

Moleculair onderzoek naar varkensvlees in vleesproducten

Een studie ter bevordering van de
voedselveiligheid in Suriname



Afstudeerverslag ter verkrijging van de graad van
Bachelor of Applied Technology (BTech.)
in de studierichting Hoger Laboratorium Onderwijs

A. Eijk
D. Tirtosentono
Paramaribo, februari 2013

Instituut voor Hoger Beroepsonderwijs in Suriname
Hoger Laboratorium Onderwijs
2011-2013

Moleculair onderzoek naar varkensvlees in vleesproducten

**Een studie ter bevordering van de
voedselveiligheid in Suriname**



Naam student + studentenreg.nr.: Alida Eijk 10961

Dewi Tirtosentono 10918

Docentbegeleider: Dr. M. Huisden, PhD, ND.

Bedrijfsbegeleider: M. Wongsokarijo, MSc.

Paramaribo, februari 2013

VOORWOORD

Het Hoger Laboratorium Onderwijs is een van de jongste richtingen aan het Polytechnic College. Deze richting heeft ten doel het afleveren van hoger opgeleide laboratoriumprofessionals. Wij studenten hebben de primeur gehad om tot de eerste groep van afstuderenden te behoren.

Ter afronding van het Hoger Laboratorium Onderwijs van het Polytechnic College hebben wij een afstudeerproject uitgevoerd met als thema: “Moleculair onderzoek naar varkensvlees in vleesproducten. Een studie ter bevordering van de voedselveiligheid in Suriname”. Dit verslag kan dienen ter ondersteuning en ter bevordering van de voedselveiligheid in Suriname.

Een woord van dank gaat uit naar:

- dhr. H. Brunings die kosten noch moeite heeft gespaard om de benodigde reagentia en hulpmiddelen voor het onderzoek te verzamelen;
- onze docent-begeleider, dr. M. Huisden, PhD., ND. en onze bedrijfsbegeleider M. Wongsokarijo, MSc. voor de totstandkoming van de praktische uitvoering en de verbetering van het verslag;
- mevr. L. Sumter die ons als Nederlands docent heeft bijgestaan;
- onze richtingscoördinator mevr. M. Grunberg, MSc.

Alida Eijk 10961
Dewi Tirtosentono 10918

Paramaribo, februari 2013

SAMENVATTING

Sinds de uitvinding van de Polymerase Chain Reaction (PCR) in de jaren 1983 door de Amerikaan Kary Mullis, PhD., zijn er verscheidene onderzoeken op de toepasbaarheid ervan gedaan. Ontwikkelingen van verbeterde en nieuwe technieken blijven zich heden ten dage voortzetten. In Suriname is deze techniek echter slechts enkele jaren geleden geïntroduceerd en zij is dus nog in de beginfase van ontwikkeling en uitbreiding voor het toepassen van de PCR op verschillende onderzoeksgebieden.

In dit onderzoek werd de toepasbaarheid van deze techniek, de conventionele PCR, onderzocht op het voorkomen van varkensvlees in halalgelabelde en andere vleesproducten. Het onderzoek werd uitgevoerd met verscheidene geïmporteerde vleesproducten. Tijdens de PCR werden 35 cycli gehanteerd voor een optimaal DNA-replicatieresultaat.

Het protocol dat werd gehanteerd was dat volgens het artikel van Ilhak, I., 2006, aangepast aan de huidige omstandigheden. De primers en overige reagentia en apparatuur werden in een proeftest uitgeprobeerd. Uit de proeftest werden goede resultaten behaald. Dit was de indicatie om het hoofdonderzoek te continueren. De resultaten die werden verkregen, ondersteunden de gestelde hypothese. Producten waarvan werd aangegeven dat die geen varkensvlees bevatten, hadden inderdaad geen varkensvlees en omgekeerd waren de varkensvleesbevattende producten wel positief op de aanwezigheid van het varkensvleesgen. Een uitzondering was een van de niet-varkensvleesbevattende producten, welk product wel een positief resultaat gaf op de aanwezigheid van varkensvlees. De redenen daarvan zouden van uiteenlopende oorzaak kunnen zijn.

Uit dit onderzoek naar het varkensvleesgen in verschillende vleesproducten is gebleken dat de PCR een betrouwbare methode is die toegepast kan worden om de samenstelling van vleescomponenten in vleesproducten, ook in Suriname, aan te tonen. De PCR kan met de nodige investering verder worden uitgebreid op verschillende toepassingsgebieden zoals, bijvoorbeeld de agricultuur, medische laboratoriumtechnieken en bij forensisch onderzoek. Kortom: alle onderzoeksgebieden waaraan DNA-materiaal te pas komt.

SUMMARY

Since the invention of the Polymerase Chain Reaction (PCR) in the year 1983 by the American Kary Mullis, PhD., the technique has vastly developed with numerous applications. Development of new improved techniques still continues. In Suriname, however, this technique was introduced only a few years ago and therefore it still requires proper introduction, development and expansion in different areas of research with great variety in applications.

Also, in this study the applicability of molecular biological techniques; specifically the conventional PCR was used to investigate the existence of pork meat in halal labeled and other meat products. The research was conducted with several imported meat products. The PCR analyses consisted of 35 cycles in order to obtain optimal result in DNA expression.

The protocol that was used was that according to the article of Ilhak, I., 2006 adapted to current conditions. The primers and other reagents and equipment were tested in a pilot test. Good results were achieved from the pilot test. This was the indication to continue with the main study. The results obtained support the hypothesis that was set. It was indicated that given that products which contain no pork, had indeed no pork and vice versa the pork containing products were to be positive for the presence of the porkgene. An exception was one of the non-pork containing products that gave a positive result for the presence of pork. The reason for this could be of any different reason

This study showed that PCR is a reliable method that can facilitate in the determination of the meat composition of meat products. PCR technology should be further developed in Suriname; with the necessary investment, different areas such as agriculture, medical laboratory research and forensic investigation can benefit significantly. PCR is applicable to every research area in which DNA is of interest.

INHOUDSOPGAVE

VOORWOORD	III
SAMENVATTING	IV
SUMMARY	IV
LIJST VAN AFKORTINGEN	VIII
LIJST VAN FIGUREN	IX
LIJST VAN TABELLEN.....	X
DEFINITIES EN TERMEN	XI
1 INLEIDING	1
2 VOEDSELVEILIGHEID MET BETREKKING TOT VARKENSVLEES	3
2.1 Varkensvlees in (vlees-)producten	3
2.1.1 Religieuze aspecten.....	4
2.1.2 Gezondheidsaspecten.....	6
3 VOEDSELCONTROLE.....	9
3.1 Voedselcontrole en voedselveiligheid	9
3.2 Nationale en internationale regelgeving	9
3.2.1 Verantwoordelijkheden onder de verschillende instanties.....	10
4 MOLECULAIR BIOLOGISCH ONDERZOEK.....	11
4.1 Het varkensgen	11
4.2 Moleculair diagnostisch onderzoek	12
4.2.1 Polymerase Kettingreactie algemeen.....	12
4.3 Bepalen van de juiste primers	14
4.4 Toepassing Conventionele Polymerase Kettingreactie.....	14
4.4.1 Materiaal en methode.....	14
4.4.2 Gelelectroforese.....	17
5 RESULTAAT	18
5.1 Uitslagen en interpretaties.....	18
5.2 Validatie, betrouwbaarheid en kwaliteitszorg.....	20
5.2.1 Validatie	20
5.2.2 Betrouwbaarheid.....	21
5.2.3 Kwaliteitszorg.....	21
5.2.4 Veiligheid.....	23

5.2.5	Chemicaliën.....	23
5.2.6	Ultraviolet licht.....	24
5.2.7	Elektriciteit	24
5.2.8	Algemene huisregels	24
5.3	Troubleshooting/problematiek en optimalisatie van het PCR-onderzoek	24
6	FINANCIEEL OVERZICHT	26
7	DISCUSSIE	27
8	CONCLUSIE	28
9	AANBEVELINGEN	29
10	LITERATUURLIJST	30
	Bijlage 1. Informatie over MtDNA van varken.....	33
	Bijlage 2. Protocol Polymerase Chain Reaction.....	35
	Bijlage 3. Prijsoverzicht varkensvleesonderzoek	37

LIJST VAN AFKORTINGEN

BOG	Bureau voor Openbare Gezondheidszorg
CL	Centraal Laboratorium
DNA	Desoxyribonucleïnezuur
dNTP	desoxyribonucleotide triphosfaten
EDTA	Ethylenediaminetetraacetic Acid
EU	Europese Unie
KPS	Korps Politie Suriname
MgCl ₂	Magnesium dichloride
MSDS	Material Safety Data Sheet
MvHI	Ministerie van Handel en Industrie
NaCl	Natrium Chloride (zout)
PCR	Polymerase Chain Reaction/Polymerase Kettingreactie
PPE	Personal Protective Equipment/persoonlijke beschermingsmiddelen
SDS	Sodium Dodecyl Sulfaat/Sodium Lauryl Sulfate (SLS)
Ta	Annealing temperature
TBE	Tris-Borate-EDTA
Tm	Smelttemperatuur
UV	Ultraviolet
WHO	World Health Organization

LIJST VAN FIGUREN

Figuur 1.	Religieuze verhoudingen in Suriname	5
Figuur 2.	Pig (<i>Sus scrofa</i>) Chromosomen Karyotype	11
Figuur 3.	Fragment varkens-DNA 212 bp	17
Figuur 4.	Uitslag 1 ^{ste} batch bestaande uit 21 monsters met behulp van gelelectroforese	18
Figuur 5.	Uitslag 2 ^e batch bestaande uit 21 monsters met behulp van gelelectroforese	18
Figuur 6.	Onduidelijke markers	25
Figuur 7.	Vage banden	25

LIJST VAN TABELLEN

Tabel 1. Parasitaire ziekten.....	7
Tabel 2. Varkensgen specifieke primers	14
Tabel 3. Onderzoeksmaterialen	15
Tabel 4. Reactiemix.....	16
Tabel 5. Polymerase Kettingreactieproces	16
Tabel 6. Uitslag interpretatieonderzoek	19
Tabel 7. Correlatie met etiket product.....	20
Tabel 8. Gevaarlijke stoffen.....	23
Tabel 9. Tijdsduur PCR.....	26
Tabel 10. Totale kosten aan artikelen, reagens en apparatuur.....	26

DEFINITIES EN TERMEN

Agarose gel is het medium bij elektroforese waarin de fragmenten zich voortbewegen. De concentratie van de agarose bepaalt de vertraging van de doorgang van de moleculen.

Basenparen zijn twee tegenover elkaar liggende nucleotiden in dubbelstrengig DNA. De tegenover elkaar liggende basen zijn met elkaar gepaard door middel van waterstofbruggen. Een basenpaar bestaat uit 2 complementaire basen. In DNA bevindt zich tegenover adenine (A) altijd thymine (T) en tegenover guanine (G) altijd cytosine (C).

Codex alimentarius is een internationale organisatie die is opgericht door de Food and Agricultural Organization (FAO) en de World Health Organization (WHO). Ze ontwikkelt normen en standaarden voor levensmiddelen zodat er een veilige en eerlijke handel in voedingsmiddelen kan worden gedaan.

DNA (Desoxyribonucleïnezuur) is celmateriaal dat voor ieder mens en ander organisme uniek is en in toenemende mate een rol speelt bij de opsporing en vervolging. Het is een verzameling van moleculen waarin de informatie voor erfelijke eigenschappen ligt opgeslagen. Desoxyribonucleïnezuur is een keten (molecuul) die is opgebouwd uit nucleotiden die bestaan uit een suiker (desoxyribose), een stikstofbase en een fosfaatgroep.

DNA ladder is een oplossing bestaande uit DNA-moleculen waarvan het moleculaire gewicht (in basenparen) van de verschillende DNA-fragmenten bekend is.

Taq DNA-Polymerase is een enzym dat zich bindt aan de primer nabij een gescheiden dubbele DNA-helix. De polymerase bindt de nucleotiden aan de doelwitsequentie en vormt een complementaire streng bij de juiste temperatuur. De Taq polymerase komt van de bacterie *Thermus Aquaticus* en werkt goed bij een temperatuur van 72 °C.

dNTP is een algemene term voor de desoxyribonucleotide triphosphaten: dATP, dCTP, dGTP en dTTP. Deze zijn de bouwstenen van een desoxyribonucleïne zuur (DNA) en worden gebruikt wanneer DNA wordt gesynthetiseerd.

Ethidium Bromide visualiseert het DNA in de gel met behulp van ultraviolet licht.

Gelelectroforese is een methode om een complexe samenstelling van DNA-fragmenten of eiwitten te scheiden onder bepaalde elektrische spanning en voor bepaalde tijd.

Loading buffer is een kleurstof die gemengd wordt met het PCR-product wanneer gelelectroforese wordt toegepast. Het PCR-product krijgt daardoor een bepaalde dichtheid en zinkt in het putje van de gel. Eveneens visualiseert het hoe snel de fragmenten transmigreren.

MgCl₂ werkt als een co-enzym van DNA-polymerase in de PCR. DNA-polymerase wordt niet geactiveerd zonder MgCl₂.

NaCl-oplossing, SDS 10%, Chloroform, Ethanol, Phenolmengsels zijn reagentia waarmee stoffen, die de reactie belemmeren zoals bloed en vetten uit het oorspronkelijke monster, verwijderd worden tijdens de verschillende stappen van monsterbewerking. Daarmee wordt opgezuiverd DNA uiteindelijk verkregen aan het eind van de monsterbewerking.

Nucleotiden zijn de bouwstenen waaruit het DNA-molecuul is opgebouwd. In een PCR-reactiemix worden deze bouwstenen (dNTP's - A's, C's, G's en T's) door de polymerase meegenomen en zodanig gebonden dat ze complementair zijn met de doelwit-sequentie.

PCR (Polymerase Chain Reaction) is een relatief simpele, doch tamelijk dure methode waarmee een DNA-segment exponentieel kan worden vermeerderd. PCR wordt tegenwoordig heel veel toegepast in het buitenland op verschillende onderzoeksgebieden.

PCR-buffer is een buffer waarin het zoutgehalte en de zuurgraad (pH) het optimale milieu creëren voor de PCR-reactie. Deze buffer levert ook de ionische kracht en buffercapaciteit tijdens de reactie.

PCR-product is het verkregen product na de amplificatie van het DNA in de Polymerase Kettingreactie.

