

Aus dem Institut für Hygiene und Technologie  
der Lebensmittel tierischen Ursprungs  
der Tierärztlichen Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität München

Lehrstuhl: Univ.-Prof. Dr. Dr. h. c. A. Stolle

**Drei kommerzielle Testkits zur Tierartenidentifikation in  
Fleischerzeugnissen im Vergleich**

Inaugural-Dissertation  
zur Erlangung der tiermedizinischen Doktorwürde  
der Tierärztlichen Fakultät  
der Ludwig-Maximilians-Universität München

von  
Elisabeth Johanna Stüber  
aus  
Starnberg

München 2007

**Gedruckt mit der Genehmigung der Tierärztlichen Fakultät der  
Ludwig-Maximilians-Universität München**

Dekan: Univ.-Prof. Dr. E. P. Märtlbauer

Referent: Univ.-Prof. Dr. Dr. h.c. A. Stolle

Korreferent: Prof. Dr. H. Kaltner

Tag der Promotion: 20. Juli 2007

**Für Freunde und Familie**



## Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung.....	1
2	Literatur.....	2
2.1	Grundlagen der Tierartenidentifizierung.....	2
2.1.1	Begriffsdefinitionen.....	2
2.1.2	Religiöse Tabus.....	3
2.1.3	Gesundheitliche Risiken.....	3
2.1.4	Konsumeinflüsse.....	4
2.1.5	Verfälschungsmöglichkeiten.....	5
2.1.6	Verfälschungen in Zahlen.....	6
2.1.7	Rechtliche Bestimmungen.....	8
2.2	DNS-Analytik.....	10
2.2.1	Grundlagen der DNS-Amplifikation.....	10
2.2.1.1	Desoxyribonukleinsäure (DNS).....	10
2.2.1.2	Denaturierung und Schmelzpunkt.....	12
2.2.1.3	Hybridisierung.....	13
2.2.1.4	Polymerase-Kettenreaktion (PCR).....	13
2.2.1.5	Effizienz der PCR.....	15
2.2.1.6	Primer.....	16
2.2.2	Grundlagen der DNS-Visualisierung.....	17
2.2.2.1	Gelelektrophorese mit Ethidiumbromidfärbung.....	18
2.2.2.2	DNS-Chiptechnologie.....	19
2.2.3	DNS-Analytik in der Tierartenidentifizierung.....	19
2.2.3.1	Das Cytochrom b-Gen.....	20
2.2.3.2	Tierarten-PCR mittels Spezies-spezifischer Primer.....	21
2.2.3.2.1	Nicht-kommerzielle Spezies-spezifische Primer.....	22
2.2.3.2.2	Kommerzielle Spezies-spezifische Primer.....	26
2.2.3.2.3	Zeit- und Kostenaufwand.....	29
2.2.3.3	Tierartenidentifizierung mittels DNS-Chip.....	30
2.3	Immunologische Analytik.....	34
2.3.1	Antigen und Antikörper.....	34
2.3.2	Mono- und polyklonale Antikörper.....	35
2.3.3	Proteine als Antigene.....	37
2.3.4	Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay (ELISA).....	38
2.3.5	Der ELISA in der Tierartenidentifizierung.....	40
2.3.5.1	Nicht-kommerzielle ELISA-Anwendungen.....	40
2.3.5.2	Kommerzielle ELISA-Testkits.....	45
2.3.5.3	Zeit- und Kostenaufwand.....	51
2.4	Vergleich verschiedener Methoden zur Tierartenidentifizierung.....	53
2.4.1	Überblick über vorhandene Methoden.....	53
2.4.1.1	DNS-basierende Methoden.....	53
2.4.1.1.1	DNS-Sonden Hybridisierung.....	53
2.4.1.1.2	Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD).....	53
2.4.1.1.3	PCR mit spezifischen Primerpaaren.....	54
2.4.1.1.4	Forensically Informative Nucleotide Sequencing (FINS).....	54
2.4.1.1.5	Restriktions-Fragment-Längen-Polymorphismus (RFLP).....	54
2.4.1.1.6	Hybridisierung.....	55

2.4.1.1.7 Single Strand Conformational Polymorphism (SSCP).....	55
2.4.1.2 Protein-basierende Methoden.....	55
2.4.1.2.1 Elektrophoretische Verfahren.....	55
2.4.1.2.1.1 Polyacrylamid-Gel-Elektrophorese (PAGE).....	56
2.4.1.2.1.2 Isoelektrische Fokussierung (IEF).....	56
2.4.1.2.2 Immunologische Verfahren.....	57
2.4.1.2.2.1 Doppelte Geldiffusion nach Ouchterlony.....	57
2.4.1.2.2.2 Countercurrent Immunelektrophorese (CIE).....	57
2.4.1.2.2.3 ELISA.....	57
2.4.1.3 Sonstige Methoden.....	58
2.4.1.3.1 Fettsäuremuster.....	58
2.4.1.3.2 Verhältnis histidinhaltiger Peptide.....	58
2.4.2 Direkte Vergleiche verschiedener Methoden.....	58
2.4.2.1 Vergleich DNS-basierender Methoden.....	60
2.4.2.2 Vergleich DNS-basierender mit Protein-basierenden Methoden.....	60
2.4.2.3 Vergleich Protein-basierender Methoden.....	63
2.4.2.4 Vergleich Protein-basierender mit sonstigen Methoden.....	64
3 Eigene Untersuchungen.....	65
3.1 Material.....	65
3.1.1 Proben.....	65
3.1.1.1 Vorversuchsproben.....	65
3.1.1.2 Hauptversuchsproben.....	65
3.1.2 Testkits und Polymerasen.....	66
3.1.3 Geräte.....	67
3.1.4 Verbrauchsmaterialien.....	68
3.2 Methoden.....	69
3.2.1 Etablierung des CIB-A-Kit.....	69
3.2.1.1 Komponenten des Premix.....	69
3.2.1.2 Temperaturprogramm.....	72
3.2.1.3 Agarose-Gelelektrophorese.....	73
3.2.2 Herstellung der Modellwürste für den Hauptversuch.....	75
3.2.3 Probenaufbereitung.....	75
3.2.4 DNS-Extraktion.....	76
3.2.5 PCR und Elektrophorese mit CIB-A-Testkit.....	78
3.2.6 PCR und Hybridisierung mit CarnoCheck®-Testkit.....	81
3.2.7 Protein-Extraktion.....	83
3.2.8 ELISA mit Transia-Testkit.....	84
3.3 Ergebnisse.....	87
3.3.1 Etablierung des CIB-A-Kit.....	87
3.3.1.1 Polymerase.....	87
3.3.1.2 Annealingtemperatur.....	89
3.3.1.3 Gelkonzentration.....	91
3.3.2 Untersuchung der Vorversuchsproben.....	92
3.3.3 Untersuchung der Modellwürste im Hauptversuch.....	94
3.3.3.1 Allgemeine Betrachtung der Ergebnisse.....	97
3.3.3.2 Statistische Betrachtung der Ergebnisse.....	100
3.3.4 Kostenkalkulation der Methoden im Hauptversuch.....	105
3.3.4.1 Polymerasen, Reagenzien und Testkits.....	106

3.3.4.2	Geräte.....	107
3.3.4.3	Verbrauchsmaterial.....	109
3.3.4.4	Zusammenfassung des Kostenaufwandes.....	110
3.3.5	Zeitaufwand der Methoden im Hauptversuch.....	111
3.3.5.1	Homogenisierung.....	111
3.3.5.2	DNS-Extraktion.....	112
3.3.5.3	CIB-A-Kit.....	112
3.3.5.4	CarnoCheck®.....	112
3.3.5.5	Protein-Extraktion und ELISA.....	112
3.3.5.6	Zusammenfassung des Zeitaufwandes.....	113
4	Diskussion.....	114
4.1	Vorversuch.....	114
4.2	Hauptversuch.....	118
4.2.1	Allgemeine Betrachtung der Ergebnisse.....	118
4.2.2	Sensitivität.....	120
4.2.3	Spezifität.....	122
4.2.4	Kostenaufwand.....	123
4.2.5	Zeitaufwand.....	124
4.3	Zusammenfassende Bewertung der Testkits.....	126
5	Schlussfolgerungen.....	128
6	Zusammenfassung.....	129
7	Summary.....	131
8	Anhang.....	133
8.1	Material-Tabellen.....	133
8.2	Ergebnis-Tabellen.....	135
8.3	Statistik-Tabellen.....	139
8.4	Kosten-Tabellen.....	152
8.5	Zeit-Tabellen.....	155
9	Verzeichnisse.....	156
9.1	Abbildungsverzeichnis.....	156
9.2	Tabellenverzeichnis.....	157
9.3	Abkürzungsverzeichnis.....	159
9.4	Literaturverzeichnis.....	162
9.4.1	Literatur.....	162
9.4.2	Amtliche Sammlung von Untersuchungsverfahren nach § 64 LFGB.....	192



## 1 Einleitung

Als Folge des allgemein steigenden Informationsbedürfnisses des Verbrauchers rückt auch die Lebensmittelproduktion und deren Überwachung vermehrt ins Interesse der Öffentlichkeit. Eine ausführliche und verlässliche Kennzeichnung der Lebensmittel ist daher unumgänglich geworden. Doch nicht nur in der Überprüfung korrekter Etikettierungen findet der Bereich der Lebensmittelanalytik Anwendung, ebenso gilt es, hierdurch die Produktionsqualität zu sichern. Für Fleischerzeugnisse spielt in diesem Zusammenhang insbesondere die Überprüfung der Tierartzugehörigkeit des verwendeten Fleisches eine Rolle. Neben dem prinzipiellen gesetzlichen Schutz der Verbraucher vor Täuschung bei der Verwendung von Fleisch nicht oder falsch deklariertes Spezie, lassen auch religiöse Tabus und gesundheitliche Risiken der Tierartenidentifikation in Lebensmitteln einen hohen Stellenwert zukommen. Um den raschen Abläufen der Lebensmittelproduktion gerecht zu werden, sind für die Routinediagnostik auch im Bereich des Tierartennachweises zuverlässige, günstige und schnelle Verfahren notwendig.

In Anbetracht dieses Sachverhaltes war es daher das Ziel dieser Arbeit, verschiedene Methoden zur Tierartenidentifizierung in Fleischerzeugnissen auf ihre Tauglichkeit im Routineeinsatz zu prüfen. Um die Reproduzierbarkeit und die Einsatzfähigkeit für den Routinebetrieb zu erhöhen, kamen für den Vergleich nur kommerziell erhältliche Testkits zum Einsatz. Den Bereich der protein-basierenden Verfahren vertrat der ELISA-Testkit von Transia. Dieser ist als einziger der getesteten Methoden bereits in die Untersuchungsverfahren der Amtlichen Sammlung nach § 64 des Lebensmittel- und Futtermittelgesetzbuches (LFGB) aufgenommen. Für den Bereich der Desoxyribonukleinsäure (DNS)-Analytik wurde einerseits ein DNS-Chip (CarnoCheck®) und andererseits eine Polymerase Kettenreaktion (PCR) auf Basis von Spezie-spezifischen Primern (CIB-A-Kit) eingesetzt. Mit der Untersuchung von Modellwürsten sollten die Methoden auf Unterschiede in der Sensitivität, der Spezifität und des finanziellen Aufwandes betrachtet werden. Desweiteren interessierte die Handhabung und der zeitliche Rahmen der Durchführung der unterschiedlichen Verfahren in Bezug auf ihren möglichen routinemäßigen Gebrauch.

## **2 Literatur**

### **2.1 Grundlagen der Tierartenidentifizierung**

Die Notwendigkeit der Tierartenidentifizierung in Fleisch und Fleischerzeugnissen ergibt sich unter anderem aus dem Schutz des Verbrauchers, welcher in rechtlichen Vorschriften festgelegt ist. Anhand von Begriffsdefinitionen und einer Auswahl an verbraucherorientierten Gründen für den Nachweis von Tierarten soll ein Überblick über die Thematik des Einsatzes der Tierartenidentifizierung vorgestellt werden und ein Einblick in die rechtlichen Grundlagen gegeben werden. Auf die Verwendung der Tierartenidentifizierung in anderen Gebieten, wie z.B. in den Bereichen der Forensik (ZEHNER et al. 1998), der Populationsforschung (PAXINOS et al. 1997) und des Artenschutzes (MALISA et al. 2005), wird in dieser Arbeit nicht näher eingegangen.

#### **2.1.1 Begriffsdefinitionen**

Die Ausdrücke Tierartendifferenzierung, Tierartennachweis, Tierartenbestimmung und Tierartenidentifizierung werden oft synonym verwendet. Auf die genaue Bedeutung der Begriffe sollte jedoch näher geachtet werden. HOFMANN (1997a) und HONIKEL (1999) wiesen darauf hin, dass ein Nachweis chemisch gesehen immer qualitativ ist. Dagegen kann eine Bestimmung sich auf eine qualitative oder eine quantitative Aussage beziehen. Immer als qualitativ zu betrachten ist daher der Tierartennachweis. Für am geeignetsten hielt HOFMANN den Ausdruck Identifizierung. Die Unterscheidung verwandter Fleischarten, wie z.B. Huhn und Pute, wird als Differenzierung bezeichnet (HOFMANN 1997a).

Für die gewerbsmäßige Herstellung von Fleischerzeugnissen versteht man unter „Fleisch“ nach den Leitsätzen für Fleisch und Fleischerzeugnisse (LMLFleisch) Skelettmuskulatur mit anhaftendem oder eingelagertem Fett- und Bindegewebe sowie eingelagerten Lymphknoten, Nerven, Gefäßen und Schweinespeicheldrüsen (LMLFleisch I. 1.1). Um Fleischerzeugnisse handelt es sich bei Erzeugnissen, die ausschließlich oder überwiegend aus Fleisch nach oben genannter Definition bestehen (LMLFleisch I. 2.).

