

## DIERSOORTIDENTIFICATIE OP BASIS VAN DNA

T. Erkens, M. Van Poucke, L.J. Peelman

Vakgroep Dierenvoeding, Dierlijke Genetica, Vee-uitbating en Ethologie  
Faculteit Diergeneeskunde, Universiteit Gent  
Heidestraat 19, B-9820 Merelbeke  
luc.peelman@ugent.be

### SAMENVATTING

**De identificatie van de diersoort waarvan een bepaald (weefsel)staal afkomstig is, is een belangrijk onderdeel geworden van de voedselveiligheid en de controle op de voedselkwaliteit. Daarom wordt hier een overzicht gegeven van de meest gebruikte technieken voor diersoortidentificatie, met de nadruk op de technieken gebruik makend van DNA en de polymerase kettingreactie (PCR), omdat deze zich op dit moment het beste voor dit doel lenen. Voor elk van deze technieken worden de voornaamste voor- en nadelen en hun toepassingsgebied besproken.**

### INLEIDING

Als gevolg van de recente problemen met onder andere bovine spongiforme encefalopathie (BSE), mond- en klauwzeer (MKZ) en varkenspest en de daling van de vleesconsumptie die daarvan het gevolg was, is het belangrijk, nu het consumentenvertrouwen in de vleesindustrie weer enigszins op peil is, dit te proberen te behouden (Kurzenhäuser, 2001; Niederer en Bollhalder, 2001). Zo is het bijvoorbeeld verboden rundvlees met rundervoer te vermengen, om het risico op overdracht van BSE zo klein mogelijk te houden (Tartaglia *et al.*, 1998; Gizzi *et al.*, 2003; Kusama *et al.*, 2004). Dit zijn slechts enkele van de redenen die het belang onderlijnen van een betrouwbare test om de diersoort waarvan een te analyseren staal afkomstig is correct te kunnen identificeren. Een ander aspect is dat het zeer verleidelijk kan zijn te frauderen door een goedkopere vleessoort te verkopen in plaats van of toe te voegen aan een duurder vleessoort. Denk bijvoorbeeld aan het prijsverschil tussen vlees van een everzwijn en gewoon varkensvlees. Daarbij komt dat niet alleen bij enkele religies de consumptie van enkele vleessoorten verboden is, maar ook dat personen allergisch kunnen zijn voor bepaalde voedselcomponenten van dierlijke of plantaardige oorsprong. Een voorbeeld hiervan is mensen die allergisch zijn voor tarwe of soja, die gebruikt wordt bij de fabricage van worsten (Allman *et al.*, 1993; Meyer *et al.*, 1996). Ook in het kader van de verplichte autocontrole tijdens de productie van zowel diervoeders

als voedsel bestemd voor humane consumptie (opgenomen in de Belgische en Europese wetgeving; KB 14-11-2003), moet een producent kunnen nagaan of de juiste grondstoffen geleverd werden. Andere redenen om diersoorten te identificeren zijn het opsporen van gestroopte of bedreigde diersoorten (Guglich *et al.*, 1994), gestolen dieren (Bravi *et al.*, 2004), grenscontroles bij in- en export en ouderschapsbepaling.

Visueel is het meestal niet mogelijk de diersoort-oorsprong van (weefsel)stalen te achterhalen, zeker niet wanneer het bijvoorbeeld vleesmengsels betreft. Vandaar dat naar andere, routinematig toepasbare mogelijkheden gezocht wordt waarvan de baten tegen de kosten opwegen. Vooral bij het opsporen van fraude is het van belang om een onderscheid te kunnen maken tussen accidentele contaminatie en moedwillige toevoeging. Daarom is gezocht naar praktische testen, voornamelijk op basis van eiwitten of DNA.

### GLOBAL OVERZICHT VAN DE SOORTEN TESTEN

De oudere methoden zijn voornamelijk gebaseerd op de identificatie van proteïnen met behulp van eiwitpatronen verkregen met elektroforese en/of immunologische technieken (precipitatie of agglutinatie; Bataille *et al.*, 1999; Meyer en Candrian, 1996). Enkele werkwijzen met eiwitten zijn de Ouchterlony dubbele immunodiffusie (Kang'ethe *et al.*, 1986), "isoelectric focussing" (IEF; King, 1984; Etienne *et*

al., 2001), "sodium dodecyl sulphate polyacrylamide gel electrophoresis" (SDS-PAGE; Zerifi *et al.*, 1991) en "enzyme-linked immunosorbent assay" (ELISA; Martín *et al.*, 1991). Het gebruik van eiwitten brengt echter een aantal nadelen met zich mee. Om te beginnen is de expressie van vele eiwitten weefselgebonden (Hunt *et al.*, 1997) en zijn ze onderhevig aan degradatie als gevolg van onder andere verhitting, zouten en pekelen. Hierdoor zijn bewerkte en/of oudere voedselproducten vaak moeilijk te identificeren met deze techniek (Bataille *et al.*, 1999). Een mogelijke oplossing voor dit probleem is het gebruik van meer thermostabiele eiwitten, maar deze zijn vaak minder immunogeen (Bauer en Rippel-Rachlé, 1998). Verder moeten de proteïnen voldoende variatie tussen de te identificeren species vertonen om van praktisch nut te kunnen zijn, zodat ook nauw verwante diersoorten van elkaar onderscheiden kunnen worden. Een ander nadeel is dat immunologische technieken mogelijk te maken krijgen met kruisreactiviteit van de gebruikte antistoffen met verschillende eiwitten (Patterson en Jones, 1990) en dat de gewenste antistoffen soms niet commercieel beschikbaar zijn. Ook contaminatie met bloed van andere diersoorten kan tot onjuiste conclusies leiden, aangezien vaak gebruik gemaakt wordt van plasmaproteïnen, zoals hemoglobine (Hunt *et al.*, 1997). In het algemeen zijn de methoden gebaseerd op eiwitten meestal trager en complexer dan de hieronder besproken technieken op basis van PCR (Wolf en Lüthy, 2001).