Primers zijn stukjes chemisch gesynthetiseerd DNA waarvan de basenvolgorde (volgorde van de bouwstenen C, A, G, T) complementair is met de uiteinden van het vermeerderde DNA-fragment. De primers worden ontworpen voor een PCR-experiment en zorgen ervoor dat aan de opengebroken streng DNA, weer nieuwe basen gekoppeld kunnen worden.

TBE buffer "1 x geconcentreerd" is een elektroforese buffer die 1x geconcentreerd mengsel bevat en bestaat uit het reagens TRIS, Borate en EDTA. Hij zorgt voor de optimale pH van de gel, het geleidingsvermogen van de elektroforese, de ionisatieconditie van de moleculen, de optimale flow door de gel en hij voorkomt beschadiging van het molecuul.

Thermocycler is een gesloten apparaat dat wordt gebruikt voor de DNA-replicatie. Met behulp van dit apparaat is het mogelijk de verschillende temperaturen, nodig bij het DNA-replicatieproces, te bereiken.

1 INLEIDING

Tegenwoordig breidt de import van voedselproducten zich uit in Suriname; met name het aantal verscheidene soorten vleesproducten neemt toe. Vele vleesproducten bezitten onbekende ingrediënten of grondstoffen en/of bij vele is de bron van herkomst niet volledig of helemaal niet kenbaar gemaakt. De consumptie van sommige producten kan ziekten, onder andere allergieën veroorzaken. Eveneens kunnen voedselproducten worden onderworpen aan wettelijke maatregelen, als blijkt dat het gaat om illegaal geïmporteerde producten, die als legaal op de markt worden gebracht of als er sprake kan zijn van gefraudeerde labeling. Vanuit een dergelijke situatie is forensisch onderzoek van eminent belang. Vanuit een religieus oogpunt, met name vanuit de islamitische, joodse en deels christelijke bevolkingsgroepen, is het ook belangrijk te weten welke vleescomponenten in bepaalde producten zitten daar deze groepen geen varkensvlees mogen nuttigen.

Het eten van varkensvlees kan behalve allergieën ook parasitaire ziekten met zich meebrengen zoals Trichinosis, een aandoening waarbij de in het varkensvlees voorkomende *Trichinella spiralis* worm zich gaat ontwikkelen in het lichaam van de mens en door migratie vele ziektebeelden (diarree, pijnlijke spieren, onregelmatige koortspieken etc.) kan veroorzaken [1].

Er bestaat in Suriname gebrek aan reguliere onderzoeken naar de authenticiteit van levensmiddelen en hun ingrediënten. Dit kan binnen de voedselveiligheid gezondheids- en religieus-ethische problemen veroorzaken. Er is volgens de docentbegeleider, dr. M. Huisden, voorts vooralsnog gebrek aan voldoende forensische onderzoeksmogelijkheden in Suriname die in dergelijke gevallen binnen korte tijd opheldering zouden moeten brengen door de samenstelling van de producten, de grondstoffen en hun herkomst te achterhalen.

Het onderzoek in dit verslag zal zich richten op het kwalitatief aantonen van varkensvlees in verschillende vleesproducten. Er zal een moleculair-biologische techniek, de Polymerase Kettingreactie (PCR), worden toegepast ter identificatie van een specifiek gen, indicatief voor de aanwezigheid van varkensvlees [2].

Doelstelling

Toetsing van de toepasbaarheid van PCR-technologie bij onderzoek van geïmporteerde vleesproducten op het voorkomen van varkensvlees als grondstof ter bevordering van de voedselcontrole en voedselveiligheid in Suriname.

Probleemstelling

Naar aanleiding van de bezorgdheid vanuit de islamitische gemeenschap en het politieel onderzoek omtrent mogelijk onjuist gelabelde frikandellen, zijn er twijfels in de Surinaamse gemeenschap opgewekt ten aanzien van de samenstelling van geïmporteerde vleesproducten. Het gebruik van producten met vervalst, onduidelijk en/of onvolledig opschrift kan voor sommigen een religieus alsook gezondheidsprobleem veroorzaken [3]. Eveneens worden er in Suriname nog geen reguliere testen verricht die de samenstelling van een vleesproduct kunnen aantonen.

Het voornoemd probleem kan als volgt worden verrat:

- Is het mogelijk om in Suriname de Polymerase Chain Reaction (PCR) te benutten voor het aantonen van varkensvlees als grondstof in geïmporteerde vleesproducten?

In hoofdstuk 2 wordt de noodzaak van voedselveiligheid met betrekking tot de gezondheidsaspecten van de consument belicht. Het consumeren van varkensvlees kan verschillende gezondheidsproblemen met zich meebrengen, waaronder allergische reacties. Ook de religieuze aspecten komen aan de orde.

In hoofdstuk 3 zal verder worden ingegaan op het huidige beleid van verschillende instanties met betrekking tot het monitoren van de voedselveiligheid en importfraude van voedselproducten waaronder ook vleesproducten in Suriname.

Het experiment voor identificatie van het varkensgen in geïmporteerde vleesproducten met behulp van PCR komt in hoofdstuk 4 aan de orde. De theorie van de methodieken en toe te passen protocollen komen daar eveneens aan de orde. De uitwerking en de resultaten, de validatiemethode en kwaliteitsaspecten komen daarna in hoofdstuk 5 aan de orde.

In hoofdstuk 6 wordt er een begroting gepresenteerd ten aanzien van dit onderzoek zodat continuering kan worden bevorderd en eventuele uitbreiding kan volgen.

Aan het eind wordt op grond van de verkregen testresultaten het verslag afgesloten met een discussie en conclusie met betrekking tot het onderzoek op het varkensgen in geïmporteerde vleesproducten. Alle mogelijke resultaten buiten verwachting worden bediscussieerd. Alle mogelijke factoren en oorzaken worden kort in kaart gebracht, alsook de mogelijke invloed die de verkregen resultaten kunnen hebben op de Surinaamse samenleving.

2 VOEDSELVEILIGHEID MET BETREKKING TOT VARKENSVLEES

Voedselveiligheid is het waarborgen van veilig voedsel, zodat het geen negatieve gevolgen kan hebben voor de consument. Het is een vereiste en een onderdeel van de voedselkwaliteit (smaak, geur, etc.) [4].

Onder voedselveiligheid zijn er vier verschillende vormen te onderkennen, namelijk (micro-) biologische, chemische, fysische en biotechnologische voedselveiligheid [5].

1. (Micro-)biologische voedselveiligheid; hieronder vallen de micro-organismen zoals schimmels en bacteriën. Gedurende de productie, bereiding en bewaring kan voedsel blootgesteld worden aan deze micro-organismen.
2. Chemische voedselveiligheid; hierbij gaat het om stoffen die om technische redenen in het product verwerkt worden om aan de eisen van de consument te voldoen zoals additieven. Tevens zijn er stoffen die niet doelbewust toegevoegd zijn aan het voedingsmiddel, maar wel erin voorkomen. Deze stoffen worden contaminanten genoemd, zoals gewasbeschermingsmiddelen.
3. Fysische voedselveiligheid; tijdens de productie kan het voorkomen dat glas- en metaaldeeltjes in het voedingsmiddel zijn verwerkt. Deze soort stukjes worden met speciale apparatuur eruit gefilterd.
4. Biotechnologische voedselveiligheid; wanneer genetisch gemodificeerde organismen toegevoegd worden in voeding. Dit moet dan eerst door de Europese Autoriteit voor Voedselveiligheid (EAV) goedgekeurd worden. Binnen de Europese Unie (EU) wordt het genetisch gemodificeerde organisme gecontroleerd op veiligheid.

2.1 Varkensvlees in (vlees-)producten

Door de toename van wereldwijde vleesconsumptie wordt door producenten van vleesproducten uitgekeken naar goedkopere alternatieven voor grondstoffen. Varkensvlees is vaak het voordeligste alternatief en daarom ook het meest toegepast ter vervanging van bijvoorbeeld rund- of schapenvlees [6]. Vele vleessoorten zoals kip, schaap, rund en konijn worden zonder problemen gegeten in Suriname, maar het eten van varkensvlees is voor bepaalde consumenten onacceptabel. Bij de islamieten, joden en sommige christenen is het nuttigen van varkensvlees een taboe [7]. De consument heeft het recht om te kiezen wat hij wil nuttigen.

De belangrijkste reden waarom varkensvlees wordt gebruikt in vleesproducten is het economische voordeel. Daarnaast wordt het verwerkt omdat het een grondstof is met gunstige eigenschappen, zoals smaak, structuur en de bindingseigenschappen van de eiwitten. Volgens internationale standaarden is een producent verplicht om op het etiket te vermelden welke vleesproducten er in het product zijn verwerkt. Echter komt het wel eens voor dat door mankementen in het productieproces de kans op contaminatie wordt vergroot, indien er verschillende vleessoorten worden verwerkt in dezelfde fabriek. Het kan ook voorkomen dat de fabrikant bewust zijn product mengt met andere soorten vlees om de smaak te verbeteren of eenvoudig om economisch voordeel, zonder dat de andere vleessoorten op het etiket worden vermeld [8]. Deze handeling is af te keuren aangezien vanuit religieus oogpunt groepen als joden en moslims geen varkensvlees mogen nuttigen en Hindoestanen geen rundvlees mogen nuttigen. Ook kan een consument allergisch zijn tegen een

bepaalde vleessoort [7]. Het fenomeen om andere vleessoorten te verwerken zonder melding is een wereldwijd probleem en wordt volgens internationale standaarden afgekeurd.

2.1.1 Religieuze aspecten

Voedselproducten van dierlijke afkomst zoals vis, gevogelte, eieren, melk zijn een onmisbare bron van eiwitten die een hoge biologische waarde en andere nutriënten leveren voor het lichaam. Desondanks zijn er mensen in de wereld die zich onthouden van sommige van deze voedselproducten en vegetariërs onthouden zich geheel hiervan [9].

Varkensvlees is wereldwijd het bekendste product dat afgekeurd wordt door verschillende groepen mensen. Volgens het artikel van M. Abdussalam, *Health aspects of the consumption of pigmeat* [10], onthouden de islamieten, joden en sommige christenen zich van varkensvlees, omdat het verboden is volgens hun Heilige geschriften, de Bijbel en de Koran.

Behalve varkens zijn alle carnivoren (vleesetende dieren) en vlees van mensen niet toegestaan voor consumptie. Herbivoren zijn toegestaan, waarbij paard en ezel in de islam als edele dieren beschouwd worden en alleen in noodgevallen gegeten mogen worden [9].

Het verbod op het eten van varkensvlees wordt duidelijk geciteerd in de Koran in verschillende verzen. Voorbeelden daarvan zijn de verzen 2: 173, 5:3, 6:145 en 16:115. Een daarvan luidt als volgt: het is verboden om het vlees en bloed van het varken en elk ander voedsel waarover Gods naam niet is uitgesproken te nuttigen.

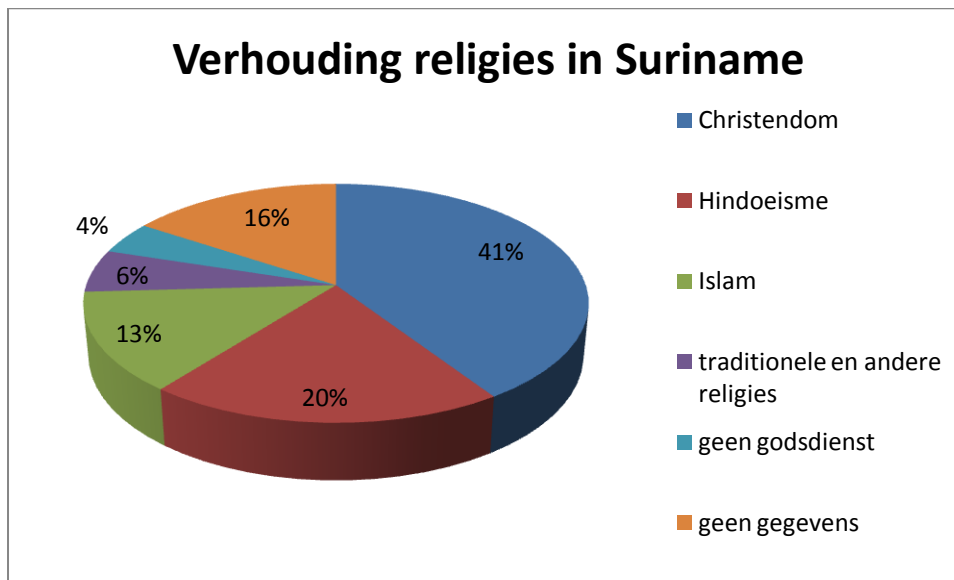
Ook in de Bijbel zijn er verschillende verzen die aangeven dat het nuttigen van varkensvlees is verboden. Deuteronomium 14:8, en Leviticus 11: 7-8 zijn enkele verzen die aangeven dat het eten van varkensvlees door God wordt verboden, omdat het varken als een onrein dier wordt beschouwd. Elk ander dier met gespleten hoeven is ook verboden voor consumptie.

Volgens de census van 2004 telt Suriname 492.829 inwoners waarvan de meesten in het noorden wonen, in de districten Paramaribo, Wanica en Nickerie. Het dunst bevolkte district is Sipaliwini, dat het grootste deel van het binnenland omvat. De Surinaamse bevolking bestaat uit een mengeling van verschillende etnische groepen. De nieuwe census vond plaats in augustus en september van 2012, maar de resultaten zijn nog niet gepubliceerd door het Algemeen Bureau voor Statistiek.

Tevens blijkt uit de cijfers van de zevende volkstelling in 2007 van dat de verhouding tussen de religies als volgt was [11]:

- 40,7% christendom (rooms-katholiek cf. Bisdom Paramaribo, Peerke Donders; hervormd, gereformeerd; e.a. protestanten, m.n. hernhutters);
- 19,9% hindoeïsme;
- 13,5% islam;
- 5,8% traditionele en andere religies;
- 4,4% geen godsdienst;
- 15,7% geen gegevens.

De mohammedanen, hindoes en christenen vormen een vrij grote groep in Suriname, zie figuur 1.



