

# Verunreinigungen tierischer Herkunft in Getreide und Getreideprodukten. Teil I, Problemstellung und Beitrag zur Tierartbestimmung mittels PCR

Autor(en): **Eugster, Albert**

Objektyp: **Article**

Zeitschrift: **Mitteilungen aus Lebensmitteluntersuchungen und Hygiene = Travaux de chimie alimentaire et d'hygiène**

Band (Jahr): **94 (2003)**

Heft 3

PDF erstellt am: **22.07.2024**

Persistenter Link: <https://doi.org/10.5169/seals-981990>

## **Nutzungsbedingungen**

Die ETH-Bibliothek ist Anbieterin der digitalisierten Zeitschriften. Sie besitzt keine Urheberrechte an den Inhalten der Zeitschriften. Die Rechte liegen in der Regel bei den Herausgebern.

Die auf der Plattform e-periodica veröffentlichten Dokumente stehen für nicht-kommerzielle Zwecke in Lehre und Forschung sowie für die private Nutzung frei zur Verfügung. Einzelne Dateien oder Ausdrucke aus diesem Angebot können zusammen mit diesen Nutzungsbedingungen und den korrekten Herkunftsbezeichnungen weitergegeben werden.

Das Veröffentlichen von Bildern in Print- und Online-Publikationen ist nur mit vorheriger Genehmigung der Rechteinhaber erlaubt. Die systematische Speicherung von Teilen des elektronischen Angebots auf anderen Servern bedarf ebenfalls des schriftlichen Einverständnisses der Rechteinhaber.

## **Haftungsausschluss**

Alle Angaben erfolgen ohne Gewähr für Vollständigkeit oder Richtigkeit. Es wird keine Haftung übernommen für Schäden durch die Verwendung von Informationen aus diesem Online-Angebot oder durch das Fehlen von Informationen. Dies gilt auch für Inhalte Dritter, die über dieses Angebot zugänglich sind.

# Verunreinigungen tierischer Herkunft in Getreide und Getreideprodukten: I. Problemstellung und Beitrag zur Tierartbestimmung mittels PCR

Albert Eugster

Kantonales Laboratorium Aargau, Aarau, Schweiz

Eingegangen 9. Dezember 2002, angenommen 21. Mai 2003

## Einleitung

Im November 2001 wurden bei Routinekontrollen durch Bundesbehörden in einer Aargauer Getreidemühle in Tierfutter Spuren tierischer Bestandteile nachgewiesen. Da die betroffene Mühle auch Mahlprodukte für den menschlichen Verzehr herstellt, wurden Mehle für die Brotherstellung untersucht. Eine Probe Ruchmehl enthielt ein mikroskopisch kleines Knochenfragment. In der Folge wurden entsprechende Produkte aller Mühlen auf dem Kantonsgebiet beprobt; in einigen Mehlproben liessen sich mit mikroskopischen Methoden entweder Knochenfragmente oder Muskelfasern nachweisen. Der Verdacht lag nahe, dass es sich dabei um Kontaminationen mit Tierkörpermehl, auch als MBM (meat and bone meal) bezeichnet, handeln könnte. Mit mikroskopischen Methoden lassen sich der Ursprung resp. die in Frage kommende Tierart, von welchem solche Spuren tierischer Verunreinigungen stammen, nur sehr grob eruieren; das Knochenfragment in der besagten Ruchmehlprobe konnte damit einem Landsäugetier zugeordnet werden. Im Zusammenhang mit der Übertragung der Bovinen Spongiformen Enzephalopathie (BSE) auf den Menschen durch den Verzehr von infektiösem, tierischem Material ist es wichtig nachzuweisen, ob tierische Verunreinigungen in Lebensmitteln von Tieren der Rindergattung stammen oder welche Tierarten daran beteiligt sind. Daher wurde die Frage nach der tierartspezifischen Herkunft immer lauter gestellt. Die Wichtigkeit der Beantwortung solcher Fragestellungen wird noch erhöht durch den Umstand, dass als Folge der beschriebenen Problematik zum heutigen Zeitpunkt erhebliche finanzielle Forderungen im Raum stehen.

Grundsätzlich lässt sich die Herkunft tierischer Verunreinigungen in Getreide und Getreideprodukten in drei Kategorien einteilen:

1. Wildtiere oder Teile davon, die beim Ernteprozess ins Getreide gelangen. Dazu gehören Gewebestandteile wie Haut, Haare, Federn und Horn sowie Ausscheidungen wie Fäkalien und Speichel. In Frage kommen vor allem Kleinnager, Reptilien und Gliederfüßler (z.B. Insekten).
2. Kontamination mit Tierkörpermehl, welches zu einem früheren Zeitpunkt im gleichen Tätigkeitsbereich transportiert, gelagert oder verarbeitet wurde.
3. Vorrats- und Lagerschädlinge während der Lagerhaltung.

