

4 DISKUSSION

Die Hybridomatechnologie ist eine seit Jahren etablierte Methode zur Gewinnung von spezifisch reagierenden Antikörpern. Monoklonale Antikörper werden heute überwiegend in Testverfahren zur medizinischen Diagnostik eingesetzt. Die Gewinnung von monoklonalen Antikörpern in diesem Bereich stellt sich insofern einfacher dar, als die Antigene bekannt sind, rein dargestellt werden können und keinem technologischen Verarbeitungsprozeß unterliegen.

Die Gewinnung von spezifischen monoklonalen Antikörpern zur Tierartidentifizierung des verarbeiteten Fleisches in Lebensmitteln, die unterschiedlichsten technologischen Prozessen unterworfen waren, stellte sich als bedeutend schwieriger heraus.

Als eine besondere Problematik der Hybridomatechnik erwies sich die Etablierung von Klonen. Hybridome, die im Screening als spezifisch reagierend identifiziert wurden, konnten häufig nicht subkloniert und als Klon etabliert werden. Die Zellen starben ab oder verloren ihre Fähigkeit zur Antikörperbildung. Dadurch standen oft nicht genügend Antikörper für umfangreichere Untersuchungen einzelner Klone zur Verfügung, obwohl zahlreiche spezifisch reagierende Antikörper von Hybridomen nachgewiesen wurden.

4.1 Antigenaufbereitungen

Als schwierig erwies sich vor allem die Auswahl und Aufbereitung des Antigenmaterials, da in jedem Fleischextrakt eine unüberschaubare Anzahl verschiedener Proteine enthalten ist. Darüber hinaus ist nicht bekannt, welche Proteine auch nach verschiedenen thermischen Belastungen und technologischen Verarbeitungsprozessen noch oder erst spezie-spezifisch reagieren. Weiterhin zeigte sich, dass die Extraktionsmethode zur Gewinnung der Antigene aus dem Probenmaterial einen großen Einfluß auf die Untersuchungsergebnisse hatte.

Die gleiche Problematik besteht auch bei der Gewinnung polyklonaler Antiseren. Aus der Literatur geht dieses deutlich hervor. So wurden von vielen Autoren die unterschiedlichsten Methoden und Variationen sowohl zur Impfantigen- als auch zur Probenantigengewinnung beschrieben.

Für die eignen Untersuchungen wurden zunächst drei sehr unterschiedliche Antigenaufbereitungsverfahren verwendet, die jedoch alle aus dem Gesamtextrakt des Probenmaterials bestanden. Darüber hinaus wurde versucht, mit der Ultrafiltration die Vielzahl der Antigene im Extrakt stark thermisch belasteten Fleisches zu reduzieren und vor allem kleinere Proteinbruchstücke zu eliminieren, da diese wahrscheinlich für unspezifische Reaktionen verantwortlich sind. Mit dieser Methode sollten nur die hochmolekularen Proteine aus dem Extrakt zur Immunisierung verwendet werden, um die Chancen zur Gewinnung eines Klons mit spezifisch reagierenden Antikörpern zu erhöhen.

4.1.1 Vergleich der vier Antigenaufbereitungen

Die vier Antigenaufbereitungsvarianten zur Gewinnung monoklonaler Antikörper unterschieden sich sowohl in ihrer thermischen Belastung als auch in dem Extraktionsverfahren. Wie die Ergebnisse zeigten, war die Antigenaufbereitung 1 (s. 3.2.1.1) durchaus zur Gewinnung spezifischer monoklonaler Antikörper geeignet. Der einzige etablierte Klon stammte aus der Zellfusion mit der Antigenaufbereitung 1 vom Schwein. In den weiteren Untersuchungen zeigte sich jedoch, dass dieser Antikörper bei stärker hitzedenaturierten Fleischproben nicht geeignet war, die Tierart zu identifizieren. Eine Erhitzung der Muskulatur auf 56 °C für 15 Minuten führte offensichtlich nur zu einer teilweisen Hitzedenaturierung der Muskelproteine, denn schon eine weitere Erhitzung auf 60 °C verursachte eine Ausfällung von Proteinen im Extrakt und bedeutete den Verlust der Spezifität des monoklonalen Antikörpers bzw. der spezifischen Antigeneigenschaften des Proteins. Diese Methode erscheint deshalb zur Gewinnung von monoklonalen Antikörpern zur Speziesidentifizierung von stark erhitztem Fleisch in Lebensmitteln als wenig geeignet.