Figuur 1. Religieuze verhoudingen in Suriname

Bron : Census over Suriname, augustus 2007, <https://www.cia.gov/library/publications/the-world-factbook/geos/ns.html> [11]

2.1.2 Gezondheidsaspecten

Varkensvlees is een van de producten die een hoge waarde aan eiwitten en nutriënten leveren. Zoals elk soort vlees, bezit dit vlees ook essentiële eiwitten/aminozuren, vetzuren, ijzer, zink, vitamine A, vitamine B1, B6 en B12, vitamine D [12]. Toch brengt het consumeren van dit vlees verschillende negatieve gezondheidsaspecten met zich mee. Vele van de ziekten die kunnen worden opgelopen zijn besmettelijk en sommige zijn erg pathogeen [1, 10]. Microbiologische en parasietologische infecties worden verdeeld in [10]:

- Zoönosen, infectieoverdracht van dier op mens. Er zijn een aantal bacteriën en parasieten, waardoor varkens geplaagd worden en die in het vlees voorkomen en door consumptie kunnen worden overgedragen.
- Contaminaties tijdens het verwerken van vlees.

Er zijn een aantal ziekten die door consumptie van producten op mensen worden overgedragen en deze zijn gerelateerd aan varkensvlees. Deze risico's omvatten sommige bacteriën, parasieten en virussen [1, 13].

Bacteriële ziekten

Bacteriële infecties zoals salmonellosis, campylobacteriosis en infecties met protozoën komen voor bij varkens en kunnen overgedragen worden op de mens wanneer varkensvlees rauw of onvoldoende verhit genuttigd wordt. Infectieuze micro-organismen of agentia kunnen relatief makkelijk vernietigd worden door voldoende verhitting. *Salmonellabacteriën* groeien niet op voedsel dat koud of heet opgeslagen is. Pathogene bacteriën veroorzaken ziekten en kunnen dodelijk zijn voor infanten, oudere mensen en mensen met verlaagde weerstand..

Enkele voorbeelden zijn:

Tuberculosis Fusiformis necrofurus: veroorzaakt voetrot, hetgeen moeilijk te genezen is.

Salmonella Cholera suis veroorzaakt acute, subacute en chronische cholera.

Paratyphoid Brucellosis kan leiden tot permanente invaliditeit.

Parasitaire ziekten

Infecties bij varkens komen voor doordat varkens onder andere geïnfecteerde weefsels of uitwerpselen van andere varkens of dieren eten op bijvoorbeeld vuilstortplaatsen. In tabel 1 is een aantal parasieten die voorkomen bij varkens weergegeven; door het nuttigen van onvoldoende verhit of ongekookt varkensvlees kunnen deze schade toebrengen aan de gezondheid van de mens.

Tabel 1. Parasitaire ziekten

Parasiet	Ziekte
<i>Trichinella spiralis</i> (Trichinosis wormen)	De gevaarlijkste parasiet; deze veroorzaakt reumatische en spierpijnen. De geïnfecteerde persoon vertoont geen en/of trage genezing van symptomen die kunnen leiden tot de dood. Sommigen ondervinden permanente invaliditeit. Er is geen kuur en niemand is immuun hiervoor.
<i>Teania solium</i> (varkenslintworm)	Deze worm veroorzaakt ondervoeding bij de persoon met als gevolg anemie, diarree, extreme depressie, melancholie en spijsverteringstoornissen. Cysticercosis betekent dat de larve de bloedbaan binnentreedt en zich in een of meerdere vitale organen zoals hersenen, lever, longen of ruggenwervel vestigt. De groeiende larven vormen een kapsel dat druk veroorzaakt op de omliggende orgaansystemen.
<i>Ascaris</i> Rondwormen	Deze kunnen leiden tot spijsverteringsstoornissen, appendicitis, obstructieve geelzucht.
Haakwormen	<i>Anchylostomiasis</i> veroorzaakt anemie, oedeem, hartfalen of groei afwijkingen (mentale en verstandelijke), tuberculosis, diarree.
<i>Schistosoma japonicum</i>	Deze worm veroorzaakt bloedingen die tot anemie leiden. Vestiging in de hersenen of de wervelkolom veroorzaakt verlamming en dood.
<i>Clonorchis sinensis</i>	Deze veroorzaakt chlonorchiasis: obstructieve geelzucht en een vergrote lever.
<i>Balantidium coli</i>	Deze veroorzaakt acute dysenterie en generale zwakte.

Bron: Islam Religion, 2009. <http://www.quranreading.com/blog/islam-religion/why-pork-pigs-meat-is-forbidden-in-islam/> [1]

Virale ziekte

Varkensvlees is overdrager van enkele virale aandoeningen, zoals pokken, hepatitis A en B, Japanse B-encefalitis, die de oorzaak is van influenza, mond- en klauwzeer en gastro-enteritis bij pasgeborenen.

Protozoën

Toxoplasma gondii leidt er potentieel toe dat pasgeborenen van geïnfecteerde vrouwen binnen een paar dagen na geboorte sterven. Een kind dat de ziekte overleeft, kan blindheid en doofheid ontwikkelen. Volwassenen kunnen lijden aan chronische koorts met een vergrote lever en milt. Pneumonie of cerebrospinale meningitis leidt tot de dood of hersenbeschadiging. De patiënt kan ook blind en/of doof worden.

Andere ziekten

Varkensvlees is relatief hard en moeilijk te verteren, hetgeen kan leiden tot chronische verteringsstoornissen. Puisten en cysten komen ook voor bij varkensvleeseters.

Er zijn nog geen behandelingen bekend om de verschillende ziekten te bestrijden [1].

Vetten in varkens

Varkensvlees bevat over het algemeen meer vetten dan andere vleessoorten. Vaak eten van varkensvlees kan het risico op een verhoogd cholesterol in het bloed veroorzaken. Het hoge cholesterolgehalte in het bloed veroorzaakt artherosclerose, de vorming van galstenen, cardiovasculaire ongevallen en plotselinge dood. Het eten van varkensvlees zou een verhoogd risico op kanker, vooral darmkanker, met zich meebrengen. Varkensvlees kan ook hormonen bevatten. Deze hormonen kunnen de groeiprocessen in het lichaam verstoren of de groei van kankercellen stimuleren [14, 15].

Resultaten allergieonderzoek

Een enquête gehouden in 2010 onder een PTC-studentenpopulatie en een aantal artsen, als onderdeel van een projectopdracht verschaft enig inzicht in de behoefte aan specifieke allergietesten naar varkensvleesallergie en andere allergieën. Uit dit onderzoek bleek dat bij 6.1% van de populatie allergie tegen vlees (varken) voorkomt. Uit de populatie artsen/specialisten gaven 5 van de 21 artsen aan allergie tegen vlees op hun poliklinieken tegen te komen. Uit het onderzoek is ook komen vast te staan dat 100% van de populatie artsen de behoefte van specifieke allergietesten wel ondersteunt. De behoefte aan het verrichten van allergietesten was het grootst onder de kinderartsen [16].

Het labelen van producten door de producent is van groot belang voor de consument. In sommige landen en volgens internationale standaarden is het verplicht en zeker aan te raden producten te labelen, daar er ernstige allergieverschijnselen kunnen ontstaan. Het aantonen van antistoffen tegen bepaalde allergenen is met behulp van PCR niet mogelijk. Voor het aantonen van antistoffen is de ELISA-methode aan te raden. Het aantonen van allergenen in voedingsmiddelen is het best aan te tonen met behulp van PCR daar deze methode heel gevoelig en heel specifiek is [17].

3 VOEDSELCONTROLE

In dit hoofdstuk staat de wetgeving omtrent varkensvlees in Suriname kort beschreven. Eerst zijn de verschillende instanties die verantwoordelijk zijn voor het opstellen en uitvoeren van de wet- en regelgeving uiteengezet. Verder zijn de verschillende partijen die bij de wetgeving betrokken zijn vermeld.

3.1 Voedselcontrole en voedselveiligheid

Voedselcontrole en voedselveiligheid zijn onderwerpen die vaker aan de orde komen in verschillende instanties hier te lande. Consumenten zijn door de jaren heen veel kritischer geworden als het gaat om hun voeding; ze stellen daarom steeds hogere eisen aan de kwaliteit van producten die worden aangeschaft. In Suriname zijn er verschillende instanties die zich richten op aspecten van voedselcontrole en voedselveiligheid. De instanties die zulks monitoren, zijn onder andere het Bureau voor Openbare Gezondheidszorg (BOG) afdeling Milieu-inspectie en Keuringsdienst, het Ministerie van Handel en Industrie (MvHI) en het Korps Politie Suriname (KPS). Het Surinaams Bureau voor Standaarden heeft geen directe rol in het monitoren van wet- en regelgeving, maar heeft wel tot doel de consument en producent kwaliteitsbewust te maken. Eveneens doet dit bureau aan kennisoverdracht met betrekking tot de internationale standaarden.

3.2 Nationale en internationale regelgeving

Er is een consumentenbeschermingsbeleid in Suriname met name van het Ministerie van Handel en Industrie. Dit beleid is erop gericht om de consumenten te beschermen tegen fraude, bedriegerij en oneerlijke praktijken op verschillende markten. De huidige regering heeft als uitgangsbepaald het ontwikkelen en implementeren van enkele certificeringsprojecten, die als doel hebben de consument te beschermen. Dit jaar, 2013, wil het Ministerie van Handel en Industrie het Nationaal Certificeringsprogramma, afgekort NCP starten volgens internationale standaarden. Dit certificeringsprogramma moet de kwaliteits-, milieu-, veiligheids- en voedselveiligheidsnormen aanpakken. Het voordeel van dit programma is dat onder andere de productie van voedingsmiddelen en het waarborgen van een gezonde en veilige samenleving worden gewaarborgd [18].

Het ministerie is momenteel bezig een consumentenbeschermingswetgeving te concipiëren. Het is de bedoeling dat binnen de Caricom-landen harmonisatie van consumenten-beschermingswetgeving plaatsvindt. In de conceptwetgeving wordt een commissie voor consumentenzaken opgericht die klachten zal behandelen. Rechten van de consumenten en taken van leveranciers komen uitgebreid aan de orde, alsmede omgaan met oneerlijke praktijken, productaansprakelijkheid, consumentenveiligheid en terugneming van goederen [18].

De verschillende consumentenorganisaties moeten samen de consument inlichten over categorieën van producten en diensten; hoe de consument zichzelf kan beschermen, hoe de beste keus kan worden gemaakt en hoe het bewustzijn van de rechten van de consument te bevorderen.

Het Standaarden Bureau Suriname stelt zich verantwoordelijk deze dienstverlening aan de consument op zich te nemen.

Internationaal is er wetgeving over de etikettering van levensmiddelen, waarbij in detail aangegeven moet worden [18]:

- de ingrediënten die bij de productie van het levensmiddel zijn gebruikt, zelfs de ingrediënten die in minieme hoeveelheden zijn verwerkt en waarvoor sommige consumenten allergisch kunnen zijn;
- de gebruikte kleurstoffen, bewaarmiddelen, zoetstoffen en andere chemische additieven.

Echter ontbreekt specifieke wetgeving vooralsnog in Suriname [18].

3.2.1 Verantwoordelijkheden onder de verschillende instanties

Het moet duidelijk zijn dat consumentenbescherming niet slechts de verantwoordelijkheid is van 1 (één) vakministerie of instantie, maar regeringsverantwoordelijkheid is en dus een meer integrale benadering behoeft, waarbij verschillende instanties ter zake in nauw overleg met elkaar treden.

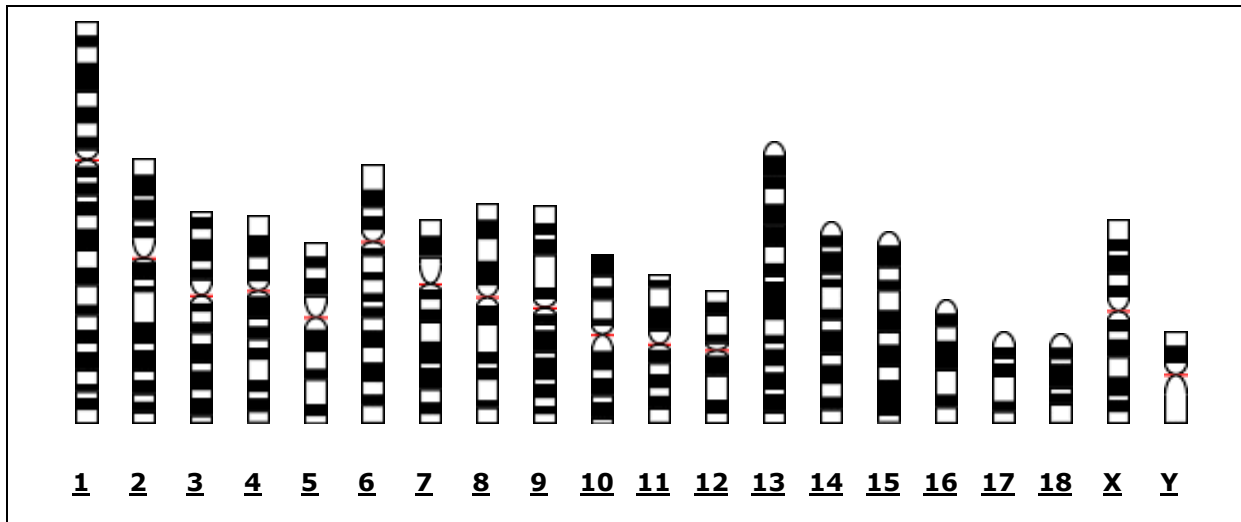
De verantwoordelijkheid ligt ook bij het Ministerie van Volksgezondheid; met name het BOG dat de producten keurt en geschikt verklaart voor menselijke consumptie. Het ministerie van Handel en Industrie buigt zich over de prijs-kwaliteitverhouding. Hierbij spelen het IJkwezen (voor het juiste gewicht) en de Economische Controle Dienst (voor de prijscontrole) en het Surinaams Bureau voor Standaarden, dat richtlijnen ontwikkelt volgens internationale standaarden (Codexnormen of WTO\SPS-maatregelen) aangepast aan de Surinaamse/regionale omstandigheden, een belangrijke rol [18].

Voedselveiligheid (consumentenbescherming) is dus gebaseerd op het beginsel dat de hele voedselketen (Farm to fork or farm to table) moet worden gecontroleerd om de veiligheid van de levensmiddelen te garanderen [18].

4 MOLECULAIR BIOLOGISCH ONDERZOEK

4.1 Het varkensgen

Het varken (*Sus scrofa*) behoort tot de artiodactyls of tweehoevige zoogdieren, waarbij het genoom van het varken uit 18 paar chromosomen met het X- en Y-chromosoom bestaat, zie figuur 2. In tegenstelling tot het varken bezit de mens 23 [19, 20]. Elk chromosoom van het varken is gemaakt uit een lange reeks van DNA-basenparen en bestaat in totaal uit 3 miljard DNA-basenparen die samen de karakteristieke eigenschappen van het varken vormen [21].