Während der Probenahme und der Analyse können auch menschliche Gewebestandteile in die Probe gelangen, welche im folgenden Analysengang ebenfalls als «tierische» Verunreinigungen erfasst werden. Die Bestimmung der Tierarten von Bestandteilen tierischer Herkunft kann prinzipiell mit tierartspezifischen, proteinchemischen Methoden erfolgen. Beschrieben wurden enzyme linked immunosorbent assays (ELISA), die als Marker Albumine (1) oder Troponin I einsetzen (2). Die Nachweisempfindlichkeit solcher Methoden ist aber gering, zudem lassen sich damit Spuren der zweiten Kategorie nicht nachweisen, da die Proteine infolge der seit den 1990er Jahren gesetzlich vorgeschriebenen Hitzebehandlung der Tierkörpermehle denaturiert sind. Die DNA-analytischen Methoden, basierend auf der Polymerasenkettenreaktion (PCR) zur Erfassung möglichst vieler Tierarten aller Kategorien können in drei Typen unterteilt werden:

- Nachweismethoden für eine einzelne Tierart,
- Nachweismethoden für ein einzelnes Taxon und
- universelle Nachweismethoden für DNA tierischen Ursprungs.

### *Nachweismethoden für eine einzelne Tierart*

Tierartspezifische Nachweismethoden mittels PCR sind einige bekannt, z.B. der auf einem Wachstumshormon-Gen basierende Nachweis der Spezies Schwein von Meyer et al. (3). Tartaglia et al. (4) weisen bovine DNA anhand des Gens der mitochondrialen ATPase-Untereinheiten nach, ebenso Krcmar und Rencova (5). Myers et al. (6) haben die Methode von Tartaglia et al. (4) validiert bezüglich des Nachweises von bovinem Tierkörpermehl in Tierfutter; über die vorgängige Art der Hitzebehandlung des Tierkörpermehl fehlen jedoch die Angaben. Wolf et al. (7) weisen in Mischfutter mit 1 g/100 g erhitztem Tierkörpermehl noch spezifisch Rind nach, der spezifische Schwein-Nachweis gelingt noch in Mischungen mit 0,1 g/100 g Tierkörpermehl. Der Nachweis basiert auf dem mitochondrialen Cytochrom b-Gen. Ein real time PCR-System (TaqMan™) beschreiben Laube et al. (8). Dieses System weist auf dem chromosomal codierten Phosphodiesterase-Gen spezifisch Rind nach; das Amplikon ist mit 104 Basenpaaren (bp) kurz und die Methode deshalb sehr empfindlich.



## Nachweismethoden für ein einzelnes Taxon

Taxonspezifische Nachweismethoden mittels PCR sind bisher kaum bekannt. Da die auf phänotypischen Merkmalen begründete zoologische Systematik mit den genotypischen Merkmalen derselben Tierart nicht einhergeht, kann eine auf DNA-Analytik basierende Methode kaum den Anspruch erheben, alle Tierarten eines Taxons vollständig zu erfassen. Trotzdem kann zum Beispiel die Arbeit von *Laube et al.* (8) zu dieser Gruppe gezählt werden. Neben dem artspezifischen Rindnachweis ist auch ein auf dem chromosomal codierten Myostatin-Gen basierendes real time PCR-System beschrieben, mit dem Säugetiere und Vögel (Geflügel) nachgewiesen werden können.

## Universelle Nachweismethoden für DNA tierischen Ursprungs

Der Forderung nach dem Nachweis möglichst vieler, stark unterschiedlicher Tierarten mit nur einem PCR-System nachzukommen, erfüllt am ehesten die Arbeit von *Meyer et al.* (9). Das mitochondrial codierte Cytochrom b-Gen weist konservierte Regionen auf, in denen die universellen Primer binden. Der Bereich dazwischen hat sich im Laufe der Evolution ständig verändert und kann daher mittels Analyse des Restriktionsfragmentlängen-Polymorphismus (RFLP) des 359 bp langen Amplikons zur Identifikation der Tierart herangezogen werden. Da bei dieser Methode die Co-Amplifikation von chromosomalen Pseudogenen die Analyse erschweren, haben *Wolf et al.* (10) diese Methode weiterentwickelt und den «forward»-Primer in das benachbarte tRNA<sup>Glu</sup>-Gen gelegt; dadurch hat das erzeugte Amplikon eine Länge von 464 bp. Der Anwendungsbereich ist gegenüber der Arbeit von *Meyer et al.* (9) insofern eingeschränkt, als dass Vögel nun nicht mehr erfasst werden, da diese eine andere Anordnung der mitochondrialen Gene besitzen.