Auch mit Antiseren, die unter Verwendung von Extrakten mit physiologischer Kochsalzlösung aus auf 70 °C erhitzter Muskulatur zur Immunisierung gewonnen wurden, war eine Tierartdifferenzierung im Agar-Gel-Präzipitationstest mit auf 100 °C erhitzten Proben nicht mehr möglich (SHERIKAR et al., 1988). Dagegen konnte mit Impfantigenen, die aus Harnstoffextrakten von auf 70 °C erhitzter Muskulatur hergestellt wurden, Antiseren gewonnen werden, die noch mit auf 120 °C erhitzten Harnstoffextrakten reagierten (SINELL u. MENTZ, 1969). Hiermit wird deutlich, dass zur Gewinnung von spezifisch reagierenden Antiseren/Antikörpern gegen hochehitzte Muskulatur eine ausreichend hohe und lange Erhitzung der Impfantigene und die Wahl des Extraktionsmittels eine wesentliche Rolle spielen. Dies konnte durch die eigenen Untersuchungsergebnisse bestätigt werden. Die Form der Antigenaufbereitung 1 zur Gewinnung von speziesspezifischen monoklonalen Antikörpern zur Tierartidentifizierung in erhitzten Fleischerzeugnissen erscheint deshalb im Nachhinein als ungeeignet. Der Grund für diesen Versuchsansatz war die Vermutung, dass sich möglicherweise speziesspezifische hitzestabile Antigene in dem Extrakt aus nur schwach erhitzter Muskulatur nachweisen lassen, die auch mit Extrakten aus stark erhitzter Muskulatur spezifisch reagierten. Die eigenen Untersuchungen ergaben jedoch keinen Hinweis darauf, dass solche speziesspezifischen, hitzestabilen Antigene sowohl in roher wie erhitzter Muskulatur vorhanden sind.

Zur Gewinnung von spezifisch reagierenden Antikörpern zeigte sich die Antigenaufbereitung 2, bei der eine thermische Belastung bis zu ca. 89 °C auf die Muskulatur einwirkte, als nur bedingt geeignet. Bei der Betrachtung der Ergebnisse war jedoch zu berücksichtigen, dass zum Nachweis von spezifischen Antikörpern gegen Schwein im ELISA nicht das Impfantigen (homologe Antigen) vom Schwein, sondern die Antigenaufbereitung 3

(s. 3.3.3.1) vom Schwein als Testantigen verwendet wurde. Im gleichen Versuchsansatz mit der Antigenaufbereitung 2 (homologes Antigen als Testantigen) vom Rind zeigten sich zahlreiche Hybridome mit spezifisch reagierenden Antikörpern (s. 3.3.2.2). Diese Antikörper reagierten mit der Antigenaufbereitung 3 vom Rind jedoch unspezifisch.

Mit Immunisierungsantigenen aus einem Nativextrakt von Puten- und Geflügelfleisch, der auf 70, 80 und 95 °C erhitzt und anschließend gepoolt wurde, gelang die Gewinnung von spezifisch reagierenden Antiseren (BREHMER, 1998). Als Untersuchungsmaterial dienten Harnstoffextrakte von auf 70, 80 und 110 °C erhitzten Fleischerzeugnissen. Auf diese Weise gelang mit der Elektroimmunodiffusion, 1% Geflügelfleischzusatz in den auf 70 und 80 °C erhitzten Fleischerzeugnissen nachzuweisen. Die Nachweisgrenze in dem auf 110 °C erhitzten Probenmaterial stieg auf 10% an.

Obwohl die Antigenaufbereitung 2 im gleichen Temperaturbereich erhitzt wurde wie das Immunisierungsantigen in der Arbeit von BREHMER (1998), konnten in den eigenen Untersuchungen keine spezifisch reagierenden Antikörper gegen die Antigenaufbereitung 3 (110 °C, AcTP-Harnstoffextrakt) gefunden werden. Möglicherweise führte die starke Bearbeitung des Antigens 3 und hier insbesondere die Herstellung eines Aceton-Trocken-Pulvers vor der Harnstoffextraktion zu diesen unspezifischen Reaktionen.