### **2.1.2 Religiöse Tabus**

Ein Grund, die Deklaration von Fleisch und Fleischerzeugnissen zu überprüfen, ist die religiös begründete Ablehnung bestimmter Bevölkerungsgruppen, Fleisch spezieller Tierarten zu verzehren. Diesbezüglich werden schon geringste Mengen der vom Verzehr ausgeschlossenen Tierart in Lebensmitteln abgelehnt (WALKER et al. 2003). Diese Tatsache spielt nicht nur für den innerdeutschen Markt eine Rolle, sondern ist besonders für Exporte in bestimmte Länder von Interesse (CANDRIAN 1994).

In Islam und Judentum ist der Verzehr von Schweinefleisch nach schriftlich festgelegten Religionslehren verboten (Koran 2,173 bzw. 3. Buch Mose 11). Der Islam stellt mit geschätzten 1,5 Milliarden Anhängern nach dem Christentum die zweitgrößte Weltreligion dar (N. N. 2006b). In Deutschland sind 3% (~2,48 Millionen) der Bevölkerung Muslime (N. N. 2006c). Das Judentum hat dagegen nur 108 000 Anhänger (~0,13%) in Deutschland (N. N. 2006d) und macht global betrachtet ca. 0,2% der Weltbevölkerung aus (N. N. 2007b).

Für den Verzehr von Rindfleisch gibt es andererseits im Hinduismus ein religiöses Tabu, welches in Teilen Indiens durch Einschränkungen oder Verbote des Schlachtens von Rindern gesetzlich verankert ist (N. N. 2007c). In Europa sind Anhänger des Hinduismus, der nach dem Christentum und Islam drittgrößten Religion der Erde, vor allem in Großbritannien zu finden (N. N. 2007a). FESSLER und NAVARRETE (2003) erläutern allgemein die möglichen Ursachen, die zu einer Tabuisierung von Fleisch führten.

### **2.1.3 Gesundheitliche Risiken**

Neben den religiösen Forderungen, einige Tierarten vom Verzehr auszuschließen, sind auch gesundheitliche Risiken durch das Fleisch bestimmter Spezies möglich. Die Verfälschung von Fleischerzeugnissen birgt beispielsweise die Gefahr, mit exotischem Fleisch Parasiten einzuschleppen (MEYER et al. 1993). Ferner besteht ein erhöhtes Risiko, vor allem in Geflügelfleisch vorkommende Bakterien wie Salmonellen auf andere Fleischsorten zu übertragen. Die übliche Erhitzungstemperatur des roten Fleisches kann dann möglicherweise nicht mehr ausreichend sein, um eine Gesundheitsgefährdung auszuschließen (BUNTJER und LENSTRA 1998, SHEU und HSIEH 1998). Diese Bedenken bestehen keineswegs nur bei betrügerischen Zusätzen von Fleisch nicht deklariertes

Spezies, sondern ebenso bezüglich der ungenügenden Reinigung und des damit verbundenen Hygierisikos in Zusammenhang mit pathogenen Bakterien (CANDRIAN 1994).

CALVO et al. (2002) sprachen neben den Risiken durch Parasiten und Bakterien bei nicht deklariertem Schweinefleisch auch den Aspekt der Allergien an. Hier besteht die Gefahr für die Gesundheit des Verbrauchers in der Aufnahme bestimmter immunogener Proteine (ROSSMANITH und BAUER 1994). Ein Beispiel stellt Rinderprotein dar, das Auslöser einer Rindfleischallergie sein kann, deren Inzidenz von FIOCCHI et al. (2000) mit bis zu 0,3% in der italienischen Bevölkerung angegeben wurde. Allgemein gesehen kann Fleisch einen Anteil von 8,2% der eine Lebensmittelallergie bei Erwachsenen auslösenden Substanzen ausmachen (WÜTHRICH 1993). Ferner werden tierartspezifische Seuchen als gesundheitliche Gefahr betrachtet, sodass bovine spongiforme Enzephalopathie (BSE)-Fälle, die Maul- und Klauenseuche sowie die Aviäre Influenza negative Auswirkungen auf den Fleischverbrauch bestimmter Tierarten hatten (WINDHORST 2006).

#### **2.1.4 Konsumeinflüsse**

Die Angst, sich mit BSE bzw. der neuen Variante der Kreuzfeld-Jakob-Krankheit über Rinderprodukte zu infizieren, ließ den Rindfleischkonsum in Deutschland von 10,4 kg pro Kopf 1999 auf 6,8 kg 2001 sinken. Die starke Zurückhaltung der Konsumenten in Europa, Afrika und Asien bewirkte so einen weitgehenden Zusammenbruch des Handels mit Rindfleisch in diesen Regionen (WINDHORST 2005). Mittlerweile ist der durchschnittliche pro Kopf-Verbrauch wieder angestiegen (Deutschland 2004: 8,8 kg) (N. N. 2004). Dennoch ist für die weitere Verbesserung der Situation das Vertrauen des verunsicherten Konsumenten nötig. Um dieses zurück zu gewinnen, ist eine korrekte Deklaration der Produkte und der Einsatz sicherer Nachweisverfahren zur Überprüfung von rindfleischfreien Produkten wichtig (BRODMANN und MOOR 2003, SCHWÄGELE 2005).

Doch nicht nur zur Vertrauensbildung bei Lebensmittelskandalen ist eine verlässliche Etikettierung erforderlich, auch das steigende Qualitätsbewusstsein der Verbraucher orientiert sich an der Lebensmittelkennzeichnung. Ferner nimmt die Bedeutung der Authentizität eines Produktes durch den Wegfall der EU-internen Grenzkontrollen zu (ZIERLER et al. 2004). Nach BINKE et al. (2005) wird in Zukunft die Nachfrage nach qualitativ hochwertigen und sicheren Produkten noch stärker werden und die korrekte Kennzeich-

nung vom Verbraucher geforderter Qualitätsprodukte wird unumgänglich (CALVO et al. 2001), sodass auch die amtliche Überwachung der Produkte an Bedeutung gewinnt.

### **2.1.5 Verfälschungsmöglichkeiten**

Als Verfälschung wird der Zusatz bzw. der Nichtentzug geringwertiger Stoffe zu einem Lebensmittel oder die Verringerung wert bestimmender Inhaltsstoffe verstanden, durch die eine bewusste Verschlechterung eintritt, ohne dass eine ausreichende Kennzeichnung des Produktes vorliegt (FEHLHABER 2000). Dadurch zählt auch der Zusatz von Fleisch einer nicht deklarierten Spezies als Verfälschung.

Jede Angebotsform, in der Fleisch in den Verkehr gebracht wird, birgt verschiedene Möglichkeiten für Verfälschungen. In frischem Zustand als Hälfte, Viertel oder Teilstück ist es für den geübten Betrachter meist unproblematisch, die Tierart rein visuell korrekt zu identifizieren. Hierdurch ist auch die Gefahr möglicher Verfälschungen minimiert. Anders sieht es bei Tiefkühlware aus, einerseits beeinträchtigt die Verpackung die visuelle Kontrolle und andererseits erschwert auch der gefrorene Zustand die Zuordnung zu einer Tierart. Hinzukommt die häufige Weiterverarbeitung der Tiefkühlware ohne vorheriges Auftauen. Das größte Risiko ist in zerkleinertem oder gewolftem Fleisch zu sehen, da diese durch den Strukturverlust für Verfälschung besonders anfällig sind (PATTERSON und JONES 1990, MARTÍN et al. 1988b). KANG'ETHE et al. (1982) sahen die Problematik ebenfalls vor allem in gefrorenem, entbeintem oder gewolftem Fleisch. Denn eine Differenzierung ist in diesen Fällen rein visuell oder mit einfachen physiko-chemischen Methoden schwierig durchzuführen. Zu Kontaminationen, die eine Verunreinigung mit unerwünschten Stoffen darstellen (FRIES 2000), kann es dagegen in jeder Stufe der Produktionskette kommen.

Schon SINELL et al. (1991) stellten fest, dass die Tierartenidentifizierung von Fleisch und Fleischerzeugnissen ein wiederkehrendes Problem in der Lebensmitteluntersuchung ist. Verbotene und exotische Tierarten wie Wal und Känguru waren in früheren Jahren meist der Anlass zu Reklamationen. Um 1958 wurden beispielsweise große Mengen gefrorenes Walfleisch nach Deutschland eingeführt und nur ein Teil davon wurde ordnungsgemäß deklariert vermarktet. Ähnliches geschah mit hunderten Tonnen gefrorenem Kängurufleisch und auch Falschdeklarationen von Pferdefleisch als „Rindsgulasch“ sorgten für Skandale (SINELL 1968). Anfang der Neunziger Jahre wurde beispielsweise

afrikanischer Springbock als österreichisches Reh falsch deklariert auf den Markt gebracht (STOLLE 2007a). Im Gegensatz zu den damaligen großen Mengen an Pferdefleisch oder Fleisch von exotischen Tierarten, verursachen heutzutage eher sehr geringe Mengen Fleisch der bei uns üblichen Farmtiere Probleme im Hinblick auf Verbrauchertäuschung durch Nicht- oder Falschdeklarationen (HSIEH et al. 1996).

So ist beispielhaft Geflügelfleisch, vornehmlich von Huhn und Pute, eine gute Eiweißquelle, die außerdem billiger als rotes Fleisch ist. In Zusammenhang mit der Zunahme der Herstellung mechanisch separierten Geflügelfleisches, wird hierdurch das Risiko für die Verfälschung von rotem Fleisch durch Geflügelfleisch erhöht (MARTÍN et al. 1991). Daher wird unter anderem in Österreich besonderer Wert auf den Nachweis von Huhn-muskelprotein gelegt, um diesem Trend zu begegnen (ROSSMANITH und BAUER 1994). Desweiteren ist die Unterscheidung zwischen Huhn und Pute von Bedeutung, da Putenfleisch teurer als Fleisch vom Huhn ist und eine Tendenz zu Verfälschungen von Putenprodukten mit Hühnerfleisch nachweisbar ist (MARTÍN et al. 1989).

Der finanzielle Beweggrund für die Substitution von teurerem mit billigerem Fleisch ist hierbei offensichtlich, dagegen ist der Grund für umgekehrte Zusätze nicht sofort erkennbar. Vorwiegend handelt es sich um eine Verwertung nicht vermarktbarer Teilstücke. So kann auch der höhere, gesetzlich festgelegte Grenzwert des Fettgehaltes bei Schweinefleisch dazu führen, dass sehr fetthaltige Rinderstücke Schweinefleischerzeugnissen beigefügt werden (HSIEH et al. 1996, Anlage 1 LMKV).

### **2.1.6 Verfälschungen in Zahlen**

In der Literatur lassen sich zahlreiche Untersuchungen über die Prüfung der Zusammensetzung von Handelsproben finden (MEYER et al. 1994a, HSIEH et al. 1995, 1996, 1998, MARTIN et al. 1998, BEHRENS et al. 1999, HEMPEL und BUSCH 2000, BRODMANN et al. 2001, WEINGARTEN und KLARE 2001, AYAZ et al. 2006). Beispielsweise untersuchten HSIEH et al. (1996) in Alabama Schweinefleisch und Schweinewürste als Zufallsproben auf Verfälschungen bzw. Kontaminationen mit anderen Tierarten. In 99% des untersuchten Schweinehackfleisches wurde Rind und in 18% Geflügel nachgewiesen. Bei den Würsten waren 96% mit Rind, 38% mit Geflügel und 2% mit Schaf verunreinigt. Die Tierart Rind machte, wie auch in einer vorherigen Untersuchung in Florida (HSIEH et al. 1995) den Hauptanteil der nicht deklarierten Spezies aus. Die Hauptursa-

che hierfür wurde in der fehlenden Reinigung der verwendeten Geräte während der Produktion gesehen. Obwohl MARTIN et al. (1998) davon ausgingen, dass unsaubere Arbeitsgeräte höchstens zu Beimengungen in Höhe von 3-5% führen, verstoßen Hersteller von Fleischerzeugnissen damit gegen die Sorgfaltspflicht (BREHMER 1998). Bleiben Reste von z.B. Rindfleisch im Kutter zurück, kann ein Test auf die Spezies Rind, je nach Sensitivität der verwendeten Methode, für die nachfolgend im kontaminierten Kutter gefertigten Produkte positiv ausfallen (BÖHMLER 2001). SCHWÄGELE (2001b) wies, neben den Verunreinigungen und dem Verbleib von Fleischresten in Maschinen wie Fleischwolf, Kutter und Füllmaschine bei der Herstellung, auch auf das Risiko der Kontamination in Verkaufsstellen durch Handkontakte des Verkaufspersonals hin. Bereits GLESSON et al. (1983) erwähnten, dass Unachtsamkeit im Umgang mit Fleisch zu Problemen bei Lebensmittelkontrollen führen kann, falls es zu nachweisbaren Kontaminationen mit nicht deklarierten Tierarten kommt. So kann es beim Zusatz verschiedener Zutaten auch zu versehentlichen, nicht „böswilligen“ Kontaminationen kommen. Beispielsweise bereitete ein Braten-Fond, bei dem die Tierart Rind nicht deklariert war, dadurch Probleme (STOLLE 2007b).

Tabelle 1 zeigt beispielhaft für die amtlich durchgeführten Analysen einen Auszug aus den Untersuchungsergebnissen des Bayerischen Landesamtes für Gesundheit und Lebensmittelsicherheit (LGL) für das Jahr 2005. Die Zahlen verdeutlichen, wie hoch die Lieferbeanstandungen aufgrund von Irreführung und anderen Kennzeichnungsmängeln sind.

