer homogenisierten Probe mittels differentiellen Zentrifugationsschritten gesammelt. Dies erlaubt bereits eine Reduktion des ursprünglichen Probenvolumens um einen Faktor 10 bis 20. Anschliessend werden die Bakterienzellen enzymatisch aufgeschlossen, die DNA wird freigesetzt und in Lösung gebracht. Nach Abtrennen der Zellbruchstücke mittels Zentrifugation werden zur rohen DNA-Lösung, die Nukleinsäuren verschiedensten bakteriellen Ursprungs enthalten kann, mit einer Fangsonde beschichtete paramagnetische Partikel gegeben. Nach erfolgter Hybridisierung der Fangsonde zur Ziel-DNA wird der Komplex mit einem Magneten abgetrennt, gewaschen und direkt in der PCR zur Visualisierung der allfälligen Hybridisierung eingesetzt.

Wir verwendeten ein derartiges System zum Nachweis von *Listeria monocytogenes* in Lebensmitteln (5). Während die Nachweisgrenze für künstlich kontaminierte Proben wie zum Beispiel Tilsiterkäse, Salat oder Lachs im Bereich von 1–10 KBE (kolonienbildende Einheiten) pro g lag, beobachteten wir bei der Analyse einer sehr limitierten Anzahl von mittels kultureller Methoden als natürlich kontaminiert erkannten Proben zwei unerwartete Effekte. Einerseits konnten wir in etwa der Hälfte der Proben, die für mehrere Jahre bei –20 °C aufbewahrt worden

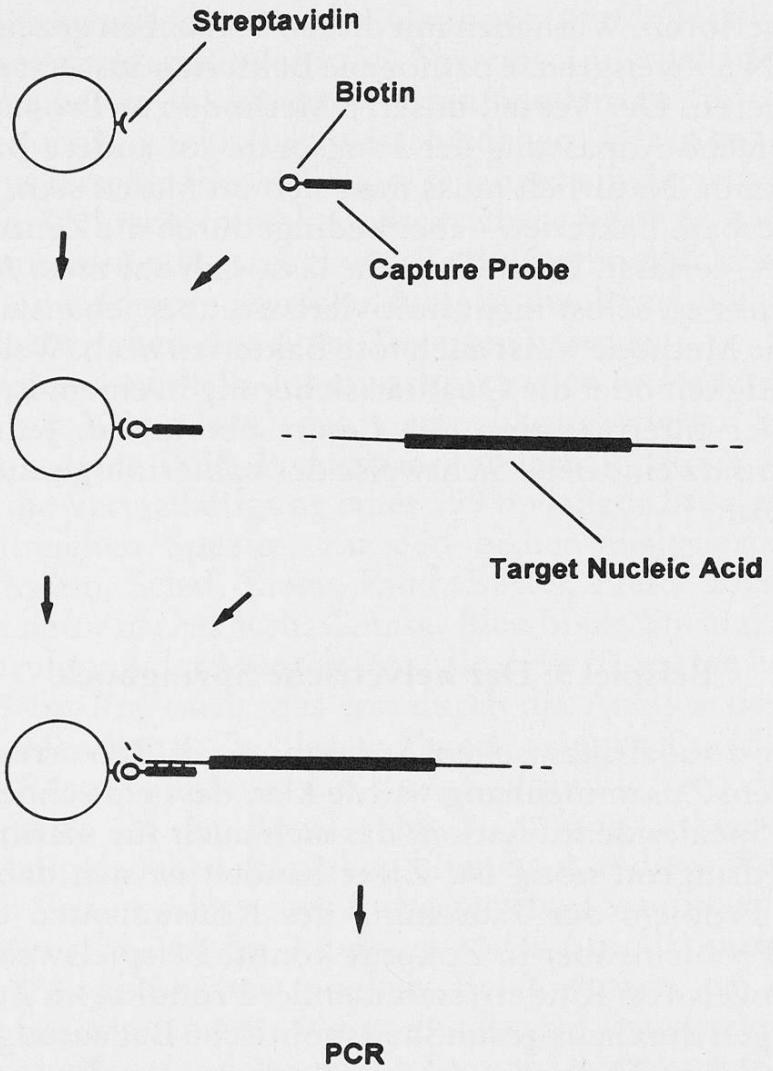

Abb. 3. Spezifische DNA-Extraktion mittels paramagnetischer Partikel: Eine synthetische Oligonukleotidsonde (sogenannte Capture Probe) wird auf synthetischem oder enzymatischem Weg an einem Ende biotinyliert. Anschliessend werden paramagnetische Partikel, an die Streptavidin kovalent gebunden ist, mit der Sonde beschichtet (Streptavidin-Biotin-Interaktion). Der stabile Komplex wird dazu verwendet, aus einer komplexen DNA-Lösung die gesuchte Sequenz (Target Nucleic Acid) durch Hybridisierung und Abtrennung des Komplexes «paramagnetischer Partikel – Streptavidin/Biotin-Sonde/Zielnukleinsäure» zu isolieren. Die darauffolgende Vervielfältigung eines Teils der Zielsequenz (fetter Balken) mittels der PCR dient lediglich der Signalverstärkung (d. h. der Hybridisierung).