Die Antigene aus der Antigenaufbereitung 2 scheinen durchaus zur Gewinnung von speziesspezifischen monoklonalen Antikörpern geeignet. Mit den auf diese Weise gewonnenen Antikörpern gelang jedoch keine Tierartidentifizierung von thermisch stark behandelten Fleischproben (Antigenaufbereitung 3).

Im Gegensatz zu den Untersuchungen mit den Antigenaufbereitungen 1, 2 und 4 brachten die Versuche mit der Antigenaufbereitung 3 (s. 3.2.1.3) keine Hybridome mit spezifisch reagierenden Antikörpern hervor. Die Antikörper zeigten im ELISA auch keine spezifischen Reaktionen mit den Antigenen der Antigenaufbereitung 1 bzw. 2. Dieses negative Ergebnis war insofern überraschend, als andere Autoren gerade mit der Harnstoffextraktion gute Ergebnisse erzielten.

Nur mit den Harnstoffextrakten von auf bis zu 120 °C erhitzten Proben war ein Tierartnachweis möglich, was mit den Extrakten von Proben mit physiologischer Kochsalzlösung nicht gelang (SINELL u. MENTZ, 1969). Känguru-, Schwein- und Rinder-muskeleiweiß in Brühwurstherzeugnissen ließen sich eindeutig identifizieren. Zur Immunisierung der Kaninchen als auch zur Antigenbeschichtung der ELISA-Platten wurden Harnstoffextrakte erhitzter Muskulatur bzw. eines daraus hergestellten Aceton-Trocken-Pulvers verwendet (MANZ, 1983, 1985). Erklärt wurde die scheinbar besondere Eignung von Harnstoffextrakten zu Gewinnung von spezifisch reagierenden Antiseren mit der Vorstellung, dass durch die Harnstoffextraktion eine im Nativpräparat kaum in Erscheinung tretende hitzestabile Proteinfraction im erhitzten Muskelmaterial desaggregiert und angereichert wird (SINELL, 1968; SINELL u. MENTZ, 1969). Unterstützt wird diese Annahme durch die

Beobachtung, dass nach Absorption des Antiserums mit nativem Pufferextrakt aus Kängurumuskulatur über die Werte der unspezifischen Bindung hinaus keine Antikörper an die Antigene der festen Phase gebunden wurden (MANZ, 1983, 1985). Dies wurde als ein Zeichen dafür gewertet, dass im nativen Material Substanzen mit antigenen Eigenschaften vorhanden waren, die sich dann mit gegen hitzebehandelte Antigene gerichteten Antikörpern verbanden.

Auch andere Arbeiten schienen dies zu bestätigen (BERGER et al., 1988). Zur Antiserumgewinnung verwendeten die Autoren ein Antigen, das aus roher Geflügel- bzw. Schweinemuskulatur hergestellt wurde. Dazu wurde ein aus 0,14 M Kochsalzlösung hergestellter Extrakt durch Ammoniumsulfatfällung und Kationaustauscher-Chromatographie zur Immunisierung weiter aufgearbeitet. Mit den so gewonnenen Antiseren ließen sich Geflügel bzw. Schwein auch in auf 100 °C und 120 °C für 15 Minuten erhitzten Proben im ELISA nachweisen. Die Empfindlichkeit des ELISA wurde für Geflügel mit 126 ppm und für Schwein mit 250 ppm angegeben (BERGER et al., 1988).