Tegenwoordig wordt vooral gebruik gemaakt van methoden gebaseerd op DNA, omdat dit een aantal voordelen biedt (Lockley en Bardsley, 2000). Op de eerste plaats is DNA een stabielere molecule dan eiwit en omdat precies hetzelfde DNA aanwezig is in zowat alle cellen van één individu, is het van weinig belang uit welk weefsel het te testen staal afkomstig is. Daarenboven zit er in DNA meer informatie vevat dan in eiwitten als gevolg van de grote variatie in de niet-coderende regio's van het DNA en de degeneratie van de genetische code (voor bijna elk aminozuur bestaan er meerdere codons).

Eén van de eerst ontwikkelde methoden op basis van DNA is de hybridisatietechniek, waarbij een gemerkte DNA-probe zich vasthecht aan zijn complementair DNA in een te testen staal (Fig.1; Chikuni *et al.*, 1990). De nadelen van deze methode zijn de langdurige procedure, de gevoeligheid voor kleine schommelingen in reactieomstandigheden waardoor de techniek moeilijk te standaardiseren is en de grotere hoeveelheid gezuiverd DNA die nodig is dan bij

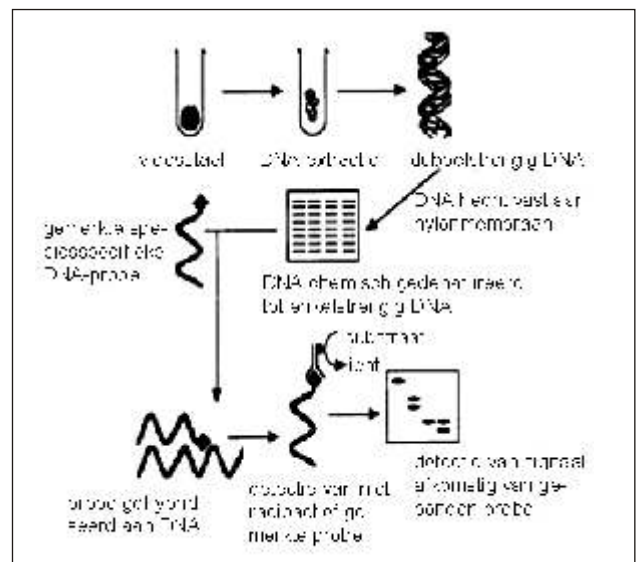


Fig. 1. Schematische weergave van DNA-hybridisatie (naar Hunt *et al.*, 1997).

PCR-methoden (Janssen *et al.*, 1998). De specificiteit van de probe is gebaseerd op de aanwezigheid van herhaalde nucleotidensequenties (satellietsequenties). Hierbij kan enerzijds het volledig genomisch DNA van een diersoort, onder gekliefde vorm, als probe gebruikt worden zonder dat op voorhand geweten hoeft te zijn welke diersoort in het staal aanwezig is (Ebbenhøj en Thomsen, 1991; Lockley en Bardsley, 2000). Dit is wel een omslachtige werkwijze omdat een hele reeks probes getest moet worden. Een ander nadeel is de mogelijke kruisreactie van een probe met DNA van vooral nauwer verwante diersoorten. Anderzijds kan ook voor een probe gekozen worden op basis van slechts een klein deel van het genomisch DNA, de zogenaamde oligonucleotiden van meestal minder dan 100 basenparen (bp). Het voordeel hiervan is de verhoogde specificiteit en selectiviteit en de mogelijkheid om gedegradeerde en dus kortere stukken DNA te identificeren. Het nadeel is echter dat op voorhand geweten moet zijn welke diersoort aangetoond moet worden om de juiste probes te kunnen kiezen (Winterø *et al.*, 1990; Meyer en Candrian, 1996; Hunt *et al.*, 1997).

Een andere groep technieken gebaseerd op DNA maakt gebruik van PCR (Mullis *et al.*, 1986). Dit is een zeer gevoelige, relatief vlugge techniek waarvoor slechts een kleine hoeveelheid uitgangsmateriaal nodig is (Matsunaga *et al.*, 1999; Zhang *et al.*, 1999). Hoewel enkele PCR-methoden werken met nucleair DNA, wordt meestal gebruik gemaakt van mitochondriaal DNA (mtDNA) omdat dit een aantal duidelijke voordelen biedt. Van mtDNA zijn enkele honderden kopieën aanwezig in de mitochondria van één enkele