Tab. 1 Auszug der Untersuchungsergebnisse des Bayerischen LGL im Jahr 2005 (N. N. 2006a)

Warengruppe	Anzahl beanstandet		Quote [%]	08	11
Fleischerzeugnisse warmblütiger Tiere	1319	411	31,2	148	77
Wurstwaren	2844	554	19,5	199	146

08 – Irreführend § 11 (1) LFGB, Art. 16 VO (EG) Nr. 178/2002  
 11 – Verstöße gegen Kennzeichnungsvorschriften VO nach § 35 LFGB  
 LGL – Landesamt für Gesundheit und Lebensmittelsicherheit

Ein Anteil von 19,5% der Wurstwaren bzw. 31,2% der Fleischerzeugnisse, die zur Analyse kamen wurde beanstandet. Von den insgesamt 2844 untersuchten Wurstwaren und 1319 untersuchten Fleischerzeugnissen wurden 345 Würste und 115

Fleischerzeugnisse immunologisch (ELISA, Ouchterlony) und molekularbiologisch mittels PCR auf ihre Zusammensetzung hin untersucht. Aufgrund ihrer tierartlichen Zugehörigkeit oder wegen Fremdeiweißzusatzes wurden 37 Wurstproben (11%) und 19 Fleischerzeugnisse (17%) beanstandet. Vierzehn Wurstwaren (4%) und neun Fleischerzeugnisse (8%) wurden wegen fehlerhafter Kennzeichnung der Tierart oder des Fremdeiweißgehaltes beanstandet. Von 27 untersuchten Proben von Wiener Würstchen aus Putenfleisch, die teilweise als „aus 100% Putenfleisch“ ausgelobt waren, wurden 14 (52%) beanstandet. In zehn Fällen war die Verwendung der Tierart Huhn nicht deklariert, und in einem Fall war neben Putenfleisch auch Schweinefleisch nachzuweisen, obwohl in der Kennzeichnung des Produktes ein Hinweis auf den Verzicht der Verwendung von Schweinefleisch enthalten war (N. N. 2006a).

### **2.1.7 Rechtliche Bestimmungen**

Um dem Verbraucher zu schützen, darf nach Artikel 16 der Verordnung (EG) 178/2002 die Kennzeichnung, Werbung und Aufmachung von Lebensmitteln auch in Bezug auf ihre Form, ihr Aussehen oder ihre Verpackung sowie über sie verbreitete Informationen den Verbraucher nicht irreführen. Das Verbot, Lebensmittel unter irreführender Bezeichnung, Angabe oder Aufmachung gewerbsmäßig in den Verkehr zu bringen, ist zusätzlich in § 11 des Lebens- und Futtermittelgesetzbuches (LFGB) fixiert und genauer ausgeführt. Nach Absatz 1 Nummer 1 des § 11 LFGB, liegt eine Irreführung insbesondere dann vor, wenn bei einem Lebensmittel zur Täuschung geeignete Bezeichnungen, Angaben, Darstellungen oder sonstige Aussagen über Eigenschaften des Produktes verwendet werden. Für die Tierartzugehörigkeit sind vor allem Angaben bezüglich der Herkunft, des Ursprungs und der Zusammensetzung, die zur Irreführung genutzt werden, von Belang (§ 11 Abs. 1 Nr. 1 LFGB).

Genauere Vorschriften in Bezug auf die Deklaration der in Lebensmitteln vorhandenen Tierarten findet sich in § 3 der Lebensmittel-Kennzeichnungsverordnung (LMKV). Danach ist die Angabe eines Zutatenverzeichnis für Lebensmittel in Fertigpackungen für ein gewerbsmäßiges Inverkehrbringen erforderlich. Nach Anlage 1 der LMKV muss Fleisch unter Voranstellung des Namens der Tierart, von der es stammt, aufgeführt werden (§ 3 Abs. 1 Nr. 3 und Anlage 1 LMKV).

Da die LMKV nur für Lebensmittel in Fertigpackungen gilt, muss für lose Ware die Definitionen nach den Leitsätzen für Fleisch und Fleischerzeugnissen herangezogen werden um festzustellen, ob Produkte in Hinblick auf die Angabe von Tierarten der Verkehrsauffassung entsprechen. Danach werden Fleischerzeugnisse, in deren Bezeichnung nicht auf eine besondere Tierart hingewiesen wird, aus Teilen von Rindern und/oder Schweinen hergestellt. Die teilweise oder ausschließliche Verwendung von Teilen anderer Tiere als vom Rind und Schwein wird in der Verkehrsbezeichnung angegeben, z.B. Geflügelfleischwurst. Bei Verwendung der Zusatzbezeichnung „rein“ in Zusammenhang mit der Tierart darf für das Fleischerzeugnis ausschließlich Fleisch der angegebenen Tierart verwendet werden (LMLFleisch I. 2.11).

Für die Probennahme und Untersuchung von Lebensmitteln wird nach § 64 LFGB vom Bundesamt für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit eine amtliche Sammlung von hierfür geeigneten Verfahren veröffentlicht. Die Verfahren werden unter Mitwirkung von Sachkennern aus den Bereichen der Überwachung, der Wissenschaft und der beteiligten Wirtschaft festgelegt (§ 64 Abs. 1 LFGB). In dieser Amtlichen Sammlung sind auch Methoden zur Tierartenidentifizierung in Fleisch und Fleischerzeugnissen zu finden (AMTLICHE SAMMLUNG VON UNTERSUCHUNGSVERFAHREN NACH § 64 LFGB). Diese Methoden wurden ausführlich in Ringversuchen getestet, um ihre Eignung zu bestätigen. Da amtliche Untersuchungsstellen die Möglichkeit haben, in begründeten Ausnahmefällen von der Sammlung abzuweichen, hat diese keinen allgemein verbindlichen Charakter. Bei der Anwendung nicht in der Amtlichen Sammlung aufgeführter Verfahren ist jedoch eine rechtfertigende Begründung für die Abweichung erforderlich (HEMPEL und BUSCH 2000).

Für den Tierartennachweis sind folgende Verfahren in der Amtlichen Sammlung enthalten. Ein Screening-Verfahren zum Nachweis von rohem und erhitztem Rind- und Schweinefleisch in Fleisch und Fleischerzeugnissen (L 06.00-17), der Nachweis der Tierart bei nativem bzw. erhitztem Muskelfleisch mit Hilfe der isoelektrischen Fokussierung (PAGIF) (L 06.00-17 bzw. -29), der Nachweis der Tierart bei nativem Muskelfleisch in Polyacrylamid-Gelen mit Hilfe der Standard-Elektrophorese (PAGE) (L 06.00-27) und der immunenzymatische Nachweis der Tierart bei erhitztem Fleisch und Fleischerzeugnissen, als ELISA-Verfahren im Mikrotitersystem (L 06.00-47).

## **2.2 DNS-Analytik**

Oswald T. Avery identifizierte 1944 die DNS als Träger der genetischen Erbinformation. Neun Jahre später gelang es James D. Watson und Francis H. D. Crick, mit ihrem Doppelhelix-Modell die Struktur der DNS aufzuklären. Damit waren die Grundsteine zur Entwicklung der Molekularbiologie gelegt (FRANK et al. 1997). Bedeutende Techniken zur Analyse und Detektion spezifischer DNS-Sequenzen sind dagegen hauptsächlich erst in den letzten 30 Jahren entwickelt und in der Routineanalytik etabliert worden. Heute stehen eine Vielzahl molekularbiologischer Methoden für Medizin, Biowissenschaften, Umweltanalysen, aber auch für die Untersuchung von Lebensmitteln zur Verfügung. Die Ansätze reichen von genetischer Mutationsdiagnostik über Genexpressionskontrolle bis hin zur Gentherapie (PETER 2003). Ein wesentlicher Bestandteil der DNS-Analytik ist der Nachweis bestimmter Zielsequenzen im Genom eines Organismus. Hierbei können unterschiedlichste Fragestellungen untersucht werden, beispielsweise der Nachweis von bakteriellen Infektionen (ANTHONY et al. 2000) und Punktmutationen (KWOK und CHEN 2003, WEN et al. 2003) oder die Sequenzanalyse von Genen oder ganzen Genomen (GRAHAM und HILL 2001, MITNIK et al. 2001). Aber auch die Untersuchung von gentechnisch veränderten Organismen (GVOs) in Lebensmitteln (HOLST-JENSEN 2003) kommt als Einsatzgebiet in Frage. Eine ausführliche Beschreibung zur Methodik der DNS-Analyse geben u.a. CHRISTOPOULOS (1999), KREUTZIG (2000) sowie PINGOUD und URBANKE (1997).

### **2.2.1 Grundlagen der DNS-Amplifikation**

#### **2.2.1.1 Desoxyribonukleinsäure (DNS)**

Die rein der Informationsspeicherung dienende Desoxyribonukleinsäure befindet sich als genomische DNS fast ausschließlich in den Chromosomen des Zellkerns von eukaryotischen Zellen. Daneben kommt genomische DNS auch in Mitochondrien vor. Das mitochondriale Genom wurde 1949 mittels genetischer Untersuchungen an Hefen entdeckt. In fast allen eukaryotischen Zellen sind maternal vererbte Mitochondrien in großer Zahl zu finden (ca. 2000 pro Zelle). Durch die Stoffwechselleistungen dienen die etwa bakterien-großen Zellorganellen als „Kraftwerke“ der Zelle, mit der Hauptaufgabe der ATP-Synthese (KOOLMAN und RÖHM 1998).

Die aus einzelnen Nukleotiden aufgebaute DNS ist ein unverzweigtes Biopolymer, das eine beträchtliche Länge erreichen kann. Die DNS einer einzigen menschlichen Zelle erreicht eine Länge von ca. 1,80 m, was in etwa 6 Milliarden Basenpaaren (bp) entspricht (FRANK et al. 1997). Als Grundbausteine dienen phosphorylierte Desoxyribose und eine Nukleinsäure-Base, die über eine N-glykosidische Bindung in Form eines Desoxyribonukleosid-triphosphats (dNTP) miteinander verbunden sind. Als Nukleinsäure-Basen kommen einerseits die Purin-Basen Adenin (A) und Guanin (G) und andererseits die Pyrimidin-Basen Cytosin (C) und Thymin (T) vor. Über die Phosphatgruppen der Zuckerreste erfolgt die Verknüpfung zum Polymer durch 3',5'-Phosphodiesterbindungen. Hierbei erhält der DNS-Einzelstrang ein 5'-Phosphat- und ein 3'-OH-Ende.

Mit zwei gegenläufigen komplementären DNS-Einzelsträngen, die um eine gemeinsame Achse gewunden sind, ist die Struktur der DNS eine Doppelhelix (Abb. 1). Durch die Zucker-Phosphatreste an den Außenseiten des Doppelstrangs ergibt sich ein polares, negativ geladenes Makromolekül. Die Bindung der Einzelstränge zum Doppelstrang erfolgt über besonders stabile Wasserstoffbrücken. Aufgrund unterschiedlicher Donor- und Akzeptor-Substituenten bilden sich zwischen Adenin und Thymin zwei und zwischen Guanin und Cytosin drei lineare Wasserstoffbrückenbindungen (STRYER 1999). Um an die in der Abfolge der Nukleinsäure-Basen gespeicherte Information zu gelangen, muss der DNS-Einzelstrang nach der ursprünglichen Syntheserichtung vom 5'- zum 3'-Ende gelesen werden (FRANK et al. 1997, KOOLMAN und RÖHM 1998, STRYER 1999).

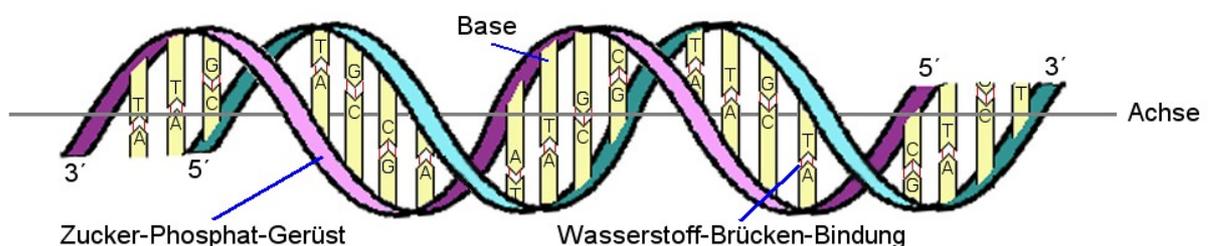


Abb. 1: Schematischer Bauplan der DNS-Doppelhelix

Die Sequenzinformation des Genoms ist für jedes Individuum spezifisch, dennoch enthält es auch Bereiche die konserviert innerhalb einer ganzen Art vorliegen. Diese Spezies-spezifischen Sequenzdaten können damit zur Differenzierung verschiedener Arten

genutzt werden (KOCHER et al. 1989) und ebenso Einsatz in der Tierartenidentifizierung in Lebensmitteln finden (BENEKE und HAGEN 1998). In der Lebensmittelproduktion wirken verschiedene Einflüsse auf die im Fleisch enthaltene tierartspezifische DNS ein. Durch Herstellungsprozesse wie Kochen oder längere Lagerung kann der Informationsgehalt, der in der Basenabfolge der DNS enthalten ist, nicht zerstört werden. Die weitgehend hitzestabile DNS verliert allenfalls ihren Längenzusammenhalt und bricht je nach Stärke des Einflusses in unterschiedlich große Fragmente auseinander. Je höher beispielsweise die Temperatur wird, desto kleinere DNS-Bruchstücke entstehen (EB-BEHØJ und THOMSEN 1991a, JEMMI und SCHLOSSER 1993). Ein weiterer Vorteil, neben der Informationserhaltung, ist das ubiquitäre Vorkommen der identischen genetischen Daten in nahezu jeder Zelle eines Individuums (BARTLETT und DAVIDSON 1992).