Im Gegensatz dazu stehen die eigenen Versuchsergebnisse, die aus der Immunisierung mit gering erhitztem Material keine spezifisch reagierenden Antikörper gegen stark erhitzte Proben hervorbrachten. Interessant ist in diesem Zusammenhang, dass auch der kommerzielle ELISA mit rohem oder nur gering erhitztem Probenmaterial keine zuverlässigen Ergebnisse produziert und für solche Proben eine zusätzliche Erhitzung von 15 Minuten im 100 °C Wasserbad vorschreibt. Dies deutet darauf hin, dass offensichtlich erst durch eine ausreichende Erhitzung des Probenmaterials speziesspezifische Antigene entstehen. Diese Antigene scheinen auch unabhängig von dem Verarbeitungszustand des Fleisches in ausreichend großer Menge vorhanden zu sein bzw. zu entstehen, um einen sicheren Nachweis im ELISA zu gewährleisten, was wahrscheinlich mit den in nur geringer Menge vorkommenden hitzestabilen Antigenen in der rohen Muskulatur nicht gegeben ist.

Die Verwendung von Gesamtextrakten aus der Muskulatur zur Immunisierung und Gewinnung speziesspezifischer monoklonaler Antikörper erwies sich als eine wenig geeignete Methode (Antigenaufbereitung 1 bis 3). Die Ausbeute an spezifisch reagierenden Klonen war gering. In einem weiteren Versuchsansatz sollte deshalb die Vielfalt der Antigene, die zur Immunisierung eingesetzt wurden, eingeschränkt werden.

Mit Hilfe der Ultrafiltration wurden die Gesamtextrakte aus erhitzter Muskulatur von Rind bzw. Schwein in Abhängigkeit von der Molekülgröße in verschiedene Proteinfractionen aufgeteilt (Antigenaufbereitung 4, s. 3.2.1.4). Um den Aufwand an durchzuführenden Immunisierungen und Zellfusionen zu beschränken, wurden maximal zwei Proteinfractionen zur Immunisierung der Mäuse verwendet. Damit die dafür am besten geeigneten Proteinfractionen ausgewählt werden konnten, wurden die einzelnen Fraktionen von Rind bzw. Schwein im ELISA mit verschiedenen institutseigenen polyklonalen Antiseren

(s. 3.3.4.1) untersucht. Hier zeigte sich, dass vor allem die Konzentrate mit einem Molekulargewicht unter 50 kDa mit den Antiseren unspezifisch und die hochmolekularen Konzentrate (> 100 kDa) spezifischer reagierten. Die niedrigeren Extinktionen bei gleichzeitig spezifischeren Reaktionen deuten zum einen darauf hin, dass die hochmolekularen Antigene weniger freie Bindungsstellen für Antikörper aufweisen, denn der Proteingehalt in den Sensibilisierungslösungen für die ELISA-Platten war bei allen Proteinkonzentraten gleich (1 µg/Kavität), zum anderen, dass eine höhere Speziespezifität der hochmolekularen Antigene vorliegt, die unter anderem auch durch die größere Komplexität der hochmolekularen Proteine gegeben ist.

Bereits in ersten Screening-ELISAs zeigte sich, dass aus dieser Fusion deutlich mehr Hybridome mit spezifisch reagierenden Antikörpern gegen Rind bzw. Schwein hervorgingen als aus Zellfusionen von mit den Gesamtextrakten immunisierten Mäusen (Antigenaufbereitung 1 – 3). Bei den weiteren Untersuchungen reagierte ein aus der Fusion mit dem Antigen vom Schwein (2. Konzentrat) stimulierten Lymphozyten hervorgegangener monoklonaler Antikörper im ELISA nicht nur mit dem homologen Antigen (2. Konzentrat), sondern auch mit dem 3. Konzentrat und deutlich schwächer mit dem 4. Konzentrat vom Schwein. Offenbar befand sich das spezifische Epitop auf einem Protein, das teilweise mit anderen Proteinen aggregiert war und so im 2. bis 4. Konzentrat vorkam (s. 3.3.4.2). Besonders bemerkenswert ist hier, dass dieser Antikörper mit dem 7. Konzentrat (< 1 kDa) vom Rind im hohen Maße unspezifisch reagierte. Durch den starken Erhitzungsprozeß können über die reinen Konformationsänderungen hinaus Zersetzungsreaktionen der Muskeleiweiße auftreten, die zur Abspaltung von Proteinketten führen (HOFMANN u. BLÜCHEL, 1992) und in der Isoelektrischen Fokussierung und SDS-Elektrophorese einen Verlust von darstellbaren Banden bewirken. Die Einwirkung steigender Temperaturen führt zu einer zunehmenden Abschwächung der Banden sowie zu einer zunehmenden und durchgehenden Untergrundfärbung der Gele im Bereich der Proteinlaufstrecken (HOFMAN et al., 1995). Auch bei den eigenen Untersuchungen zeigte sich in der SDS-PAGE ein Verlust von anfärbbaren Banden (s. 3.3.6.1). Stattdessen kam es über den gesamten Trennbereich zu einer schwachen Anfärbung von Proteinen (s. Abb. 37). Offensichtlich entstanden durch den Erhitzungsprozeß viele Proteinbruchstücke unterschiedlichster Molekulargröße. Es scheinen vor allem die kleineren Proteine bzw. Proteinbruchstücke für unspezifische Reaktionen verantwortlich zu sein. Dies zeigte sich auch in der Voruntersuchung zur Auswahl der Proteinkonzentrate zur Immunisierung (s. 3.3.4.1).