cel tegenover maximum 2 kopieën nucleair DNA per cel, waardoor minder uitgangsmateriaal nodig is (Lockley en Bardsley, 2000). Verder bevat mtDNA de snelst evoluerende en dus de meest variabele regio (D-loop) van nucleair en mitochondriaal DNA, waardoor het eventueel mogelijk is een onderscheid tussen nauw verwante species aan te tonen (Sbisá *et al.*, 1997). Er kunnen zelfs verschillen binnen eenzelfde species voorkomen, waarmee soms rekening gehouden moet worden bij de interpretatie van de resultaten (Chow en Inogue, 1993). Een ander voordeel is dat complicaties als gevolg van heterozygositeit vermeden worden aangezien algemeen aangenomen wordt dat mitochondria uitsluitend maternaal overerven, hoewel de laatste jaren echter steeds vaker getwijfeld wordt aan deze opvatting (Awadalla *et al.*, 1999; Berlin en Ellegren, 2001). Een nadeel is de mogelijke aanwezigheid van pseudogenen in het nucleair DNA, die ontstaan zijn door genduplicatie en transfer van een kopie van het mitochondriale naar het nucleaire DNA gedurende de evolutie. Tijdens de PCR kunnen dan primers, gebaseerd op een mtDNA-sequentie, vasthechten op nucleair DNA, wat ook PCR-producten zal opleveren. Deze amplicons kunnen echter van een andere lengte zijn en zo na gelelektroforese banden opleveren op een andere dan de verwachte hoogte, wat de interpretatie bemoeilijkt (Burgener en Hübner, 1998). Dit kan vermeden worden door primers voor de PCR te gebruiken die op een andere plaats in de nucleotidensequentie vasthechten of door zuiver mtDNA te gebruiken. De belangrijkste PCR-testen worden hierna kort toegelicht.

## PCR-TESTEN

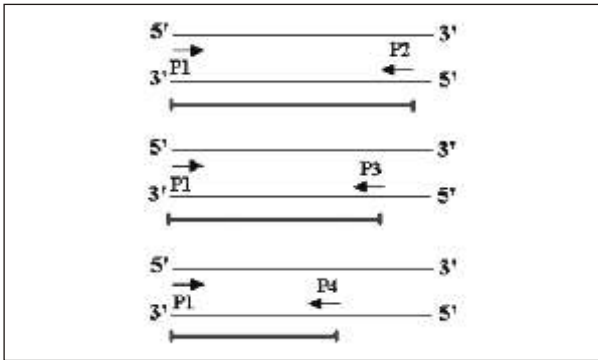
Sequencing levert rechtstreeks informatie over de nucleotiden en hun volgorde in de te analyseren sequentie. Bij het sequencen zelf wordt geen PCR gebruikt, maar meestal wordt deze techniek toegepast op de PCR-producten (amplicons) van het mitochondriale gen voor cytochroom b vanwege de hoge variabiliteit in bepaalde regio's (Bartlett en Davidson, 1992; Parson *et al.*, 2000). Het nadeel is dat het een relatief trage en momenteel nog moeilijk routinematig uit te voeren techniek is vanwege de technische complexiteit.

Bij PCR-“restriction fragment length polymorphism” (PCR-RFLP) wordt tijdens een eerste stap met behulp van primers, gebaseerd op een gedurende de evolutie geconserveerde DNA-regio, via PCR een DNA-sequentie vermenigvuldigd. Hiervoor kan bij-

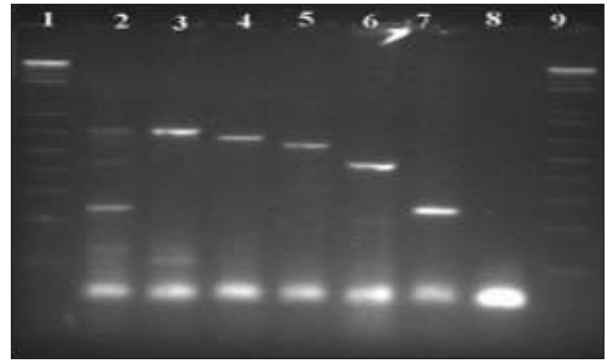
voorbeeld het mitochondriale cytochroom-b gen gebruikt worden (Aida *et al.*, 2005). Vervolgens worden de verschillen tussen de diersoorten zichtbaar gemaakt door de PCR-producten te knippen met restrictie-enzymen, wat karakteristieke fingerprints oplevert (Meyer *et al.*, 1995; Murray *et al.*, 1995; Wolf *et al.*, 1999). De voorwaarde voor een goed resultaat is dat de enzymen hun werking volledig uitoefenen en dat er geen polymorfismen binnen dezelfde diersoort op de restrictieplaats van het enzym aanwezig zijn (Partis *et al.*, 2000). Hoewel dit een goede techniek gebleken is voor de identificatie van rauwe en enkelvoudig verhitte vlees- en visproducten, bleek de toepassing voor vleesmengsels problematisch. Partis *et al.* (2000) vonden dat zowel het soort primer gebruikt in de PCR als hun onderlinge verhouding de detectie beïnvloeden.

Een techniek deels vergelijkbaar met PCR-RFLP is de “amplified fragment length polymorphism”-analyse (AFLP; Vos *et al.*, 1995). Hierbij wordt eerst het DNA verknipt met behulp van restrictie-enzymen en vindt er ligatie plaats met dubbelstrengige oligonucleotide adapters aan de uiteinden van de fragmenten, wat noodzakelijk is om de daaropvolgende PCR mogelijk te maken. Tijdens een laatste stap worden de PCR-producten zichtbaar gemaakt via gelelektroforese, wat karakteristieke banden oplevert. De patronen die hier ontstaan, zijn dus afhankelijk van de aanwezigheid of afwezigheid van restrictiefragmenten, terwijl de klassieke PCR-RFLP gebaseerd is op verschillen in lengte. Om AFLP te gebruiken is het niet noodzakelijk de te knippen en amplificeren sequentie op voorhand te kennen. Omdat de PCR plaatsvindt bij een lagere temperatuur (om de primers de kans te geven op meerdere plaatsen vast te hechten), is AFLP minder gevoelig voor verschillen in reactieomstandigheden. Het is wel belangrijk, net zoals bij de vorige techniek, dat de restrictie volledig plaatsvindt om het ontstaan van afwijkende bandenpatronen te vermijden.