Eine säugetierspezifische Nachweismethode soll aus dem EU-Projekt «Strategies and methods to detect and quantify mammalian tissues in feedingstuffs» (STRATFEED, Projekt G6RD-CT-2000-00414; <http://stratfeed.cragx.fgov.be>) resultieren. Das Projekt ist seit 3 Jahren in Bearbeitung.

Die vorliegende Arbeit zum Nachweis von Spuren tierischer Verunreinigungen in Getreide und Getreideprodukten gründet auf den Arbeiten von *Meyer et al.* (9) und *Wolf et al.* (10), welche für diese Anwendung weiterentwickelt wurden. Bei Letzterer wurden die verwendeten Primer erweitert, bei beiden Arbeiten die PCR-Bedingungen verändert. Das PCR-System von *Meyer et al.* (9) wurde in diese Arbeit miteinbezogen, um auch Vögel (z.B. Geflügel) detektieren zu können, die mit der Methode von *Wolf et al.* (10) nicht erfasst werden. Die Verwendung des mitochondrial codierten Cytochrom b-Gens erlaubt wegen seiner hohen Genkopienzahl eine hohe Empfindlichkeit, zudem sind die DNA-Sequenzen vieler dieser Gene für verschiedenste Tierarten in DNA-Datenbanken und in der Literatur oft beschrieben.

## Material und Methoden

### Probenmaterial

Mit Hilfe dieser Methode wurden Tierkörpermehlmischungen untersucht, welche die Forschungsanstalt für Nutztiere Posieux (RAP) zur Verfügung stellte. Sie hat Tierkörpermehle verschiedener Tierarten (u.a. «Fleischmehl» und «Geflügelmehl») in dekadischen Verdünnungsschritten zu pflanzlichem Mischfutter zugeetzt. Das Tierkörpermehl der Mischungen «Fleischmehl» wurde vorgängig derart behandelt, wie es die Verordnung über die Entsorgung tierischer Abfälle (VETA) vom 3.2.1993 (Stand 15.5.2001) verlangt: Erhitzung während 20 Minuten bei mindestens 133 °C und einem Druck von 3 bar. Vom Tierkörpermehl der Mischungen «Geflügelmehl» ist die Art der Hitzebehandlung nicht gesichert, wahrscheinlich war sie identisch mit den Anforderungen der VETA.

### Probenvorbereitung

Die homogenisierten Proben wurden direkt zur DNA-Extraktion eingewogen.

### DNA-Extraktion

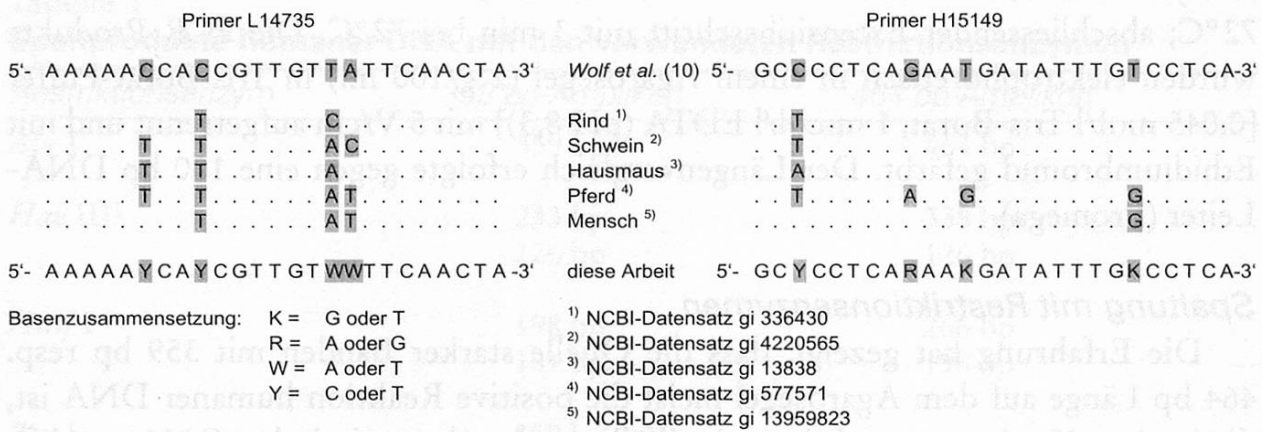
Ca. 200 mg des homogenisierten Probenmaterials wurden mit 1000 µl Extraktionspuffer [10 mmol/l Tris-HCl (pH 8,0), 150 mmol/l NaCl, 2 mmol/l EDTA und 1 g/100 ml Natriumdodecylsulfat], 100 µl 5 mol/l Guanidinhydrochlorid und 50 µl Proteinase K (20 mg/ml) für ca. 6 h bei 59 °C auf einem Thermomixer inkubiert. Es wurde 10 min bei 14000 × g zentrifugiert, 500 µl vom Überstand zu 1 ml Wizard™ DNA-Aufreinigungsharz (Promega, Madison, WI, USA) gegeben und die extrahierte DNA entsprechend den Herstellerangaben gereinigt. Die DNA wurde mit 50 µl (70 °C) Tris-HCl (10 mmol/l, pH 9,0) eluiert und mit Wasser 5 × verdünnt.