### **2.2.1.2 Denaturierung und Schmelzpunkt**

Der Vorgang der reversiblen Trennung des DNS-Doppelstranges in die beiden Einzelstränge wird als Denaturieren oder Schmelzen der DNS bezeichnet. Hierbei werden die Wasserstoffbrückenbindungen zwischen den Basen durch beispielsweise Wärmeeinwirkung oder eine Änderung des pH-Wertes ( $<3$  bzw.  $>10$ ) getrennt. Die entsprechende Rückreaktion dieses reversiblen Vorgangs bezeichnet man als Renaturierung oder Annealing. Die Temperatur, bei der die Hälfte der Doppelhelix-Struktur aufgrund der Denaturierung des Doppelstranges verloren gegangen ist, wird als sogenannte Schmelztemperatur  $T_m$  definiert. Diese hängt von vielen Faktoren ab und ist charakteristisch für jede doppelsträngige DNS-Sequenz (STRYER 1999).

Aufgrund der dreifachen Wasserstoffbrückenbindungen zwischen Guanin und Cytosin ist die Bindung der Doppelstränge aneinander umso fester, je höher der GC-Gehalt eines DNS-Abschnittes ist und umso höher liegt damit die Schmelztemperatur. Auch die zunehmende Länge eines Doppelstranges führt zu einer erhöhten Schmelztemperatur, da die Anzahl der Wasserstoffbrückenbindungen zunimmt. Ein stabilisierendes Abschirmen der sich abstoßenden, negativ geladenen Phosphate des Helixrückgrates durch monovalente Kationen wie z.B.  $\text{Na}^+$  oder  $\text{Mg}^{2+}$  führt ebenfalls zur Erhöhung des  $T_m$ -Wertes. Dagegen wirkt Formamid, durch Hemmung der Wasserstoffbrückenbindungen, destabilisierend und senkt die Schmelztemperatur ab. Auch die erwähnte, deutliche pH-

Wert-Änderung kann durch Ionisation der Stickstoffatome in den Nukleinsäurebasen zur Auflösung der Wasserstoffbrückenbindung und damit zu einem erniedrigten  $T_m$ -Wert führen (CASEY und DAVIDSON 1977, McCONAUGHY et al. 1969, SCHILDKRAUT und LIFSON 1965). Bei DNS-Abschnitten bekannter Länge und Sequenz bzw. GC-Gehalt, kann durch empirische Näherung mittels Formeln der Schmelzpunkt abgeschätzt werden (NEWTON und GRAHAM 1997, SAMBROOK und RUSSEL 2001).

### **2.2.1.3 Hybridisierung**

Hybridisierung bezeichnet das Annealing eines DNS-Einzelstranges mit einem komplementären exogenen Oligo- oder Polynukleotid. Diese hoch spezifische biomolekulare Erkennungsreaktion stellt die Grundlage einer Vielzahl molekularbiologischer Methoden, wie z.B. der Sequenzierung, der gezielten Detektion oder der Amplifikation von Gensequenzen, dar. Je nach Methodik werden die benötigten Oligo- bzw. Polynukleotide als Primer oder DNS-Sonden bezeichnet. Entscheidend für die Stringenz der Hybridisierung und damit für die Spezifität der Bindung der komplementären Paarung ist die von der Schmelztemperatur charakterisierte Hybridstabilität. Somit haben die oben bereits erwähnten Faktoren auch auf die Stringenz einen entscheidenden Einfluss. Bei steigender Konzentration an monovalenten Kationen werden beispielsweise der Schmelzpunkt und die Hybridisierungsgeschwindigkeit erhöht, während die Stringenz abnimmt (SCHILDKRAUT und LIFSON 1965, ANDERSON und YOUNG 1985). Sind Ionenstärke und Formamidkonzentration der Reaktionslösung bekannt, wird die Stringenz durch die Temperatur bestimmt. D.h. je näher die Reaktionstemperatur an die Schmelztemperatur angeähert wird, desto weniger treten tolerierbare Basenfehlpaarungen (Mismatches) auf und es finden zunehmend nur noch perfekt komplementäre Hybridisierungen der Sequenzen (Perfect-Matches) statt (PETER 2003).

### **2.2.1.4 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)**

In den Achtziger Jahren des letzten Jahrhunderts entwickelte Kary B. Mullis die Polymerase-Kettenreaktion (Polymerase-Chain-Reaction, PCR) und revolutionierte die Molekularbiologie. Für diese Amplifikationstechnik, mit der es möglich ist, geringe Mengen einer DNS-Sequenz spezifisch zu vermehren, erhielt er 1993 den Nobelpreis für Chemie (MULLIS 1990, NEWTON und GRAHAM 1997). Die Reaktion nutzt das Prinzip der DNS-Replikation in der Zelle. Hierbei ist die Fähigkeit der DNS-Polymerase, entlang ei-

nes Einzelstranges, der DNS-Matrize, den komplementären Gegenstrang zu synthetisieren, entscheidend. Die DNS-vervielfältigenden Enzyme wurden früher unter anderem aus dem Bakterium *Escherichia coli* (Klenow-Fragment) gewonnen, ihr Hauptnachteil bestand in der Hitzeempfindlichkeit. Deshalb stammen heutzutage die meisten Polymerasen, die in der PCR Verwendung finden, aus dem thermophilen Archaeobakterium *Thermus aquaticus*, da diese sogenannten Taq-Polymerasen den großen Vorteil der Hitzebeständigkeit besitzen. Mittlerweile sind diese Polymerasen von vielen Anbietern zu beziehen. Sie unterscheiden sich jedoch in der Ausbeute, der Länge und der Genauigkeit des Amplifikationsproduktes.

Als Bausteine für die Synthese des komplementären DNS-Stranges vom 5'- zum 3'-Ende benutzt die Polymerase Desoxynukleinsäuretriphosphate (dNTPs), die in ausreichender Menge in der Reaktionslösung vorliegen müssen. Die Anteile der einzelnen Purin- bzw. Pyrimidinbasen sollten hierbei äquivalent sein. Um der Polymerase einen Ansatzpunkt für die Amplifikation zu liefern und um den zu vervielfältigenden Bereich der DNS-Matrize zu definieren, benötigt man spezifische Primer. Hierbei handelt es sich um kurze DNS-Fragmente einer bestimmten Basensequenz. Nach Denaturierung des Doppelstranges hybridisiert der sogenannte forward Primer am sense- und der reverse Primer am antisense-Strang der Einzelstrang-Matrize, bzw. der Template-DNS. Um ein optimales Milieu im Reaktionsgefäß für die Polymerase zu schaffen, werden verschiedene Puffer zugesetzt. Hiermit kann der pH-Wert und auch die Konzentration an freiem Magnesium beeinflusst werden. Im Allgemeinen kann eine zu geringe  $Mg^{2+}$ -Konzentration die Ausbeute verringern, während ein Überschuss an  $Mg^{2+}$ -Ionen die Bildung unspezifischer Produkte fördert (NEWTON und GRAHAM 1997, SAMBROOK und RUSSELL 2001).

Der Ablauf der PCR ist ein zyklisches Geschehen, wobei jeder Zyklus aus drei Teilabschnitten unterschiedlicher Temperaturen besteht (Abb. 2). Der erste Schritt besteht in der Denaturierung der DNS-Doppelhelix bei z.B. 94°C. Hierauf folgt bei Temperaturen, je nach Sequenz der verwendeten Primer, zwischen 50 und 65°C deren Annealing an komplementäre Sequenzen auf den DNS-Einzelsträngen. Um eine möglichst ähnliche Hybridisierungsgeschwindigkeit der beiden Primer zu gewährleisten, werden die Primersequenzen so gewählt, dass die gebildeten Hybride annähernd die gleiche Schmelztemperatur aufweisen. Je näher Schmelztemperatur und Annealingtemperatur beieinander lie-

gen, desto geringer wird die Effizienz der PCR. Aus diesem Grund wählt man die Annealingtemperatur für gewöhnlich ca. 2-5°C unterhalb des  $T_m$ -Wertes, um noch eine ausreichende Spezifität der Bindung zu bewahren. Während der Elongation, dem dritten Schritt der PCR mit einer Temperatur von 72°C, herrschen ideale Bedingungen für die Vervollständigung der Stränge durch die Polymerase. Üblicherweise folgt den oben genannten Zyklen am Ende der PCR ein verlängerter Elongationsschritt, um der Polymerase genug Zeit zu geben, angefangene Ketten zu vollenden. Ein anschließendes Abkühlen dient der Minimierung weiterer, womöglich unspezifischer Reaktionen (NEWTON und GRAHAM 1997, SAMBROOK und RUSSELL 2001).

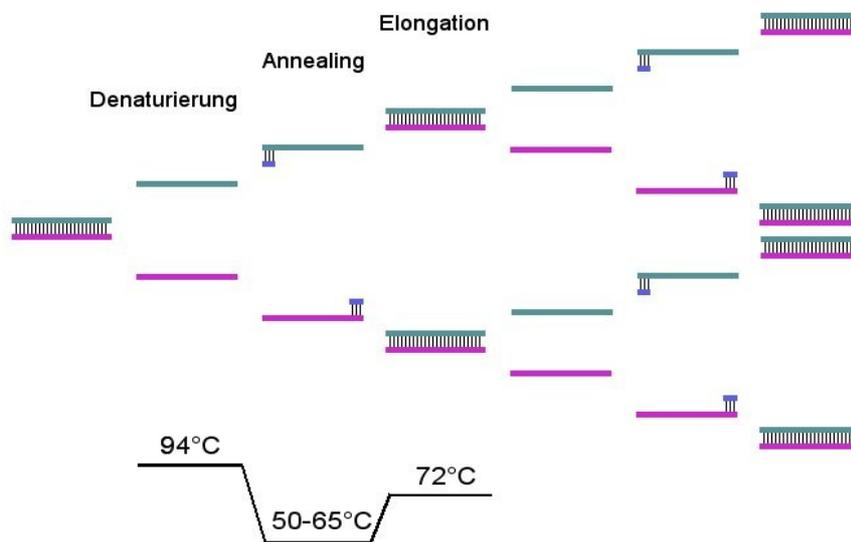


Abb. 2: Ablaufschema einer PCR

### 2.2.1.5 Effizienz der PCR

Theoretisch ist es möglich, mittels PCR ein einziges Template-Molekül in  $n$  Zyklen exponentiell auf  $2^n$  Amplifikate zu vervielfältigen. Diese ideale Ausbeute wird durch Faktoren, wie den Aktivitätsverlust des Enzyms mit zunehmender Zykluszahl oder der Akkumulation von hemmenden Reaktionsprodukten minimiert. Zusätzlich nimmt die Konzentration der dNTPs und der Primer ab und das Re-Annealing der Einzelstränge konkurriert mit der Hybridisierung der Primer. Als Folge dieser Effekte geht die exponentielle Phase der Reaktion in eine Plateauphase über, bis die PCR langsam ganz zum Erliegen kommt.

Durch die exponentielle Amplifikation des Templates können schon geringste Unterschiede in der Zusammensetzung von verschiedenen Proben Auswirkungen mit deutlichen Effekten auf die Effizienz der PCR haben, weshalb das Verfahren in erster Linie für

den qualitativen Nachweis spezifischer DNS-Sequenzen geeignet ist (NEWTON und GRAHAM 1997, SAMBROOK und RUSSELL 2001). Innerhalb der exponentiellen Phase führt eine höhere Zykluszahl zu einer höheren Ausbeute an Amplifikaten und damit zu einer gesteigerten Sensitivität des Nachweises (SCHWÄGELE 2001b). Wie schon erwähnt, ist auch die verwendete Polymerase hierfür entscheidend. Diese unterscheiden sich nicht nur untereinander, sondern ihr Einsatz variiert auch in Abhängigkeit der Zielsequenz, der Primersequenz und der Reaktionsbedingungen (ECKERT und KUNKEL 1991, CHA und THILLY 1993). Daneben hat auch der Zustand der Ausgangs-DNS Einfluss auf die PCR-Effizienz. So können stark erhitzte Proben nur noch kurze Bruchstücke an DNS enthalten, weshalb eventuell eine Trennung der nachzuweisenden Sequenz stattgefunden hat. Eine ausreichende Menge und Reinheit der Template-DNS ist ebenfalls für die Sensitivität ausschlaggebend, um genügend DNS-Matrizen für die PCR zur Verfügung zu haben und störende Einflüsse eventuell ebenfalls enthaltener Stoffe auszuschließen. Diese Faktoren werden vor allem durch die verwendete Extraktionssysteme beeinflusst (BINKE et al. 2003).

Die millionenfache Amplifikation einer DNS-Sequenz birgt auch das Risiko unerwünschter Reaktionen, vor allem in Form von falsch-positiven Resultaten. Bei Kontaminationen der Proben während der Bearbeitung sind schon geringste Spuren, im Extremfall sogar ein einziges DNS-Molekül ausreichend, um ein falsches Ergebnis zu liefern. Ausführliche Anweisungen, um Kontaminationen während und vor einer PCR zu verhindern, geben u.a. KWOK und HIGUCHI (1989), DIEFFENBACH und DVEKSLER (1993) und NEWTON und GRAHAM (1997) wobei auch auf die Notwendigkeit von Kontaminationskontrollen bei der Durchführung einer PCR hingewiesen wird.

### **2.2.1.6 Primer**

Im Allgemeinen sind Primer für die PCR zwischen 20 und 30 Nukleotide lang, wodurch es möglich ist, mit relativ hohen Hybridisierungstemperaturen zu arbeiten. Diese Länge der Primer ist zudem für eine hohe Spezifität ausreichend. Wenn es die Sequenz zulässt, sollten alle vier Basen möglichst gleich oft vertreten sein. Ebenso sollten die Primerpaare an ihren 3'-Enden nicht inter- oder intramolekular komplementär sein, um Primerdimere zu verhindern, welche zu kurzen DNS-Artefakten führen. Für Primer empfiehlt sich ein Abstand auf der DNS-Matrize zwischen forward und reverse Primer von

weniger als 10 kbp, da sich bereits Amplikons, die länger als 3 kbp sind, schlechter vervielfältigen lassen (JEFFREYS et al. 1988). Etliche Computerprogramme unterstützen die Entwicklung von Primern durch die Bereitstellung von Sequenzdaten oder eine automatische Auswertung von Sequenzen (EMBL (ZEHNER et al. 1998), GenBank/EMBL/DDJB, NCBI (PARSON et al. 2000), NCBI/Blast, GCG (ZIERLER 2001), NCBI/Blast, MacVector™ (LAUBE et al. 2002)).