waren, noch Listerien nachweisen, während kulturelle Methoden in der Regel bei derartigem Probenmaterial versagen. Andererseits erhielten wir mit unserer PCR-Methode bei frischem Material einige falsch negative Resultate (5). In der Zwischenzeit gelang es uns, dieses Problem durch den Einbau eines Verdauungsschrittes mit Pronase nach der Homogenisation und vor der Isolation der gesamten Bakterienzellen zu lösen. Dadurch werden an Lebensmittelpartikeln haftende bakterielle Zellen losgelöst und gehen bei der Abtrennung von Lebensmittelbe-

standteilen nicht verloren. Wir haben mit diesen Versuchen gezeigt, dass es möglich ist, bei bekannter Nachweisgrenze pathogene Bakterien äusserst sensitiv in Lebensmitteln zu detektieren. Der Vorteil unserer Methode zur Probenvorbereitung ist, dass sie durch einfache Anpassung der Fangsonde auf andere Bakterienarten ausgedehnt werden kann. Natürlich muss man sich im klaren sein, dass die Methode auch nicht kultivierbare Bakterien – aber bedingt durch die Zentrifugationsschritte nicht nackte DNA – erfasst. Diese Tatsache lässt sich auf zwei Arten formulieren: Die Methode erlaubt es, selbst nicht kultivierbare, aber lebensfähige Bakterien zu erfassen. Oder: Die Methode weist auch tote Bakterien nach. Welche Formulierung für die Kontrolltätigkeit oder die Qualitätssicherung in einem Lebensmittelbetrieb relevant ist, sei der Interpretation des Lesers überlassen. Jedenfalls erlaubt, ja erfordert dieser Ansatz eine neue Sichtweise der bakteriologischen Kontamination eines Lebensmittels.

Beispiel 3: Der helvetische Springbock

Der Verkauf von südafrikanischem Springbock als Reh erregte in der Schweiz Aufsehen. In diesem Zusammenhang wurde klar, dass ein schnelles und zuverlässiges System zur Speziesidentifikation, das sich auch für marinierte und erhitzte Produkte eignet, dringend nötig ist. Zwar handelt es sich dabei in erster Linie lediglich um ein Problem der Täuschung des Konsumenten und nicht um ein gesundheitliches Problem, aber in Zukunft könnte beispielsweise der sichere und zuverlässige Nachweis von Rindern stammender Produkte im Zusammenhang mit Prion-Erkrankungen durchaus gesundheitspolitische Bedeutung erlangen. Die gegenwärtig zugänglichen Methoden basieren auf der Analyse von Proteinen (3). Dazu gehören die isoelektrische Fokussierung und serologische Testverfahren. Diese Methoden eignen sich für die Identifikation von rohem Fleisch, versagen aber häufig bei der Analyse von erhitztem oder mariniertem Fleisch und von Produkten, die aus Fleisch von verschiedenen Tierarten zusammengesetzt sind.

Die mögliche Lösung dieses Problems mit Hilfe der DNA-Analytik wurde in unserem Laboratorium untersucht (6). Wie bereits im ersten Beispiel erwähnt, lässt sich aus erhitztem und mariniertem Fleisch DNA in ausreichender Qualität für die Vervielfältigung mittels PCR gewinnen. Bei der Auswahl des Zielgens für die Definition der PCR-Primer orientierten wir uns aber nicht an möglichen speziesspezifischen Genen oder Teilsequenzen. Dies würde nämlich unweigerlich dazu führen, dass für jede Spezies von Interesse ein eigenes PCR-System ausgearbeitet werden müsste. Um einen derart hohen, unökonomischen Arbeitsaufwand zu umgehen, wählten wir eine andere Strategie. Als Zielgen wählten wir nicht ein Gen aus der Kern-DNA der Zelle, sondern aus der mitochondrialen DNA (mtDNA). mtDNA-Sequenzen weisen eine Reihe von für analytische Zwecke vorteilhaft nutzbaren Eigenschaften auf (6). Das mitochondriale Genom wird mit wenigen Ausnahmen mütterlich vererbt und ist frei von Rekombinationsereignissen, unterliegt aber einer schnellen Evolutionsgeschwindigkeit. Die hohe Kopienzahl (Hun-

derte bis Tausende von mitochondrialen Genomen per Zelle) ist die Voraussetzung für die Entwicklung eines sensitiven PCR-Systems. Innerhalb des mitochondrialen Genoms existieren neben hochkonservierten Sequenzen (d.h. gleiche oder sehr ähnliche Basensequenzen zwischen verschiedenen Tierarten) auch variable Sequenzabschnitte unterschiedlicher Länge. Je länger ein derartiges Stück ist, um so grösser ist auch die Wahrscheinlichkeit, dass selbst zwischen Stämmen der gleichen Spezies Sequenzunterschiede erscheinen. Bei kürzeren Stücken ist dagegen damit zu rechnen, dass eine Stammunterscheidung in der Regel nicht möglich ist, aber dass Unterschiede zwischen einzelnen Tierarten bestehen.