Figuur 2. Pig (*Sus scrofa*) Chromosomen Karyotype

Bron: The ArkDB database system:

<http://www.thearkdb.org/arkdb/do/getChromosomeDetails?accession=ARKSPC00000001> [22]

Het onderzoek naar het complete DNA van het varken blijft zich voortzetten, dit ten behoeve van het zoeken naar diverse bestrijdingsmedicamenten en ontwikkelen van vaccinaties voor diverse ziekten zoals influenza, waar verschillende mutaties van influenza- virussen bij varkens mogelijk zijn [23]. Hieruit zijn miljoenen sequenties van het varkens-DNA bekend en in verschillende researchdatabanken terug te vinden.

Bij dit project wordt de genotypering gebruikt ter identificatie van het varkensgenoom in vleesproducten ten behoeve van gezondheids-, religieuze en economische redenen.

Voor vele researchers is in het algemeen van belang welke sequentie het doelwit is om een onderzoek voort te zetten. Volgens het gebruikte artikel van Ilhak, I., et al. 2006, "Identification of meat Species by Polymerase Chain Reaction (PCR) Technique" [2] voor dit project, is meer informatie te halen over de doelwitsequentie via het toegangsnummer (Accession number) in Gen databankbanken op het Internet.

Uitgebreidere en gedetailleerde gegevens over Mitochondriaal DNA (mtDNA) van varken kunnen middels toegangsnummer: AF039170, verkregen worden (zie bijlage 1).

Het mtDNA is bekend als “Sus scrofa cytochrome oxidase subunit 2 (COII) gene, partial cds; tRNA-Lys gene, complete sequence; ATPase subunit 8 gene, complete cds; and ATPase subunit 6 gene, partial cds, mitochondrial genes for mitochondrial products” [24].

4.2 Moleculair diagnostisch onderzoek

Om te onderzoeken in welke vleesproducten en samengestelde vleesproducten varkensvlees verwerkt is, is van verschillende halal en niet-halal gelabelde producten een experiment uitgevoerd, waarbij het varkensgen moleculair biologisch aangetoond wordt. Dit kan met behulp van moleculair diagnostische technieken zoals de conventionele Polymerase Kettingreactie en de Real Time Polymerase Kettingreactie. De conventionele Polymerase Kettingreactie is bij dit project toegepast. DNA is een vrij stabiel molecuul, dat behalve in rauwe producten ook in verwerkte vleesproducten is aan te tonen. Ook in heel kleine concentraties (<0.5%) is een bepaalde vleessoort al aan te tonen [2], zowel in vleesproducten bevattende één soort vlees als in vleesmixproducten met verschillende vleessoorten. Voor de isolatie van het DNA en de identificatie daarvan zijn er verschillende soorten DNA-analysemethoden beschikbaar, die echter nog niet allemaal toepasbaar zijn in Suriname[25]. Er zijn over een langer tijdsbestek methoden toegepast, waarbij er onderzoek is gedaan naar de aanwezigheid van varkensvlees in rauwe vleesproducten of de aanwezigheid in verwerkte vleesproducten en met PCR of een andere moleculair diagnostische testmethode toegepast ter identificatie [26, 27].

4.2.1 Polymerase Kettingreactie algemeen

De Polymerase Chain Reaction (PCR) ofwel Polymerase Kettingreactie is een van de meest belangrijke moleculair biologische technieken, die een ware revolutie teweeg heeft gebracht binnen de biomedische wetenschappen. Deze techniek wordt volop toegepast in onderzoeks-, analytische, forensische en diagnostische laboratoria en is nog steeds in ontwikkeling. De Real Time PCR is in vergelijking met de conventionele PCR een veel snellere en minder arbeidsintensieve methode [28].

Sinds de uitvinding van de Polymerase Kettingreactie in de jaren 1983 door de Amerikaan Kary Mullis, PhD.[29], zijn er verscheidene onderzoeken op de toepasbaarheid gedaan. Ontwikkelingen van verbeterde en nieuwe technieken blijven zich heden ten dage voortzetten. In Suriname is de PCR-techniek echter slechts enkele jaren geleden geïntroduceerd en zij is dus nog in de beginfase van ontwikkeling en uitbreiding voor het toepassen op verschillende onderzoeksgebieden.

De Polymerase Kettingreactie is een techniek die een klein DNA-fragment exponentieel amplificeert. Dit geschiedt op basis van drie processen namelijk denaturatie, annealing en synthese [30]. Elk van deze reacties is snel (seconden tot minuten) en wordt onder identieke condities (met uitzondering van de temperatuur) uitgevoerd in een reageerbuisje. De totale procedure vergt 20-35 cycli, hetgeen 2-4 uren in beslag kan nemen.

DNA-matrijs:

DNA is een dubbele helix en bevat twee polynucleotide strengen die met elkaar antiparallel gebonden zijn. Deze bindingen vormen een hydrogene binding tussen de complementaire basenparen. Voor het initiëren van PCR moet het DNA eerst geïsoleerd worden.

De processen binnen de PCR vinden in principe als volgt plaats[30]:

- Denaturatie van de DNA-matrijs:

Het DNA wordt bij een temperatuur van 95 ° C verhit, waardoor de hydrogene bindingen tussen de basenparen losbreken. Er ontstaan hierdoor twee enkelvoudige losse DNA-strengen.

- Annealing :

Oligonucleotide primers zijn gesynthetiseerde korte sequenties van 17-24 basenparen die uit enkelstrengig DNA bestaan. Deze binden met de te onderzoeken sequentiefragmenten van de DNA-matrijs en initiëren de polymerase activiteit. Deze primers zijn specifiek aan het te onderzoeken gen. Na denaturatie wordt de temperatuur verlaagd naar 50-60 ° C om bindingen van de primers met het specifieke gen plaats te laten vinden. Annealingtemperatuurvariaties zijn afhankelijk van de nucleotide compositie van de geselecteerde primer.

- Synthese van het nieuwe DNA:

Na annealen van de primers, wordt de temperatuur verhoogd naar 72 ° C. Dit is een optimale temperatuur voor Taq DNA-polymeraseactiviteit. Taq DNA-polymerase wordt gesynthetiseerd uit een hittebestendige bacterie *Thermus Aquaticus*. Taq DNA-polymerase synthetiseert nieuw DNA tot een nieuwe DNA-streng door nieuwe nucleotiden die complementair zijn met de nucleotide van het specifieke gen te matchen.

De kettingreactie

De drie processen: denaturatie, annealing en synthese, worden herhaaldelijk op gang gebracht in 20-35 cycli. Aan het eind van de cyclus wordt een DNA-matrijs exponentieel verkregen. Met andere woorden wordt na 30 cycli 2^{30} dubbelstrengig DNA, identiek aan de DNA-matrijs verkregen [30].

Het PCR-product:

Het PCR-product is na reactie in grote hoeveelheid aanwezig en kan gevisualiseerd worden middels ethidiumbromide kleuring en ultraviolet licht na gelelectroforese. Hier wordt een patroon van banden weergegeven op een specifieke plek in de gel.

Voordelen:

- PCR is erg gevoelig, omdat het een klein fragment DNA kan amplificeren.
- PCR is erg specifiek door gebruik van specifieke primers voor het te onderzoeken gen.
- PCR-technieken kunnen in een korte tijd uitgevoerd worden en zijn eenvoudig te gebruiken.

Nadelen:

- Een geringe contaminatie kan leiden tot vals positieve resultaten.
- PCR-technieken zijn duur.
- Inhibitoren in de PCR-reactie kunnen leiden tot vals negatieve resultaten.

4.3 Bepalen van de juiste primers

Voor het ontwikkelen en analyseren van primers, zijn tegenwoordig diverse sites, online tools en softwareprogramma's verkrijgbaar. Deze zijn handig voor het snel en accuraat bepalen van de optimale primercondities zoals smelttemperatuur, annealingstemperatuur, percentage GC/AT, onderlinge complementariteit en specifieke priming-sites op de aangeboden template-sequentie[31].

Primers zijn eenvoudig en relatief goedkoop commercieel verkrijgbaar. Het materiaal voor de gehanteerde proeven werd gevriesdroogd aangeleverd, voorzien van een specificatierapport waarmee een oplossing werd voorbereid die in kleine hoeveelheden stockoplossingen werd verdeeld. Stockoplossingen bieden het voordeel dat ze nog goed bewaard blijven en in kleine hoeveelheden kunnen worden ingevroren en ontdooid voor gebruik.

Tabel 2. Varkensgen specifieke primers

Varken	Primersequentie	Annealingstemperatuur	Fragment moleculair gewicht
Forward primer	5'-GCCTAAATCTCCCCTCAATGGTA-3'	58 °C	212 bp
Reverse primer	5'-ATGAAAGAGGCAAATAGATTTTCG-3'	58 °C	

Bron: Ilhak, I., et al. 2006. Identification of Meat Species by Polymerase Chain Reaction (PCR) Technique [2]

4.4 Toepassing Conventionele Polymerase Kettingreactie

Na bestudering van verschillende artikelen werd er een protocol samengesteld, dat werd gevolgd (bijlage 2). Dit is van groot belang voor het verkrijgen van betrouwbare resultaten.

4.4.1 Materiaal en methode

Monsterverzameling

Voor de uitvoering van dit onderzoek is gebruikgemaakt van verschillende vleesproducten, zowel verse als blikjeswaren. Er is een onderscheid gemaakt tussen halalproducten (vleesproducten zonder varkensvlees) en producten waarop duidelijk werd vermeld dat die varkensvlees bevatten. Eveneens werd het product van primaire interesse, de frikandellen, meegenomen, zie tabel 3. De materialen werden met verpakking vervoerd ter voorkoming van kruiscontaminatie. Bevroren materialen werden in die staat vervoerd en voor analyse eerst ontdooid.

Tabel 3. Onderzoeksmaterialen

Categorie	Onderzoeksmateriaal	Etiket Varkensvlees- Gehalte	Aantal monsters
Negatieve controle	Vis en garnalen als negatieve controle	0 %	1
Positieve controle	Varkensvlees als positieve controle	100 %	1
Vleesproduct als halal gelabeld	GROOT Luncheon meat	0 %	Triplo
	KINGSFORD Hot dogs	0 %	Triplo
	POLARSTERN luncheon meat	0 %	Triplo
Vleesproduct met varkensvlees	MARKANT	46 %	Triplo
	DAK paté de foie –leverpastei	46 %	Triplo
	JUMBO worstjes	44 %	Triplo
Vleesproduct zonder varkensvlees	LIBBY'S sausages kip	0 %	Triplo
	GOOD BURRY luncheon meat beef	0 %	Triplo
	CHICKEN VIENNAS, chicken sausages	0 %	Triplo
Verdacht vleesproduct	Frikandel 1		Triplo
	Frikandel 2		Triplo
	Frikandel 3		Triplo

Voor de optimalisering van de Thermocycler werden de volgende monsters meegenomen:

- positieve controle; rauw varkensvlees
- negatieve controle; vis/garnalen
- een varkensvleeshoudend product
- een niet-varkensvleeshoudend product

De benodigheden voor het uitvoeren van PCR met varkensvlees zijn vermeld in bijlage 3.

Monstervoorbereiding

Van alle producten werd er 2 gram afgewogen, fijngemaakt en in reageerbuizen (polypropyleen buizen) overgebracht voor verdere bewerking.

DNA-extractie

De DNA-extractie werd uitgevoerd volgens het artikel van Ilhak, I., et al. 2006. De monsters werden gehomogeniseerd in 4 ml TNES-oplossing (een mengsel van 20 mM Tris pH 8.0, 150 mM NaCl en 10 mM EDTA) in een 15 ml reageerbuis. 750 µl van het mengsel werd overgebracht in een 2 ml Cryotube, waarna 10 µl protease en 50 µl SDS (Sodium Dodecyl Sulphate) 10% werden toegevoegd. Het mengsel werd na hard mengen in een waterbad van 56 ° C gelegd ter overnachting. Aan het mengsel werd 250 µl 6 M NaCl toegevoegd en toen werd er 5 minuten gecentrifugeerd bij een snelheid van 11600 x g. 500 µl van het supernatant werd overgebracht in een nieuwe Cryotube, waarna 300 µl phenol-chloroform-isoamyl alcohol werd toegevoegd (25:24:1). Het geheel werd op de vortex gemengd en daarna weer 5 minuten gecentrifugeerd bij

een snelheid van 11600 xg. 300µl van het supernatant werd weer overgebracht in een eppendorf buisje, waarna er 400 µl absolute ethanol van -20 ° C en 40 µl Natrium Acetaat werd toegevoegd. Dit mengsel werd op de vortex gemengd en bij -20 ° C bewaard ter overnachting. Het zou echter ook mogelijk zijn geweest om het 2 uren bij -80 ° C te bewaren en daarna verder te bewerken[32].

Het eppendorf buisje met het mengsel werd vervolgens 10 minuten gecentrifugeerd bij 11600 x g. Het supernatant werd zo veel mogelijk verwijderd. 400 µl 70% ethanol werd toegevoegd en de buis werd wederom gecentrifugeerd bij een snelheid van 11600 x g voor 5 minuten. Het Ethanol werd verwijderd en de buis met de pellet werd voor 30 minuten aan de lucht gedroogd. Hierna werd er 100 µl steriel H₂O toegevoegd om de pellet met opgeschoond DNA op te lossen.

Voor een (1) monster werd de volgende mix van reactiecomponenten van tabel 4 gebruikt.

Tabel 4. Reactiemix

Reagens	Hoeveelheid in µl
Nuclease vrij H ₂ O	27.35
5 x PCR buffer (Promega, Gotaq)	10
25 mM MgCl ₂	5
dNTP 250 µM	2
Primer forward 20 pmol	0.20
Primer reverse 20 pmol	0.20
Taq DNA-polymerase (Invitrogen Superscript mix)	0.20
Reactiemix Totaal	45 µl

Bron: Ilhak, I., et al. 2006. Identification of Meat Species by Polymerase Chain Reaction (PCR) Technique [2]

Daarbij werd een totaal volume van 50 µl met een monster van 5 µl gebruikt en met behulp van een thermocycler-apparaat de Polymerase Kettingreactie op gang gebracht, zoals weergegeven in tabel 5.