Neben der Amplifikation einer einzigen Zielsequenz während einer PCR, besteht auch die Möglichkeit, mehrere verschiedene Sequenzen einer Probe simultan zu vervielfältigen. Eine Methode stellt die Konsensus-PCR dar. Hierbei nutzt man ein sogenanntes universales Primerpaar, welches an identische Sequenzen verschiedener DNS-Proben binden kann, wobei sich jedoch die Bereiche zwischen den Primern in der Basenabfolge unterscheiden. Von Vorteil ist, dass die verschiedenen PCR-Produkte mit der selben Amplifikationseffizienz gebildet werden. Eine weitere Möglichkeit bietet die Multiplex-PCR, deren Vorteil in der flexibleren Auswahl der verschiedenen zu amplifizierenden DNS-Bereiche liegt. Das Prinzip besteht aus dem Einsatz eines spezifischen Primerpaares pro gewünschtem Amplikon. Trotz gezieltem Primerdesign mit möglichst ähnlichen Eigenschaften der Primer kann jedoch hierbei eine einheitliche Amplifikationseffizienz nur mit sehr großem Aufwand erreicht werden. Je größer zudem die Zahl der verwendeten Primerpaare wird, desto höher ist die Wahrscheinlichkeit für gegenseitige Beeinflussungen und unspezifische PCR-Produkte. Multiplex- und Konsensus-PCR sind durch ihre relativ hohe Informationsdichte bei mehr oder weniger niedrigem Arbeitsaufwand für Fragestellungen der Routinediagnostik geeignet (NEWTON und GRAHAM 1997, PETER 2003).

### **2.2.2 Grundlagen der DNS-Visualisierung**

Um die aus einer PCR resultierenden Produkte detektierbar zu machen, gibt es verschiedene Ansätze. Einerseits kann die Detektion nach der Amplifikation stattfinden. Hierfür werden die einzelnen DNS-Amplikons ihrer Größe nach in Medien wie Agarosegel aufgetrennt und beispielsweise mittels Silber- oder Ethidiumbromidfärbung sichtbar gemacht. Um zusätzlich zur Fragmentlänge noch eine Aussage zur Sequenz des Abschnittes treffen zu können, kann man fluoreszenz- oder radioaktiv-markierte DNS-Sonden nutzen. Andererseits gibt es auch die Möglichkeit, PCR-Produkte bereits während

der PCR zu markieren. Radioaktiv-, fluoreszenz- oder biotin-markierte Primer oder speziell markierte dNTPs werden hierbei in die synthetisierten Amplikons eingebaut. Im Anschluss kann mittels Agarose-Gel und Röntgenfilm oder spezieller Fluoreszenz-Scanner die Visualisierung stattfinden (NEWTON und GRAHAM 1997). Auf die umfangreichen Möglichkeiten wird hier nicht näher eingegangen und im Folgenden werden nur die für diese Arbeit genutzten Verfahren erläutert.

### **2.2.2.1 Gelelektrophorese mit Ethidiumbromidfärbung**

DNS-Moleküle wandern in einem elektrischen Feld aufgrund ihrer negativen Nettoladung in Abhängigkeit vom pH-Wert des Mediums zur Anode. Durch Anlegen einer Spannung werden in einer geeigneten Matrix DNS-Fragmente nach der Größe aufgetrennt. Als Matrix wird häufig Agarose in einer Pufferlösung suspendiert verwendet. Je größer der Agaroseanteil ist, desto langsamer laufen die Fragmente beim Anlegen der Spannung, da die jeweilig größere Dichte des Gels die Wanderung der Fragmente stärker behindert. Auch eine Erniedrigung der Spannung hat eine geringere Laufgeschwindigkeit zur Folge. Um den Lauf der zu untersuchenden Proben besser verfolgen zu können, wird die DNS mit einem Gel-Ladepuffer versetzt. Dieser besteht aus einem Farbzusatz und Glycerin und/oder verschiedenen Zuckern. Meist dient Bromphenolblau als färbendes Agens, während Glycerin für eine erhöhte Dichte der Probe sorgt, um ihr Absinken in den Vertiefungen des Gels (Slots) zu gewährleisten. Um die Größe der aufgetrennten Fragmente näher charakterisieren zu können, werden sogenannte DNS-Längenstandards gemeinsam mit den Proben elektrophoretisch aufgetrennt. Durch die bekannte Länge der im Standard enthaltenen DNS-Moleküle kann die Größe der zur untersuchenden Probe bestimmt werden. Die DNS-Längenstandards werden üblicherweise in die an die Proben angrenzenden Slots zu beiden Seiten des Gels aufgetragen, um zusätzlich die Geradlinigkeit des Elektrophoreselaufs zu überprüfen. Um die aufgetrennte DNS sichtbar zu machen, wird häufig Ethidiumbromid eingesetzt. Diese planare, aromatische Verbindung interkaliert zwischen die Basenpaare der doppelsträngigen DNS und fluoresziert in diesem Zustand im nah ultravioletten Bereich des Lichtes sehr intensiv. Hierdurch kann doppelsträngige DNS in Mengen von bis zu wenigen Nanogramm nachgewiesen werden. Der Nachteil dieser Färbemethode in Bezug auf die Arbeitssicherheit beruht gerade auf der Fähigkeit, in der Doppelhelix zu interkalieren und hierdurch stark kanzerogen zu wirken (OGDEN und ADAMS 1987, NEWTON und GRAHAM 1997).

### **2.2.2.2 DNS-Chiptechnologie**

Miniaturisierte Träger, auf deren Oberfläche DNS-Moleküle bekannter Sequenz als Fangsonden in einem geordneten Raster (Array) in hoher Dichte und Anzahl immobilisiert werden, nennt man DNS-Mikroarrays oder DNS-Chips. Ihre rasante Entwicklung in den letzten Jahren hat sie zu einem wesentlichen Baustein der modernen Molekularbiologie gemacht. Das Prinzip eines DNS-Chips beruht auf der Hybridisierung mittels PCR fluoreszenz-markierter Proben-DNS mit dazu komplementären, kovalent an den Chip gebundenen Sonden. Für eine optimale Bindung der einzelsträngigen DNS aneinander sind je nach verwendetem DNS-Chip unterschiedlich lange Inkubationsphasen nötig, die mit speziellen Anforderungen an die Temperatur und Luftfeuchtigkeit verbunden sind. Durch Waschschriffe werden ungebundene DNS-Moleküle entfernt und anschließend wird das Signalmuster mittels Fluoreszenzscanner detektiert. Die Verteilung des Fluoreszenzsignals in Zusammenhang mit der bekannten Arraystruktur ermöglichen eine Aussage über die in der Probe enthaltenen oder nicht enthaltenen DNS-Abschnitte (PETER 2003, PODSADLOWSKI 2004, N. N. 2005).

Da auf einem Chip von wenigen hundert bis zu mehreren tausend verschiedene Sondensequenzen immobilisiert werden können und es möglich ist, mehrere dieser DNS-Chips oder Mikroarrays auf einem einzigen Objektträger zu platzieren, liefert ein einzelnes DNS-Chip-Experiment eine sehr hohe Informationsdichte. Das Haupteinsatzgebiet ist dabei immer noch die Forschung, da der Einführung in die Routineanalytik vor allem der hohe Kostenaufwand für die DNS-Chip-Herstellung und die Anschaffung eines Fluoreszenzscanners im Wege stehen. Der Schwerpunkt der Verwendung liegt daher in medizinischen Fragestellungen, wie der Genexpressionsanalyse (N. N. 2005). Dennoch nimmt der Einsatz auch im Bereich der Lebensmittel- und Umweltanalytik zu (PETER 2003), wie beispielsweise durch den LCD-Array für die Spezies-Identifikation von Fleisch der Firma Chipron (CHIPRON 2006). HEDGE et al. (2000), HELLER (2002) und HOLLOWAY (2002) geben eine Übersicht über verschiedene Aspekte zur Technologie der DNS-Chips.

### **2.2.3 DNS-Analytik in der Tierartenidentifizierung**

Zahlreiche verschiedene DNS-basierende Ansätze in der Tierartenidentifizierung wurden bereits publiziert und können hier nicht in ihrer Vollständigkeit dargestellt werden. Eine

kurze Übersicht über verschiedene Verfahren wird in Kapitel 2.4.1.1 gegeben. Ausführlichere Darstellungen über die vorhandenen Methoden und ihre Anwendungsmöglichkeiten in der Lebensmittelanalytik, bieten unter anderen LEIGHTON JONES (1991), MEYER und CANDRIAN (1996), LOCKLEY und BARDSLEY (2000), SCHWÄGELE (2004) und ZIERLER et al. (2004). Im Folgenden werden Arbeiten basierend auf Spezies-spezifischen Primern und DNS-Chips zur Tierartenidentifizierung, sowie ein in diesem Bereich häufig verwendetes Gen näher charakterisiert.

### **2.2.3.1 Das Cytochrom b-Gen**

Cytochrom b ist Bestandteil der Ubichinon-Cytochrom-c-Reduktase und spielt damit beim Elektronentransport der Atmungskette eine wichtige Rolle (KOOLMAN und RÖHM 1998, KOLB 2000). Es wird als einziges Protein dieses Komplexes mitochondrial, durch das ca. 1140 bp lange *Cytochrom b* (*Cytb*)-Gen, codiert (HATEFI 1985). Aufgrund der Eigenschaften von mitochondrialen Genen eignen sich diese besonders zur Speziesdifferenzierung. Das mitochondriale Genom kommt in hoher Kopienanzahl von bis zu 10.000 in den Zellen vor (ALBERTS et al. 1990). Durch die maternale Vererbung der Mitochondrien liegen die Gene meist nur in Form eines Alleles vor, wodurch Probleme bei Analysen aufgrund von Heterozygotie ausgeschlossen werden können (LANSMAN et al. 1983, HAYASHI und WALLE 1985). Desweiteren treten einerseits hochkonservierte Regionen auf an die universalen Primer binden können. Andererseits können aufgrund einer ca. 10-fach höheren Mutationsrate des mitochondrialen Genoms im Vergleich zur Kern-DNS durch häufiger auftretende Punktmutationen meist auch nah verwandte Arten differenziert werden (VAWTER und BROWN 1986, KOCHER et al. 1989, UNSELD et al. 1995, BARALLON 1998). Die Spezies-spezifischen Informationen, die in der Nucleotid-Sequenz des *Cytb*-Gens enthalten sind, wurden in zahlreichen phylogentischen und forensischen Arbeiten verwendet (KOCHER et al. 1989, SMITH und PATTON 1991, CARR und MARSHALL 1991, BARTLETT und DAVIDSON 1991, 1992, IRWIN et al. 1991, RUSSO et al. 1996, ZEHNER et al. 1998, BATAILLE et al. 1999).

Aus diesem Grund stehen Sequenzdaten des *Cytb*-Gens vieler Vertebraten vollständig oder zumindest teilweise für Vergleiche der Spezies zur Verfügung (KOCHER et al. 1989, MEYER et al. 1990, IRWIN et al. 1991, RICHMAN und PRICE 1992, BOWEN et al. 1993, MA et al. 1993, CHIKUNI et al. 1994), auf deren Basis Primer für eine Spezies-

spezifische PCR entwickelt werden können. Eine der wichtigsten Arbeiten veröffentlichten MEYER et al. (1995), die mittels eines universalen Primerpaares einen 359 bp großen Abschnitt des *Cytb*-Gens für die Differenzierung von 22 verschiedenen Spezies verwendeten. Die Primer setzten an konservierten Regionen des Gens an, welche einen variablen und für jede Tierart charakteristischen Bereich umschlossen. Durch verschiedene Restriktionsenzyme erhaltene Bandenmuster konnten über Vergleiche, bestimmten Tierarten zugeordnet werden (RFLP, Restriktions-Fragment-Längen-Polymorphismus). Viele folgende Arbeiten nutzten dieselben Primer für das *Cytb*-Gen (BENEKE und HAGEN 1998, BRANCIARI et al. 2000, BELLAGAMBA et al. 2001) oder positionierten den forward Primer neu, um eine noch höhere Spezifität für das mitochondriale Genom zu erhalten (BURGENER und HÜBNER 1998, WOLF et al. 1999). Für den Erhalt charakteristischer Einzelbanden ohne vorherige Restriktion, fanden verschiedene spezifische Primer in der Literatur Anwendung (MATSUNAGA et al. 1999, HERMAN 2001). Auch einige kommerzielle Tests nutzen *Cytb*-Gensequenzen mit unterschiedlichen Primern und verschiedenen Verfahren der Detektion (GREINER BIO-ONE 2005, GENESCAN 2006).

### **2.2.3.2 Tierarten-PCR mittels Spezies-spezifischer Primer**

Für die Identifikation der Tierart können Spezies-spezifische Primer in einer PCR eingesetzt werden. Die Entwicklung der Primer orientiert sich an DNS-Abschnitten, die eine hohe Diversität zwischen verschiedenen Tierarten aufweisen und dagegen innerhalb einer Art konserviert sind. Damit sollen die Primer nur an DNS der zu untersuchende Tierart komplementär binden. Falls in Lebensmitteln PCR fähige DNS enthalten ist, können so Spezies-spezifische PCR-Amplifikate synthetisiert werden. Durch entsprechende Sequenzen der Primer für verschiedene Tierarten ergeben sich unterschiedlich lange Fragmente. Diese können beispielsweise durch den Vergleich parallel amplifizierter Kontrollen (DNS bekannten Ursprungs) mit der in Kapitel 2.2.2.1 beschriebenen Methode der Gel-Elektrophorese differenziert werden (LAUBE 2002, CIBUS 2001). Auch die Detektion der Amplifikate mittels Fluoreszenzfarbstoffen ist möglich und kann in Form der Real-time PCR während des Reaktionsprozesses durchgeführt werden (LAUBE et al. 2002, SAWYER et al. 2003, BINKE et al. 2004, RODRÍGUEZ et al. 2004b, ZIERLER et al. 2004). Mit dem zuletzt genannten Verfahren wird zusätzlich versucht, eine Quantifizierung der verwendeten Tierart im Produkt zu ermöglichen (WALKER et al. 2003, 2004).