Wir wählten daher innerhalb des mitochondrialen *cytb*-Gens ein relativ kurzes variables Stück (etwa 300 bp lang), das von hochkonservierten Sequenzen flankiert ist. Die Definition eines PCR-Primerpaars innerhalb dieser konservierten Abschnitte erlaubte die Vervielfältigung eines 359 bp langen Stückes mit der variablen Region von zahlreichen Spezies. Zu den bisher analysierten Arten gehören Schwein, Wildschwein, Schaf, Ziege, Rind, Büffel, Pferd, Elch, Rentier, Hirsch, europäisches und chinesisches Reh, Gemse, Blessbock, Springbock, Kudu, Huhn, Truthahn, Känguruh und der Mensch (6). Alle diese Tierarten ergeben in der PCR das erwähnte 359-bp-Fragment, das erst durch die Analyse der variablen Region unterschieden werden kann. Zu diesem Zweck können Restriktionsenzyme verwendet werden. Restriktionsenzyme sind Endonukleasen, die eine spezifische kurze DNA-Sequenz (in der Regel 4 bis 8 bp lang) erkennen und die DNA innerhalb oder wenig daneben schneiden können. Auf diese Weise können Punktmutationen durch Verlust oder neues Auftreten einer Schnittstelle erkannt werden. Bei der Analyse des *cytb*-359-bp-Amplikons (das Amplikon ist das vervielfältigte DNA-Stück) sind zwei Ansätze möglich. Bei Tierarten, bei denen die variable Sequenz bekannt ist, können gezielt einzelne Restriktionsenzyme zur Unterscheidung ausgewählt werden. Ist dagegen die Sequenz unbekannt, kann mit 15 bis 20 Restriktionsenzymen eine eigentliche Typisierung durchgeführt werden.

Ein Beispiel für den gezielten Einsatz von einzelnen Restriktionsenzymen ist die Unterscheidung von Schwein und Rind. Während die Verdauung des Schweine-*cytb*-Amplikons mit dem Restriktionsenzym *Alu*I ein 244-bp- und ein 115-bp-Fragment ergibt, werden bei der Verdauung des Rind-Amplikons Fragmente der Länge 190 bp und 169 bp gefunden. Das Büffel-Amplikon ergibt mit *Alu*I die gleichen Fragmente wie Rind, weist aber im Gegensatz zu Rind eine *Taq*I-Schnittstelle auf. Auf diese gezielte Art und Weise lassen sich auch Schwein und Wildschwein, Schaf und Ziege, Huhn und Truthahn unterscheiden (6). Dieser Ansatz lässt sich aber nicht nur zur Analyse reiner Fleischsorten, sondern auch zur Untersuchung von zusammengesetzten Produkten verwenden. So können bei der Analyse von erhitzten Rind-Schweinefleisch-Mischungen noch 0,5% Schweinefleisch erkannt werden. Bei der Analyse von käuflichen Würsten war die Methode bei Produkten mit bis zu 3 Fleischsorten, die alle in einem PCR-Durchgang erkannt werden konnten, erfolgreich (6). Wie beim ersten Beispiel wurden auch hier wieder verschiedene «Fehler» in den Zutatenangaben gefunden.

Ist dagegen die zur Diskussion stehende variable Sequenz nur ungenügend bekannt, wie es zum Beispiel bei Wildtierarten der Fall ist, kann mit einer Vielzahl

von Restriktionsenzymen eine speziesspezifische Typisierung durchgeführt werden. Bei der Analyse der Wildtierarten verwendeten wir 15 verschiedene Enzyme (6). Durch die Zuordnung eines Grossbuchstabens zu jedem Enzym kann für jede Spezies ein Typisierungscode erhalten werden. Falls ein Enzym das Amplikon nicht schneidet, wird der entsprechende Grossbuchstabe bei der Kodierung weggelassen; werden für bestimmte Enzyme bei verschiedenen Tierarten verschiedene Schnittmuster nachgewiesen, werden sie durch Zahlenindices identifiziert. So hat der Hirsch den Code $AE_2H_1J_1L_1N_2$, das Reh dagegen den Code $AE_1F_1H_1I_1L_1N_1O_1$ (6). In der Abbildung 4 ist als Beispiel die Ausarbeitung des Codes für das chinesische Reh gezeigt. Mit dieser Methode lassen sich die folgenden 9 Wildtierarten unterscheiden: Reh, Hirsch, Gemse, Springbock, Elch, Rentier, Kudu, Blessbock und Känguruh. Dagegen können erwartungsgemäss die beiden nahe verwandten Subspezies des Rehs, das europäische Reh *(Capreolus capreolus capreolus)* und das chinesische Reh *(Capreolus capreolus bedfordi)*, nicht unterschieden werden. Wir konnten ausserdem zeigen, dass sich diese Methodik auch auf mariniertes Fleisch anwenden lässt (6). Die Vorteile dieses Vorgehens liegen klar darin, dass wahrscheinlich jede für die Ernährung interessante Tierart, selbst Fische, mit einem einzigen PCR-System kombiniert mit der in diesem Absatz beschriebenen RFLP-