Aangezien de nucleotidensequenties van het DNA van de verschillende diersoorten steeds verder ontrafeld raken, kunnen steeds meer en betere speciesspecifieke primers ontwikkeld worden. Hierbij is vaak op voorhand exact geweten hoe groot de amplicons zullen zijn. Dit maakt ook de ontwikkeling van multiplextesten mogelijk waardoor men in staat is te screenen op meerdere diersoorten tegelijkertijd. Hierbij wordt vaak gebruik gemaakt van één universele primer gebaseerd op een geconserveerde sequentie aanwezig bij al de te testen diersoorten en verschillende speciesspecifieke primers die zorgen voor de lengteverschillen tussen amplicons (Fig. 2). Op deze manier



**Fig. 2.** Schematische weergave van de keuze van de primers bij de ontwikkeling van een multiplex PCR-test (P1=geconserveerde primer; P2-4=specifieke primers) en van de lengte van de gegenereerde amplicons (uit Erkens, 2004).



**Fig. 3.** Voorbeeld van een resultaat verkregen met een multiplex PCR-test (laan 1: basenpaarladder; 2: DNA-mix van 5 vogelspecies; 3: kalkoen; 4: fazant; 5: kip; 6: eend; 7: struisvogel; 8: negatieve controle; uit Erkens, 2004).

ontstaat voor elke species een specifieke band, veroorzaakt door een sequentie met een karakteristieke lengte (Behrens *et al.*, 1999; Matsunaga *et al.*, 1999). Vaak wordt gebruik gemaakt van primers die gebaseerd zijn op het cytochroom b gen of de hypervariabele D-loop, die zich beide in het mitochondriaal DNA bevinden (Bataille *et al.*, 1999; Matsunaga *et al.*, 1999; Bellagamba *et al.*, 2001). Een andere mogelijkheid bleek genen coderend voor ribosomaal RNA (rRNA) te zijn als basis voor primers (Naito *et al.*, 1992; Bellis *et al.*, 2003; Dalmasso *et al.*, 2004; Rodriguez *et al.*, 2004). Daarnaast kan echter ook gebruik gemaakt worden van verschillende nucleaire genen, waarvan het tumor suppressor gen 53 (TP53) goed bruikbaar bleek door verschillen in introns (Bellis *et al.*, 2003). Maar het is nog niet bekend of deze techniek ook aangewend kan worden voor stalen met gedegradieerd DNA, omdat TP53 aanleiding geeft tot fragmenten langer dan 300 bp.

Het is de bedoeling speciesspecifieke primers te vinden die fragmenten opleveren die voldoende van elkaar verschillen in lengte, zodat ze via gelelektroforese eenvoudig van elkaar zouden kunnen onderscheiden worden (Fig. 3). De primers mogen geen kruisreacties aangaan met DNA van een andere dan de bedoelde diersoort. Het is bekend dat primers vooral gevoelig zijn voor 'mismatches' met het complementaire DNA aan het 3'-uiteinde (Kwok *et al.*, 1990), maar dat ze nog wel kunnen vasthechten als er tot 4 of 5 'mismatches' aanwezig zijn die zich niet aan de uiteinden bevinden (Christopherson *et al.*, 1997). Als geen rekening gehouden wordt met deze aspecten, wordt het moeilijk op deze manier te achterhalen wat de oorsprong van een band op gel is. Dit geldt zeker voor situaties waarbij door kruisreactie een band wordt bekomen met ongeveer dezelfde lengte als deze

bij de diersoort waarvoor de primer ontwikkeld werd. Het is daarom van belang dat de doelsequenties van de specifieke primers voldoende verschillen tussen de verschillende diersoorten, opdat de primers enkel op hun beoogde sequentie kunnen vasthechten tijdens de PCR. Hoe meer mismatches, hoe lager de smeltemperatuur voor de primers zal zijn. Het gevolg hiervan is dat primers bij de gebruikte hogere temperatuur tijdens PCR alleen maar kunnen binden ("annealing") aan de gewenste sequentie (Matsunaga *et al.*, 1999). Om het interpreteren van de resultaten niet onnodig complex te maken, wordt het best gekozen voor speciesspecifieke primers die slechts één band (fragmenten van dezelfde lengte) per diersoort opleveren. Bij de keuze van de primers moet ook rekening gehouden worden met de kwaliteit van het DNA, aangezien dit beïnvloed wordt door de eventuele bewerking van het te testen staal. Die bewerking gaat gepaard met de degradatie van het DNA, wat vooral kan interfereren met de vorming van de langere amplicons. Er moet dan gezocht worden naar primers die kortere PCR-fragmenten opleveren en daardoor minder gevoelig zijn voor de degradatie van het DNA (Matsunaga *et al.*, 1999). Hoewel deze methode routinematig goed bruikbaar is voor de kwalitatieve identificatie van species, ook voor die van vleesmengsels, is kwantificatie onmogelijk. Dit wordt veroorzaakt door een verschil in efficiëntie tijdens de amplificatie als gevolg van het bovenvernoemde verschil in smeltemperatuur van de verscheidene primers, maar ook doordat naarmate de reactie vordert de werking van het polymerase vermindert, er een gebrek aan in te bouwen nucleotiden ontstaat, en de matrijs/primerverhoudingen veranderen. Uit de intensiteit van de banden is met andere woorden nooit met zekerheid de kwantiteit af te leiden.