### 2.2.3.2.1 Nicht-kommerzielle Spezies-spezifische Primer

Eine PCR mit Spezies-spezifischen Primern wurde von vielen Autoren beschrieben. Hierbei fand nicht nur die Sequenz des *Cytb*-Gens Verwendung. Tabelle 2 zeigt einige Arbeiten mit weiteren zur Speziesdifferenzierung genutzten Genen. So verwendeten LOCKLEY und BARDSLEY (2002) und RODRÍGUEZ et al. (2003) Sequenzen des  $\alpha$ -*Aktin*-Gens. Nukleäre Gene kamen auch bei MEYER et al. (1994b), SCHWÄGELE et al. (2002) und ALTMANN et al. (2004) in Form des *Wachstumshormon*-, des *Neuroglobin*- und des  $\beta$ -*Casein*-Gens für den Spezies-Nachweis zum Einsatz. CHIKUNI et al. (1994) und ZHANG et al. (1999) nutzten Satelliten-DNS, als Zielsequenz spezifischer Primer. Die Verwendung von ribosomaler 5S und 12S DNS (RODRÍGUEZ et al. 2001, 2004a) und des mitochondrialen D-loops (MONTIEL-SOSA et al. 2000) wurde ebenfalls beschrieben.

Unterschiede lassen sich nicht nur in der Wahl der nachzuweisenden Gensequenz finden, sondern sind auch in der **Sensitivität** der verschiedenen Methoden erkennbar. ALTMANN et al. (2004) konnten in erhitzten und prozessierten Fleisch- und Milchprodukten für die Tierart Ziege ein 161 bp langes Amplifikat sicher nachweisen. SCHWÄGELE et al. (2002) haben mittels spezifischer Primer unterschiedliche Fragmente für Schaf (341 bp) und Ziege (118 bp) in verschiedenen Mischungsverhältnissen der beiden Tierarten in Fleisch und in Fetakäse detektiert. Hierbei zeigten die spezifischen Banden in den Käseproben eine schwächere Intensität als in den Fleischproben. Mittels einer Multiplex-PCR für den simultanen Nachweis von Ente und Gans konnten RODRÍGUEZ et al. (2001) das 106 bp lange Amplifikat der Gänse-DNS durch Gel-Elektrophorese gut vom 171 bp langen Enten-Fragment differenzieren. Hierbei wurden universale forward Primer und Spezies-spezifische reverse Primer genutzt.

Bei CHIKUNI et al. (1994) wurden bis zu 10 pg Schaf-DNS in 375000 pg Rinder-DNS nachgewiesen und auch nach Erhitzung der Proben auf 120°C für 30 min war ein Nachweis von Schaf mit einer schwachen Bande noch möglich. Hingegen konnte Ziegen-DNS nach Behandlung bei diesen Temperaturen nicht mehr amplifiziert werden. ZHANG et al. (1999) gaben als Nachweisgrenze Rind-spezifischer Primer für genomische DNS für rohe Proben 0,0336 pg und für gekochte und autoklavierte Proben 0,32 pg an.

LOCKLEY und BARDSLEY (2002) publizierten eine Multiplex-PCR für die Detektion von Huhn und Pute. Der universale reverse Primer bildete bei diesem Verfahren mit den spe-

zifischen forward Primern ein 159 bp langes Fragment für Pute und ein 372 bp langes Fragment für Huhn. Im Multiplex-Ansatz konnten Zusätze von 10% Huhn und 25% Pute erkannt werden. In einer PCR mit getrennten Reaktionsansätzen wurde sogar ein Zusatz von 1% Huhn in Pute nachgewiesen und umgekehrt. Nicht als Multiplex-PCR verwendeten RODRÍGUEZ et al. (2003) spezifische forward Primer für Ente und Gans in Zusammenhang mit einem universalen reverse Primer. Diese ermöglichten durch unterschiedliche Amplifikate einer Länge von 172 bp bei Gänse-DNS bzw. 225 bp bei Enten-DNS den Nachweis von bis zu 1% Entenzusatz in Gänse-Foie Gras mittels Gel-Elektrophorese. Die gleiche Arbeitsgruppe konnte mit einer anderen Methode ebenfalls eine Nachweisgrenze von 1% in binären Mischungen verschiedener Tierarten bis zu einer Erhitzung von 121°C für 20 min erzielen (RODRÍGUEZ et al. 2004a). Hierfür wurden ein universaler forward Primer und spezifische reverse Primer in separaten Ansätzen genutzt, um unterschiedliche Fragmente der Tierarten Rind (223 bp), Schwein (383 bp), Schaf (371 bp) und Ziege (142 bp) zu amplifizieren.

MONTIEL-SOSA et al. (2000) publizierten eine spezifische PCR für Schwein, mit der selbst für prozessierte und gekochte Produkte ein 531 bp langes Fragment aus Schweinefleisch und -fett amplifiziert wurde. Jedoch konnte nur eine Sensitivität von 5% erreicht werden. MEYER et al. (1994b) gelang es, mit porzinen Primern ein 108 bp langes Fragment aus Schweine-DNS sowohl in rohen als auch in erhitzten Proben mit einer Nachweisgrenze von unter 2% zu detektieren. Durch Variieren der Zyklenzahl der PCR konnte die Sensitivität verändert werden, so dass beispielsweise mit 35 Zyklen Schweinefleisch noch in Konzentrationen von ca. 0,1% nachweisbar war.

Durch die hohe **Spezifität** der Methoden in den Untersuchungen von MEYER et al. (1994b), SCHWÄGELE et al. (2002), RODRÍGUEZ et al. (2003, 2004) und ALTMANN et al. (2004) konnte die interessierende Tierart eindeutig differenziert werden. Mit den entwickelten spezifischen Primern traten keinerlei Kreuzreaktionen bei den untersuchten Spezies auf. Auch bei LOCKLEY und BARDSLEY (2002) wurden keine Kreuzreaktionen beobachtet. Jedoch war aufgrund der Verwendung eines nukleären single copy Gens bei Eiern, in denen vor allem mitochondriale DNS vorkommt, kein Nachweis der Spezies möglich. CHIKUNI et al. (1994) beobachteten bei Verwendung eines ovinen Primerpaares Kreuzreaktionen nur mit Ziegen-DNS, da für Ziege und Schaf ein 374 bp langes Amplifikat erhalten wurde. Für eine Differenzierung dieser Spezies konnte das Restriktions-

enzym *Apa* I eingesetzt werden, welches das Schaf-DNS-Amplifikat in zwei Fragmente spaltete (236+138 bp), während die Ziegen-DNS nicht geschnitten wurde. Ähnliches berichteten ZHANG et al. (1999) bei einem bovinen Primer, der mit Ausnahme von Yak und Büffel keine Kreuzreaktionen aufwies. Das aus Rind-, Yak- und Büffelproben erhaltene 218 bp lange Amplifikat konnte nur für Rind mit der Restriktions-Endonuklease *Hae* III in drei Fragmente (129+79+10 bp) geschnitten werden. Ebenso waren bis auf die zusätzlich amplifizierte DNS von Wildschwein auch mit den porzinen Primern von MONTIEL-SOSA et al. (2000) keine Kreuzreaktionen aufgetreten. Über einen Restriktionsverdau mit der Endonuklease *Ava* II wurden nur für das 531 bp lange Schweine-DNS-Amplifikat zwei Fragmente (286+245 bp) erzeugt.

Tab. 2 Spezies-spezifische Primer verschiedener Gene in der Tierartenidentifizierung

Quelle	PCR	Gen	Tierarten	Material	NWG
ALTMANN et al. 2004	Single	$\beta$ -Casein	<u>Zg</u> , Schf, Rd, Sw, Pf, Pu, Hu, Ente, Strauß, Hirsch Känguru, Wildsw	prozessierte und erhitzte Fleisch- und Milcherzeugnisse	Diff. möglich
CHIKUNI et al. 1994	Single	Satelliten I DNS	<u>Schf</u> , Zg, Rd, Sw, Pf, Hu, Wasserbüffel, Sika-Reh, Kan	rohe und erhitzte Proben (Max. 120°C, 30 min)	10 pg DNS in 375 ng Rd DNS
LOCKLEY und BARDSLEY 2002	Multiplex Single	cardiales <i>Aktin</i> (Intron)	<u>Hu</u> , <u>Pu</u> , Sw, Schf, Rd	DNS, Fleisch, Hu-Ei	10% Hu, 25% Pu (Multiplex) 1% (singel)
MEYER et al. 1994b	Single	<i>Wachstums-hormon</i>	<u>Sw</u> , Rd, Pf, Schf, Zg, Hu, Pu	rohe und erhitzte Proben (Max. 121°C, 10 min)	<2%
MONTIEL-SOSA et al. 2000	Single	D-loop mtDNA	<u>Sw</u> , Rd, Schf, Hu, Mensch, <u>Wildsw</u>	prozessierte und erhitzte Produkte	5% Fleisch und Fett
RODRÍGUEZ et al. 2001	Multiplex	nukleäre 5S rDNS	<u>Gans</u> , <u>Mulard-Ente</u>	erhitzte Proben (Max. 115°C, 75 min)	Diff. möglich
RODRÍGUEZ et al. 2003	Single	$\alpha$ -Aktin	<u>Gans</u> , <u>Mulard-Ente</u> , Hu, Pu, Sw	Foie Gras	1% Ente in Gans
RODRÍGUEZ et al. 2004a	Single	mitochondriale 12S rRNA	<u>Sw</u> , <u>Rd</u> , <u>Schf</u> , <u>Zg</u> , Gans, Ente, Hu, Pf, Kan	rohe und erhitzte Fleischgemische (Max. 120°C, 20 min)	1%
SCHWÄGELE et al. 2002	Single	<i>Neuroglobin</i>	<u>Schf</u> , <u>Zg</u>	Fleisch- und Milcherzeugnisse	Diff. möglich
ZHANG et al. 1999	Single	1.709 Satelliten DNS	<u>Rd</u> , Büffel, Yak, Pf, Zg, Schf, Kamel, Sw, Reh, Maus, Hund, Esel, Hu, Fisch, Gans, Maultier	rohes und erhitztes Fleisch (Max. 120°C, 30 min)	DNS: 33,6 fg roh, 0,32 pg erhitzt

— - nachzuweisende Spezies, Diff. - Differenzierung, Max. - maximal, Hu - Huhn, Pu - Pute, Rd - Rind, Sw - Schwein, Schf - Schaf, Zg - Ziege, Pf - Pferd, Kan - Kaninchen, NWG - Nachweisgrenze

Bei der Identifikation der Tierart mit Spezies-spezifischen Primern findet ebenfalls das **Cytb**-Gen in verschiedenen Protokollen Anwendung (Tab. 3). HIRD et al. (2003) nutzten für die Detektion nicht wie üblich eine Gel-Elektrophorese, sondern den Fluoreszenzfarbstoff Vista green. Dieser Farbstoff entwickelt eine Fluoreszenz erst nach Bindung an doppelsträngige DNS. Damit konnte im Anschluss an die PCR auf die An- oder Abwesenheit der durch die zwei spezifischen Primer-Paare amplifizierten Fragmente von Huhn und Pute in einer Probe getestet werden (120 bp, 101 bp). COLOMBO et al. (2000) kreierten mit der *Cytb*-Gensequenz für Strauß ein spezifisches Primerpaar. Durch eine PCR wurde ein 543 bp langes Fragment aus Straußen-DNS und zusätzlich ein 229 bp langer Abschnitt aus Emu-DNS amplifiziert. Mittels Gel-Elektrophorese und einer sensitiven Silberfärbung konnten die beiden Spezies differenziert werden.

Die von MATSUNAGA et al. (1999) publizierte Multiplex-PCR wies sechs Tierarten simultan nach. Durch einen universalen forward Primer und Spezies-spezifische reverse Primer wurden für Ziege, Huhn, Rind, Schaf, Schwein und Pferd 157 bp, 227 bp, 274 bp, 331 bp, 398 bp bzw. 439 bp lange Fragmente erhalten, die durch Gel-Elektrophorese und Ethidiumbromidfärbung differenziert wurden. Aufgrund seiner Länge konnte das Pferde-Fragment als einziges nach einer Erhitzung auf 120°C für 30 min nicht mehr detektiert werden. Die Nachweisgrenze lag für das Fleisch der getesteten Spezies bei 0,25 ng und auch die Unterscheidung der nah verwandten Arten Schaf und Ziege bereitete keine Probleme. OBROVSKÁ et al. (2004) nutzten ebenfalls die oben beschriebene Multiplex-PCR. Hierbei war nach Erhitzung auf 121°C für 30 min ein Nachweis des Pferde-spezifischen Fragmentes möglich und mit Ausnahme der schwächeren Rindfleisch-Bande ergaben die anderen Tierarten fast gleiche Intensitäten im Gel. Das Detektionslimit wurde mit 2%, entsprechend 0,00050 g Fleischeinwaage angegeben.

Im Allgemeinen wurden bei MATSUNAGA et al. (1999), HIRD et al. (2003) und OBROVSKÁ et al. (2004) die Tierarten mit hoher **Spezifität**, ohne Kreuzreaktionen zwischen den getesteten Spezies nachgewiesen. Jedoch beschrieben OBROVSKÁ et al. (2004), dass die spezifische Detektion (157 bp) von Ziegenfleisch nur in Abwesenheit von Schaffleisch gelang. Lagen sowohl Schaf- als auch Ziegen-DNS vor, wurde nur das Schaf-spezifische Fragment von 331 bp detektiert.