KANG'ETHE (1991) bestimmte mit der Gelfiltration das Molekulargewicht eines speziesspezifischen Antigens, dass er mit Hilfe der Immunadsorptionschromatographie aus erhitzter Muskulatur vom Rind isolierte. Dieses Antigen hatte ein Molekulargewicht von 210 kDa.

Aufgrund der eigenen als auch der Untersuchungsergebnisse von KANG'ETHE (1991) wurde zur Immunisierung das zweite Proteinkonzentrat (100–300 kDa) von Rind bzw. Schwein ausgewählt. Darüber hinaus wurde auch das 1. Konzentrat vom Rind (300 kDa) zur Immunisierung eingesetzt. Diese Antigene erwiesen sich den Antigenenaufbereitungen 1 bis 3 überlegen und brachten deutlich mehr Hybridome mit spezifisch reagierenden Antikörpern gegen Rind bzw. Schwein hervor als aus Zellfusionen von mit den Gesamtextrakten aus erhitzter Muskulatur immunisierten Mäusen.

Aufgrund der eigenen Untersuchungsergebnisse ist letztlich festzuhalten, dass sich die Verwendung von ausschließlich hochmolekularen, wasserlöslichen Proteinen aus stark erhitzter Muskulatur für die Immunisierung von Mäusen zur Gewinnung von spezies-spezifischen monoklonalen Antikörpern bewährt hat. Diese so in der Literatur noch nicht beschriebene Methode zeigte sich den Antigenaufbereitungen 1 bis 3 deutlich überlegen.

4.1.2 Brauchbarkeit monoklonaler Antikörper im Vergleich zu konventionellen Antiseren

Gelangt ein Antigen in einen Säugetierorganismus, reagiert das Immunsystem immer mit der Bildung tausender verschiedener Antikörper. Diese unterscheiden sich in ihrer Spezifität und Affinität zum Antigen. Die Antikörpervielfalt entsteht selbst bei hochgereinigten Antigenen. Auf diese Weise bietet das Immunsystem dem Organismus einen möglichst großen Schutz vor körperfremden Substanzen. Die Vielfalt und die Menge der gebildeten Antikörper hängt dabei sowohl von der Immunpotenz des Antigens als auch von der genetischen Konstitution und der körperlichen Kondition des Organismus ab. Die Antikörpervielfalt und die individuellen Reaktionen der Versuchstiere auf die Antigene erschweren die Gewinnung von diagnostischen Antiseren erheblich. Selbst bei der Verwendung eines hochgereinigten Antigens zur Immunisierung entwickeln Versuchstiere immer verschiedene Antiseren, die sich in ihrem Titer und ihrer Spezifität unterscheiden. Das Ergebnis der Immunisierung eines Versuchstieres ist in der Regel nicht reproduzierbar. Dieses erschwert vor allem die Gewinnung von spezifischen Antiseren zur Identifizierung von sehr ähnlichen Antigenen z. B. aus der erhitzten Muskulatur verschiedener Tierarten. Um für diesen Zweck geeignete polyklonale Antiseren zu erhalten, ist es häufig erforderlich, eine große Zahl von Versuchstieren zu immunisieren. Oft besteht sogar die Notwendigkeit, die Antiseren z. B. durch Immunadsorption zu reinigen, um eine ausreichende Spezifität der Antiseren zu erlangen. Darüber hinaus ist auch die Vergleichbarkeit von Untersuchungsergebnissen, die mit verschiedenen Antiseren erzielt wurden, mit erheblichen Schwierigkeiten verbunden. Nicht ohne Grund wurde deshalb selbst für den kommerziellen ELISA, der polyklonale Antiseren verwendet, vorgeschlagen, chargenweise auf seine Spezifität zu überprüfen (WEINGARTEN und KLARE, 2001). Aus den oben genannten Gründen drängt sich die