### Primer

Die Primer Cyt b1 und Cyt b2 für das 359 bp-Amplikon wurden gemäss (9) unverändert eingesetzt.

Die Primer L14735 und H15149 für das 464 bp-Amplikon gemäss (10) wurden ersetzt durch ein Paar von degenerierten Primern (Abb. 1). Ursprünglich wurde diese Modifikation an unserem Labor eingeführt, um gemäss Deklaration pferdefleischhaltige Fleischwaren auf die Anwesenheit der Tierart Pferd zu überprüfen. Mit diesem System erniedrigt sich die Stringenz z.B. zu Rind und Schwein (weniger Basenfehlpaarungen), zusätzlich wird der Anwendungsbereich auf zusätzliche Tierarten wie Hund, Hauskatze, Esel und diverse Kleinnager ausgedehnt. Diese Aufzählung kann nicht abschliessend erfolgen, da bei vielen Tierarten keine DNA-Sequenzdaten vom tRNA<sup>Glu</sup>-Gen vorhanden sind. Abbildung 1 zeigt die Homologie der degenerierten Primer zu Rind, Schwein, Hausmaus, Pferd und Mensch.





- <sup>1)</sup> NCBI-Datensatz gi 336430
- <sup>2)</sup> NCBI-Datensatz gi 4220565
- <sup>3)</sup> NCBI-Datensatz gi 13838
- <sup>4)</sup> NCBI-Datensatz gi 577571
- <sup>5)</sup> NCBI-Datensatz gi 13959823

**Abbildung 1 Homologie einiger ausgewählter Tierarten und Mensch zum verwendeten Paar von degenerierten Primern für das 464 bp-PCR-System.** Die Arbeit von *Wolf et al. (10)* wurde entwickelt für den Nachweis von Wild. Damit können u.a. auch Rind und Schwein detektiert werden, obwohl Basenfehlpaarungen in beiden ursprünglichen Primern vorliegen. Die neu verwendeten degenerierten Primer weisen bei den angeführten Tierarten weniger Basenfehlpaarungen auf.

### PCR-Reaktion

Die Proben wurden mit dem PCR-System für das 359 bp-Amplikon und dem PCR-System für das 464 bp-Amplikon mit dem degenerierten Primerpaar mittels «wiederholter PCR» amplifiziert; d.h. nach erfolgter Amplifikation wurde ein Teil des Reaktionsansatzes nochmals als Templat für eine erneute PCR-Reaktion mit den identischen Primern wie bei der ersten Reaktion eingesetzt. Mit diesem Vorgehen erhöht sich die Empfindlichkeit der beiden Nachweissysteme (Daten nicht gezeigt).

Die PCR-Amplifizierung erfolgte in einem Endvolumen von 100 µl in 0,5 ml PCR-Reaktionsgefäßen unter folgenden Bedingungen: 1×PCR-Reaktionspuffer [10 mmol/l Tris-HCl (pH 8,7), 50 mmol/l KCl], 2 µg/ml BSA, 2 mmol/l MgCl<sub>2</sub>, 200 µmol/l je dNTP (dATP, dCTP, dGTP und dTTP), 0,5 µmol/l der beiden Primer Cyt b1 (5'-CCATCCAACATCTCAGCATGATGAAA-3') und Cyt b2 (5'-GCCCCTCAGAATGATATTTGTCCTCA-3') für das 359 bp-Amplikon resp. 0,5 µmol/l der beiden Primer L14735 deg. (5'-AAAAAY-CAYCGTTGTWWTTCAACTA-3') und H15149 deg. (5'-GCYCCTCARAAK-GATATTTGKCCTCA-3') für das 464 bp-Amplikon, zwei Units *Taq* Polymerase (Qiagen, Hilden, Deutschland) und 10 µl der verdünnten DNA-Lösungen für die erste PCR-Reaktion, resp. 4 µl Amplikon und 6 µl Wasser für die zweite PCR-Reaktion. Das Temperatur-Zeit-Programm für den verwendeten Crocodile II-Thermocycler (Appligene, Illkirch, Frankreich) war wie folgt festgelegt: Erster Denaturierungsschritt bei 95 °C für 3 min; dann 25 Zyklen für die erste PCR resp.