Bataille *et al.* (1999) beschreven een PCR-techniek waarmee kan nagegaan worden of een onbekend staal van humane oorsprong is dan wel van dierlijke. Hierbij gebruikten ze twee primerparen, één om het cytochroom b gen te amplificeren en één om specifiek een stuk van de D-loop van de mens te amplificeren. Indien het staal afkomstig is van de mens ontstaan er dus twee banden, terwijl een dierlijk staal slechts één band oplevert, omdat alleen de primers voor de cytochroom b regio kunnen vasthechten tijdens de PCR. Vervolgens kunnen bij een menselijk staal de PCR-producten van de D-loop gesequeneerd worden om de individuele identiteit vast te stellen. Bij een dierlijk staal kunnen de amplicons afkomstig van het cytochroom b gen gesequeneerd worden om de diersoort te identificeren.

Hybridisatie met satellietprobes aangemaakt via PCR is een combinatie van de hybridisatietechniek en het gebruik van speciesspecifieke primers. In een eerste stap worden via PCR probes aangemaakt gebaseerd op speciesspecifieke sequenties. De tweede stap bestaat uit de eventuele binding van de probes aan hun complementair DNA uit het te testen staal, waarna dit complex met vrijwel elke merker- en detectietechniek zichtbaar gemaakt kan worden (Janssen *et al.*, 1998). Deze methode is routinematig goed toepasbaar gebleken en is minder gevoelig voor schommelingen in reactieomstandigheden dan hybridisatie zonder PCR. Een beperking is dat om nauw verwante diersoorten te onderscheiden, zoals schaap en geit, een gevoeliger techniek gebruikt moet worden (Janssen *et al.*, 1998).

Een andere techniek is "single strand conformation polymorphism" (SSCP). Hierbij wordt met behulp van PCR dezelfde DNA-sequentie vermenigvuldigd bij verschillende diersoorten, waarna denaturatie van dubbelstrengig tot enkelstrengig PCR-fragment plaatsvindt. Deze fragmenten hebben elk een eigen secundaire structuur en dit resulteert door een verschil in migratiesnelheid tijdens gelelektroforese in een species-specifiek bandenpatroon (Hayashi, 1991; Rehbein *et al.*, 1999). Praktisch wordt meestal een standaard van de te identificeren diersoorten gebruikt om meer zekerheid te hebben bij het interpreteren van de resultaten.

Voor een "random amplified polymorphism DNA"-analyse (RAPD) worden arbitraire primers gebruikt, waarvan de bruikbaarheid empirisch bepaald is. Meestal wordt met een aantal verschillende primers gewerkt om geen polymorfismen in de DNA-sequenties te missen. Ook hier wordt via de daaropvolgende gelelektroforese een karakteristiek bandenpatroon verkregen. Dit is een relatief vlotte en eenvoudige, kwa-

litatieve techniek gebleken, toepasbaar voor zowel rauwe als bewerkte producten. Verschillen in sequentie binnen dezelfde diersoort en de degradatietoestand van het DNA kunnen echter interfereren met de interpretatie van de resultaten (Welsh en McClelland, 1990; Koh *et al.*, 1998; Lockley en Bardsley, 2000; Huang *et al.*, 2003; Saez *et al.*, 2004).

Bij de kwantitatieve competitieve (QC) PCR wordt een interne standaard (competitor) samen met het te analyseren DNA geamplificeerd. Deze competitor bevat precies dezelfde sequenties waaraan de primers kunnen binden als het te analyseren DNA; alleen verschillen de amplicons van de competitor in grootte of aantal restrictieplaatsen van die van het te identificeren staal. Aan de hand daarvan kan de hoeveelheid van een bepaalde component geschat worden. Wolf en Lüthy (2001) ontwikkelden deze techniek voor varkensvlees op basis van het gen voor groeihormoon om contaminatie en fraude op te sporen en om ze te kunnen onderscheiden. De test bleek ook bruikbaar voor bewerkte vleesproducten, omdat er gebruik werd gemaakt van een geringe fragmentlengte. Bij extrapolatie naar andere diersoorten moet rekening gehouden worden met het feit dat elke soort weefsel een bepaalde hoeveelheid DNA bevat en dat er een verschil bestaat tussen nucleair en mitochondriaal DNA. Het gevolg is dat deze methode voor elke diersoort apart op punt gesteld moet worden.

De identificatie van diersoorten via real-time PCR maakt naast primers gebruik van gemerkte probes of intercalerende kleurstoffen waardoor tijdens de PCR de voortgang gevolgd kan worden. Deze methode blijkt zeer accuraat, geeft een relatief vlug resultaat, het risico op contaminatie is veel kleiner en het is een minder arbeidsintensief proces doordat er een kleiner aantal handelingen uitgevoerd hoeft te worden (Heid *et al.*, 1996; Sawyer *et al.*, 2003). Door Brodmann en Moor (2003) werd een dergelijke methode ontwikkeld met een zeer hoge gevoeligheid (werkend met zeer korte PCR-fragmenten) om ook bewerkte voedselproducten met gedegradeerd DNA te kunnen analyseren. Hiermee kon ook de hoeveelheid van de componenten semi-kwantitatief bepaald worden via spectrofotometrie. Dit liet in principe toe een onderscheid te maken tussen opzettelijke toevoeging en contaminatie tijdens het productieproces. Hierbij wordt ervan uitgegaan dat het bij opzet een beduidend grotere hoeveelheid betreft dan bij contaminatie, maar de grens tussen beide is vaak moeilijk te trekken. Wel is het zo dat hoe minder DNA aanwezig is, hoe minder precies de bepaling zal zijn. Sterke degradatie van het DNA heeft ook een negatieve invloed, maar

het gebruik van andere probes kan dan mogelijk verbetering brengen. Deze methode werd ontwikkeld voor rundvlees en voor de meest gebruikte zoogdieren in de vleesindustrie (Sawyer *et al.*, 2003; Dooley *et al.*, 2004). Pluimvee en vis kunnen er nog niet mee gedetecteerd worden. Ook voor het opsporen van beendermeel en gelatine in het kader van BSE bleek de techniek nog niet gevoelig genoeg te zijn, maar er moet eerder gezocht worden naar methoden voor een efficiëntere DNA-extractie dan naar een verbetering van de PCR-techniek zelf (Brodmann en Moor, 2003).

