

# Etablierung einer MALDI-TOF MS-Datenbank zur schnellen Identifizierung von Schnapper-Speisefischen (*Lutjanidae*)

Rebecca Bonke\*, Jannika Fuchs, Christine Wind, Arthur P. Schiffmann, Sabine Kehm

\*Rebecca.Bonke@lhl.hessen.de

## Einleitung

Durch den weltweit steigenden Handel mit importiertem Fisch steigt auch beim Verbraucher das Risiko an einer Ciguatera-Vergiftung (Ciguatera) zu erkranken, wenn belastete tropische Speisefische verzehrt werden (z.B. *Lutjanidae*, Schnapper).

In der EU wurden bereits Erkrankungen auf den Verzehr von falsch gekennzeichneten importierten Fischen zurückgeführt [1]. Eine Untersuchung von 975 über die TGSH Frankfurt importierten frischen Speisefischen belegte eine Falschdeklaration von 31 %, wobei die Falschdeklarationen bei Fischen aus den Familien *Lutjanidae* bei 79 % lag. Dies entsprach einem Ciguatera-Risiko von 72 % [2].

## Ziel

Die Überprüfung von importierten Fischen erfolgt am größten deutschen Frischfischhafen u.a. mittels PCR-basierter DNA-Sequenzierung. Dieses Untersuchungsverfahren ist sehr kosten- und insbesondere zeitintensiv, wodurch Fische schon verzehrt sein können, bevor ein Sequenzierungsergebnis vorliegt. Zur Erhöhung des Verbraucherschutzes sollte am Hessischen Landeslabor anhand der 925 importierten Fische eine MALDI-TOF MS-Datenbank aufgebaut werden, die es ermöglicht falsch gekennzeichnete tropische Fischarten ohne große Verzögerungen bei der Einfuhr schnell und kostengünstig zu detektieren und damit die Gefahr des Verzehrs von Ciguateratoxin-belasteten Fischen zu senken.

## Datenbankaufbau

Zum Aufbau der Fischdatenbank wurden bislang 950 importierte Speisefische gemäß des Extraktionsprotokolls für Fisch und Meeresfrüchte des CVUA Karlsruhe [3] aufgearbeitet und auf ein Maldi-TOF Target aufgebracht. Die Messungen erfolgten mit dem Biotyper LT-microflex, Bruker Daltonik im Bereich von 2-20 kDa. Aus den gewonnenen Spektren wurden MSPs (Main Spectra Projections) als Referenz für die Datenbank sowie Validierungsspektren zur Überprüfung der Methode und der Datenbank erzeugt (s. Abb. 1).



Abb. 1: Workflow zur Datenbankerstellung

## Ergebnis

Bislang wurden 362 unabhängige MSPs von >75 sequenzierten Fisch-Spezies aus > 16 Familien am LHL erzeugt und in die Datenbank aufgenommen. Zusätzlich wurde die Datenbank um 299 MSPs anderer Institute erweitert.

Die Einträge aus der Familie der *Lutjanidae* (Schnapper) umfassen 9 *Lutjanus* spp. und 2 *Pinjalo* spp., wobei sich die MSPs der Spezies deutlich voneinander unterscheiden (Abb. 3). Auch die Clusteranalyse zeigt eine deutliche Differenzierung der Spezies. Vor allem die mit Ciguateratoxin belasteten Fischarten *Lutjanus argentimaculatus* und *Lutjanus bohar* sind sicher abgrenzbar (Abb. 2).

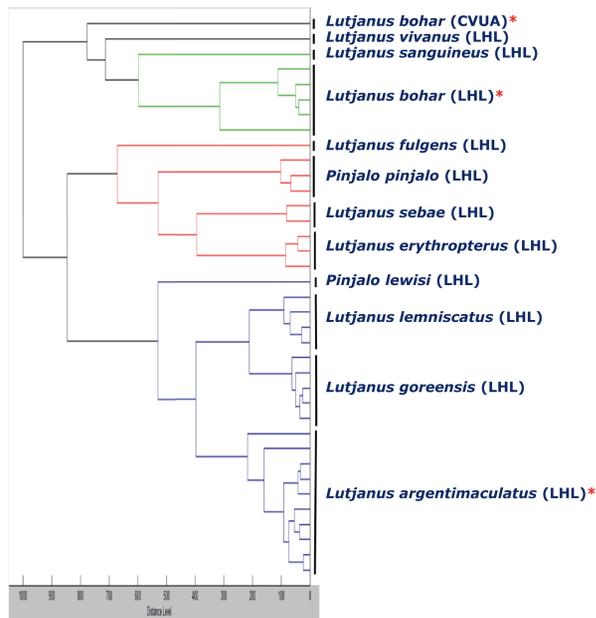


Abb. 2: Maldi-TOF MS-basiertes Dendrogramm von 37 MSPs aus der Familie *Lutjanidae* (33 MSPs LHL, 4 MSPs CVUA Freiburg), \*Ciguatera