50 Zyklen für die zweite PCR mit 20 sec bei 95 °C, 30 sec bei 55 °C und 40 sec bei 72 °C; abschliessender Extensionsschritt mit 3 min bei 72 °C. Die PCR-Produkte wurden elektrophoretisch in einem Agarosegel (2 g/100 ml) in Tris-Borat-Puffer [0,045 mol/l Tris-Borat, 1 mmol/l EDTA (pH 8,3)] mit 5 V/cm aufgetrennt und mit Ethidiumbromid gefärbt. Der Längenvergleich erfolgte gegen eine 100 bp DNA-Leiter (Promega).

### **Spaltung mit Restriktionsenzymen**

Die Erfahrung hat gezeigt, dass die Quelle starker Banden mit 359 bp resp. 464 bp Länge auf dem Agarosegel meist die positive Reaktion humaner DNA ist, die in einer Konkurrenzreaktion mit allfällig vorhandener tierischer DNA amplifiziert wird. Die Wahrscheinlichkeit des Auftretens solcher «Störbanden» wird naturgemäss grösser, je tiefer die Konzentration tierischer DNA ist.

Der Zweck einer Restriktionsenzym-Spaltung liegt darin, eventuell vorhandene tierische DNA von humaner DNA auf dem Agarosegel abzutrennen. Bei Anwesenheit von DNA verschiedener Tierarten ermöglicht sie, die DNA der einzelnen Tierarten aufzutrennen. Eine gute Differenzierung wurde erreicht bei Spaltungen mit mindestens drei verschiedenen Restriktionsenzymen. Die einzelnen Ansätze des 464 bp-Amplikon PCR-Systems wurden einerseits unverdaut belassen, beziehungsweise je mit *Alu* I, *Hinf* I und *Hae* III verdaut. Die Ansätze des 359 bp-Amplikon PCR-Systems wurden einerseits unverdaut belassen, beziehungsweise je mit *Alu* I, *Hinf* I, *Hae* III und *Rsa* I verdaut. Die Wahrscheinlichkeit, dass sich tierische DNA von der humanen DNA nicht abtrennt und sich damit der Analytik entzieht, ist gering. Die nächsten Verwandten des Menschen, der Gorilla und der Schimpanse, würden sich bei der Spaltung des 464 bp- sowie des 359 bp-Amplikons mit *Alu* I und *Hinf* I von der humanen DNA unterscheiden (*Alu* I spaltet das Amplikon des Schimpansen, während humane DNA ungespalten bleibt; resp. *Hinf* I spaltet humane DNA, während die DNA der beiden anderen Primaten nicht gespalten wird). Um die Ausbeute für die anschliessende Sequenzierung der gespaltenen DNA zu erhöhen, wurden bis zu 80 µl Amplikon mit 10 Units Restriktionsenzym/20 µl Amplikon versetzt und 2 h bei 37 °C inkubiert. Die DNA-Fragmente wurden elektrophoretisch, auf benachbarten Bahnen verteilt, in einem Agarosegel (2 g/100 ml) aufgetrennt. Anschliessend wurden die DNA-Banden, deren Länge sich von den Fragmenten humaner DNA unterscheidet (Tab. 1), mit Hilfe eines Skalpells aus dem Gel ausgeschnitten, die analogen Banden aus zusammengehörenden Bahnen vereint und mittels QIAquick® Gel Extraction Kit (Qiagen) gemäss den Angaben des Herstellers zurückgewonnen und zur Sequenzierung verwendet.

### **Sequenzierung der DNA**

Die DNA-Sequenzierung der isolierten DNA-Fragmente (Fragmente der Verdauungen sowie die unverdauten Amplikons) erfolgte durch Microsynth (Balgach, Schweiz).



Tabelle 1

**Spaltprodukte humaner DNA mit den verwendeten Restriktionsenzymen**

| Restriktionsenzym           | 359 bp-Amplikon  | 464 bp-Amplikon  |
|-----------------------------|------------------|------------------|
| <i>Alu</i> I                | 359 bp           | 464 bp           |
| <i>Hae</i> III <sup>1</sup> | 233 bp<br>126 bp | 338 bp<br>126 bp |
| <i>Hinf</i> I               | 198 bp<br>161 bp | 266 bp<br>198 bp |
| <i>Rsa</i> I                | 359 bp           |                  |

<sup>1</sup>*Hae* III: eine in (9) beschriebene zweite Schnittstelle, im Abschnitt eines Primers liegend, bleibt intakt, da der verwendete Primer die Erkennungssequenz von *Hae* III nicht aufweist

Weist ein Amplikon zwei oder mehr Schnittstellen des eingesetzten Restriktionsenzym auf, so können nur die endständigen DNA-Fragmente mit je einem der beiden Sequenzierprimer (=PCR-Primer) erfasst werden. Nicht randständige DNA-Fragmente ergeben mit den verwendeten Primern keine Sequenzierdaten.

