

# Identifikation von Krebstieren mittels MALDI-TOF-MS

A. Sabrowski<sup>1</sup>, A. Bachert<sup>1</sup>, E. Müller-Hohe<sup>1</sup>, J. Fuchs<sup>2</sup>, C. Wind<sup>1</sup>



## Einleitung

Krebstiere stellen wirtschaftlich gesehen die wichtigsten Meeresfrüchte dar. Dabei stammt der Großteil der bei uns auf dem Markt zu findenden Produkte aus China, Indonesien, Thailand, Indien, Ecuador und Costa Rica. Neben der Wildfischerei haben Aquakulturen große Bedeutung, wobei die White Tiger Garnele (*Litopenaeus vannamei*) weltweit am meisten produziert wird.

Im Sinne der VO (EU) Nr. 1379/2013 müssen den Verbrauchern für eine bewusste Kaufentscheidung klare und verständliche Informationen unter anderem über die Herkunft und das Verfahren für die Produktion der Erzeugnisse zur Verfügung gestellt werden. Zu Verbraucherschutzzwecken sind die zuständigen nationalen Behörden gehalten, umfassenden Gebrauch von den verfügbaren Techniken zu machen, um die Marktteilnehmer davon abzuhalten, falsche Angaben über ihre Fänge zu machen (Erwägungsgründe 21, 23). Zu den verpflichtenden Angaben gemäß Art. 35 (1) a) VO (EU) Nr. 1379/2013 zählen u.a. die Handelsbezeichnung der Art und deren wissenschaftlicher Name. Zum Schutz des Verbrauchers vor Täuschung kann die MALDI-TOF-Massenspektrometrie als zeitsparende und kostengünstige Analyseverfahren eingesetzt werden, um die Angabe der Tierart zu überprüfen. Für Krebstiere entwickelt das CVUA Freiburg in Zusammenarbeit mit dem CVUA Karlsruhe derzeit eine Datenbank auf diesem Gebiet.

## Material und Methoden

### Proteinextraktion:

Die Proteinextraktion basiert auf der für Fischarten beschriebenen Methode [1]. Dabei wurden ca. 5 mg Probe in 500 µl Trifluoressigsäure (0,1%) mit einem Mikropipistill zermahlen, im TissueLyser LT (Fa. Qiagen) aufgeschlossen, ca. 2 Stunden bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend 10 Minuten zentrifugiert. 1 µl des Extraktes wurde auf das Target gegeben, trocken gelassen und im Anschluss mit 1 µl Matrix (HCCA) überschichtet.

### Datenbankaufbau:

Zur Erzeugung von Referenzspektren für die Datenbank wurden Krebstiere verschiedener, mittels Sequenzierung bestätigter Arten verwendet (16S rRNA [2]). Nach Proteinextraktion wurden im MALDI microflex LT/SH System (Fa. Bruker) Referenzspektren erzeugt. Diese wurden in der Datenbank hinterlegt.

### Probenmessung:

Nach Proteinextraktion wurden die Proben im MALDI microflex LT/SH System (Fa. Bruker) gemessen und von der gerätespezifischen Software mit den in der Datenbank hinterlegten Referenzen abgeglichen. Die Auswertung der Spektren erfolgte durch die Software anhand eines Score-Systems.

### Validierung:

Im Rahmen von Validierungsstudien werden die Kenngrößen Sensitivität und Spezifität für jede Art bestimmt. Dabei wird eine Mindestprobenzahl von n=20 jeweils für die zu überprüfende Ziel-Art und die Nicht-Ziel-Arten angestrebt. Als Nicht-Ziel-Arten werden insbesondere Proben eng verwandter Arten, Arten mit ähnlicher Morphologie sowie Arten des gleichen Herkunftsgebietes ausgewählt. Für die Auswertung wird das softwarespezifische Score-System des Geräteherstellers herangezogen. Dabei werden Scores  $\geq 2,0$  als Identifizierung der Art gewertet. Scores  $< 2,0$  und  $\geq 1,7$  geben lediglich die Identifizierung auf Gattungsebene wider und werden bei einer Validierung auf Art-Ebene als „nicht identifiziert“ gewertet.

## Ergebnisse und Schlussfolgerungen

Die Datenbank umfasst für Krebstiere derzeit 30 Referenzen von 12 verschiedenen Arten (Abb. 2). Die Erweiterung der Datenbank um weitere Referenzen der bereits vorhandenen Arten (ca. n=5 Referenzen pro Art) sowie um weitere Arten wird fortgeführt.