Tab. 3 Spezies-spezifische Primer des *Cytb*-Gens in der Tierartenidentifizierung

Quelle	PCR	Gen	Tierarten	Material	NWG
<b>COLOMBO et al. 2002</b>	Single	<i>Cytb</i> -Gen	Strauß, Emu	Proben aus kommerziellen Quellen	Diff. möglich
<b>HIRD et al. 2003</b>	Single	<i>Cytb</i> -Gen	Hu, Pu, Sw, Schf, Kan, Ente, Reh	DNS, rohe und erhitzte Fleischerzeugnisse	Diff. möglich
<b>MATSUNAGA et al. 1999</b>	Multiplex	<i>Cytb</i> -Gen	Hu, Pf, Rd, Schf, Sw, Zg	rohe und erhitzte Proben (Max. 120°C, 30 min)	0,25 ng
<b>OBROVSKÁ et al. 2004</b>	Multiplex nach Matsunaga	<i>Cytb</i> -Gen	Hu, Pf, Rd, Schf, Sw, Zg	rohe und erhitzte Proben (Max. 121°C, 30 min)	2%

\_\_ - nachzuweisende Spezies, Diff. - Differenzierung, Max. - maximal, Hu – Huhn, Pu – Pute, Rd – Rind, Sw – Schwein, Schf – Schaf, Pf – Pferd, Zg – Ziege, Kan – Kaninchen, NWG - Nachweisgrenze

### 2.2.3.2 Kommerzielle Spezies-spezifische Primer

Testkits, die auf Spezies-spezifischen Primern basieren, sind kommerziell erhältlich. In Deutschland werden derartige Kits beispielsweise von der Firma Coring System Diagnostix GmbH, Gernsheim (Hersteller Cibus Biotech GmbH, Gütersloh), der Firma Th.geyer, Renningen (Hersteller ifp, Berlin) und der Firma Alcum GmbH, Rietberg vertrieben. Einige Testkits und Beispiele für Erfahrungen mit deren Anwendung sind in Tabelle 4 zusammengefasst.

Tab. 4 Kommerzielle Spezies-spezifische Primer für die Tierartenidentifikation

Quelle	Methode	Tierarten	Material	NWG
<b>ALCUM 2006</b>	Animal-Standard-Kit	Esel, Hu, Pu, Rd, Schf, Sw, Zg	rohe, gebrühte und gekochte Produkte	ca. 1%
<b>ALCUM 2006</b>	Animal-Extra-Kit	Hu, Pf, Pu, Rd, Sw	extrem verarbeitete und hoherhitzte Produkte	ca. 1%
<b>BEHRENS et al. 1999</b>	Animal-Standard-/Extra-Kit (Alcum)	Esel, Hu, Pu, Rd, Schf, Sw, Zg (Ex.) / Pf, Hu, Pu, Rd, Sw (St.)	erhitzte und komplexe Fleischerzeugnisse, Mischungen (Max. 121°C, 20 min)	0,1-1%
<b>CIBUS 2001</b>	CIB-A-Kits Standard	Esel, Hu, Pu, Rd, Schf, Sw, Zg, Mix (Rd, Sw, Hu, Pu)	rohe, gebrühte und gekochte Produkte	0,1-1%
<b>CIBUS 2001</b>	CIB-A-Kits Extra	Hu, Pf, Pu, Rd, Sw, Hase, Kanin, Schf, Zg, Strauß, Wdk, Mix (Rd, Sw, Hu, Pu)	extrem verarbeitete und hoherhitzte Produkte	0,1-1%
<b>POSER et al. 2000</b>	Animal-Extra-Kit (Alcum)	Sw, Rd, Pu	erhitzte Fleischerzeugnisse (Max. 130°C, F-Wert bis 373)	Diff. möglich
<b>TH. GEYER 2007</b>	PCRFast® Testkits	Sw, Rd, Wdk, Sgt, Hu, Pu, Ente, Gf, Schf, Zg, Pf, Nager, Hund, Ktz	Lebens- und Futtermittel	< 10 Gen-Kopien

Diff. - Differenzierung, Ex. - Extra, Max. - maximale Erhitzung, St. - Standard, Hu – Huhn, Pu – Pute, Rd – Rind, Sw – Schwein, Pf – Pferd, Schf – Schaf, Zg – Ziege, Wdk – Wiederkäuer, Gf – Geflügel, Sgt – Säugetier, Ktz – Katze, NWG - Nachweisgrenze

Bei den PCRFast® Testkits für Tierarten der Firma Th.geyer handelt es sich um eigenständige Systeme für jede nachzuweisende Spezies. Spezifische Primer und artspezifische Positivkontrollen liegen in 96 Reaktionsgefäßen vor, davon enthalten 48 bereits die spezifische Kontroll-DNS als PCR-Kontrolle. Anschließend wird durch zwei Pipettierschritte, einerseits die Proben-DNS und andererseits der Master Mix hinzugefügt. Die tierartspezifischen Primer basieren auf verschiedenen Genen und erzeugen unterschiedlich lange Amplifikate (Tab. 5). Der Testkit ist für den Nachweis der Tierart in Lebens- und Futtermittel, sowie in pharmazeutischen Produkten konzipiert. Der Detektionsgrenze liegt dabei unter 10 Kopien des nachzuweisenden Spezies-spezifischen Sequenzabschnitts (IFP 2007, TH.GEYER 2007).

Tab. 5 Tierartspezifische Fragmentlängen und Gene der PCRFast® Testkits

<b>Tierart</b>	<b>Lokalisation</b>	<b>Gen</b>	<b>Fragmentlänge [bp]</b>
Geflügel	mitochondrial	Cytochrom b	227
Huhn	mitochondrial	12S-rRNA	247
Pferd	mitochondrial	Cytochrom b	146
Pute	mitochondrial	16S-rRNA	78
Rind	mitochondrial	ATPase6	147
Säuger	mitochondrial	tRNA-Cytochrom b	130
Schaf	mitochondrial	12S-rRNA	99
Schwein	nukleär	Transferrin-mRNA	78
Wiederkäuer	nukleär	Interferon	77
Ziege	mitochondrial	Cytochrom b	157

Die nur für Forschungszwecke zu verwendenden Alcum Animal-Kits sind in zwei Produktlinien erhältlich. Zum einen kann mittels des Animal-Standard-Kits die Tierart aus rohen, gebrühten und gekochten Fleischprodukten nachgewiesen werden und zum anderen ist der Nachweis aus stark prozessierten Proben, Konserven und Fleischwaren mit zahlreichen Zusätzen oder extremen pH-Werten mit den Animal-Extra-Kits möglich. Die jeweilige Tierart kann direkt nach der PCR ohne Restriktionsspaltung elektrophoretisch identifiziert werden. Für beide Produktgruppen bilden die Primer nur mit der spezifischen Tierart PCR-Amplifikate und Kreuzreaktionen mit anderen Spezies treten nicht auf. Die Nachweisgrenze wird mit ca. 1% angegeben (BEHRENS und UNTHAN 1999, ALCUM 2006).

BEHRENS et al. (1999) beschrieben den Spezies-spezifischen PCR-Testkit der Firma Alcum. Die in zwei verschiedenen Ausführungen erhältlichen Testkits (Standard, Extra) wurden für sieben (Esel, Huhn, Pute, Rind, Schaf, Schwein, Ziege) bzw. fünf (Pferd, Huhn, Pute, Rind, Schwein) Spezies getestet. Die Standard-Kits ermöglichten auch noch in gekochten Produkten eine sichere und spezifische Amplifikation der Tierarten. Für hochehitze oder extrem prozessierte Proben wurden die Extra-Kits eingesetzt, die sich durch kurze Amplifikationsprodukte auszeichneten. Die Nachweisgrenze lag bei 1% für alle Spezies in beiden Testkit-Versionen. Durch Optimierung der PCR-Bedingungen könnten auch Zusätze in der Größenordnung von 0,1% nachgewiesen werden. Nur stark salzhaltige Produkte wie Ziegenkäse und Ziegengouda brachten vereinzelt schwache unspezifische Nebenprodukte. Im Vergleich verschiedener Methoden der Tierartenidentifikation nutzten POSER et al. (2000) ebenfalls die Spezies-spezifischen Primer der Firma Alcum aus den Animal-Extra-Kits für die Amplifikation kurzer Fragmente von 146-182 bp. Es konnten hierbei in den auf maximal 130°C erhitzten Proben die Tierarten Rind, Schwein und Pute detektiert werden.

Bei den CIBUS Tierarten-PCR-Kits (CIB-A-Kits) werden entsprechend der Testkits von Alcum auch zwei Produktlinien unterschieden. Der Zusatz „Standard“ bezieht sich auch hier auf den Nachweis der Tierart aus rohen, gebrühten und gekochten Fleischprodukten. Mit „Extra“ werden die Testkits bezeichnet, die für extrem verarbeitete und hochehitze Produkte zum Nachweis eingesetzt werden. Tierartspezifische PCR-Fragmente können durch einen Vergleich mit parallel synthetisierten Kontrol-PCR-Amplifikaten im Agarose-Gel identifiziert werden. Spezifische Fragmente werden nur in Anwesenheit der entsprechenden DNS amplifiziert. Die tierartspezifischen Primer bilden keine PCR-Amplifikate mit DNS von anderen lebensmittelrelevanten Tierarten. Die Nachweisgrenze wird mit ca. 0,1-1% in Produkten aus Säugetier- oder Geflügelfleisch angegeben (CIBUS 2001, CORING 2006a).

Über die Sequenz der verwendeten Primer oder das zugrunde liegende Gen werden bei Alcum und Cibus für die erwähnten Testkits keine Angaben gemacht (CIBUS 2001, AL-CUM 2006). Jedoch ergeben sich für beide Anbieter mit den Spezies-spezifischen Primern die in Tabelle 6 dargestellten Fragmentlängen für die einzelnen Tierarten (BEHRENS et al. 1999, CORING 2006b).

Tab. 6 Tierartspezifische Fragmentlängen mit kommerziellen Primern

Tierart	Länge [bp], Standard	Länge [bp], Extra
Huhn	416 a/c	159 a/c
Pute	550 a/c	149 a/c
Rind	431 a/c	166 a/c
Schwein	769 a/c	182 a/c
Ziege	561 a/c	189 c
Schaf	265 a/c	189 c
Esel	335 a/c	
Strauß		199 c
Pferd		146 a/c
Hase		162 c
Kaninchen		169 c
Wiederkäuer		161 c

a - Animal-Kit von Alcum, c - CIB-A-Kit von Cibus, Extra – Primer für extrem verarbeitete oder gekochte Produkte, Standard – Primer für rohe, gebrühte oder gekochte Produkte

### 2.2.3.2.3 Zeit- und Kostenaufwand

Die Angaben des zeitlichen und finanziellen Aufwandes einer Methode schienen den meisten Autoren nebensächlich, so dass sich zu diesem Thema nur wenige Daten finden lassen (Tab. 7). Oft bezeichneten Autoren das Verfahren als schnell und einfach in der Handhabung (BEHRENS et al. 1999, RODRÍGUEZ et al. 2001, OBROVSKÁ et al. 2004, RODRÍGUEZ et al. 2004a), sowie als schnell und mit geringem Kostenaufwand (MEYER et al. 1994b) oder als schnell und sensitiv (MATSUNAGA et al. 1999). Konkrete Angaben lieferten ZHANG et al. (1999), HIRD et al. (2003) und BEHRENS et al. (1999).

HIRD et al. (2003) erhielten mit einer PCR innerhalb von 5 Stunden Resultate, in Abhängigkeit der Probezusammensetzung, und beschrieben den robusten Test als einfach in der Handhabung. ZHANG et al. (1999) benötigten für eine Spezies-spezifische PCR 6 Stunden. Wurden dagegen die Proben für 30 min vor der Extraktion mit einem Zerkleinerungsgerät bearbeitet, für die Präparation der DNS eine Stunde aufgewandt und zusätzlich 2 Stunden für die PCR und anschließend eine halbe Stunde für die Gel-Elektrophorese benötigt, dann war der Test sogar in 4 Stunden durchführbar. BEHRENS et al. (1999) konnten mit den Testkits der Firma Alcum mit Spezies-spezifischen Primern die gesamte Analyse innerhalb eines Tages abschließen. Der tatsächliche Zeitaufwand für

eine Einzelprobe betrug hierbei 1,5 Stunden, welcher aber durch die gleichzeitige Bearbeitung mehrerer Proben verringert werden konnte.

Mit dem CIB-A-Kit kann die komplette Untersuchung innerhalb eines Arbeitstages durchgeführt werden (CIBUS 2006). Die derzeitigen Preise für diesen Testkit sowie für die Animal-Kits von Alcum, wie auch Angaben zum Zeitaufwand können Tabelle 7 entnommen werden.