**DNA-Datenbanksuche**

Die aus den Sequenzierarbeiten resultierenden Chromatogramme wurden vor ihrer Verwendung als digitalisierte DNA-Sequenz auf die Qualität geprüft. Ein Teil der Sequenzrohdaten, vor allem jene aus den ungespaltenen DNA-Fragmenten, wiesen oft Überlagerungen einer zweiten oder dritten DNA-Sequenz auf, was auf die Anwesenheit verschiedener Tierarten hinweist (Abb. 2). Sind die einzelnen Komponenten in etwa gleicher Konzentration vorhanden, ist die Sequenz nicht auswertbar. War eine Tierartkomponente in viel grösserer Menge als die andere vorhanden, konnte die DNA-Sequenz der Hauptkomponente unverändert übernommen werden. In vereinzelt Fällen, d.h. beim Auftreten von binären DNA-Mischungen mit einem grösseren Konzentrationsunterschied zwischen beiden Komponenten, wurde neben der DNA-Sequenz der Hauptkomponente auch jene der Nebenkomponekte ermittelt. Dabei muss die minoritäre Basenabfolge von Auge aus dem Chromatogramm herausgelesen werden und die Basen der Hauptkomponente durch diese ersetzt werden (Abb. 2). Diese Technik ist mit Unsicherheiten behaftet, da die beiden resultierenden Chromatogramme der beiden DNA-Sequenzen ein unterschiedliches zeitliches Laufverhalten aufweisen können. Des Weiteren kann aus den Sequenzierdaten nicht die Ermittlung einer völlig fehlerfreien DNA-Sequenz erwartet werden, da die zur Analyse eingesetzte DNA-Konzentration oftmals sehr gering war (<1 ng/µl) und damit weit unter dem vom Sequenzierlabor geforderten Gehalt von mindestens 10 ng/µl lag.

Die bereinigten DNA-Sequenzen wurden einer DNA-Datenbanksuche unterzogen. Dieser BLAST search (basic local alignment search tool) erfolgte auf der



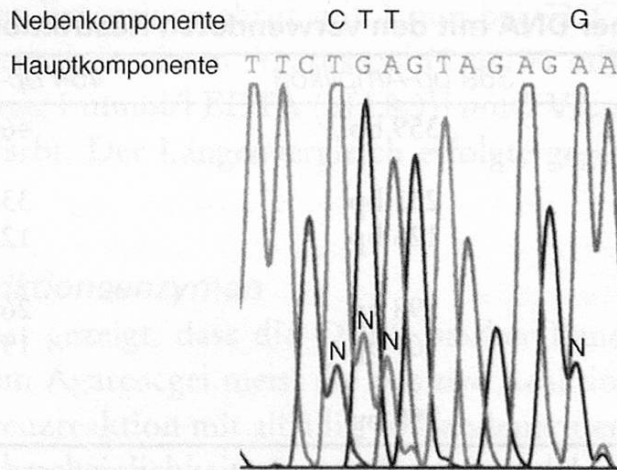


Abbildung 2 **Beispiel einer Analyse der Nebenkompente eines DNA-Sequenzierdatensatzes (Ausschnitt).** Es handelt sich um die Analyse des ungespaltenen 359 bp-Amplikons eines Knochenfragmentes (Probe RK, siehe Teil II dieser Arbeit). Während die Hauptkomponente humane DNA darstellt, stammt die Nebenkompente von Haushuhn. N=Nebenkompente.

DNA-Datenbank des NCBI (National Center for Biotechnology, Bethesda, MD, USA; [www.ncbi.nlm.nih.gov](http://www.ncbi.nlm.nih.gov)). Aus der Suche resultierten Trefferlisten mit DNA-Datensätzen, sortiert nach absteigender Übereinstimmung der Sequenzen. In das Mass der Übereinstimmung gehen sowohl die prozentuale Homologie, als auch die Länge der identischen resp. ähnlichen Sequenzen ein.

### Resultate und Diskussion

Um die Empfindlichkeit und die Richtigkeit dieser Methode zu prüfen, wurden Tierkörpermehlmischungen untersucht. Zum ersten wurde ein Fleischmehl uns unbekannter Zusammensetzung, welches mit einem Gehalt von 0,1 g/100 g resp. 1 g/100 g zu pflanzlichem Mischfutter beigemischt wurde, untersucht. Zum zweiten wurde eine Mischung analysiert von 0,1 g/100 g resp. 1 g/100 g Geflügelmehl uns unbekannter Zusammensetzung in demselben pflanzlichen Mischfutter. Bei den Tierkörpermehlmischungen mit einem Gehalt von 1 g/100 g konnten die bei der Herstellung üblicherweise verwendeten Tierarten nachgewiesen werden (Tab. 2). Bei den anderen nachgewiesenen Tierarten handelt es sich meist um wildlebende Kleinnager, Reptilien und Insekten. Die Quelle dieser tierischen Verunreinigungen dürfte das für die Herstellung der Tierkörpermehlmischungen verwendete pflanzliche Mischfutter mit uns unbekannter Zusammensetzung sein.