Gewinnung von monoklonalen Antikörpern zur Tierartidentifizierung geradezu auf. Mit dieser Methode lassen sich nicht nur die Anzahl der Versuchstiere erheblich reduzieren, sondern auch Antikörper gewinnen, die eine hohe Spezifität aufweisen und in der Zellkultur quasi unbegrenzt vermehrt werden können. Mit solchen hochspezifischen Antikörpern ließen sich dann auch reproduzierbare und vergleichbare Ergebnisse erzielen.

Die eignen Untersuchungsergebnisse erwiesen sich als vielversprechend. Insbesondere die Verwendung der Antigenaufbereitung 4 zur Immunisierung führte zur Bildung von mehreren hochspezifisch reagierenden, monoklonalen Antikörpern. Damit steht eine einfache Methode zur Aufbereitung von Immunisierungsantigenen für weitere Entwicklungsarbeiten auf diesem Gebiet zur Verfügung.

Aufgrund eigener Erfahrungen zeigte sich, dass als wesentliche Voraussetzung zur erfolgreichen Entwicklung und Etablierung von Klonen eine gesicherte Zellkultivierung und stabile Laborbedingungen vorhanden sein müssen.

4.2 Kommerzieller ELISA

In den eigenen Untersuchungen wurde sowohl das Anti-Schwein- als auch das Anti-Rind-Testkit verwendet. Mit diesen Testkits wurden die Antigene aus der Antigenaufbereitung 4 (s. 3.2.1.4) und die Testantigene (s. 3.2.2) untersucht.

Die Gesamtextrakte aus der Antigenaufbereitung 1 wurden eindeutig identifiziert. Die Extinktionen der einzelnen Proteinkonzentrate unterschieden sich jedoch teilweise deutlich von einander. Auffällig war besonders, dass die Extinktionen der niedermolekularen Konzentrate (< 3 kDa) beim Rind deutlich niedriger als die der anderen Konzentrate waren und beim Schwein sogar unterhalb des Cut off-Wertes lagen.

Zu erklären wäre dieser Sachverhalt damit, dass die Antikörper des kommerziellen ELISA aus polyklonalen Antiseren gewonnen wurden. Deshalb wurden auch mit fast allen Konzentraten von Rind bzw. Schwein positive Reaktionen verzeichnet. Darüber hinaus erfolgte offensichtlich durch die Zugabe von Antigenen anderer Spezies eine Absättigung der Antiseren, um die unspezifischen Reaktionen zu eliminieren bzw. unterhalb des Cut off-Wertes zu halten. Bei dieser Maßnahme wären dann auch vor allem die mit den niedermolekularen Antigenen reagierenden unspezifischen Antikörper verringert worden. Dies erklärt die deutlich niedrigeren Extinktionen bei den Reaktionen mit dem 6. und 7. Proteinkonzentrat. Das kann als ein weiterer Beleg dafür gewertet werden, dass für unspezifische Reaktionen vor allem die niedermolekularen Antigene aus den Extrakten der erhitzten Fleischproben verantwortlich waren.

Bei der Untersuchung der Testkits mit den für 30 Minuten auf 60, 70, 80, 90 und 100 °C erhitzten Proben von Rind, Schaf, Schwein, Wildschwein und Pute zeigten sich sehr einheitliche Extinktionswerte zu den einzelnen Tierarten-Antigenen unabhängig von der

Erhitzungsstufe. Das Anti-Schwein-Testkit war jedoch nicht in der Lage, zwischen Schwein und Wildschwein zu differenzieren.