Tabel 5. Polymerase Kettingreactieproces

Proces	Tijd	Temperatuur °C
Activatie van Taq Polymerase "Hot Start"	10 minuten	95
PCR wordt uitgevoerd bij 35 cycli		
Denaturatie	45 seconden	94
Annealing	45 seconden	58
Extension	90 seconden	72

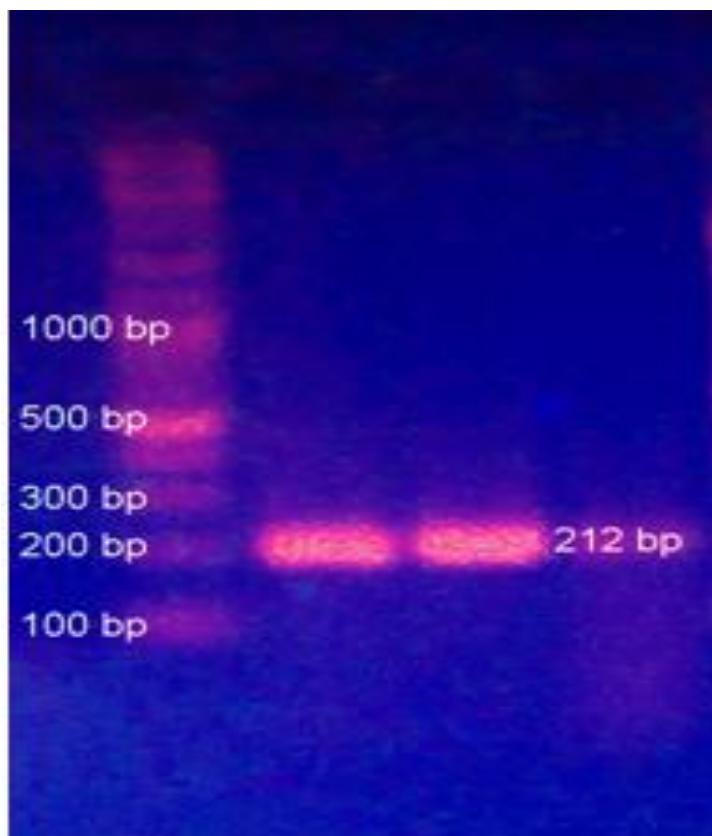
Note: Hot Start PCR is uitgevoerd door gebruikmaking van de Superscript mix Taq Polymerase

Bron: Ilhak, I., et al, 2006, Identification of Meat Species by Polymerase Chain Reaction (PCR) Technique [2]; Bijsluiter Invitrogen, 2005, Superscript III Platinum One-Step Quantitative RT-PCR System with Rox [33]

4.4.2 Gelelectroforese

Na de Polymerase Kettingreactie werd het verkregen PCR-product op een 2% agarose gel verlopen en met ethidiumbromide 5 µg/5 ml aangebracht en met een spanningsveld van 100 V voor 2 uren geactiveerd. Het eindresultaat werd gefotografeerd.

De gelelectroforesetechniek wordt gebruikt om elektrisch geladen moleculen in het PCR-product te scheiden op basis van de moleculaire grootte of het moleculaire gewicht. Grotere moleculen migreren trager door de gel dan kleinere moleculen bij een bepaald percentage gel. DNA bevat negatiefgeladen fosfaatgroepen en migreert naar de positieve pool (anode) wanneer het elektrisch veld een negatieve spanning over de agarose gel doet ontstaan[34]. Met behulp van elektroforese wordt het DNA-product in een agarose gel met kleuring van Ethidiumbromide en bij ultraviolet licht zichtbaar gemaakt. Gelelectroforese wordt aangewend om de aanwezigheid van het varkens-DNA in het monster aan te tonen. Bij een 2% agarose gel vindt er een scheiding plaats van het varkens-DNA op 212 bp zoals weergegeven in figuur 3.



Figuur 3. Fragment varkens-DNA 212 bp

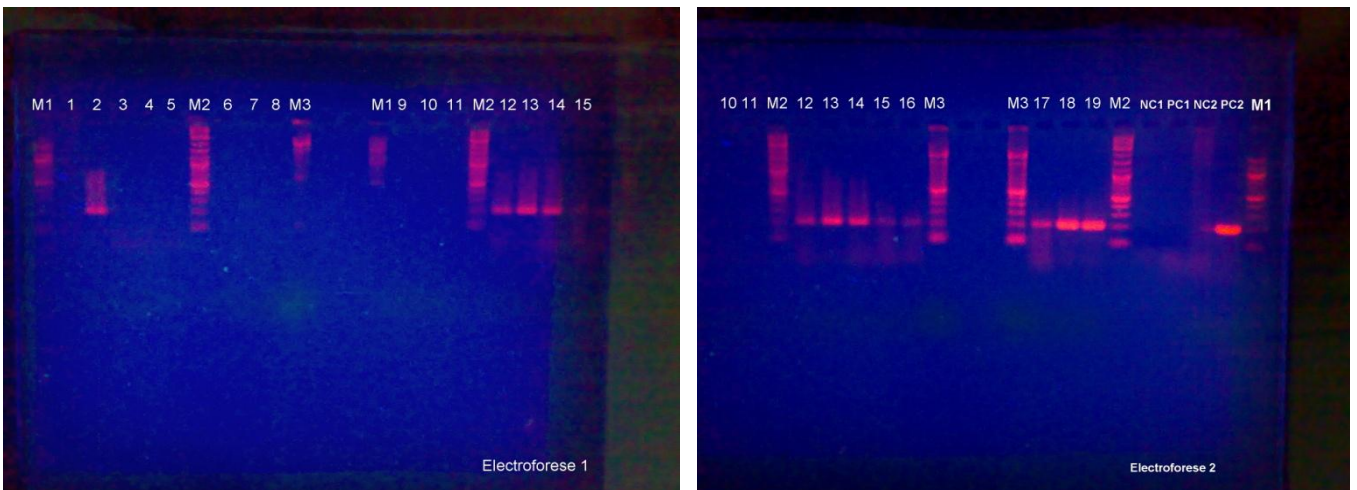
5 RESULTAAT

Door middel van fotografische vastlegging aan het eind van de praktijkuitvoering zijn door interpretatie van de aanwezigheid van controlebanden de juiste toepassing en validatie van de methode beoordeeld. De aanwezigheid van banden op de juiste locatie werd voorts indicatief gebruikt voor de aanwezigheid van varkensvlees in de producten. Tijdens het werken werd met verschillende aspecten zoals kwaliteit, betrouwbaarheid van de testen en veiligheid rekening gehouden. Voorafgaand aan het werkelijke onderzoek werd de PCR-methode geoptimaliseerd met verschillende reagens, verhoudingen en concentraties.

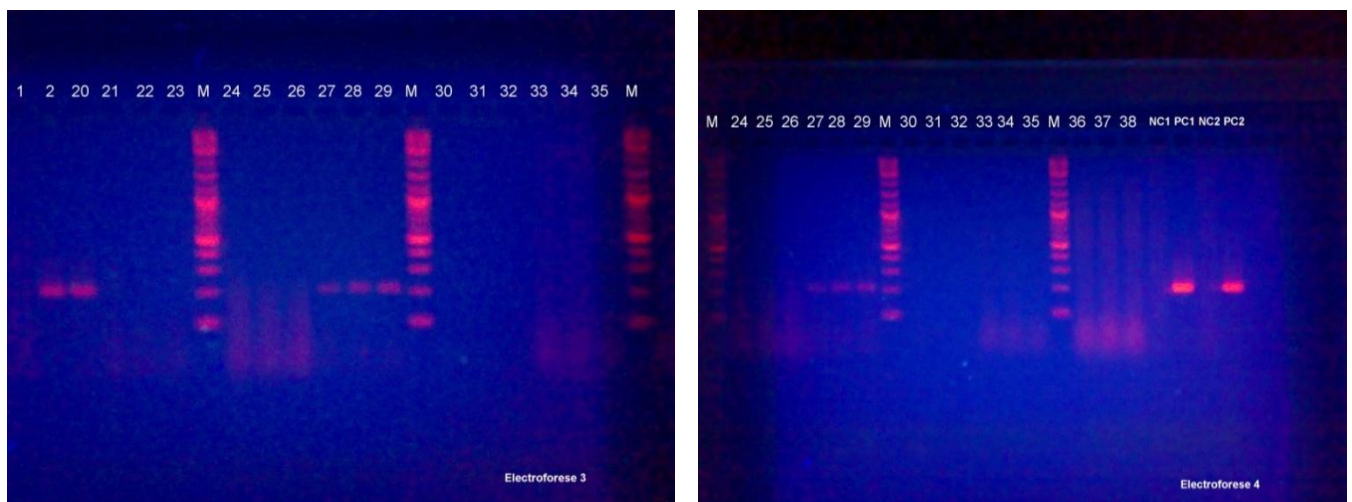
5.1 Uitslagen en interpretaties

Het resultaat van de uitvoering van conventionele PCR op het varkensgen is in figuur 4 en 5 alsmede in tabel 6 weergegeven.

Visuele uitslagen middels gelelectroforese:



Figuur 4. Uitslag 1^{ste} batch bestaande uit 21 monsters met behulp van gelelectroforese



Figuur 5. Uitslag 2^e batch bestaande uit 21 monsters met behulp van gelelectroforese

M: Moleculaire marker (100 bp); M1, M2 en M3 zijn de verschillende soorten markers voor de volgende testen:

1: Negatieve controle voor het valideren van de extractie.

2: Positieve controle voor het valideren van de extractie.

NC1 en PC1: respectievelijk negatieve en positieve controle; valideren van de gelelectroforese en controleren naar bruikbaarheid van deze controles voor de volgende testen.

NC1 en PC1: respectievelijk oude negatieve en positieve controle van de vorige test; valideren van de gelelectroforese en controleren naar bruikbaarheid van deze controles voor de volgende testen.

Tabel 6. Uitslag interpretatieonderzoek

Monster No.	Onderz. ID	Onderzoeksmateriaal	Resultaat	
			Batch#1 5-10-2012	Batch#2 9-10-2012
1	1	Garnalen als negatieve controle	Negatief	
2	2	Varkensvlees als positieve controle	Positief	
Vleesproduct Halal gelabeld:				
3	4A-1	GROOT Lunch meat (A)	Negatief	
4	4A-2	GROOT Lunch meat (B)	Negatief	
5	4A-3	GROOT Lunch meat (C)	Negatief	
6	4B-1	KINGSFORD Hot dogs (A)	Negatief	
7	4B-2	KINGSFORD Hot dogs (B)	Negatief	
8	4B-3	KINGSFORD Hot dogs (C)	Negatief	
9	4C-1	POLARSTERN lunch meat (A)	Negatief	
10	4C-2	POLARSTERN lunch meat (B)	Negatief	
11	4C-3	POLARSTERN lunch meat (C)	Negatief	
Vleesproduct met varkensvlees:				
12	5A-1	MARKANT (A)	Positief	
13	5A-2	MARKANT (B)	Positief	
14	5A-3	MARKANT (C)	Positief	
15	5B-1	DAK paté de foie -leverpastei (A)	Positief	
16	5B-2	DAK paté de foie –leverpastei (B)	Positief	
17	5B-3	DAK paté de foie –leverpastei (C)	Positief	
18	5C-1	JUMBO worstjes (A)	Positief	
19	5C-2	JUMBO worstjes (B)	Positief	
20	5C-3	JUMBO worstjes (C)		Positief
Vleesproduct zonder varkensvlees:				
21	6A-1	LIBBY'S sausages kip (A)		Negatief
22	6A-2	LIBBY'S sausages kip (B)		Negatief
23	6A-3	LIBBY'S sausages kip (C)		Negatief
24	6B-1	GOOD BURRY luncheon meat beef (A)		Negatief
25	6B-2	GOOD BURRY luncheon meat beef (B)		Negatief
26	6B-3	GOOD BURRY luncheon meat beef (C)		Negatief
27	6C-1	CHICKEN VIENNAS, chicken sausages (A)		Positief
28	6C-2	CHICKEN VIENNAS, chicken sausages (B)		Positief
29	6C-3	CHICKEN VIENNAS, chicken sausages (C)		Positief

Verdacht product:

30	7A-1	frikandel 1(A)	Negatief
31	7A-2	frikandel 1 (B)	Negatief
32	7A-3	frikandel 1 (C)	Negatief
33	7B-1	frikandel 2 (A)	Negatief
34	7B-2	frikandel 2 (B)	Negatief
35	7B-3	frikandel 2 (C)	Negatief
36	7C-1	frikandel 3 (A)	Negatief
37	7C-2	frikandel 3 (B)	Negatief
38	7C-3	frikandel 3 (C)	Negatief

Tabel 7. Correlatie met etiket product

Onderzoeksmateriaal	Verwacht resultaat	Aantal monsters	Lab uitslag	Correlatie hypothese
Garnalen als negatieve controle	Negatief	1	Negatief	100 %
Varkensvlees als positieve controle	Positief	1	Positief	100 %
Vleesproduct als Halal gelabeld				
Merk 1	Negatief	Triplo	Negatief	100 %
Merk 2	Negatief	Triplo	Negatief	100 %
Merk 3	Negatief	Triplo	Negatief	100 %
Vleesproduct bevattend varkensvlees				
Merk 1	Positief	Triplo	Positief	100 %
Merk 2	Positief	Triplo	Positief	100 %
Merk 3	Positief	Triplo	Positief	100 %
Vleesproduct zonder varkensvlees				
Merk 1	Negatief	Triplo	Negatief	100 %
Merk 2	Negatief	Triplo	Negatief	100 %
Merk 3	Negatief	Triplo	Positief	0 %

5.2 Validatie, betrouwbaarheid en kwaliteitszorg

5.2.1 Validatie

Validatie is vereist bij nieuwe testen of technieken. Dit proces omvat de prestaties van de test in vergelijking met een gouden standaard of verwijzing, waarbij de monsterstatus of het proces getoetst wordt. Met andere woorden kan validatie gezien worden als een proces om te bepalen of de test goed en betrouwbaar is voor gebruik. Volgens de World Health Organisation (WHO) is validatie gedefinieerd als een proces om te bewijzen dat een procedure werkt zoals verwacht en daarbij het resultaat consequent bereikt wordt. In de genetica ontbreken vaak gecertificeerde testen of materialen die als referentie beschikbaar moeten zijn voor de validatie. Het onderzoek naar het varkensgen in vleesproducten zoals in dit project aangewend, is een voor Suriname uniek onderzoek; er waren tijdens de onderzoeksperiode dan ook geen referentiematerialen en -testen lokaal beschikbaar ter validering. Gekozen werd voor reproduceerbaarheid. Indien een PCR-methode betrouwbare en reproduceerbare resultaten geeft, werd er volstaan met controlemonsters en detectie middels elektroforese. De praktische uitvoering is geadopteerd uit een artikel van

Ilhak, I., et al. 2006 “ Identification of meat Species by Polymerase Chain Reaction (PCR) Technique” [2], waarbij de methodiek zich uitermate goed leende voor de huidige doelstellingen.