Bezüglich der Empfindlichkeit der eingesetzten Methode sind diese beiden Gruppen von Verunreinigungen (Tierkörpermehle und Wildtiere) klar zu unterscheiden. Die DNA in den Tierkörpermehlen ist wegen der erfolgten enormen

Tabelle 2

**Nachgewiesene Tierarten in mit Tierkörpermehlen gespickten, pflanzlichen Mischfuttermitteln**

| <i>Tierkörpermehl</i>  | <i>Mikroskopie</i>                                    | <i>nachgewiesene Tierarten</i>  | <i>Bemerkungen</i>                              |
|--|---|---|---|
| <b>Nachgewiesene Bestandteile der zugesetzten Tierkörpermehle:</b> |   |   |   |
| 0.1 % Fleischmehl  | Sediment: ca. 200 K/20 g<br>Flotat: negativ           | –   |   |
| 1 % Fleischmehl  | Sediment: ca. 2200 K/20 g<br>Flotat: 5 M/Präparat     | Rind ( <i>Bos taurus</i> )  | 100 % (194 bp)<br>homolog                       |
| 0.1 % Geflügelmehl   | Sediment: ca. 100 K/20 g<br>Flotat: 4 M/2 Präparate   | –   |   |
| 1 % Geflügelmehl   | Sediment: ca. 1000 K/20 g<br>Flotat: 11 M/2 Präparate | Haushuhn<br>( <i>Gallus gallus</i> )<br>Trute<br>( <i>Meleagris gallopavo</i> )<br>Rind ( <i>Bos taurus</i> ) | 100 % (228 bp)<br>homolog                       |
| <b>Nachgewiesene Bestandteile von Wildtieren:</b>                  |   |   |   |
|  |   | Wiesenhühlmaus<br>( <i>Microtus pennsylvanicus</i> )  | häufigste Feldmausart in Nordamerika            |
|  |   | Hausmaus<br>( <i>Mus musculus</i> )   | 100 % (259 bp)<br>homolog                       |
|  |   | Zauneidechse<br>( <i>Lacerta agilis</i> )   | 100 % (254 bp)<br>homolog                       |
|  |   | Steppengrille<br>( <i>Gryllus assimilis</i> )   | Lebensraum in Mittelamerika                     |
|  |   | unbekannte Tierart xy   | Erläuterungen zu xy siehe Teil II dieser Arbeit |

Mikroskopie: M=Muskelfragment, K=Knochenfragment

Hitzebehandlung sehr stark degradiert. Der Nachweis dieser degradierten DNA mittels PCR ist, verglichen mit dem mikroskopischen Nachweis tierischer Bestandteile, sehr unempfindlich. Im Gegensatz dazu liegt die Nachweisgrenze der gefundenen DNA von Wildtieren um Größenordnungen tiefer.

Als Schlussfolgerung kann aufgrund dieser ersten Untersuchungen Folgendes dargelegt werden: Diese Methode eignet sich wegen der hohen Nachweisstärke für Wildtiere zum Beispiel für Untersuchungen im Zusammenhang mit Lagerschädlingen oder mit der Ernte assoziierten Wildtieren (u.U. bezüglich der Herkunft eines Erntegutes). Für die Tierartbestimmung von in tiefen Konzentrationen kontaminierten



rendem Tierkörpermehl ist die Methode zu wenig sensitiv, es sei denn, das fragliche Tierkörpermehl wurde nicht so stark erhitzt wie es die heute gültigen Vorschriften verlangen. Im Falle einer Untersuchung einer Probe mit einer starken, mikroskopisch festgestellten, tierischen Kontamination, vermag der Einsatz dieser Methode durchaus zu einem brauchbaren Resultat bezüglich der Tierart verhelfen, wenn es sich bei der Quelle der tierischen Verunreinigung um Wildtiere handelt. Wird die Fragestellung bei einer zu untersuchenden Probe eingeschränkt auf die Problematik der BSE, so sind andere, empfindlichere PCR-Nachweismethoden für den Nachweis von Rinderbestandteilen dieser Methode vorzuziehen (siehe Einleitung).

Der zweite Teil dieser Publikation beschreibt Untersuchungen mit Hilfe dieser Methode, die parallel zu den mikroskopischen Untersuchungen an amtlich erhobenen Proben von Getreide und Getreideprodukten durchgeführt wurden, um mikroskopisch ermittelte, tierische Verunreinigungen einer bestimmten Tierart zuordnen zu können.