## BESLUIT

Er bestaan dus vele verschillende mogelijkheden om de oorsprong van een te analyseren staal te achterhalen. Afhankelijk van de reden om de diersoort te identificeren, kan gekozen worden voor een bepaalde test waarvan in de gegeven situatie de beste resultaten verwacht worden. Voor routinematig uit te voeren testen zijn vooral de kosten en de praktische toegankelijkheid van de techniek van belang. Door de voortdurende vooruitgang zullen ook steeds nieuwe, meer verfijnde technieken ontwikkeld worden voor de identificatie van diersoorten.

## REFERENTIES

- Aida A.A., Man Y.B.C., Wong C.M.V.L., Raha A.R., Son R. (2005). Analysis of raw meats and fats of pigs using polymerase chain reaction for Halal authentication. *Meat Science* 69, 47-52.
- Allman M., Candrian U., Hofelein C., Luthy J. (1993). Polymerase chain-reaction (PCR) - A possible alternative to immunochemical methods assuring safety and quality of food - Detection of wheat contamination in non-wheat food-products. *Zeitschrift für Lebensmittel-Untersuchung und -Forschung* 196, 248-251.
- Awadalla P., Eyre-Walker A., Smith J.M. (1999). Linkage disequilibrium and recombination in hominid mitochondrial DNA. *Science* 286, 2524-2525.
- Bartlett S.E., Davidson W.S. (1992). FINS: a procedure for identifying the animal origin of biological specimens. *Biotechniques* 12, 408-411.
- Bataille M., Crainic K., Leterreux M., Durigon M., De Mazancourt P. (1999). Multiplex amplification of mitochondrial DNA for human and species identification in forensic evaluation. *Forensic Science International* 99, 165-170.
- Bauer F., Rippel-Rachl B. (1998). Tierartidentifizierung bei Fleisch und Fleischwaren. *Wiener Tierärztliche Monatschrift* 85, 260-266.
- Behrens M., Unthan M., Brinkmann Y. (1999). Identification of animal species in heated and complex meat products using species specific reactions. *Fleisch-Wirtschaft* 79, 97-100.
- Bellagamba F., Moretti V.M., Comincini S., Valfre F. (2001). Identification of species in animal foodstuffs by polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism analysis of mitochondrial DNA. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 49, 3775-3781.
- Bellis C., Ashton K.J., Freney L., Blair B., Griffiths L.R. (2003). A molecular genetic approach for forensic animal species identification. *Forensic Science International* 134, 99-108.
- Berlin S., Ellegren H. (2001). Clonal inheritance of avian mitochondrial DNA. *Nature* 413, 37-38.
- Bravi C.M., Lirón J.P., Mirol P.M., Ripoli M.V., Peral-García P., Giovambattista G. (2004). A simple method for domestic animal identification in Argentina using PCR-RFLP analysis of cytochrome b gene. *Legal Medicine* 6, 246-251.
- Brodmann P.D., Moor D. (2003). Sensitive and semi-quantitative TaqMan™ real-time polymerase chain reaction systems for the detection of beef (*Bos taurus*) and the detection of the family *Mammalia* in food and feed. *Meat Science* 65, 599-607.
- Burgener M., Hübner P. (1998). Mitochondrial DNA enrichment for species identification and evolutionary analysis. *Zeitschrift für Lebensmittel-Untersuchung und -Forschung* 207, 261-263.
- Chikuni K., Ozutsumi K., Koishikawa T., Kato S. (1990). Species identification of cooked meats by DNA hybridization assay. *Meat Science* 27, 119-128.
- Chow S., Inogue S. (1993). Intra- and interspecific restriction fragment length polymorphism in mitochondrial genes of *Thunnus* tuna species. *Bulletin of the National Research Institute of Far Seas Fisheries* 30, 207-224.
- Christopherson C., Sninsky J., Kwok S. (1997). The effects of internal primer-template mismatches on RT-PCR: HIV-1 model studies. *Nucleic Acids Research* 25, 654-658.
- Dalmasso A., Fontanella E., Piatti P., Civera T., Rosati S., Bottero M.T. (2004). A multiplex PCR assay for the identification of animal species in feedstuffs. *Molecular and Cellular Probes* 18, 81-87.
- Dooley J.J., Paine K.E., Garrett S.D., Brown H.M. (2004). Detection of meat species using TaqMan real-time PCR assays. *Meat Science* 68, 431-438.
- Ebbehøj K.F., Thomsen P.D. (1991). Species differentiation of heated meat products by DNA hybridization. *Meat Science* 30, 221-234.
- Erkens T. (2004). Scriptie: Identificatie van diersoorten via mitochondriaal DNA. Universiteit Gent, Faculteit Diergeneeskunde.
- Etienne M., Jérôme M., Fleurence J., Rehbein H., Kündiger R., Mendes R., Costa H., Martínez I. (2001). Species identification of formed fishery products and high pressure-treated fish by electrophoresis: a collaborative study. *Food Chemistry* 72, 105-112.
- Gizzi G., van Raamsdonk L.W., Baeten V., Murray I., Berben G., Brambilla G., von Holst C. (2003). An overview of tests for animal tissues in feeds applied in response to public health concerns regarding bovine spongiform