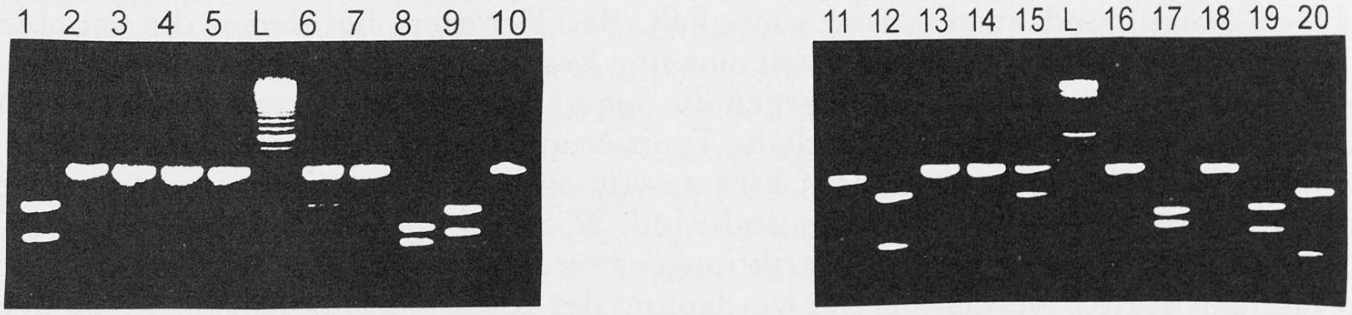

Abb. 4. Agarosegelelektrophorese des *cytb*-Amplikons des chinesischen Rehs (*Capreolus capreolus bedfordi*) verdaut mit 20 verschiedenen Restriktionsenzymen. *Bahnen:* 1, *Afl*III (Buchstabencode A); 2, *Alu*I (B); 3, *Ase*I (C); 4, *Cfo*I; 5, *Dra*I (D); 6, *Dra*III; 7, *Eco*RI; 8, *Hae*III (E); 9, *Hind*II (F); 10, *Hind*III (G); 11, *Hinf*I (H); 12, *Mbo*I (I); 13, *Mbo*II (J); 14, *Pst*I; 15, *Rsa*I (K); 16, *Sal*I; 17, *Ssp*I (L); 18, *Taq*I (M); 19, *Tru*9I (N); 20, *Xba*I (O); L, Molekulargewicht-Standards (100 bp – Leiter). Für die Tierarttypisierung verwenden wir die 15 Enzyme mit Buchstabencode. Das Amplikon wird durch die Enyme A, E, F, H (sehr kleines Teilfragment, auf dem Gel nicht sichtbar), I, L, N und O geschnitten (die schwachen Fragmente, kleiner als 359 bp, erhalten mit dem Enzym K, liessen sich wiederholt nicht reproduzieren). Daraus resultiert für das chinesische Reh der folgende Tierartencode: $AE_1F_1H_1I_1L_1N_1O_1$. Der Index identifiziert ein bestimmtes Schnittmuster bei Enzymen, die mit verschiedenen Tierarten mehr als ein Muster ergaben.

Typisierung (Restriction Fragment Length Polymorphisms) in kurzer Zeit identifiziert werden kann, ohne dass jedes Mal grundlegende Untersuchungen durchgeführt werden müssen.

Beispiel 4: Tot und doch lebendig

Aus Lebensmitteln kultivierbare pathogene Bakterien stellen ein Gesundheitsrisiko dar. Gemäss Lebensmittelrecht gelten nicht kultivierbare Bakterien als tot und damit ungefährlich. Dabei handelt es sich aber um ein gefährliches Schwarz-Weiss-Denken. Es ist mittlerweile belegt und bekannt, dass die Kultivierbarkeit unter künstlichen Laborbedingungen nicht mit dem Potential der Bakterien, einen Wirt zu befallen, korreliert. Vielmehr besteht ein weiter Bereich, in welchem die Bakterien im Laboratorium nicht mehr wachsen, aber noch als lebensfähig bezeichnet werden müssen, da sie gewisse metabolische Aktivitäten besitzen. Derartige Bakterienzellen können ein gesundheitliches Risiko darstellen. Gerade *Campylobacter*-Arten sind dafür bekannt, dass sie sehr schwierig aus Lebensmitteln zu isolieren sind und auf künstlichen Medien nur ungenügend wachsen. So konnten wir aus 93 Milch- und Milchproduktproben in 6 Proben mittels DNA-Analytik *Campylobacter jejuni* oder *Campylobacter coli* nachweisen, während mit der offiziellen Kultivierungsmethode des Schweizerischen Lebensmittelbuches in keinem Fall *Campylobacter* spp. gefunden wurde (7).