### **Zusammenfassung**

In pflanzlichem Mischfutter konnte bei einem Zusatz von 1 g/100 g hochoerhitztem Tierkörpermehl DNA tierischer Herkunft nachgewiesen und Vertreter der hauptsächlich verwendeten Tierarten bestimmt werden. Eine «wiederholte PCR» eines 359 und eines 464 bp langen PCR-Produktes wurden auf dem mitochondrialen Cytochrom b-Gen durchgeführt. Nach der Spaltung der Amplikons mit Restriktionsenzymen wurden auf einem Agarosegel die DNA-Fragmente tierischer Herkunft aufgetrennt und einer DNA-Sequenzierung und anschließender DNA-Datenbanksuche unterzogen.

### **Résumé**

De l'ADN d'origine animale et les représentants des principales espèces animales ont pu être détectés dans un fourrage végétal contenant 1 g/100 g de farine animale chauffée à haute température. Deux séquences d'une longueur de 359 bp et 464 bp, situées sur le gène mitochondrial du cytochrome b, ont été analysées par PCR, les produits étant soumis à une double amplification («repeated PCR») utilisant les mêmes amorces. Après séquençage des amplicons par des enzymes de restriction, les différents fragments d'ADN d'origine animale ont été séparés par électrophorèse sur un gel d'agarose. Les différents segments d'ADN ainsi obtenus ont été comparés à des séquences d'ADN d'une banque de données.

### **Summary**

In vegetable feed with addition of 1 g/100 g heat treated meat and bone meal, animal DNA was detectable, which results correctly indicated those animal species that represented the main components of the animal meal. Two sequences of a length of 359 bp and 464 bp respectively, both located on the mitochondrial



cytochrome b gene, were amplified by "repeated PCR". After enzymatic restriction, DNA fragments of animal origin were separated by agarose gel electrophoresis, sequenced and then inspected for homology to databank sequences.

## Key words

Animal contamination, species identification, cytochrome b

## Literatur

- 1 Hofmann K., Blüchel E., Fischer K., Müller E. und Blunk H.-C.: Erfahrungen mit dem ELISA-Test zur Tierartbestimmung bei erhitztem Fleisch und Fleischerzeugnissen. Mittbl. Bundesanst. Fleischforsch. Kulmbach **33**, 171–177 (1994).
- 2 Chen F.-C., Hsieh Y.-H.P. and Bridgman R.C.: Monoclonal antibodies against troponin I for the detection of rendered muscle tissues in animal feedstuffs. Meat Science **62**, 405–412 (2002).
- 3 Meyer R., Candrian U. and Lüthy J.: Detection of pork in heated meat products by the polymerase chain reaction. J. Assoc. Off. Anal. Chem. **77**, 617–622 (1994).
- 4 Tartaglia M., Saulle E., Pestalozza S., Morelli L., Antonucci G. and Battaglia P.A.: Detection of bovine mitochondrial DNA in ruminant feeds: A molecular approach to test for the presence of bovine-derived materials. J. Food Protection **61**, 513–518 (1998).
- 5 Krcmar P. and Rencova E.: Identification of bovine-specific DNA in feedstuffs. J. Food Protection **64**, 117–119 (2001).
- 6 Myers M.J., Friedman S.L., Farrell D.E., Dove-Pettit D.A., Bucker M.F., Kelly S., Madzo S., Campbell W., Wang R.-F., Paine D. and Cerniglia C.E.: Validation of a polymerase chain reaction method for the detection of rendered bovine-derived materials in foodstuffs. J. Food Protection **64**, 564–566 (2001).
- 7 Wolf H., Gaede W., Wolf C., Zellermann S. und Höber S.: Nachweis von tierischen Bestandteilen in Mischfutter. Fleischwirtschaft **81**, 197–201 (2001).
- 8 Laube I., Butschke A., Zagon J., Spiegelberg A., Schauzu M., Bögl K.-W., Kroh L.W. und Broll H.: Nachweisverfahren für Rindfleisch in Lebensmitteln unter Anwendung der TaqMan®-Technologie. Bundesgesundheitsbl. **44**, 326–330 (2001).
- 9 Meyer R., Höfelein C., Lüthy J. and Candrian U.: Polymerase chain reaction – restriction fragment length polymorphism analysis: A simple method for species identification in food. J. Assoc. Off. Anal. Chem. **78**, 1542–1551 (1995).
- 10 Wolf C., Rentsch J. and Hübner P.: PCR-RFLP analysis of mitochondrial DNA: A reliable method for species identification. J. Agric. Food Chem. **47**, 1350–1355 (1999).

Korrespondenzadresse: Albert Eugster, Kantonales Laboratorium Aargau, Kunsthausweg 24, CH-5000 Aarau, E-Mail: [albert.eugster@ag.ch](mailto:albert.eugster@ag.ch)