5.2.2 Betrouwbaarheid

Bij dit project zijn verschillende monsters gebruikt die voldoen aan de internationale wetgeving van labeling met het daarbij behorende opschrift van afwezigheid en aanwezigheid van de component varkensvlees. Een totaal van 14 verschillende soorten monsters bestaande uit varkensvlees- en niet-varkensvleesmonsters werd getest; hieronder waren er 12 soorten die in triplo uitgevoerd werden om de correlatie met andere resultaten te bepalen. Op basis hiervan is na experimentele verificatie van het al dan niet aantoonbaar zijn van varkensvlees in zo een monster, een identificatie gedaan van monsters met en zonder varkensvlees als ingrediënt, hetgeen overeenkwam met de voorgeschreven labels en verwachtingen. Tevens zijn er meerdere controlematerialen meegenomen die voldoen aan de verwachte uitslagen

5.2.3 Kwaliteitszorg

Het gebruik van PCR voor onderzoek en diagnostische doeleinden vereist aanvullende procedurele beperkingen die nageleefd moeten worden, zodat de test/reactie geldige resultaten oplevert. De mate van striktheid wordt vaak bepaald bij de uitvoering van de test [35].

Contaminatieprevalentie bij PCR

Het probleem van contaminatie dient niet te worden onderschat. PCR is extreem gevoelig, waarbij een geringe contaminatie kan leiden tot vals negatieve en vals positieve uitslag. Daarbij neemt het Centraal Laboratorium, waar PCR wordt uitgevoerd, uitgebreide maatregelen om te trachten contaminatie te voorkomen. Contaminatie kan gemakkelijk ontstaan tijdens het werken met positieve en negatieve monsters die naast elkaar gebruikt worden. Aerosolen kunnen het DNA ook verspreiden via medewerkers [36], niet meer dan 3 medewerkers/personen waren in de verschillende PCR-ruimten van het Centraal Laboratorium. Ter voorkoming van contaminatie bij gebruik van PCR werden ook diverse handelingen gepleegd: er werd bijvoorbeeld gewerkt met kleine hoeveelheden oplossingen en pipetten met wisselbare puntjes of zuigers.

Kwantificeren van resultaten

De PCR-techniek is zeer geschikt als hulpmiddel voor het aantonen van kleine hoeveelheden DNA [6, 25, 27, 37] en bij dit project niet goed mogelijk om resultaten op statistisch verantwoorde wijze te kwantificeren. Het gaat in dezen dus om een kwalitatieve bepaling, waarbij alleen maar is aangegeven of het varkens-DNA aanwezig is, maar niet hoeveel ervan aanwezig is. De hoeveelheid in het monster kan ook bepaald worden met kwantitatieve PCR-methoden zoals de Real Time PCR [38] die niet bij dit project werd toegepast, omdat volgens de gegeven doelstelling deze methode niet nodig is en bovendien erg kostbaar zou zijn.

Kwaliteitsbewust werken

Elke laboratoriumtechniek, ook bij de moleculaire biologie, heeft haar specifieke problemen en valkuilen. Hierdoor moet er voldoende kennis van gebruikte technieken, passende voorzorgsmaatregelen en adequate kwaliteitscontroles worden meegenomen om onbetrouwbare en onjuiste resultaten tot een minimum te beperken. Indien deze techniek wordt toegepast in de forensische techniek, moet de uiterste zorg worden besteed omdat het om de identificatie van personen of andere producten die ander DNA bevatten, gaat. De resultaten kunnen vergaande gevolgen hebben, hetgeen kwaliteitszorg uitermate noodzakelijk maakt.

De volgende aspecten en hoofdlijnen hebben betrekking op de kwaliteitsborging van moleculair biologisch onderzoek [36]; Het Centraal Laboratorium voldoet aan de meeste voorwaarden, hetgeen een belangrijke reden was waarom deze locatie verkozen werd.

- *Inrichting van het laboratorium*

Het uitvoeren van PCR dient te geschieden in verschillende ruimten waarbij diverse handelingen toegepast moeten worden. De ruimte is opgedeeld in 3 niveaus:

niveau 1, voor de bereiding van reagentia (een DNA-vrije ruimte);

niveau 2, voor het isoleren van het DNA uit de monsters met toevoeging van de reagentia;

niveau 3, voor de digestie en detectie van het doelwit-DNA. De meest vervuilde ruimte waar miljarden kopieën van de target verspreid kunnen worden in de vorm van aerosolen uit onder andere cupjes.

Ter voorkoming van verspreiding en dus contaminatie, is in PCR-flowkasten gewerkt.

- *Laboratorium, benodigdheden en reagens*

Elke ruimte van het Centraal Laboratorium is voorzien van zijn eigen pakket van benodigdheden en reagentia. Transport van reactiemengsel vindt alleen plaats van niveau 1 naar niveau 2 en vervolgens naar niveau 3. Tweerichtingsverkeer is niet toegestaan. Voor en na elke werkzaamheid wordt gereinigd met 70% alcohol (tafeloppervlaktes, centrifuges, etc.). Tevens zijn gebruiksmiddelen/hulpmiddelen voor en na testen in de PCR-kast voor 15 minuten onder UV-stralen geplaatst.

- *Controles*

Controlemonsters werden gebruikt om te verifiëren of de resultaten onder valide onderzoeksomstandigheden met kwalitatief goede reagentia en goed werkende protocollen tot stand kwamen. Dit geldt voor zowel de kwalitatieve als de kwantitatieve PCR. Bij de uitvoering van dit kwalitatief onderzoek zijn vleesproducten gebruikt waarbij redelijk zeker het varkensgen wel of niet aanwezig is op basis van internationale etiketteringregels en wetenschappelijke toetsing. Elke meegenomen negatieve controle die tot negatief resultaat leidt, bij de uitvoering die negatief blijft na het testen is een indicatie van contaminatie gevrijwaarde uitvoering. Een negatief resultaat bij een positieve controle kan duiden op het mislukken van de PCR-reactie; mogelijkkerwijs door inhiberende factoren of het ontbreken van kwalitatief goede ingrediënten.

- *Logistiek en uitslagwerking*

De onderzoeksmaterialen waren in triplo ingezet. Indien er geen betrouwbare resultaten behaald werden, werd het onderzoek herhaald. Het gebruik van monsters in triplo is nodig om met enige zekerheid de aanwezigheid van het varkensgen te bepalen.

- *Scholing*

Het benadrukken van de gevaren en de gevolgen van contaminatie is essentieel. Daarbij zijn de nodige trainingen en scholing onontbeerlijk ter voorkoming daarvan. Dankzij de ervaren praktijkbegeleider werd het onderzoek naar voldoening afgerond.

5.2.4 Veiligheid

Tijdens het werken in een laboratorium is de veiligheid te allen tijde belangrijk. Door onder andere gebruik te maken van Personal Protective Equipments (PPE) en de Material Safety Data Sheets (MSDS) werd de veiligheid tijdens dit onderzoek gewaarborgd.

5.2.5 Chemicaliën

Een aantal chemicaliën in het laboratorium zijn gevaarlijk. Fabrikanten zijn wettelijk verplicht om de gebruiker te voorzien van relevante informatie over eventuele gevaren die samenhangen met hun chemicaliën. Deze informatie wordt verstrekt in de vorm van Material Safety Data Sheets (MSDS). De MSDS bevat informatie zoals het CAS-nummer, gevarenummer, gevaar voor de gezondheid, eerste hulp, fysische gegevens van de stof, brand- en explosiegevaaren, reactiviteit, morsen of procedures bij het lekken, enzovoorts [39].

Tabel 8. Gevaarlijke stoffen

Reagens	Gevaar
Chloroform	Irriterend voor de huid, het oog, de slijmvliezen en luchtwegen. Is kankerverwekkend, tast lever en nieren aan. Erg vluchtig. Vermijd inademen van dampen. Draag geschikte handschoenen en PPE.
Fenol	Uiterst giftig, sterk bijtend, veroorzaakt ernstige brandwonden, kan schadelijk zijn bij inademing, inslikken of opname door de huid. Spoel de gebieden van de huid met een grote hoeveelheid water, was met water en zeep, maar gebruik geen Ethanol.
SDS (natrium dodecylsulfaat)	Is giftig, irriterend, vormt risico op ernstige schade aan de ogen. Het kan schadelijk zijn bij inademing, inslikken of opname door de huid.
Ethidiumbromide	Is een krachtig mutageen en giftig. Vermijd inademing.

Bron: Material Safety Data Sheets online, <http://www.amresco-inc.com> [39]

5.2.6 Ultraviolet licht

Bij de uitvoering van PCR wordt gebruikgemaakt van ultraviolet licht, namelijk bij het aflezen van de uitslagen na gelelectroforese, tevens bij het steriliseren van de werkomgeving en hulpmiddelen in een PCR-kast. Blootstelling aan UV-licht kan leiden tot acute oogirritatie. Ernstige oogletsels ontstaan, indien de ogen 30 minuten tot 24 uren blootstaan. Er moet aangepaste oogbescherming gebruikt worden bij het gebruik van UV-licht. Sommige apparaten zijn voorzien van oogbeschermingsschields die de lichtstralen blokkeren.

5.2.7 Elektriciteit

Het voltage voor electroforese is voldoende om elektrocutie te veroorzaken, vandaar dat de bufferbekkens tijdens de electroforese bedekt worden. De stroomvoorziening moet uitgeschakeld worden voordat de gel verwijderd wordt.

5.2.8 Algemene huisregels

Alle werkruimtes moeten vrijgehouden worden van rommel en vuile vaat. Electroforese en andere PCR-equipments moeten op de juiste wijze behandeld worden. De PCR-ruimtes zijn beperkte ruimtes voor 2-3 personen. Alle gemeenschappelijke faciliteiten, oplossingen, opgeslagen reagens moeten geëtiketteerd worden. Bij het oplossen en ingebruikname van nieuwe reagens zijn identificatie en datum van productie of gebruik vereist. Om verwarring te voorkomen moet elke persoon het product voorzien van datum van gebruik, voorbereiding, aankoop, naam, relevante experimentele analyses, enzovoorts.

5.3 Troubleshooting/problematiek en optimalisatie van het PCR-onderzoek

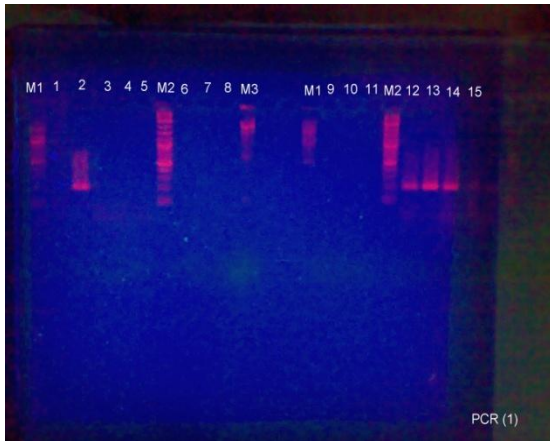
Voor het uitvoeren van het varkensgenonderzoek werd een vooronderzoek met bekende controlemonsters op kleine schaal uitgevoerd. Hiermee werden alle middelen o.a. apparatuur zoals thermocycler, gecontroleerd en geoptimaliseerd. Indien de interpretaties niet volgens verwachting uitkomen, worden alle mogelijke oorzaken geanalyseerd en daarmee het onderzoek geoptimaliseerd.

Bij conventionele PCR worden problemen met reactiecomponenten en amplificatieprotocol gediagnosticeerd door het runnen van een gel[40]. De diagnose wordt onderverdeeld in:

1. geen of vage banden;
2. niet specifieke banden of primer dimeren (meerdere onverwachte banden);
3. smears (brede uitgelopen/vage banden).

Waar de bovenstaande problemen zich voordeden, zal middels de website “Conventionele PCR-doctor” een lijst van oorzaken in kaart staan en zullen de bijbehorende adviezen in acht worden genomen ter optimalisering van het PCR.

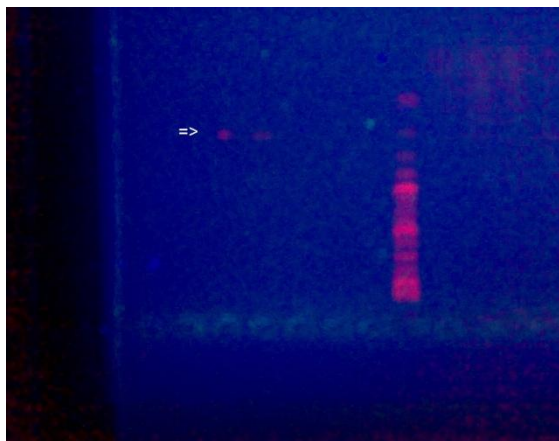
Enkele ongewenste resultaten:



Figuur 6. Onduidelijke markers

Geen en vage banden van markers:

M1 en M3, fragmenten met een kleinere bp zijn niet meer zichtbaar en kunnen afgebroken zijn doordat de markers mogelijk niet juist zijn opgeslagen en de vervaldatum was verstreken. Het aflezen is verholpen door gebruikmaken van de ideale marker (M2).



Figuur 7. Vage banden

Vage banden:

Onvoldoende hoeveelheid PCR-monsters in de slotjes (3 en 4). Bij de volgende test zijn deze monsters in volume vergroot, zodat de banden beter zichtbaar worden.

Tijdens de optimalisatie van de PCR werd gebruikgemaakt van verschillende merken DNA-polymerase en PCR-buffers, vanwege beperkte voorraad. Uiteindelijk werd het DNA-polymerase, Invitrogen Superscript Mix, als enige optie gebruikt voor het werkelijke onderzoek op de aanwezigheid van het varkensvlees op de onderzoeksmaterialen, zonder enige verandering aan de reactie mix aan te brengen. Polymerase is actief bij de DNA-replicatie voorafgegaan door een activiteit bij 95°C voor 10 minuten. Deze methode wordt volgens praktijkbegeleider, dhr. H. Brunings, de "Hot Start PCR" genoemd.