Dabei stellt sich natürlich unmittelbar die Frage nach der Relevanz DNA-analytischer Resultate. Es ist zwar bekannt, dass nicht kultivierbare Erreger Krankheiten bewirken können, aber wie häufig dies der Fall ist und wie bedeutsam es im Vergleich zu durch kultivierbare Bakterien verursachten Erkrankungen ist, ist nicht bekannt (8). Ein möglicher Weg, diesen Fragen nachzugehen, sind epidemiologische Untersuchungen, also der Vergleich von in der Klinik angetroffenen und in Lebensmitteln vorkommenden Typen einer Spezies. Üblicherweise erfolgt die Typisierung mittels biochemischer Tests (Biotypen) oder serologisch (Serotypen). Beide Ansätze haben sich in der Vergangenheit bei der ersten Charakterisierung neuer Spezies bewährt, weisen aber doch ein relativ geringes diskriminierendes Potential auf. Neuere Methoden wie die Analyse von Isoenzymen (Multilocus Enzyme Electrophoresis, MEE) und die Vervielfältigung polymorpher Genomabschnitte (Random Amplification of Polymorphic DNA, RAPD-PCR) sind zwar stärker diskriminierend, aber technisch auch äusserst anspruchsvoll. Eines aber haben alle diese Typisierungsmethoden gemeinsam: Sie lassen sich ausschliesslich mit isolierten Reinstämmen durchführen.

Das Ziel unserer Arbeiten war die Entwicklung einer Methode, die es erlaubt, Bakterien direkt aus Lebensmitteln zu typisieren, ohne dass ihre Isolation notwendig wäre (7, 8). Ein entsprechendes PCR-System hätte also einerseits möglichst sensitiv zu sein, andererseits müsste es aber auch einen möglichst grossen Sequenzenabschnitt erkennen, um im vervielfältigten Fragment Unterschiede zwischen einzelnen Klonen einer Bakterienspezies nachweisen zu können. Da kurze (maxi-

mal einige Hunderte Basenpaare lange) PCR-Systeme in der Regel sensitiver sind als lange (mehr als 1000 Basenpaare lange), scheint dieser Ansatz wenig aussichtsreich. Bei der Auswahl einer Zielsequenz für die Definition eines PCR-Systems zum Nachweis von *Campylobacter* spp. in Lebensmitteln stiessen wir aber auf eine interessante Genomkonfiguration: Diese Bakterien besitzen zwei Gene (*flaA* und *flaB*), die für zwei Flagellinproteine kodieren. Die beiden Gene liegen auf dem Genom in gleicher Orientierung nebeneinander und sind nur durch eine kurze, bezüglich Länge und Basenabfolge äusserst variable Zwischensequenz getrennt. Wir definierten einen PCR-Primer am Ende des einen Gens und den anderen zu Beginn des zweiten Gens und konnten zeigen, dass diese Vervielfältigung der Zwischengensequenz ein sehr sensitives PCR-System zum Nachweis von *Campylobacter* spp. in Lebensmitteln ergibt (7).

Als nächstes klärten wir ab, ob sich dieses PCR-System auch zur Typisierung von isolierten Stämmen eignet (8). Gesamthaft wurden 22 *Campylobacter jejuni*- und *Campylobacter coli*-Stämme menschlichen und tierischen klinischen Ursprungs und aus Hühnerleber untersucht. In einem ersten Schritt wurde die PCR-Fragmentlänge bestimmt, wobei 3 verschiedene Typen gefunden wurden (Abb. 5, 1. Spalte). Die Mehrzahl der Stämme gehörte zum Typ KP, wobei keine Unterscheidung zwischen den drei Gruppen von Stämmen möglich war. Als zweiter Ansatz wurde daher eine RFLP-Analyse der Amplikons, wie bereits im vorangehenden Beispiel beschrieben, durchgeführt. Dazu wurden die beiden Restriktionsenzyme *Alu*I (A) und *Dra*I (D) verwendet, für die jeweils verschiedene Schnittmuster gefunden wurden (0–4). Wir stellten sieben verschiedene RFLP-Typen fest (Abb. 5, 2. Spalte), von denen 3 in der Abbildung 6 dargestellt sind. Allerdings enthielten die Typen A0D3, A1D1 und A2D4 je ein klinisches Isolat menschlichen und tierischen Ursprungs, während die Typen A1D2 und A1D3 menschliche Isolate und Isolate aus Hühnerleber umfassten. In einem dritten Schritt wurden daher Teile aller PCR-Fragmente sequenziert und die Basenabfolgen verglichen (8). Die daraus folgende Unterteilung in Sequenziertypen (S; Abb. 5, 3. Spalte) erlaubte eine weitgehende Unterscheidung der verschiedenen Stämme. Ich möchte an dieser Stelle ausdrücklich darauf hinweisen, dass die folgenden Überlegungen auf sehr kleinen Stammzahlen beruhen und in Zukunft bestätigt oder auch widerlegt werden müssen. Die S-Typisierung erlaubt es jedenfalls, klinische Isolate aus unserer Stammsammlung menschlichen Ursprungs eindeutig von jenen tierischen Ursprungs abzugrenzen. Dies deutet darauf hin, dass keine ausgeprägte Übereinstimmung zwischen Tier- und Menschenpathogenität eines Stammes besteht. Interessanterweise weist kein Hühnerleberisolat den gleichen S-Typ wie klinische Isolate tierischen Ursprungs auf. Die Annahme stiller Infektionen dieser Hühner mit einem primär menschenpathogenen Stamm wäre in guter Übereinstimmung mit der Tatsache, dass sämtliche Hühnerleberisolate zu zwei S-Typen mit klinischen Isolaten menschlichen Ursprungs gehören. Dies wiederum passt zur häufig geäusserten Vermutung, dass Infektionen des Menschen durch Pouletfleisch verursacht sein können. Schliesslich ist festzuhalten, dass die S-Typisierung nicht mit der Spezieseinteilung in *Campylobacter jejuni* und *Campylobacter coli* basierend auf der als unzuverlässig geltenden Hippurat-Hydrolyse übereinstimmt. Auffallend ist