- encephalopathy. *Revue Scientifique et Technique* 22, 311-331.
- Guglich E.A., Wilson P.J., White B.N. (1994). Forensic application of repetitive DNA markers to the species identification of animal tissues. *Journal of Forensic Science* 39, 353-361.
- Hayashi, K. (1991). PCR-SSCP: a simple and sensitive method for detection of mutations in the genomic DNA. *PCR Methods and Applications* 1, 34-38.
- Heid C.A., Stevens S.J., Livak K.J., Williams P.M. (1996). Real time quantitative PCR. *Genome Research* 6, 986-994.
- Huang M.C., Horng Y.M., Huang H.L., Sin Y.L., Chen M.J. (2003). RAPD fingerprinting for the species identification of animals. *Asian-Australasian Journal of Animal Sciences* 16, 1406-1410.
- Hunt D.J., Parkes H.C., Lumley I.D. (1997). Identification of species of origin of raw and cooked meat products using oligonucleotide probes. *Food Chemistry* 60, 437-442.
- Janssen F.W., Hagele G.H., Buntjer J.B., Lenstra J.A. (1998). Species identification in meat by using PCR-generated satellite probes. *Journal of Industrial Microbiology & Bio-technology* 21, 115-120.
- Kang'ethe E.K., Gathuma J.M., Lindqvist K.J. (1986). Identification of the species of origin of fresh, cooked and canned meat on meat product using antisera to thermostable muscle antigens by Ouchterlony's double diffusion test. *Journal of Science of Food and Agriculture* 37, 157-162.
- King N.L. (1984). Species identification of cooked meats by enzyme staining of isoelectro-focussing gels. *Meat Science* 11, 59-64.
- Koh M.C., Lim C.H., Chua S.B., Chew S.T., Phang T.W. (1998). Random amplified poly-morphic DNA (RAPD) fingerprints for identification of red meat animal species. *Meat Science* 48, 275-285.
- Kurzenhäuser S. (2001). Risikokommunikation in der BSE-Krise / Illusorische Sicherheit und Transparenz. *Bundesgesundheitsblatt* 44, 226-340.
- Kusama T., Nomura T., Kadowaki K. (2004). Development of primers for detection of meat and bone meal in ruminant feed and identification of the animal origin. *Journal of Food Protection* 67, 1289-1292.
- Kwok S., Kellogg D.E., McKinney W., Spasic D., Goda L., Levenson C., Sninsky J.J. (1990). Effects of primer-template mismatches on the polymerase chain reaction: Human immunodeficiency virus type 1 model studies. *Nucleic Acids Research* 18, 999-1005.
- Lockley A.K., Bardsley R.G. (2000). DNA-based methods for food authentication. *Trends in Food Science & Technology* 11, 67-77.
- Martín R., Wardale R.J., Jones S.J., Hernández P.E., Patterson L.S. (1991). Monoclonal antibody sandwich ELISA for the potential detection of chicken meat in mixtures of raw beef and pork. *Meat Science* 30, 23-31.
- Matsunaga T., Chikuni K., Tanabe R., Muroya S., Shibata K., Yamada J., Shinmura Y. (1999). A quick and simple method for the identification of meat species and meat products by PCR assay. *Meat Science* 51, 143-148.
- Meyer R., Candrian U. (1996). PCR-based DNA analysis for the identification and characterization of food components. *Lebensmittel-Wissenschaft und -Technologie* 29, 1-9.
- Meyer R., Chardonens F., Hubner P., Luthy J. (1996). Polymerase chain reaction (PCR) in the quality and safety assurance of food: Detection of soya in processed meat products. *Zeitschrift für Lebensmitteluntersuchung und -Forschung* 203, 339-344.
- Meyer R., Hofelein C., Luthy J., Candrian U. (1995). PCR-RFLP analysis: a simple method for species identification in food. *Journal of AOAC International* 78, 1542-1551.
- Mullis K., Faloona F., Scharf S., Saiki R., Horn G., Erlich H. (1986). Specific enzymatic amplification of DNA in vitro – The polymerase chain reaction. *Cold Spring Harbor Symposia on Quantative Biology* 51, 263-273.
- Murray B.W., McClymont R.A., Strobeck C. (1995). Forensic identification of ungulate species using restriction fragment digests of PCR-amplified mitochondrial DNA. *Journal of Forensic Sciences* 40, 943-951.
- Naito E., Dewa K., Ymanouchi H., Kominami R. (1992). Ribosomal ribonucleic acid (rRNA) gene typing for species identification. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 37, 396-403.
- Niederer M., Bollhalder R. (2001). Identification of species specific central nervous tissue by gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS) – a possible method for supervision of meat products and cosmetics. *Mitteilungen aus Lebensmitteluntersuchung und Hygiene* 92, 133-144.
- Parson W., Pegoraro K., Niederstatter H., Fogger M., Steinlechner M. (2000). Species identification by means of the cytochrome b gene. *International Journal of Legal Medicine* 114, 23-28.
- Partis L., Croan D., Guo Z., Clark R., Coldham T., Murby J. (2000). Evaluation of a DNA fingerprinting method for determining the species origin of meats. *Meat Science* 54, 369-376.
- Patterson R.L., Jones S.J. (1990). Review of current techniques for the verification of the species origin of meat. *Analyst* 115, 501-506.
- Rehbein H., Mackie I.M., Pryde S., Gonzales-Sotelo C., Medina I., Perez-Martin R., Quinteiro J., Rey-Mendez M. (1999). Fish species identification in canned tuna by PCR-SSCP: validation by a collaborative study and investigation of intra-species variability of the DNA-patterns. *Food Chemistry* 64, 263-268.
- Rodriguez M.A., Garcia T., Gonzalez I., Asensio L., Hernandez P.E., Martin R. (2004). PCR identification of beef, sheep, goat, and pork in raw and heat-treated meat mixtures. *Journal of Food Protection* 67, 172-177.
- Saez R., Sanz Y., Toldra F. (2004). PCR-based fingerprinting techniques for rapid detection of animal species in meat products. *Meat Science* 66, 659-665.
- Sawyer J., Wood C., Shanahan D., Gout S., McDowell D. (2003). Real-time PCR for quantitative meat species testing. *Food Control* 14, 579-583.
- Sbisà E., Tanzariello F., Reyes A., Pesole G., Saccone C. (1997) Mammalian mitochondrial D-loop region struc-