Das Anti-Rind-Testkit konnte Rind sicher von den Antigenen anderer Tierarten unterscheiden. Es fiel dabei auf, dass die unspezifische Reaktion gegenüber den Schafantigenen höher war als gegen Schwein, Wildschwein und Pute, jedoch noch deutlich unter dem Cut off-Wert lag. Dies war mit Sicherheit durch die größere genetische Verwandtschaft dieser beiden Tierarten bedingt.

4.3 Weitere Untersuchungsverfahren zum Tierartennachweis in Lebensmitteln – Bedeutung und Ausblick

Die tierartige Identifizierung von Fleisch ist seit jeher eine wichtige Aufgabe in der amtlichen Lebensmittelüberwachung. Durch verschiedene Rechtsvorschriften ist die Deklaration der Tierart des verwendeten Fleisches in einem Lebensmittel vorgeschrieben.

Während es sich früher vorwiegend um den Schutz des Verbrauchers vor Übervorteilung durch Weglassen wertbestimmender Anteile im Fleischerzeugnis (Rind- / Kalbfleisch) oder Ersatz durch Fleisch anderer Tierarten oder Einsatz minderwertigen Geflügelseparatorenfleisches handelte, hat die Tierartbestimmung durch die BSE-Problematik seit November 2000 sowohl für den Verbraucher als auch für die Überwachungsbehörden hohe Priorität erlangt.

Ein Bewerben von Produkten mit „ohne Rindfleisch“ oder „rindfleischfrei“ bzw. die Verwendung von Rinderdärmen für Wurstwaren ohne Rindfleisch oder die Verwendung von Rinderfett als Trägersubstanz für Fertiggewürzmischungen in der Fleischwarenindustrie führte auch zu neuen Fragen an die Leistungsfähigkeit und Grenzen der verschiedenen Methoden zur Tierartidentifizierung.

Die IEF ist als Methode zur Proteindifferenzierung von rohem und erhitztem Muskelfleisch in die Amtliche Sammlung von Untersuchungsverfahren nach § 35 LMBG aufgenommen worden (Methode L 06.00-17 und L 06.00-29). Untersuchungen von HOFMANN (1997b) zeigten, dass der Nachweis von Rind- und Schweinefleisch in Mischungen in erhitzten Fleischerzeugnissen mit der IEF nur möglich ist, wenn der Anteil mindestens 10 % beträgt. Diese Methode kann daher bei Fleischerzeugnissen nur ergänzend zu anderen Untersuchungsmethoden durchgeführt werden.

Der kommerzielle ELISA (inzwischen auch in die Amtliche Methodensammlung nach § 35 LMBG, Methode L 06.00-47 aufgenommen) hat sich als immunologische Untersuchungsmethode prinzipiell bewährt. Aber auch die Ergebnisse dieses Testes müssen kritisch hinterfragt werden. Zu berücksichtigen ist, dass dieser Test nicht nur mit Muskeleiweiß, sondern auch mit anderen Geweben wie Leber, Herz, Zunge, Niere, Pansen, Blut und Blutplasma positiv reagiert (WEINGARTEN und KLARE, 2001). Das ist insbesondere bei der

rechtlichen Bewertung von Untersuchungsergebnissen amtlicher Proben zu beachten (KUSCH u. WEINGARTEN, 2001).

Die Empfindlichkeit des ELISA ist auch abhängig von der Stärke der Hitze einwirkung auf das Fleischerzeugnis, denn mit zunehmender thermischer Belastung der Antigene nimmt die Empfindlichkeit des Testes ab (HOFMANN et al., 1995). Für Geflügel wurde eine Nachweisgrenze von 0,5 %, für Schweinefleisch und Rindfleisch eine Nachweisgrenze von 2,0 % und bei sterilisierten Konserven mit einem Fc-Wert von 5 und für Geflügel in Brüh- und Kochwürsten von 0,2 % ermittelt (HOFMANN, 1994b).