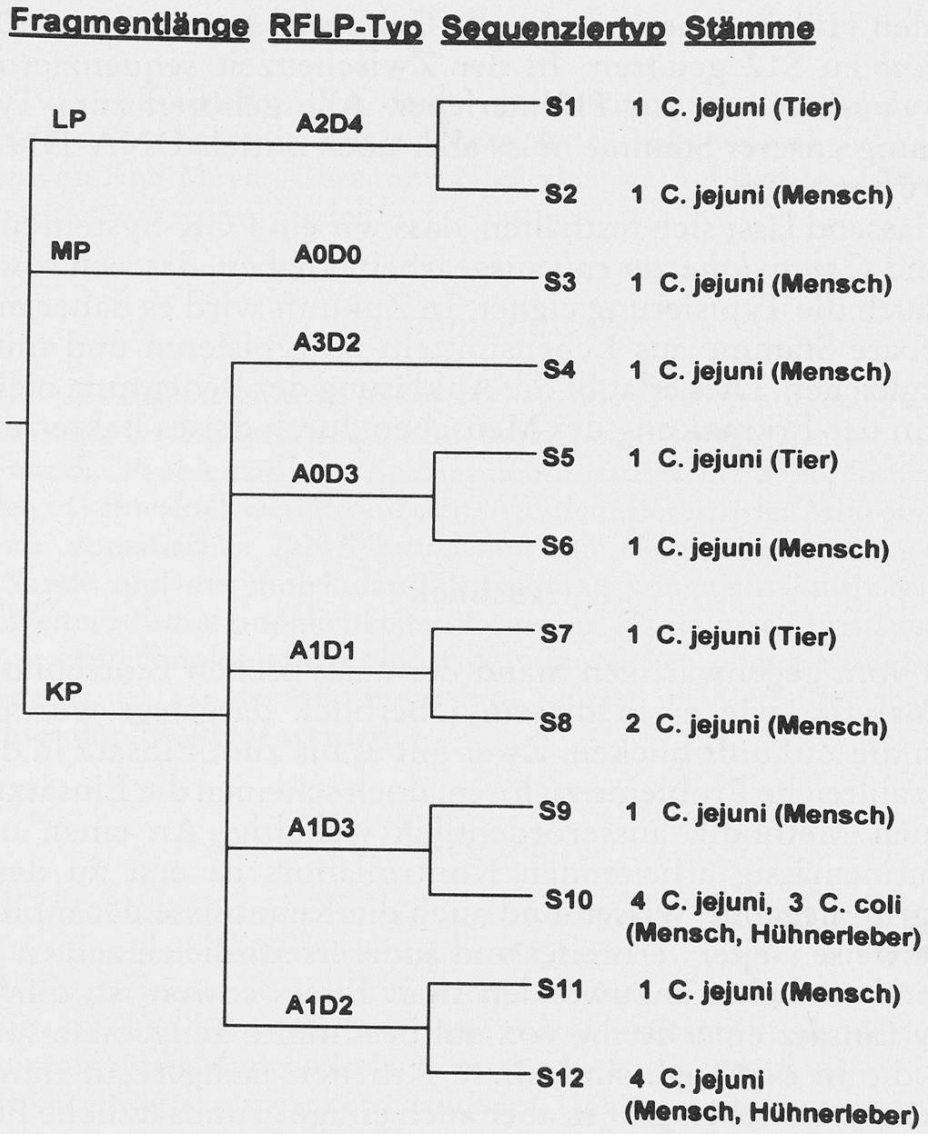

Abb. 5. Zuordnung der im Text erwähnten *Campylobacter*-Stämme zu den verschiedenen Typisierungsgruppen. Bei den Hühnerleberisolaten in S10 handelt es sich um 2 *Campylobacter coli*-Stämme. Drei der vier Stämme in S12 sind Hühnerleberisolate