- tural analysis: identification of new conserved sequences and their functional and evolutionary implications. *Gene* 205, 125-140.
- Tartaglia M., Saulle E., Pestalozza S., Morelli L., Antonucci G., Battaglia P.A. (1998). Detection of bovine mitochondrial DNA in ruminant feeds: a molecular approach to test for the presence of bovine-derived materials. *Journal of Food Protection* 61, 513-518.
- Vos P., Hogers R., Bleeker M., Reijans M., Van de Lee T., Hornes M., Frijters A., Pot J., Peleman J., Kuiper M., Zabeau M. (1995). AFLP: an new technique for DNA fingerprinting. *Nucleic Acids Research* 23, 4407-4414.
- Welsh J., McClelland M. (1990). Fingerprinting genomes using PCR with arbitrary primers. *Nucleic Acids Research* 18, 7213-7218.
- Winterø A.K., Thomsen P.D., Davies W. (1990). A comparison of DNA-hybridization, immunodiffusion, counter-current immunoelectrophoresis and isoelectric focusing for detecting the admixture of pork to beef. *Meat Science* 27, 75-85.
- Wolf C., Lüthy J. (2001). Quantitative competitive (QC) PCR for quantification of porcine DNA. *Meat Science* 57, 161-168.
- Wolf C., Rentsch J., Hubner P. (1999). PCR-RFLP analysis of mitochondrial DNA: a reliable method for species identification. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 47, 1350-1355.
- Zerifi A., Labie C., Benard G. (1991). SDS-PAGE technique for the species identification of cooked meat. *Fleischwirtschaft* 71, 1107-1110.
- Zhang G.L., Zheng M.G., Zhou Z.J., Ouyang H.S., Lu Q. (1999). Establishment and application of a polymerase chain reaction for the identification of beef. *Meat Science* 51, 233-236.

### Uit het verleden

## DR. PAUL LENELLE

Paul Lenelle (1919 - 2004) zal enkel nog een aantal oudere lezers bekend zijn. De verdiensten van deze man mogen nochtans niet vergeten worden. Hij speelde immers een hoofdrol in de inrichting van de structuren die tot voor kort de veterinaire keuring beheersten.

Meteen bij de oprichting van de *Inspectie van de Vleeshandel* in 1948 werd hij de eerste medewerker van Dr. Vet. G. Degryse, de pasaangestelde *Veearts-Hoofdinspecteur* van de nieuwe dienst bij het Bestuur van Volksgezondheid. In 1954 werd Paul Lenelle diens opvolger. Door zijn kennis en diplomatisch optreden, zowel in de controleren sector als bij de veeartsen – keurders werd de belangrijke *Wet van 5 september 1952 betreffende de vleeskeuring en de vleeshandel* in goede banen geleid. De jaren daarna heeft hij met evenveel enthousiasme de *Wet van 15 april 1965 betreffende de keuring van en de handel in vis, gevogelte, konijnen en wild* voorbereid en door het parlement laten aannemen. Lenelle kon de veeartsen en het consumentenpubliek van toen overtuigen dat ook het vlees van dergelijke dieren diende gekeurd te worden. Eveneens door zijn bemiddeling werd onder toezicht van het Ministerie van Volksgezondheid het *Fonds voor Veterinaire Keuringen van Pluimvee* opgericht. Deze samenwerking tussen het VPE (Verbond voor Pluimvee en Eieren) en het BSDV (Belgische Syndicale Dierenartsenvereniging) regelde de financiële aspecten van de pluimveekeuring. De toepassing van de wet van 1965 leidde ertoe dat de benaming op 30 maart 1977 gewijzigd werd in *Fonds voor Veterinaire Keuringen*. Ook de ondertussen (1974) te Gent gestarte postgraduaatopleiding in de hygiëne van voedingsmiddelen van dierlijke oorsprong kon op forse steun van hoofdinspecteur Lenelle rekenen. Hij deed ook de nodige inspanningen om een identiek Fransstalig postgraduaat op te richten, toen nog te Kuregem. Bijna aan het einde van zijn lange en vruchtbare loopbaan heeft hij zich nog ten volle ingezet voor de voorbereiding en de bespreking van de hervorming van de keuring die leidde tot de wet van 13 juli 1981 (*Wet tot oprichting van een Instituut voor Veterinaire Keuring*).

Een jaar later, nu intussen al meer dan een kwarteeuw geleden, ging Paul Lenelle met pensioen en daarmee scheen hij zijn veterinaire leven af te sluiten.