6 FINANCIËEL OVERZICHT

DNA-technieken zijn kostbaar en arbeidsintensief. PCR is vrij eenvoudig uit te voeren, maar vergt een zekere mate van monstervoorbereiding voorafgaand aan de PCR amplificatie. Tezamen neemt het maximaal 4 dagen in beslag.

Voor 14 monsters, waarvan 12 soorten producten in triplo zijn ingezet voor het optimaal gebruik van een reactiemix, is in tabel 9 de tijdsduur aangeven. Er is rekening gehouden met de gebruikscapaciteit van de thermocycler voor de amplificatie, zodat het aflezen van het PCR-product na een langere tijdsduur mogelijk werd. Tevens moest rekening gehouden worden met voorbereidingen en praktische handelingen ter voorkoming van contaminatie.

Tabel 9. Tijdsduur PCR

	Proces	Maximale Tijdsduur in Uren	Aantal manuren	Automatisch
Dag 1	Monster afwegen	2	✓	
	Extractie 1	3	✓	
Dag 2	Extractie 2	2	✓	
Dag 3	Extractie 3	1	✓	
	Reactiemix partij 1 en amplificatie	30 min. en 3 uren, 15 min.	✓	✓
	Reactiemix partij 2 en amplificatie	30 min. en 3 uren, 15 min.	✓	✓
	Gelelectroforese partij 1	2.5	✓	✓
Dag 4	Gelelectroforese partij 2	2.5	✓	✓

Gebruik van apparatuur zoals Thermocycler en Electroforese-syteem neemt daarbij weinig tijd voor arbeid, zoals het nemen van voorbereidingen en opruimen. Het proces kan overgelaten worden aan de automaat.

De kosten van DNA-technologie zijn op te splitsen in eenmalige investeringen, materiaalkosten per experiment en arbeidstijd. Onder eenmalige investeringen vallen behalve de aan te schaffen apparatuur ook de eventueel noodzakelijke verbouwkosten om de benodigde infrastructuur te kunnen realiseren. De kosten hangen per experiment van een aantal factoren af, waarbij een negatief monster evenveel kost als een positief monster. Bij dezen wordt echter de financiële begroting voor de analyse van het varkens-DNA tot het gebruik van hulpmiddelen, reagens en apparatuur beperkt. De begroting is voor 100 monsters in bijlage 3 aangegeven en tevens omgerekend met een koers van 3,35 SRD voor 1 USD (dagkoers op 19 november, 2012).

Tabel 10. Totale kosten aan artikelen, reagens en apparatuur

	SRD	USD
Hulpmiddelen en reagens	5,951.74	1,776.64
Apparatuur	62,007.4	18,509.62
Totaal	67,958.98	20,286.26

7 DISCUSSIE

Afhankelijk van de fabriek waar de vleesproducten worden geproduceerd, kunnen er bij eventuele onzorgvuldigheden contaminanten van andere vleessoorten en dus ook varkensvlees voorkomen in de verschillende producten ook al worden deze producten als halal omschreven. De mogelijkheid dat varkensvlees wordt aangetoond in de negatieve producten is aanwezig. Het verwerken van het varken tot varkensvlees en het op de markt brengen daarvan gebeurt in verschillende fasen, waarbij er enige kans bestaat dat kruiscontaminatie plaatsvindt.

Er zal, voor het voeren van een degelijk beleid, met betrekking tot de voedselveiligheid in Suriname, een betere structuur moeten worden uitgestippeld, waarbij de te volgen procedures ter harte worden genomen. Een goede samenwerking tussen de verschillende instanties die de voedselveiligheid monitoren, is van groot belang.

De verkregen resultaten kwamen overeen met de gestelde hypothese. De onderzochte frikandellen waarop er geen originele productbeschrijving was, bezaten ondanks de twijfels geen varkensvlees. Het belang van het kunnen uitvoeren van testen ter bepaling van de samenstelling van vleesproducten heeft zich bewezen. Een minpunt is dat het uitvoeren van de testen heel lang op zich heeft laten wachten. Het binnenhalen van de primers ter identificatie van het mogelijk aanwezige varkensvlees heeft langer dan een kwartaal geduurd. Ook het bij elkaar krijgen van overige benodigheden zorgde voor enige stagnatie. Het eindresultaat is echter geslaagd.

Uitbreiding van de PCR naar andere vakgebieden, met name het forensisch onderzoek is mogelijk indien er vanuit de betreffende instantie aanbevelingen uitgaan voor de aanschaf van specifieke primers ten behoeve van de verschillende soorten DNA onderzoek. Uitgebreider DNA-onderzoek zal zeker bijdragen tot het efficiënter uitvoeren van Opsporing en Forensisch onderzoek.

8 CONCLUSIE

Alle positieve uitslagen geven de juiste locatie (212 bp) voor varkens-DNA.

Uit de resultaten van het onderzoek blijkt 100% correlatie te zijn met de verwachte uitslag (door middel van het etiket) met uitzondering van het product zonder varkensvlees: Chicken viennas, chicken sausages. De positieve uitslag kan mede oorzaak zijn van verontreiniging tijdens het verwerkingsproces; vanaf het bewerken van de grondstof tot en met de procedures in handen van de onderzoeker lenen zich min of meer voor potentiële contaminatie.

Het adopteren van de methode uit het artikel “Identification of meat Species by Polymerase Chain Reaction (PCR) Technique” heeft in de praktijk uitgewezen dat de methode zeer toepasbaar is voor het aantonen van varkensvlees in vleesproducten. Dit kan met de juiste primers en met het reagens 5x PCR buffer (Promega) en DNA-Polymerase (Invitrogen Superscript mix) bij een Hot Start PCR van 35 cycli.

9 AANBEVELINGEN

Het identificeren van het varkensvleesgen in frikandellen en andere vleesproducten zal een aanzet moeten zijn voor verdere ontwikkeling van de voedselveiligheid en een aspect voor het forensisch onderzoek voor de Surinaamse gemeenschap. Belangrijk is dat werd aangetoond dat deze techniek goed toepasbaar is en relatief eenvoudig te gebruiken in een Surinaamse setting en dat de toepassingsgebieden van deze techniek met de nodige investering, ook in Suriname kunnen worden uitgebreid. Uitbreiding naar testen ter ondersteuning van forensisch onderzoek is met de nodige aanvoer van primers en overige reagentia mogelijk.

Inzetten van het Centraal Laboratorium voor het verrichten van de PCR op voedselproducten is aan te bevelen, daar dit laboratorium:

- reeds ervaring heeft in het testen van voedselproducten met behulp van andere testmethoden;
- beschikt over een zeer adequaat uitgerust gecertificeerd laboratorium volgens ISO 9001;
- beschikt over gekwalificeerd personeel;
- beschikt over de gepaste infrastructuur met de nodige equipments voor moleculaire diagnostieken zoals de conventionele PCR en de Real Time-PCR.

10 LITERATUURLIJST

1. Islam Religion, (2009). *Why Pork (Pig's Meat) is forbidden in Islam?*:
<http://www.quranreading.com/blog/islam-religion/why-pork-pigs-meat-is-forbidden-in-islam/>
2. Ilhak, I., Arslan, A., (2006). *Identification of Meat Species by Polymerase Chain Reaction (PCR) Technique*. Turk. Journal Vet. Anim. Sci. 2007; 31(3): 159-163. Research article.
3. Dagblad Suriname, dec.2011: http://www.dbsuriname.com/archief/nat/2011/dec11/29-12-11/Nat_Halal%20frikandel%20heeft%20varkensvlees%20.asp
4. Veiligheidsdossier van AgriHolland, (2011):
<http://www.agriholland.nl/dossiers/voedselveiligheid/home.html>
5. Folder HACCP Direct: <http://www.haccpdirect.nl/haccp-hygiene/voedselveiligheid/>
6. Sahilah, A., Norhayati, Y., (2011). *Halal authentication of raw meats using PCR amplification of mitochondrial DNA*. International Food Research Journal 18(4): 1489-149.
7. Lenstra, H., (2009). *Voedselveiligheid. Verdacht voedsel. DNA-onderzoek naar de herkomst van vlees*. Faculteit Diergeneeskunde, Universiteit Utrecht:
<http://www.uu.nl/faculty/veterinarymedicine/NL/Actueel/media/2009/november/Documents/20091101%20Voeding%20NU2.pdf>
8. Hsieh, H., Tsai, C., Tsai, L., Chiang, H., Huang, N., Shih, R., Linacre, A., Lee, J., (2005). *Species identification of meat products using the cytochrome b gene*. Forensic Science Journal 2005;4:29-36.
9. Sakr, A., n.d. *Waarom heeft de schepper varkensvlees verboden?*:
<http://www.moslimweb.nl/verbodenvlees.php>
10. Abdussalam, M., (n.d). *Health aspects of the consumption of pigmeat (pork)*:
www.firstchurchoftheinternet.org/pdf/PigMeat.pdf
11. Central Intelligence Agency, (2012). *The World Factbook*. Census over Suriname, augustus 2007: <https://www.cia.gov/library/publications/the-world-factbook/geos/ns.html>
12. Biesalski, H., (2005). *Meat as a component of a healthy diet – are there any risks or benefits if meat is avoided in the diet?* Meat Science Journal 70 (2005) 509–524.
13. European Food Safety Authority, (2011). *Technical specifications on harmonised epidemiological indicators for public health hazards to be covered by meat inspection of swine*. EFSA Journal 2011; 9(10): 2371.
14. Arkwriter, n.d. *Eating pork can be hazardous to your health*: <http://arkwriter.hubpages.com>

15. Kruidengeneeskunde, 2011. *Waarom het eten van varken slecht voor je is*:
<http://kruidengeneeskunde.wordpress.com/2011/04/19/waarom-het-eten-van-varkensvlees-slecht-voor-je-is/>
16. Bhagwandin, S., Dipowiriono, J., Eijk, A., Soekhoe, R., Tirtosentono, D., (2010). *Het opzetten en inrichten van een diagnostisch laboratorium en het opzetten van het Kwaliteitssysteem*. PTC–studenten projectonderzoek A994.
17. Tanabe, S., (2008). *Analysis of Food Allergen Structures and Development of Foods for Allergic Patients*. Biosci. Biotechnol. Biochem., 72 (3), 649–659.
18. Ministerie van Handel en Industrie, Consumenten Zaken: *Standaarden, Wat de consument moet weten!*: <http://www.minhi.gov.sr/index.php/Linkermenu/Consumenten>
19. NCBI Organism Overview, n.d. *Sus scrofa (pig)*:
<http://0-www.ncbi.nlm.nih.gov.ilsprod.lib.neu.edu/genome/84>
20. NCBI genome view, 2012, *Homo sapiens (human) genome view*:
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/mapview/map_search.cgi?taxid=9606
21. Pig Gene Mapping project, n.d.: <http://www.projects.roslin.ac.uk/pigmap/book.html>
22. The ArkDB database system, 2007-2012. *Pig (Sus scrofa) Chromosomen Karyotype*:
<http://www.thearkdb.org/arkdb/do/getChromosomeDetails?accession=ARKSPC00000001>
23. CBCNews Technology and Science, Canada, 2009. *Pig DNA sequence decoded*:
<http://www.cbc.ca/news/technology/story/2009/11/02/tech-biology-pig-dna-genome.html>
24. EMBL-EBI, European Nucleotide Archief ENA, n.d.,
<http://www.ebi.ac.uk/ena/data/view/AF039170>
25. Lenstra, J., Buntjer, J., Jansen, F., (2001). *On the origin of meat - DNA techniques for species identification in meat products*
26. Erwanto, Y., Abidin, M., Rohman, A., Sisindari, (n.d.). *Pig Species Identification in Meatballs Using Polymerase Chain Reaction Restriction Fragment Length Polymorphism for Halal authentication*. International food research journal 19 (3): 901-906 (2012)
27. Calvo, J., Zaragoza, P., Osta, R., (2001). *Technical note: A quick and more sensitive method to identify pork in processed and unprocessed food by PCR amplification of a new specific DNA fragment*. Journal Animal Science 79(8):2108-12.
28. Applied Biosystem, nd. *Real-Time PCR vs Traditional PCR*:
http://www6.appliedbiosystems.com/support/tutorials/pdf/rtpcr_vs_tradpcr.pdf

29. Vrije encyclopedie/ Karry Mullis: http://nl.wikipedia.org/wiki/Kary_Mullis
30. Kendall, L., Lela, K., (1999). *Polymerase Chain Reaction*. Volume 38 nr.6.
31. Ontwikkelen en analyseren van primers Webtool: <http://frodo.wi.mit.edu/primer3>
32. Arslan, A., Ilhak, I., Calicioglu, M., Karahan, M., (2005). *Identification of meats using random amplified polymorphic DNA (RAPD) technique*. Journal of Muscle Foods 16 (2005) 37–45.
33. Bijsluiter Invitrogen, 2005. *Superscript III Platinum One-Step Quantitative RT-PCR System with Rox*
34. Campbell, N., Reece, J., 2004. *Biology 7th edition*. ISBN0-8053-7171-0, hoofdstuk 20, paragraaf 20.2.
35. Theodore, E., (n.d.). *Setting up a PCR laborator*:
http://www.biosupplynet.com/pdf/01_PCR_Primer_p.5_14.pdf
36. Martens, A., Danneberg, J., Gerrits, J., (1999). Thema Moleculaire Biologie: *Kwaliteitsbewust werken met moleculaire biologische technieken* . Chem; 24: 329-334.
37. Ibrahim, A., (2008). *Improved DNA Extraction Method for Porcine Contaminant, Detection in Import Meat to The Saudi Market*. Saudi Journal of Biological Science 15 (2) 225-229 , ISSN 1319-562X.
38. Tanabe, S., Hase, M., (2007). *A Real-Time Quantitative PCR Detection Method for Pork, Chicken, Beef, Mutton, and Horseflesh in Foods*. Biosci, Biotechnol, Biochem., 71 (12), 3131-3135.
39. Material Safety Data Sheets online, Amresco: <http://www.amresco-inc.com>
40. Bio-Rad Webtool, PCR Doctor, PCR Troubleshooting: <http://www.bio-rad.com>

