

Nachweis und quantitative Bestimmung von Pferd, Rind, Schwein und Lamm in Fleischerzeugnissen mittels Multiplex-Real-Time-PCR



Pietsch, K.^{1*}, Kneer, N.¹, Rentsch, J.², Köppel, R.³

¹ Chemisches und Veterinäruntersuchungsamt Freiburg, Bissierstraße 5, 79114 Freiburg

² SQTS - Swiss Quality Testing Services, Courtepin (CH)

³ Kantonales Laboratorium Zürich (CH)

Abstract

Meat products are often composed of more than one meat species. A quantitative multiplex PCR was developed to determine the proportion of meat fractions of beef, pork, horse and sheep (AllHorse). The precision and accuracy was investigated by dilutions of DNA from all four species and examining different meat products from the market. Application of this tetraplex quantitative real-time PCR system will enable official food control and production control laboratories to efficiently investigate the composition of meat products. This tetraplex quantitative real-time PCR system was used successful for the detection and quantification of horse DNA in meat products and convenience foods during the "Pferdefleisch-Skandal" in the early 2013. The quantification of meat proportions in raw and boiled sausage according to the recipe is difficult. The possibilities were evaluated using different calibrators. To measure the DNA-contents from beef, pork, sheep (mutton) and horse (equidae), a tetraplex real-time PCR method was applied. This tetraplex quantitative real-time PCR system will be validated 2013 in a ring-trial for the admission to the official collection of methods according to 64 of the German Food and Feed Code (LFGB).

Nachweis und quantitative Bestimmung von Equus (Pferd), Rind, Schwein und Lamm in Fleischerzeugnissen mittels Multiplex-Real-Time-PCR

Mit der Multiplex-Real-Time-PCR (AllHorse) können die Tierarten Equus (Pferd, Esel, Zebra), Rind, Schwein und Lamm in Lebensmitteln tierischen Ursprungs nachgewiesen werden. Nach Isolierung der DNA aus Lebensmitteln werden die tierartspezifischen DNA-Sequenzen für Beta-Actin-Gen (Rind, Schwein), Wachstumshormon-Gen (Equus) und Prolactin-Rezeptor (Lamm) nachgewiesen [1,2]. Verfälschungen und Fehletikettierungen können somit zuverlässig und schnell auch bei erhitzten und verarbeiteten Produkten nachgewiesen werden. Die Quantifizierung amplifizierbarer DNA von Rind, Schwein, Lamm und Equus erfolgt mittels Standardkurvenverfahren. Die endgültige Bestätigung von Pferd kann dann mit der Methode „Nachweis Pferd-spezifischer DNA-Sequenzen in Fleisch-Vollkonserven mit der PCR und Bestätigung durch Restriktionsanalyse „(ASU L 06.26/27-2 : 2007-12) erfolgen.



Material & Methoden

Standard-DNA für die Kalibrierung

Aus Muskelgewebe der vier Tierarten Rind, Schwein, Lamm und Pferd (für Equiden) wurden DNA-Mischungen (Standardlösungen) für die Standardkurven hergestellt. Aus Stammlösungen von 20 ng/µl und 2 ng/µl je Tierart wurden entsprechende DNA-Mischungen von 0,02, 0,064, 0,2, 0,64, 2 und 6,4 ng/µl für die Standardreihe hergestellt und mit Hering Sperm DNA [20 ng/µl] 100 µl aufgefüllt (Abb. 1). Als Qualitätskontrollproben (QKP) wurden eine Rohwurst (Kal-D LJ mit Pferd 1 %, Schaf 55 %, Rind 35%; Schwein 9% und eine LVU-Probe (LVU Herbolzheim, 2012, Probe A, Gew% Schwein ca. 43%, Huhn 9,5%, Pferd 6,3%, Rind 9,5%, Hirsch 6,3%, Ziege 3,1%) eingesetzt (Einwaagen jeweils in Gew.%).

Validierung

Die Validierung erfolgte im Rahmen des Ringversuchs 2010 „Tierarten in Roh- und Brühwurstwaren“ des Kantonalen Labors Zürich (CH) [2]. Vier unbekannte Fleischerzeugnisse mit unterschiedlichen Fleischanteilen von Pferd, Rind, Schwein und Lamm wurden in 19 Laboratorien in D und CH untersucht. Für die Kalibrierung wurde die oben beschriebene Standard-DNA sowie Roh- und Brühwürste mit bekannter Zusammensetzung eingesetzt [1,2].

Probenmaterial

Lebensmittelproben des Handels (z.B. Lasagne).

DNA-Extraktion

Die DNA-Extraktion erfolgte mittels Wizard Plus Miniprep DNA Purification Kit (Promega). Die DNA-Konzentration wurde photometrisch auf 20 ng/µl eingestellt [1].

Real-time PCR

Zum Nachweis der Tierarten Rind, Schwein, Lamm und Equus wurde der AllHorse-Kit der Fa. Microsynth (www.microsynth.ch) verwendet. Die PCR-Bedingungen erfolgten nach Koepfel et al. [1] bzw. dem Kit-Manual.

Ergebnis

Für die Berechnung der einzelnen Ct-Werte wurden gem. Geräte-Manual der jeweils optimale Threshold bestimmt. Die Standardkurven werden durch lineare Regression von log [% Pferd, Rind-, Schwein- und Lamm-DNA der Referenzmischung] versus Ct-Wert durch die Geräte-Software berechnet. Zunächst werden anhand der DNA-Verdünnungsreihen S1-S6 (Pferd, Rind, Schwein und Lamm) die Menge an DNA (ng/µl) von Pferd, Rind, Schwein, und Lamm in der Lebensmittelprobe (Beispiel: Lasagne) und den Vergleichsmaterialien bestimmt: Pferd 1,40; Rind 1,00; Schwein 0,00 und Lamm 0,00 ng/µl (Abb. 2).