Als Voraussetzung für den Routineeinsatz im Labor werden parallel Validierungsstudien durchgeführt. Im Rahmen dieser Studien wurde beispielsweise für die Art *Litopenaeus vannamei* eine Sensitivität von 95 % und eine Spezifität von 100 % ermittelt (Tab. 1). Dabei wurden von den 20 Proben der Ziel-Art *Litopenaeus vannamei* 19 Proben (=95 % Sensitivität) richtig erkannt (Score  $\geq 2,0$ ). Keine (=0 %) dieser Proben wurden fehlerhaft einer anderen Art zugeordnet. Eine Probe (=5%) wurde nicht identifiziert (Score  $< 2,0$ ). Keine (=0%) der 26 Proben der Nicht-Ziel-Arten wurde als Ziel-Art identifiziert.

Wie bereits für Fische und Fischrogen [1, 3] konnte auch für Krebstiere gezeigt werden, dass die Artidentifizierung mittels MALDI-TOF MS innerhalb kurzer Zeit (ca. 2,5 h) möglich ist. Das Verfahren eignet sich somit insbesondere zum Screening hoher Probenzahlen.

### Literatur:

- Fuchs, J., Krause, A., Skuballa, J., Eisenbeiss, F., Pietsch, K., Wind, C. (2017). Fischarten-Identifizierung mittels MALDI-TOF-MS. Amstierärztlicher Dienst, Sonderausgabe: 26.9.-29.9.2017, S. 149.
- Ämtliche Sammlung von Untersuchungsverfahren nach § 64 LFGB: BVL L 12.01-3:2012-07 Untersuchung von Lebensmitteln - Krebstierartbestimmung in rohen Krebstieren und Krebstiererzeugnissen durch Sequenzanalyse von 16S rRNA-Sequenzen
- Wind, C., Müller-Hohe, E., Fuchs, J., Becker, E., Bohl, B. (2019) Fischrogen: Artidentifizierung mittels MALDI-TOF-MS. Poster 60. Arbeitstagung des Arbeitsgebietes Lebensmittelhygiene der DVG vom 24. bis 27. 09. 2019 in Garmisch-Partenkirchen
- Verordnung (EU) Nr. 1379/2013 des Europäischen Parlaments und des Rates über die gemeinsame Marktorganisation für Erzeugnisse der Fischerei und der Aquakultur

### Anschrift der Verfasser:

<sup>1</sup> Chemisches und Veterinäruntersuchungsamt Freiburg, Am Moosweiher 2, 79108 Freiburg, e-mail: poststelle@cvuaf.bwl.de  
<sup>2</sup> Chemisches und Veterinäruntersuchungsamt Karlsruhe, Weißenburger Str. 3, 76187 Karlsruhe, e-mail: poststelle@cvuaka.bwl.de

60. Arbeitstagung des Arbeitsgebietes Lebensmittelhygiene der DVG vom 24. bis 27. 09. 2019 in Garmisch-Partenkirchen



Abbildung 1: Beispielhafte Darstellung verschiedener Krebstier-Arten – *Nephrops norvegicus*, *Homarus americanus*, *Macrobrachium* spp.

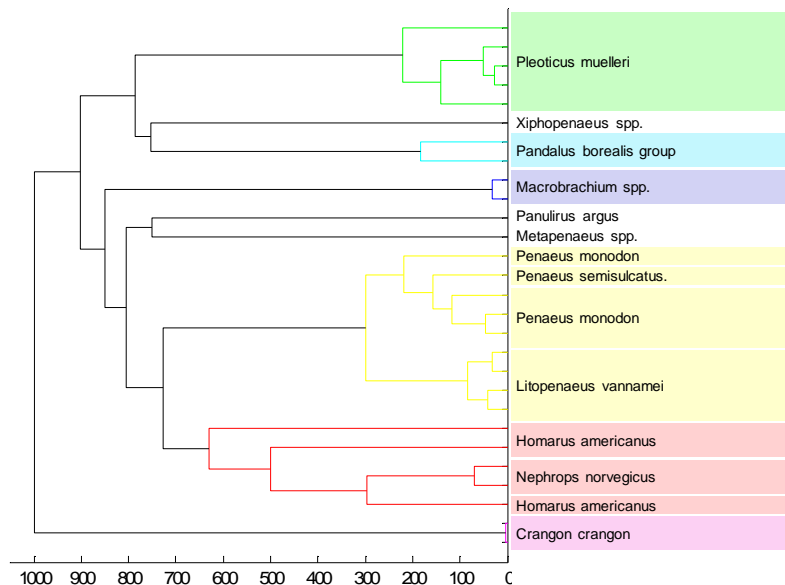


Abbildung 2: Dendrogramm der Krebstier-Referenzen

Tabelle 1: Validierungsergebnisse für die Art *Litopenaeus vannamei*

### *Litopenaeus vannamei*

Sensitivität	<b>Anzahl Proben</b>	<b>20</b>
	Richtig-positiv	19
	Falsch-negativ	1
	<b>Sensitivität</b>	<b>95 %</b>
Spezifität	<b>Anzahl Gegenproben</b>	<b>26</b>
	Richtig-negativ	26
	Falsch-positiv	0
	<b>Spezifität</b>	<b>100 %</b>



Baden-Württemberg