Bijlage 1. Informatie over MtDNA van varkenEMBL-CDS: **AAD05063.1** : *Sus scrofa* (pig) partial cytochrome oxidase subunit 2 View: [TEXT](#) [FASTA](#) [XML](#)Download: [TEXT](#) [FASTA](#) [XML](#)[Overview](#) [Source](#) [Feature\(s\)](#) [Other Features](#) [Assembly](#) [Sequence](#)

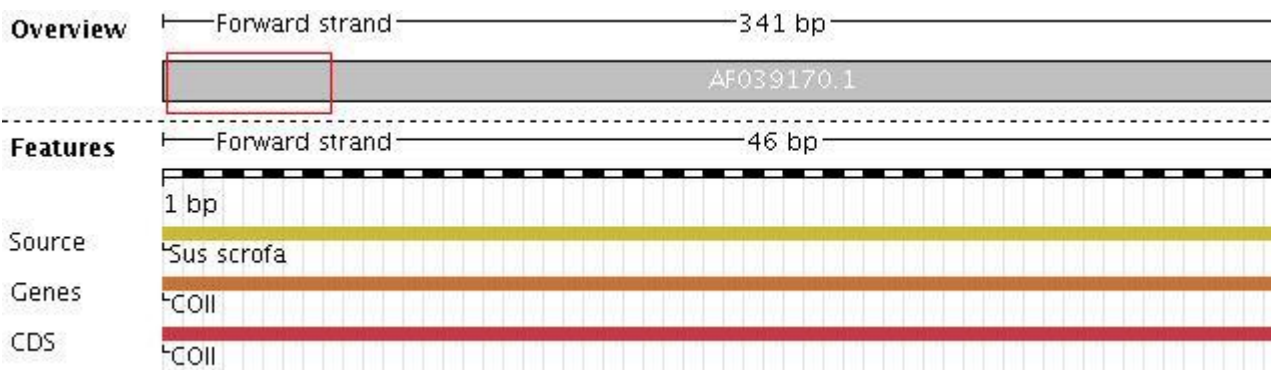
<i>Organism</i>	<i>Molecule type</i>	<i>Topology</i>	<i>Data class</i>	<i>Taxonomic Division</i>
Sus scrofa	genomic DNA	linear	STD	MAM
<i>Sequence length</i>	<i>Sequence Version</i>			
46	1			

Lineage

[Eukaryota](#), [Metazoa](#), [Chordata](#), [Craniata](#), [Vertebrata](#), [Euteleostomi](#), [Mammalia](#), [Eutheria](#), [Laurasiatheria](#), [Cetartiodactyla](#), [Suina](#), [Suidae](#), [Sus](#)

Navigation

- [↑](#) EMBL Bank Entry: [AF039170.1](#)
- [🏠](#) Taxon: [Taxon:9823](#)
- [➔](#) SVA [AAD05063](#)

Overview**Source Feature(s)**

Source(s)

[🏠](#) Taxon: [Taxon:9823](#)

source 1..46

organism *Sus scrofa*

organelle mitochondrion
tissue type peripheral blood

Other Features

CDS AF039170.1:<1..46
 codon_start 1
 transl_table 2
 transl_except (pos:AF039170.1:46,aa:TERM)
 Gene COII
 product cytochrome oxidase subunit 2
 Note TAA stop codon is completed by the addition of 3' A residues to the mRNA
 translation PLKYFEKWSTSMITG
 ↓ EMBL-Bank CDS: [AAD05063](#)
 → GOA [O99386](#)
 → UniProtKB/TrEMBL [O99386](#)

Assembly**No results****Sequence**

Base range: - of 46

>ENA|AAD05063|AAD05063.1 Sus scrofa (pig) partial cytochrome oxidase subunit 2
: Location:1..46

CCATTAAAGTACTTCGAAAAATGGTCAACATCAATATTAACAGGTT

Bijlage 2. Protocol Polymerase Chain Reaction

Materiaalverwerking

Sla voedselproducten bij -20°C op voor gebruik.

Weeg 2 g voedselproduct en plaats dit in een 15 ml polypropylene buis

DNA-extractie

Dag 1

1. Homogeniseer voedselproduct met 4 ml TNES oplossing (20 mM Tris, pH8; 150 mM NaCl en 10 mM EDTA) in een 15 ml Polypropylene buis.
2. Gebruik 750 μl van het mengsel in een 1.5 ml Eppendorf buis en voeg 10 μl Protease en 50 μl van 10% SDS.
3. Meng het mengsel incubeer bij 58°C in een waterbad voor een nacht.

Dag 2

4. Voeg 250 μl volume van 6M NaCl in het mengsel.
5. Centrifugeer bij 11.600 xg voor 5 minuten.
6. Voeg 500 μl supernatant mengsel in een andere eppendorf buis.
7. Voeg 300 μl phenol-chloroform-isoamylalcohol (25:24:1) in het mengsel.
8. Centrifugeer 11.600 x g voor 5 minuten.
9. Voeg 400 μl supernatant van het mengsel in een ander Eppendorf buis
10. Voeg 300 μl Chloroform toe.
11. Meng hard en centrifugeer 11.600 x g voor 5 minuten.
12. Plaats 300 μl supernatant in een andere Eppendorf buisje
13. Voeg 400 μl Absolute ethanol toe bij -20°C
14. Voeg 40 μl Natrium acetaat toe.
15. Vortex en bewaar bij -20°C voor een nacht. Mengsel kan ook bewaard worden bij -80°C voor 2 uren.

Dag 3

16. Centrifugeer 11.600 xg voor 10 minuten.
17. Verwijder het supernatant.
18. Voeg 400 μl van 70% ethanol toe aan het sediment.
19. Centrifugeer 11.600 xg voor 5 minuten.
20. Verwijder het ethanol door op kamertemperatuur te incuberen, geopend.
21. Los het sediment met 100 μl steriel H_2O op.

Reactiemix

1. Er wordt eerst een reactiemix gemaakt in een epje van 1,5 ml en van hieruit verdeeld in PCR-epjes met toevoeging van monster.

De volgende tabel bestaat uit een mix van de volgende reagentia, waarbij een extra meer dan het aantal monster wordt meegenomen:

Tabel 1. Reactiemix

Reagens	Hoeveelheid in μl
Nucleasevrij	27.35
5 x PCR buffer (Promega, Gotaq)	10
25 mM MgCl ₂	5
dNTP 250 μM	2
Primer forward 20 pmol	0.20
Primer reverse 20 pmol	0.20
Taq DNA-polymerase (Superscriptmix)	0.20

2. Meng het mengsel voorzichtig.
3. Breng 45 μl van bovenstaand mengsel in PCR-epjes en voeg 5 μl DNA-monster toe.
4. Plaats monster in het PCR-apparaat (Thermocycler).

Tabel 2. Polymerase Kettingreactieproces

Proces	Tijd	Temperatuur $^{\circ}\text{C}$
Activatie van Taq Polymerase "Hot Start"	10 minuten	95
PCR wordt uitgevoerd bij 35 cycli		
Denaturatie	45 seconden	94
Annealing	45 seconden	58
Extension	90 seconden	72

Note: Hot Start PCR is uitgevoerd door gebruikmaking van de Superscript mix Taq Polymerase

5. Maak een 2% agarose gel (100 ml gel) met 1x TBE-buffer.
6. Breng ook 4 μl marker op gel (afhankelijk van soort marker wordt een mix met loadingbuffer gemaakt volgens bijsluiter). Noteer welke slotjes voor de verschillende monsters gebruikt zijn.
7. Elektroforeer bij 100 Volt gedurende 2 uren en bekijk het gel onder UV-licht, maak een foto/print en noteer de resultaten.

Bijlage 3. Prijsoverzicht varkensvleesonderzoek**Methode: Conventionele Polymerase Kettingreactie****Artikel: Identification of meat species by Polymerase Chain Reaction****Datum: 19-11-2012****Aantal samples: 100****Koers: 1 USD= 3,35 SRD, 1 EURO=4,17 SRD**

Items	Catalog #	Inhoud	unit	prijs per stuk	USD	EUR	SRD
Reagens voor extractive							
Tris (pH 8,0)	ICN19485580	100 g	1	36.70	36.70		122.95
NaCl	MSX04201	500 g	1	16.77	16.77		56.18
EDTA	AC32720-1000	100 g	1	55.00	55.00		184.25
Protease	19155	2 ml	1	68.80	68.80		230.48
10% SDS	ICN19483125	25 g	1	46.50	46.50		155.78
Phenol-chloroform-iso amyl alcohol (25:24:1)	BP17521100	100 ml	1	80.60	80.60		270.01
Chloroform	AC15821-0010	1 liter	1	61.70	61.70		206.70
Absolute ethanol	AC61509-0010	1 L	1	96.10	96.10		321.94
Sodium acetate / natrium acetaat	S2889	250 g	1	33.30		33.30	138.86
70% ethanol	in het lab verdund						
d H2O sterile	geautoclaveerde steriel Aqua Dest						
Reactiemix							
10 x PCR Buffer	50-720-3980	3x1 ml	1	58.00	58.00		194.30
25 mM MgCl ₂	FERR0971	4x1.25 ml	1	16.16	16.16		54.14
Dntp 250 µM	PRU1515	1 ml	1	65.52	65.52		219.49
Taq DNA-polymerase	D4545-50UN	50 UN	1	37.50		37.50	156.38
primer forward			1			25.00	104.25
primer reverse			1			25.00	104.25
Nuclease free water (voor het verdunnen van primers en voor negatieve controle)	W4502	1 L	1	65.20		65.20	271.88
Electroforese							
Agarose gel 1.5 %	FERR0491	100 g	1	136.60	136.60		457.61
Ethium bromide 0.5 ug/ml	E7637-1G	1 g	1	50.50		50.50	210.59
DNA ladder	50-811-776	500 ug/ ml	1	68.90	68.90		230.82

TBE 10x buffer	AC32733-0010	1 L	1	48.00	48.00		160.80		
Hulpmiddelen									
Micro-tips 0.1 - 20 µl	02-707-470	960 stuks/pak	2	109.00	218.00		730.30		
Micro-tips 10-100 µl	02-707-431	960 stuks/pak	1	122.00	122.00		408.70		
Micro-tips 100-1000 µl	02-707-404	960 stuks/pak	1	136.00	136.00		455.60		
PCR clean Microcentrifuge tubes 0.5 ml/ pack of 500	13-698-790	250 stuks/pak	1	38.36	38.36		128.51		
PCR clean Micro centrifuge tubes 2.0 ml / Pack of 500	13-698-792	250 stuks/pak	1	38.36	38.36		128.51		
15 ml Polypropylene tube	352099	Case/ 500 stuks	1	65.00	65.00		217.75		
Powder free small (50 paren) of	Lokaal	1 pak	3	9.18	9.18		30.75		
TOTAAL				 totaal	1,482.25	236.50	5,951.74	1,776.64	1,427.28
				(Omzetting SRD)	4,965.54	986.21	5,951.74		
				Voor 1 test	1		59.52	17.77	14.27
				voor 25 testen maximaal tijdens onderzoek			1,487.94	444.16	356.82
				voor 40 testen maximaal tijdens onderzoek			2,380.70	710.66	570.91
APPARATUUR									
Balance	S94793B		1	93.00	93.00		311.55		
Cleanroom									
Vriezer -20C	n.v.t.								
Koelkast met vriezer	Lokaal	11 cft		559.70	559.70		1,875.00		
Vortex	n.v.t.								
Centrifuge mini /Fisher Scientific* Mini Centrifuges	S67601A	115V 50/60Hz	1	279.00	279.00		934.65		
pipetten eppendorf 0.5-10µl	TI13-690-026		1	220.00	220.00		737.00		
pipetten eppendorf 10-100µl	TI13-690-029		1	220.00	220.00		737.00		
pipetten eppendorf 20-200µl	n.v.t.								
pipetten eppendorf 100-1000µl	TI13-690-032		1	220.00	220.00		737.00		
Extractieroom									
PCR Flowkast	16-108-268	Filtered PCR Enclosure; 2 ft. No monitor; UV lamp		5,639.52	5,639.52		18,892.39		
Staande vriezer -20C	n.v.t.								
Koelkast met vriezer	Lokaal	11 cft		559.70	559.70		1,875.00		
centrifuge (11.600 xg)/ Fisher Scientific* accuSpin Micro 17/Micro 17R Microcentrifuges	S98645	9.5L x 8.9W x 13.8 in.H	1	1,914.00	1,914.00		6,411.90		
Centrifuge mini /Fisher Scientific* Mini Centrifuges	n.v.t.		1						

waterbad (58C)	S63076Q	5 L	1	800.00	800.00		2,680.00		
Vortex	S25F7087G		1	200.00	200.00		670.00		
Thermoblok	n.v.t.								
pipetten eppendorf 0.5-10µl	TI13-690-026		1	220.00	220.00		737.00		
pipetten eppendorf 10-100µl	TI13-690-029		1	220.00	220.00		737.00		
pipetten eppendorf 20-200µl	n.v.t.								
pipetten eppendorf 100-1000µl	TI13-690-032		1	220.00	220.00		737.00		
PCR room									
Real time RT-PCR	n.v.t.								
Electroforese klein en groot	09-528-110B	12-20 wells	1	587.00	587.00		1,966.45		
Laptop met printer en UPS	n.v.t.								
pipetten eppendorf 0.5-10µl	TI13-690-026		1	220.00	220.00		737.00		
pipetten eppendorf 10-100µl	n.v.t.								
pipetten eppendorf 20-200µl	n.v.t.								
pipetten eppendorf 100-1000µl	n.v.t.								
Vriezer -20C	n.v.t.								
Koelkast met vriezer		11cft		559.70	559.70		1,875.00		
Vortex	n.v.t.								
Dark room									
PCR Flowkast 1	n.v.t.								
Thermocycler	EW-02662-00	24 x 0.2 mL	1	4,670.00	4,670.00		15,644.50		
Transilluminator	11-992-139	312nm	1	1,108.00	1,108.00		3,711.80		
pipetten eppendorf 0.5-10µl	n.v.t.								
pipetten eppendorf 10-100µl	n.v.t.								
pipetten eppendorf 20-200µl	n.v.t.								
pipetten eppendorf 100-1000µl	n.v.t.								
								USD	Euro
				Totaal	18,509.62	0.00	62,007.24	18,509.62	14,869.84
				Omzetting SRD	62,007.24	0.00	62,007.24		
				TOTAAL	67,958.98			20,286.26	16,297.12