Voraussetzung: Es sind keine weiteren Tierarten im Erzeugnis vorhanden.

Normierung und Abschätzung der DNA-Prozente (Lasagne-Probe)

Die DNA-Mengen (ng/µl) der vier verschiedenen Spezies werden summiert und auf 100% normiert (Abb.3):

$$DNA\% (Tierart) = \frac{100 \times [ng\ Tierart/\mu l]}{\text{Summe aller 4 Tierarten } [ng/\mu l]}$$

Beispiel Lasagne-Probe:

$$DNA\% (Pferd) = \frac{100 \times [Pferd] 1,40\ ng/\mu l}{[Rind + Pferd] = 2,40\ ng/\mu l}$$

$$DNA\% (Rind) = \frac{100 \times [Schwein] 1,00\ ng/\mu l}{[Rind + Schwein] = 2,40\ ng/\mu l}$$

In der Lasagne wurden ca. 58 DNA-% Pferd und ca. 42 DNA-% Rind nachgewiesen. Schwein und Lamm waren nicht nachweisbar.

Bestimmung des Gewichtanteils

Mit Hilfe von matrix-adaptiertem Vergleichsmaterialien (z.B. Hackfleischmischungen mit bekannten Anteilen) kann eine Quantifizierung des Gewichtanteils von Pferd, Rind, Schwein und Lamm abgeschätzt werden. Diese Ergebnisse zeigte auch der Ringversuch „Tierarten in Roh- und Brühwurstwaren“ des Kantonalen Labors Zürich (CH) [1].

Fazit

Die Multiplex-Real-Time-PCR AllHorse eignet sich zum Nachweis von Equus (Pferd), Rind, Schwein und Lamm in Lebensmitteln. Insbesondere bei der Untersuchung von nicht deklariertem Pferdefleisch in rindfleischhaltigen Erzeugnissen Anfang 2013 hat sich dieses Verfahren als schnelle und zuverlässige Methode etabliert. Ein Ringversuch in D sowie die Aufnahme in die ASU nach 64 LFGB ist für 2013/2014 vorgesehen.

Bei Spuren von DNA nicht deklarierter Tierarten bis zu 1 DNA% ist von herstellungsbedingten Verschleppungen auszugehen. Bei DNA-Anteilen > 1 DNA% können sich Hinweise auf eine nicht deklarierte Tierart ergeben und es sollten weitere Prüfungen folgen. Bei DNA-Anteilen > 5 % ist im Lebensmittel von einer Zutat - z.B. Pferd - auszugehen.

Bei Verwendung von matrix-angepassten Standards ist eine quantitative Bestimmung von Fleischanteilen an Pferd, Rind, Schwein und Lamm mittels Multiplex-Real-Time-PCR in Fleischerzeugnissen mit ausreichender Messunsicherheit von ca. +/- 20% möglich. Die Ergebnisse aus dem „AllMeat“-Ringversuch nach ASU 64 LFGB (März 2009) zeigen ebenfalls eine sehr gute Übereinstimmung zwischen ermittelten DNA% zu Gew% der Fleischeinwaage. In diesem Ringversuch konnte gezeigt werden, dass z.B. 2,5 DNA% ca. 1 % Gewichtanteil der Tierart entsprachen [3].

Abb.1: Standard-DNA für die Kalibrierung

	Rind	Schwein	Pferd	Lamm	Summe Standard	Beleg-Sperm DNA
0.02	0.02	0.02	0.02	0.02	0.08	10.00
0.064	0.064	0.064	0.064	0.064	0.256	10.00
0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.8	10.00
0.64	0.64	0.64	0.64	0.64	2.56	10.00
2	2	2	2	2	8	10.00
6.4	6.4	6.4	6.4	6.4	25.6	10.00

Abb.2: a.) Amplifikationskurven mit DNA-Standards S1-S6, QKP Kal-D LJ und der Lasagne-Probe b.) dazugehörige Standardkurve (Konzentration in ng/µl)

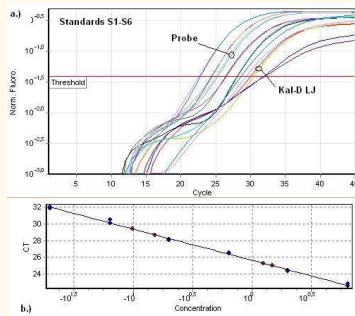


Abb. 3: Bestimmung der DNA-Konzentration von Rind, Pferd, Schwein und Lamm in der Lasagne-Probe anhand der DNA-Standardkurve aus Abb. 2 a.) und b.)

Probe	Rind (ng/µl)	Pferd (ng/µl)	Schwein (ng/µl)	Lamm (ng/µl)	Rind (DNA%)	Pferd (DNA%)	Schwein (DNA%)	Lamm (DNA%)	NG Rind (DNA%)	NG Pferd (DNA%)
Lasagne Probe	1,00	1,40	0,00	0,00	41,7	58,3	0,0	0,0	2,7	2,7
Kal L1 D	4,00	0,20	1,00	1,00	7,20	31,8	1,4	13,8	52,9	0,5

Literatur:

- Köppel R., Ruf, J. and Rentsch, J., Multiplex real-time PCR for the detection and quantification of DNA from beef, pork, horse and sheep. European Food Research and Technology. 2011, Volume 232 (1), 151-155
- 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, AOAC INTERNATIONAL, 2012. Volume 95 (2), 494-499
- Uhlig S., Baldauf, H., Kunath, K., Simon, K., Methodenringversuch „Tierartendifferenzierung“ Ergebnisbericht – Entwurf, QuoData GmbH, Dresden