Zu falsch positiven Ergebnissen kann es durch die zunehmende Verarbeitung von pflanzlichen Proteinen in Fleischerzeugnissen (WIJNGAARDS, 2001), die Anwesenheit von Hühnereieiweiß (MIFEK u. GLAWISCHNIG, 1990) oder durch einen hohen Anteil an aufgeschlossenem Bindegewebeisweiß kommen (HOFMANN, 1997a). Während die Extrakte einzelner Gewürzmischungen schwach positiv bzw. zweifelhaft reagierten, zeigten die aus Schweinefleisch und mit diesen Gewürzmischungen hergestellten Fleischerzeugnisse nur eindeutige Ergebnisse im ELISA (SPERNER et al., 2002).

Aufgrund der unterschiedlichen Spezifität einzelner Chargen der ELISA-Kits wurde vorgeschlagen, die Amtliche Methode L 06.00 – 47 nach § 35 LMBG bzgl. der Qualitätskontrolle der verwendeten Antikörper zu ergänzen und lebensmittelrechtlich relevante Befunde durch eine andere Methode zu bestätigen (WEINGARTEN und KLARE, 2001).

Die Nachweisgrenzen der gentechnischen Methoden liegen um den Faktor 10 bis 1000 niedriger als beim ELISA (SCHWÄGELE, 2001a). Eine prinzipiell unbegrenzte Möglichkeit zur Artenidentifizierung von tierischen und pflanzlichen Zutaten in Lebensmitteln bietet die Gentechnik mit der PCR-Methode, RFLP und der DNA-Sonden-Technik. Voraussetzung dafür ist jedoch, dass geeignete spezifische Primer bzw. DNA-Sonden zur Verfügung stehen, denn auch die DNA unterliegt in Abhängigkeit von dem Verarbeitungsprozeß (thermische Belastung) einem zunehmenden Abbau. Die gentechnischen Untersuchungsmethoden haben jedoch einen entscheidenden Nachteil. Mit ihnen kann nicht unterschieden werden, aus welchen Zutaten eines zusammengesetzten Lebensmittels die nachgewiesene DNA stammt. Durch hochwirksame DNA-Polymerasen und mehr als 35 Zyklen kann es unter Umständen zur Überbewertung von Spuren und somit zur falsch positiven Validierung von Ergebnissen kommen (SCHWÄGELE, 2001b). Gewürze können unterschiedlich starke Hemmstoffe für die PCR-Reaktion aufweisen, und auch wenn mit dem universell vorkommenden Cytochrom b-Gen gearbeitet wird, kann es zu Problemen bei der Zuordnung besonders bei Wildtierarten und Geflügel kommen (SCHWÄGELE, 2001a).

Hiermit wird deutlich, dass keine der beschriebenen Methoden zur Speziesidentifizierung für sich allein ausreicht, um bestimmte Fragestellungen in der Lebensmittelüberwachung zu beantworten. Die Suche nach weiteren, effektiveren Verfahren ist deshalb gut begründet.

Während der qualitative Nachweis einer Tierart (> 1 %) in einem Lebensmittel relativ sicher möglich ist, weist der quantitative Nachweis noch erhebliche Schwierigkeiten auf. Die quantitative Analyse hinsichtlich der verwendeten Tierarten in einem Lebensmittel ist auf Basis der DNA trotz einer Reihe verschiedener Ansätze und unterschiedlicher Geräte auf dem Markt zur Zeit noch nicht reproduzierbar (SCHWÄGELE, 2001b).

Die elektroforetischen und immunologischen Untersuchungsmethoden ließen bisher nur grobe Abschätzungen zu (SINELL et al., 1991). Genauere Bestimmungen waren nur bei Modellprodukten mit bekannter Zusammensetzung und entsprechenden Referenzproben möglich (BREHMER, 1998).

Für neue Fragestellungen in Abhängigkeit von der lebensmittelrechtlichen Lage kann es notwendig sein, monospezifische, nur mit einzelnen Geweben (Muskeleiweiß, zentralnervöse Substanzen) einer Tierart reagierende Antikörper zu entwickeln. Solche hochspezifischen Antikörper über die Herstellung polyklonaler Antiseren und umfangreiche Absättigungen zur Reduktion von Kreuzreaktionen zu gewinnen ist problematisch. Die Entwicklung von hochspezifischen monoklonalen Antikörpern, die unter Verwendung von vorgereinigten Antigenen hergestellt werden, könnte ein erfolgsversprechender Weg sein.