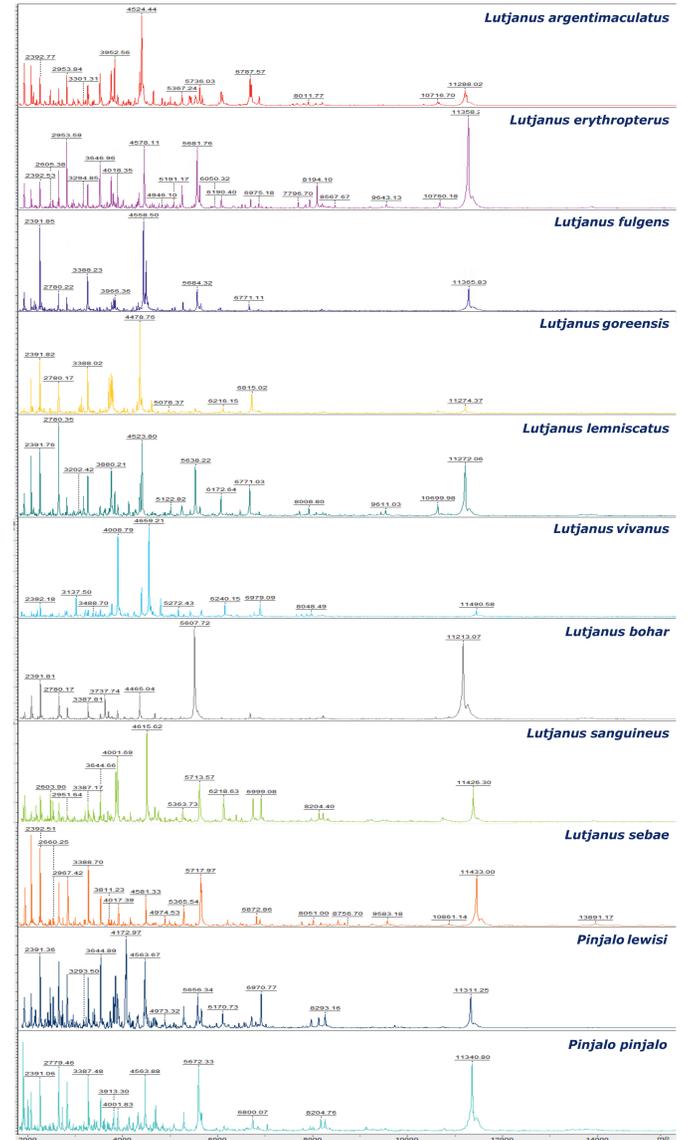


Abb. 3: Maldi-TOF MSPs von *Lutjanus* spp. und *Pinjalo* spp.

## Validierung

Für die Validierung gemäß BVL-Leitlinie [4] wurden unabhängige Einzelspektren von 107 *Lutjanus* spp. (74x *L. argentimaculatus*, 10x *L. bohar*, 1x *L. erythropterus*, 3x *L. gorensis*, 16x *L. lemniscatus*, 3x *Lutjanus* spp.) und 817 unabhängige Gegenspektren ( $\emptyset$  *Lutjanus* spp.) anderer Fisch-Spezies verwendet. Mit der erstellten LHL Fisch-Datenbank sowie den 299 MSPs anderer Institute beträgt die Sensitivität für den Nachweis von *Lutjanus* spp. 99,1 % und die Spezifität 100 % (Tab. 1). Für *Pinjalo* spp. konnte bislang nur die Spezifität (= 100 %) anhand von 924 unabhängigen Gegenspektren bestimmt werden.

Schnapper-Validierungsproben	Biotyper Ergebnis	
	<i>Lutjanus</i> spp.	$\emptyset$ <i>Lutjanus</i> spp.
<i>Lutjanus</i> spp. (n = 107)	99,1 % (n: 106)	0
$\emptyset$ <i>Lutjanus</i> spp. (n = 817)	0	100 % (n: 817)

Tab. 1: Validierungsergebnis (Vierfeldertafel) für *Lutjanus* spp.; *Lutjanus* spp. Proben: 101xLHL, 6xCVUA F;  $\emptyset$  *Lutjanus* spp. Proben: 353xLHL, 354xCVUA F, 111xCVUA W;  $\emptyset$  = nicht *Lutjanus* spp.; n: Anzahl; oben Mitte = Sensitivität; unten rechts = Spezifität

## Fazit

Die MALDI-TOF MS ist eine schnelle (< 1h), einfache und kostengünstige Methode zur Identifizierung von Fischen bis auf Speziesebene. Der unterstützende Einsatz bei der Überwachung von Warensendungen an Grenzkontrollstellen kann zur Erhöhung des Verbraucherschutzes ohne relevante Verzögerungen beitragen [5]. Wir tauschen unsere Spektren über die MALDI User Plattform „MALDI-UP“. Hiermit kann die eigene Datenbank stetig erweitert und die Identifizierungssicherheit erhöht werden [6].

[1] Loeffler et al. (2022): Food Food Safety Risk in Germany From Mislabeled Imported Fish: Ciguatera Outbreak Trace-Back, Toxin Elucidation, and Public Health Implications. *Frontiers in Marine Science*, 9:849857  
 [2] Henrik Kusche, Reinhold Hanel (2021): Consumers of mislabeled tropical fish exhibit increased risks of ciguatera intoxication: A report on substitution patterns in fish imported at Frankfurt Airport, Germany. *Food Control*, 121: 107647  
 [3] Martin D, et al. (2020): Collection of Sample Preparation Protocols for MALDI-TOF MS Based Identification of Meat, Dairy Products, Fish and Insects. *eJournal 2020*, Volume 13  
 [4] BVL §64 LFGB-Arbeitsgruppe MALDI-TOF (2021): Leitlinien für die Validierung von Spezies-Identifizierungen mittels MALDI-TOF-MS im Einzellabor oder in Laborverbänden  
 [5] Bonke et al., 2022: Applicability of MALDI-TOF-Mass Spectrometry (MALDI-TOF MS) for rapid identification of edible fish including tropical fish species, in prep.  
 [6] MALDI-UP - Datenbanken - Protokolle - Tools - <https://maldi-up.ua-bw.de>