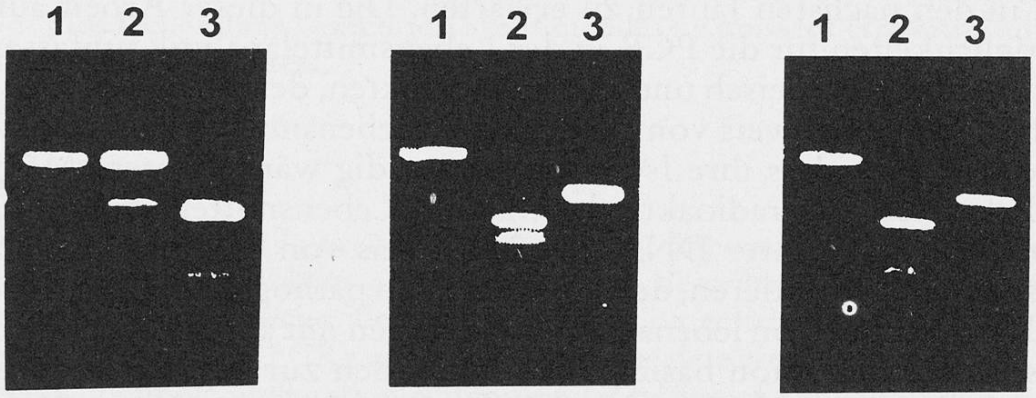

Abb. 6. Agarosegelelektrophorese von unverdauten *(Bahn 1)* und mit *Alu*I *(Bahn 2)* und *Dra*I *(Bahn 3)* verdauten *Campylobacter*-Amplikons. *Links: Campylobacter jejuni* LMC 8, A0D3, S6. *Mitte: Campylobacter jejuni* LMC 287, A1D3, S10. *Rechts: Campylobacter jejuni* LMC 14, A3D2, S4

aber, dass bei den Hühnerleberisolaten alle *Campylobacter coli* zu S10, alle *Campylobacter jejuni* zu S12 gehören. In der Zwischenzeit sequenzierten wir drei weitere *Campylobacter coli* aus Hühnerleber. Alle gehören zum Typ S10. Die Spezieszuordnung unserer Stämme muss aber noch mittels DNA-DNA-Hybridisierung überprüft werden.

Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass wir ein PCR-System für *Campylobacter jejuni* und *Campylobacter coli* ausgearbeitet haben, das sich sowohl für den Nachweis als auch die Typisierung eignet. In Zukunft wird es daher möglich sein, nicht kultivierbare Stämme aus Lebensmitteln zu typisieren und mit klinischen Isolaten zu vergleichen. Dies erlaubt die Abklärung der Bedeutung nicht kultivierbarer Stämme in der Erkrankung des Menschen durch dieses Bakterium.

Ausblick

Ausgehend vom gegenwärtigen Stand der analytischen Biotechnologie in der Lebensmittelanalytik, wie er in diesem Überblick dargelegt wurde, darf man optimistisch in die Zukunft blicken. Zwar gilt es bis zum Einsatz in der Routineanalytik noch zahlreiche Probleme zu lösen, doch scheinen die Einsatzmöglichkeiten dieser neuen Methodik ausserordentlich vielfältig. An einen umfassenden Einsatz in routinemässig arbeitenden Kontrollabors ist erst zu denken, wenn einerseits das grundlegende Wissen und auch die Kenntnisse der molekularbiologischen Arbeitsweise weiter verbreitet und andererseits die einzelnen Testsysteme einheitlicher und einfacher anzuwenden sind. Bis es soweit ist, dürfte noch für einige Zeit der Einsatz einer Reihe von auf bestimmte Teilgebiete spezialisierten Laboratorien, die in der Lage sind, diese Arbeiten fachgerecht durchzuführen, unumgänglich sein. Daneben gibt es aber auch einige grundsätzliche Probleme mit der DNA-Analytik. Dazu gehören die Quantifizierbarkeit der Resultate und die Interpretation positiver Befunde. An derartigen Problemen wird in verschiedenen Laboratorien gearbeitet, und entsprechende Resultate liegen teilweise bereits vor oder sind in den nächsten Jahren zu erwarten. Die in dieser Arbeit aufgezeigten Einsatzmöglichkeiten für die PCR in der Lebensmittelanalytik umfassen die Speziesidentifikation von Fleisch und Fleischprodukten, den Nachweis von bestimmten Tierarten, den Nachweis von Bakterien in Lebensmitteln und die Typisierung von Bakterien, ohne dass ihre Isolation notwendig wäre. Weitere Möglichkeiten sind das Erkennen von radioaktiv bestrahlten Lebensmitteln durch die Bestimmung von Schäden in ihrer DNA, der Nachweis von gentechnisch veränderten Nahrungspflanzen und -tieren, der Nachweis von pathogenen Viren in Lebensmitteln und das Erkennen von lebensfähigen Bakterien mit auf der Transskription und der reversen Transskription basierenden Methoden zur Vervielfältigung von Boten-Ribonukleinsäure (mRNA). Speziell der Nachweis von Viren dürfte interessant sein, da eine eigentliche Lebensmittelvirologie gegenwärtig nicht existiert.

