

# Hoch sensitiver Nachweis von DNA aus Schwein mit real-time PCR

Derzeit lassen sich die analytischen Aspekte zu Speziesanalytik mittels real-time PCR in vier wesentliche Fragestellungen untergliedern:

1. Als Folge des Pferdefleischskandals ist ein nicht zielgerichtetes Screening auf verschiedene Tierarten in Fleischwaren von zunehmendem Interesse um Verfälschung auszuschließen (Food Fraud).
2. Der Trend zu vegetarischen/veganen Lebensmitteln, also dem sicheren Ausschluss von Fleischwaren in Lebensmitteln, wird auch unter dem Aspekt des Klimawandels und des Bevölkerungswachstums zunehmen.
3. die Verwendung von Insekten als Proteinquelle wird auch in westlichen Ländern an Bedeutung gewinnen können, entsprechende Nachweise könnten von Interesse werden.
4. Der Ausschluss von Spuren von Schweinefleisch in Lebensmitteln wird aus religiösen und gesellschaftspolitischen Gründen signifikant an Bedeutung gewinnen.

Die Transformation der Gesellschaft beeinflusst die Lebensmittellieferketten maßgeblich und zunehmend werden Lebensmittel als vegan bzw. als frei von Schweinefleisch beworben. Für die Laboranalytik bedeutet dies, dass in Fleischwaren wie auch in prozessierten Lebensmitteln Spuren aus Schwein (*sus scrofa*) nachweisbar sein sollten. Analytische Marker können

- Proteine (immunologische Methoden),
- Peptidfragmente (massenspektroskopische Methoden) oder
- DNA (real-time PCR) sein.

Während für Produktverfälschung nicht juristische technische Grenzwerte von 1% bzw. von 0,1% zur Beurteilung herangezogen werden, gibt es für religiöse Bewertung (Abwesenheit von Schweinefleisch) keine Grenzwerte. Neben der aufwändig zu etablierenden und durchzuführenden Massenspektroskopie als zunehmend empfindlichere Methode hat sich die real-time PCR als analytische Methode der Wahl durchgesetzt. Vorteil der real-time PCR ist die einfachere Etablie-

rung in kleinen Laboren und Verfügbarkeit von kommerziellen analytischen Testkits für den Nachweis von Tierarten. Für den Nachweis von Schwein werden besonders sensitive Methoden beworben, die Teils unter dem Aspekt von halal ausgelobt werden. Diese sensitiven qualitativen Testkits verwenden häufig mitochondriale multicopy targets als Zielsequenz. Bei allen Nachweisverfahren handelt es sich um rein technische Lösungen



Abb. 1: Testkit von CONGEN zum sensitiven Nachweis von DNA von Schwein (*sus scrofa*)

zum sensitiven Nachweis von Speziesmarkern. Eine anschließende Beurteilung des Lebensmittels, speziell unter religiös gesellschaftlichen Aspekten, ist nicht integraler Teil der laboranalytischen Methode sondern eine davon getrennte Interpretation.

Die technische Herausforderung eine möglichst niedrige Bestimmungsgrenze mit dem theoretischen Ziel von Null zu erhalten liegt weniger in Fleisch oder Fleischwaren als in hochprozessierten Produkten wie Gelatine und Folgeprodukten. Gelatine wird als Geliermittel und Texturzusatz für Süßigkeiten verwendet. Dieser Inhaltsstoff ist entsprechend in der Zutatenliste aufzuführen. Die Angabe der verwendeten Tierart ist freiwillig, mit Ausnahme von Fischgelatine.

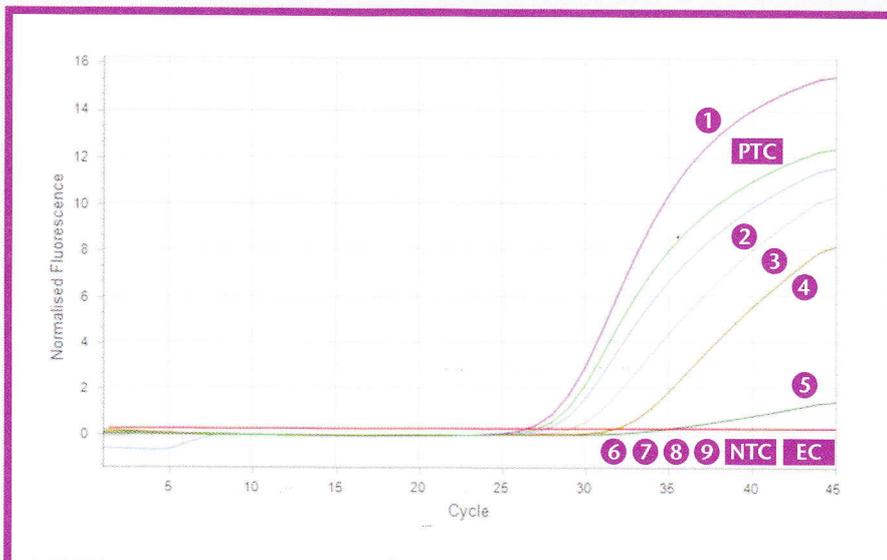
Durch die Prozessierung bei niedrigen oder hohem pH Wert und der unterschiedlichen Aufreinigung/Abreicherung bzw. Fragmentierung der DNA ist Gelatine eine anspruchsvolle Matrix für den sensitiven Nachweis von Markern tierischer Spezies. Bei Süßigkeiten

erfolgt eine weitere Verdünnung, Vermischung mit anderen Inhaltsstoffen und thermische Prozessierung. Dadurch wird der Nachweis in Endprodukten wie Süßigkeiten nochmals erschwert.

In Gelatine kann der Tierartennachweis relativ einfach gelingen, wie z. B. die Proficiency Tests der Firma DRRR (Deutsches Referenzbüro für Ringversuche & Referenzmaterialien) in den letzten Jahren zeigten. Verschieden Testhersteller konnten die Verfahren aus DNA Präparation und real-time PCR zunehmend bezüglich eines sensitiveren Nachweises optimieren.

Der wohl am längsten etablierte sensitive Testkit SureFood® Pork Sens PLUS (Abb. 1) wurde nun in einer zweiten Version nochmals optimiert. Die Sensitivität wurde erhöht und prozessierte DNA Fragmente können deutlicher erkannt werden. Das Thermo-profil läuft mit 45 Zyklen und die steileren Amplifikationskurven sind differenzierter. Durch die erhöhte Sensitivität kann in prozessierten Endprodukten wie Gummibärchen, Marshmallows und ähnlichen Produkten tierische DNA nachgewiesen werden. Dabei wird wie bisher die DNA auf Spin-Filter basierten Säulenteknologie mit SureFood® PREP Basic oder SureFood® PREP Advanced aufbereitet. Für den Testlauf in Abbildung 2 sind Proben mit je 100 mg Einwaage und 50 µl Elution für SureFood® PREP Advanced vorbereitet und in einem beliebigen 2-Kanal real-time Thermocycler (FAM/HEX) analysiert worden. Die Gesamtdauer einer solchen Analytik beträgt abhängig von der Probenanzahl ca. 3 Stunden.

Mit verhältnismäßig geringem Aufwand kann tierische Spezies, speziell von Schwein, in Gelatine und mit Einschränkungen in prozessierten Lebensmitteln nachgewiesen werden. Lebensmittelherstellern ist eine korrekte Kennzeichnung damit möglich. Eine falsche Deklaration der Abwesenheit von tierischen Produkten, insbesondere die Abwesenheit von Schwein, kann zu Reklamationen mit erheblichem Aufwand führen. Im Endpro-



Probennummer	Probe	Kennzeichnung	Resultat / Ct
1 2 3	Gelatine	Gelatine bzw. Gelatine, Schwein	Ct ca. 26 bis 29
4	Marshmallow	Gelatine (vom Schwein)	29,5
5	Gummibärchen	Gelatine (Herkunft Mexiko)	30,5
6 7 8	Gummibärchen,	Gelatine bzw. Gelatine, Rind	Nicht detektiert
9	Gelatine	halal, Rind	Nicht detektiert
NTC EC	Kontrollen	Negativkontrollen	Nicht detektiert
PTC	Kontroll DNA des Kits	Positivkontrolle	25

Abb. 2: Im internationalen Einzelhandel gekaufte Gelatineprodukte wurden getestet und zeigen klare Signale für *sus scrofa* im FAM Kanal. Die Grafik zeigt Einzelwerte aus Replikaten der gelisteten Produkte. Die nicht gezeigte Interne Amplifikationskontrolle (IAC) zeigt durchgehende positive Resultate.

dukt ist der Nachweis mit verringerter Sensitivität durchführbar. Wesentlich sicherer ist die Analytik für das Zwischenprodukt Gelatine und damit auch für die Endprodukte. Für Gelatine ist kein allgemeingültiges Referenzmaterial verfügbar, da die Produktion nicht durch einheitliche Verfahren und Standards festgelegt ist.

Ein sensibler Nachweis von DNA in Muskelgewebe, bei hochprozessierten Inhaltsstoffen und Endprodukten insbesondere von Schwein stellen besondere Anforderungen: Im Umgang mit Testdurchführung, vermeiden von Kreuzkontaminationen, eine besondere Verantwortung bei Bewertung der Ergebnisse und in der Kommunikation. Die Einhaltung anerkannter festgelegter Standards für valide Ergebnisse ist ein wichtiger Faktor. Die ISO 20813:2019-05 Norm (Molecular biomarker analysis – Methods of analysis for the detection and identification of animal species in foods and food products (nucleic acid-based methods) – General requirements and definitions) beschreibt Voraussetzungen für die Laboranalytik und ist allen, die in diesem sensiblen Analytikbereich gefordert sind besonders empfohlen.

#### Kontakt:

R-Biopharm AG  
 Dr. Martin Mehl  
 Produktmanager PCR Lebensmittel- & Futtermittelanalytik  
 An der neuen Bergstraße 17  
 64297 Darmstadt