Dank

Ich danke allen Mitarbeitern aus dem Laboratorium für Lebensmittelchemie für die ausgezeichnete Zusammenarbeit. Diese Übersicht enthält wesentliche Resultate aus den Dissertationen von Rolf Meyer, Christoph Niederhauser und Bernhard Wegmüller und aus der Lizentiatsarbeit von Edgar Studer.

Zusammenfassung

Anhand von vier Beispielen wird in der vorliegenden Arbeit aufgezeigt, dass die analytische Biotechnologie im Lebensmittelsektor bereits weit fortgeschritten ist. Die Beispiele befassen sich mit der Problematik der Speziesidentifikation und dem Nachweis von Schweinebestandteilen in schweinefreien Produkten. Aus dem Bereich der Mikrobiologie wird eine Möglichkeit zur spezifischen DNA-Extraktion mit einer an paramagnetische Partikeln gebundenen Sonde und die molekulare Typisierung von nicht kultivierbaren Bakterien beschrieben. Weitere Einsatzmöglichkeiten bestehen; als politisch brisantes Thema sei die Erkennung von gentechnologisch veränderten pflanzlichen oder tierischen Lebensmitteln erwähnt. Für den Einsatz in der Routineanalytik müssen die Methoden aber noch zuverlässiger und leichter durchführbar werden.

Résumé

La présente publication démontre, avec quatre exemples à l'appui, combien la biotechnologie analytique dans le domaine alimentaire a déjà fait des progrès. Il est question dans les exemples cités, du problème de l'identification d'espèces et de la preuve d'une présence de composants porcins dans des produits déclarés comme exempts de viande de porc. En ce qui concerne la microbiologie alimentaire, une méthode est décrite en vue de la détermination moléculaire de bactéries ne pouvant être cultivées. Dans ce deuxième cas, la préparation des échantillons a été effectuée par l'extraction spécifique de DNA à l'aide d'une sonde liée à des particules paramagnétiques. D'autres applications existent. La mise en évidence de denrées alimentaires d'origine végétale ou animale modifiées par des techniques du génie génétique est un sujet très délicat. Les méthodes biotechnologiques d'analyse devront certes devenir plus fiables et plus faciles dans l'exécution avant qu'elles ne puissent être introduites comme méthodes analytiques courantes.

Summary

Analytical biotechnology is becoming increasingly important in food analysis. In this review, several principal problems are addressed and described using examples from the author's laboratory. First, species identification based on restriction digestion of universal polymerase chain reaction (PCR) amplicons and the detection of pork in sausages are discussed. Second, sample preparation and molecular typing of nonculturable bacteria were chosen as difficult tasks from the field of food microbiology. Future developments will include the recognition of foods based on genetically altered plants or animals. However, for application in routine control, these methods should become more reliable and easier to perform.

Literatur

1. *Ebbehoj, K.F.* and *Thomson, P.D.:* Species differentiation of treated meat products by DNA hybridisation. Meat Sci. **30,** 221–234 (1991).
2. *Candrian, U., Niederhauser, Ch., Höfelein, Christiane, Bühler, H.-P., Müller, U.* und *Lüthy, J.:* Polymerase-Kettenreaktion in der bakteriologischen Lebensmitteldiagnostik am Beispiel von *Listeria monocytogenes.* Mitt. Gebiete Lebensm. Hyg. **82,** 539–558 (1991).
3. *Meyer, R., Candrian, U.* and *Lüthy, J.:* Detection of pork in heated meat products by the polymerase chain reaction. J. AOAC Intern. **77,** 617–622 (1994).
4. *Candrian, U.:* Amplification methods in food microbiology. J. Med. Microbiol., in press (1995).
5. *Niederhauser, Ch., Lüthy, J.* and *Candrian, U.:* Direct detection of *Listeria monocytogenes* using paramagnetic bead DNA extraction and enzymatic DNA amplification. Molec. Cell. Probes **8,** 223–228 (1994).
6. *Meyer, R., Höfelein, Christiane, Lüthy, J.* and *Candrian, U.:* PCR-RFLP analysis: A simple method for species identification in food. J. AOAC Intern., in press (1995).
7. *Wegmüller, B., Lüthy, J.* and *Candrian, U.:* Direct polymerase chain reaction detection of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* in raw milk and dairy products. Appl. Environm. Microbiol. **59,** 2161–2165 (1993).
8. *Studer, E.: Campylobacter jejuni* und *Campylobacter coli:* Nachweis in Lebensmitteln und molekulare Typisierung. Diplomarbeit in Biologie mikrobiologischer Richtung, Abteilung für Lebensmittelchemie, Institut für Biochemie, Universität Bern (1994).

Gegenwärtige Adresse des Autors:
Dr. Urs Candrian
Bundesamt für Gesundheitswesen
Sektion für immunbiologische Erzeugnisse
Bollwerk 27
CH-3001 Bern