Tab. 7 Zeit-und Kostenaufwand für Spezies-spezifische PCR-Methoden

Quelle	Methode	Zeit	Preis [€]*
<b>ALCUM 2006</b>	Animal-Standard-Kit		285,- (20 Ansätze mit Ex)
<b>ALCUM 2006</b>	Animal-Extra-Kit		335,- (20 Ansätze mit Ex)
<b>BEHRENS et al. 1999</b>	Animal-Standard-/ Extra-Kit	Innerhalb 1 Tages, 1,5 h je Einzelprobe	
<b>CORING 2006a</b>	CIB-A-Kits Standard	Innerhalb 1 Tages	290,- (60 Ansätze mit Ex) 525,- (120 Ansätze ohne Ex)
<b>CORING 2006a</b>	CIB-A-Kits Extra	Innerhalb 1 Tages	340,- (60 Ansätze mit Ex) 630,- (120 Ansätze ohne Ex)
<b>HIRD et al. 2003</b>	ssp Single-PCR	5 h	
<b>TH.GEYER 2007</b>	PCRFast®		300,- € (96 Reaktionsgefäße, 48 davon mit Kontroll-DNS)
<b>ZHANG et al. 1999</b>	ssp Single-PCR	6 h	

\* - Stand: 2006 exklusiv 16% MwSt, Ex – Extraktion, ssp – Spezies-spezifische Primer

### 2.2.3.3 Tierartenidentifizierung mittels DNS-Chip

Das Prinzip des Nachweises einer Tierart mittels DNS-Chip basiert auf dem unter Kapitel 2.2.2.2 beschriebenen Grundprinzip. Danach hybridisieren Tierart-spezifische Sequenzen amplifizierter DNS-Abschnitte an komplementären Sonden, welche in einem bestimmten Muster auf einem Objektträger fixiert wurden. Tabelle 8 fasst die nachfolgend gemachten Angaben zusammen.

PETER (2003) etablierte und verwendete die konventionelle Hybridisierung auf einem DNS-Chip als Vergleichsmethode für die Entwicklung eines Evaneszent-Feld-DNA-Biosensors. Bei den Evaneszent-Feld-Biosensoren, die zur Gruppe der optischen Biosensoren gehören, wird das Phänomen der evaneszierenden Welle genutzt. Evaneszierende Wellen treten bei einer totalen internen Lichtreflexion an Grenzflächen von Medien unterschiedlicher Brechungsindices auf. Die evaneszierenden Wellen regten hier Cy5-markierte DNS-Amplifikate zur Fluoreszenz an, wenn diese komplementär an immobilisierte

DNS-Sonden gebunden hatten. Dadurch wurde die Detektion einer Hybridisierung tierartspezifischer Sequenzen in Realzeit möglich. Die konventionelle Chip-Hybridisierung und der Biosensor sollten in der Tierartendifferenzierung in Lebensmitteln und zur Identifizierung von Mikroorganismen zum Einsatz kommen. Für beide Verfahren wurde mittels PCR ein 377 bp langes PCR-Produkt aus dem *Cytb*-Gen amplifiziert. Die hierfür verwendeten universalen Primer bestanden zum einem aus dem von MEYER et al. (1995) und BURGNER und HÜBNER (1998) eingesetzten reverse-Primer *cytb403*, der hier als forward-Primer eingesetzt wurde, und dem von PETER (2003) entwickelten *cytb779* reverse-Primer. Die selbst hergestellten DNS-Sonden, mit Spezies-spezifischen Sequenzen des *Cytb*-Gens, wurden für den „konventionellen“ DNS-Chip auf einem Glasobjektträger im Standardformat (Sigma-Aldrich, Taufkirchen) immobilisiert. Die Hybridisierung Cy5-markierter PCR-Produkte erfolgte unter einem Deckgläschen in einer feuchten Kammer für eine Stunde bei 37°C. Anschließend wurde der Chip in drei verschiedenen Waschlösungen unter Erhöhung der Stringenz je 5 min gewaschen. Nach Reinigung unter fließendem, vollentsalztem Wasser für ca. 10 sec wurde der Objektträger unter einem Stickstoffstrom getrocknet. Das Auslesen der Fluoreszenz erfolgte bei 635 nm mittels GMS418 Mikroarray-Scanner (MWG-Biotech, Ebersberg), die hiermit erhaltenen Bilder wurden unter Verwendung einer Demoversion der GenePix Pro™ Software (Axon Instruments, USA) ausgewertet. Durch einen festgelegten Schwellenwert für die gemessenen Signale, wurde die schwache Fluoreszenz geringer Kreuzreaktionen der Sonden in der Auswertung nicht berücksichtigt. Starke Kreuzreaktionen zeigte vor allem eine Ziegen-Sonde, die sowohl Ziegen- als auch Schweine-PCR-Produkte gebunden hatte. Abgesehen davon konnten 1% Zumischungen in binären Speziesproben noch eindeutig nachgewiesen werden. Zudem zeigten die Ergebnisse der Chiphybridisierung von Handelsproben eine insgesamt sehr gute Übereinstimmung mit der vom Chemischen Landes- und Staatlichen Veterinäruntersuchungsamt (CVUA) Münster durchgeführten Referenzanalytik (ELISA von TRANSIA, tierartspezifische PCR von Cibus Biotech). Die Nachweisgrenze wurde mit ca. 0,1% angegeben und der zeitliche Aufwand betrug im Mittel 120 min, mit einer Standardinkubationszeit von einer Stunde.

Tab. 8 DNS-Chips in der Tierartenidentifikation

Quelle	Methode	Tierarten	NWG	Zeit*	Preis
<b>PETER 2003</b>	DNS-Chip, Glasträger	Hu, Pu, Rd, Sw, Schf, Zg, (Actin)	0,1-1%	120 min inkl. 60 min Inkub.	
<b>GREINER BIO-ONE 2005</b>	CarnoCheck®, Kunststoffträger	Sw, Rd, Schf, Pu, Hu, Pf, Esel, Zg	0,05-0,35%	20 min rA exkl. 20 min Inkub.	492,- € / 5x 6 Chips 648,- € / 5x 12 Chips
<b>CHIPRON 2005</b>	DNS-Chip, LCD-Array	Sw, Rd, Schf, Zg, Pf, Büffel, Hu, Esel, Kan, Hase, Pu, Gans, 2 Entenarten [Bison, Hirscharten, Karibu, Hund, Ktz, Ratte, Strauß, Fasan, Wachtelarten, Känguru]	<0,5%	45 min Inkub. exkl. rA	

\* - berechnet nach Abschluss der PCR, [ ] - auf Anfrage, inkl. - inklusive, Inkub. - Inkubation, exkl. - exklusive, rA - reine Arbeitszeit, Hu – Huhn, Pu – Pute, Rd – Rind, Sw – Schwein, Schf – Schaf, Zg – Ziege, Pf – Pferd, Kan – Kaninchen, Ktz – Katze

Mit Ausnahme der Arbeit von PETER (2003) findet sich in der Literatur kein analoger Ansatz, der die Sensitivität der PCR mit der Spezifität der Hybridisierung in Form eines DNS-Chips kombiniert. Jedoch existieren bereits kommerzielle Testkits für diese Art der Tierartenidentifikation. Zum einen wird ein LCD-Array von Chipron (Berlin) angeboten (CHIPRON 2006), der die parallele Detektion von 13 oder 30 Spezies, mit einer Nachweisgrenze von unter 0,5%, je nach Prozessierungsgrad der Probe, ermöglicht (CHIPRON 2005). Zum anderen ist von Greiner Bio-One (Frickenhausen) der DNS-Chip CarnoCheck® auf dem Markt, der nachfolgend genauer betrachtet werden soll.

Der Nachweis mittels CarnoCheck® basiert auf den Spezies-spezifischen Unterschieden innerhalb des *Cytb*-Gens. Universale Primer, die an hochkonservierten Regionen dieses Gens binden, ermöglichen die simultane Amplifikation eines 389 bp langen DNS-Fragments verschiedener Spezies. Durch Kopplung einer der beiden Primer mit dem Fluoreszenzfarbstoff Cy5 werden die PCR-Produkte markiert. Die anschließende Hybridisierung erfolgt an Spezies-spezifische, komplementäre DNS-Sonden. Diese sind auf definierten Positionen in dem Mikroarray fixiert (Abb. 3). Auf dem Objektträger des CarnoCheck® sind 6 bis 12 dieser einzelnen DNS-Chips platziert. Die Detektion der Hybridisierungsergebnisse wird mit Hilfe eines Scanners bei verschiedenen Wellenlängen durchgeführt. Auf diese Weise können acht verschiedene Tierarten je DNS-Chip (Schwein, Rind, Schaf, Pute, Huhn, Pferd, Esel, Ziege) in prozessierten und komplexen Lebensmitteln identifiziert werden. In Abhängigkeit der Spezies, der Verarbeitung der Proben und der

verwendeten Extraktionsmethode sind Nachweisgrenzen von 0,05% bis 0,35% möglich (GREINER BIO-ONE 2005). Die genauen Abläufe des Verfahrens, sowie die Auswertung des Scans mittels der CheckReport™ Software sind in Kapitel 3.2.6 dargestellt. Bisher stehen keine Daten zur Verfügung, die die verwendeten Primer oder Sonden näher charakterisieren würden, und es finden sich auch keine veröffentlichten Erfahrungen über die Anwendung dieses Testkits (PETER 2003).



Abb. 3: Schema der immobilisierten DNS-Sonden des CarnoCheck®

Sonden auf jeweils fünf Spots verteilt, O – Spot, HYB. - Hybridisierung

## 2.3 Immunologische Analytik

Die immunologische Analytik basiert auf der Bildung eines Antigen-Antikörper-Komplexes, als Folge einer Reaktion zwischen einem Antigen und einem passenden Antikörper. Der entstehende unlösliche, präzipitierende Komplex ist die Basis der ältesten aber immer noch wichtigen, als immunologisch oder immunochemisch bezeichneten Methoden der Tierartenidentifizierung (SCHWÄGELE 1999, BLICKE 2003). Eines dieser Verfahren ist der Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay (ELISA), auf den im Besonderen eingegangen werden soll.

### 2.3.1 Antigen und Antikörper

Im Rahmen der Immunantwort tierischer Lebewesen werden als Folge der Gegenwart fremder Materialien Antikörper produziert. Als ursächliche Substanz für die Bildung von Antikörpern kommen Makromoleküle wie Proteine, aber auch Polysaccharide und Nucleinsäuren in Betracht. Allgemein werden diese als Antigene bezeichnet. Jeder Antikörper besitzt eine für sein auslösendes Antigen spezifische Affinität. Diese Affinität bezieht sich nur auf eine spezielle Region, das sogenannten Epitop oder die antigene Determinante des makromolekularen Antigens. Kleinere Fremdmoleküle, die alleine nicht in der Lage wären, eine Immunreaktion mit Antikörperbildung auszulösen, können diese Fähigkeit durch Bindung an Makromoleküle wie z.B. Proteine erlangen. Die produzierten Antikörper können sowohl auf die gebundenen, als auch auf die ungebundenen, als Haptene bezeichneten kleinen Fremdmoleküle reagieren (STRYER 1999, BRUNING und VAN DEN TWEEL 1999).

Die durch Immunisierung mit einem Antigen entstehenden Antikörper werden auch als Immunglobuline bezeichnet. Ihre Struktur setzt sich aus zwei Arten von Polypeptidketten zusammen. Die leichten und schweren Ketten des Immunglobulins (Ig) werden durch sich periodisch wiederholende intramolekulare Disulfidbrücken stabilisiert. Es gibt insgesamt fünf verschiedene Klassen von Immunglobulinen (IgG, IgA, IgM, IgD, IgE), die sich in ihren spezifischen biologischen Eigenschaften unterscheiden, aber die Grundstruktur der Ketten gemeinsam haben. Die Gestalt des Immunglobulin G konnte mittels elektronenmikroskopischer Analysen untersucht werden und wird in Form eines Y beschrieben. Die sogenannten variablen Regionen der leichten und schweren Ketten, die am Ende der

beiden Y-Schenkel liegen (Abb. 4), bilden die Antigenbindungsstellen. Durch ihre große genetische Rekombinationsmöglichkeit können Millionen von unterschiedlichen Bindungsstellen produziert werden, wobei jede eine spezifische Affinität zu einem Antigen oder Hapten besitzt. Dadurch ist es einem tierischen Organismus möglich, gegen fast jede antigene Determinante innerhalb weniger Wochen nach Kontakt große Mengen spezifischer Antikörper zu synthetisieren (KOOLMAN und RÖHM 1998, BRUNING und VAN DEN TWEEL 1999).

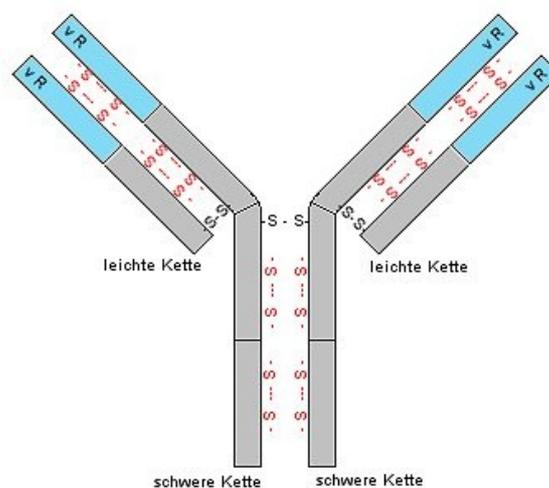


Abb. 4: Schematischer Aufbau eines Immunglobulin G

S-S – Disulfidbrücken, v R – variable Region

### 2.3.2 Mono- und polyklonale Antikörper

Durch die Affinität eines Antikörpers zu einem spezifischen Antigen ist ein Antikörper ein wertvolles analytisches Reagenz. In der Analytik werden sowohl polyklonale als auch monoklonale Antikörperpräparationen eingesetzt. Nicht identische Klone antikörperproduzierender Zellen eines gegen ein Antigen immunisierten Tieres produzieren polyklonale Antikörper. Diese stellen ein Gemisch von Antikörpern dar, welche unterschiedliche Epitope des immunisierenden Agens erkennen. Monoklonale Antikörper sind dagegen das Produkt identischer Zellen, die in einer Zellkultur wachsen. Diese homogenen Antikörper erkennen alle dasselbe Epitop des Antigens. 1984 erhielten Milstein und Koehler den Nobelpreis für Chemie, nachdem sie 1975 die Technik zur Herstellung von monoklonalen Antikörpern entwickelt hatten (HAAIJMANN und EGBERTS 1999, SCHWÄGELE 1999).

Unabhängig, ob es sich um monoklonale oder polyklonale Antikörper handelt, müssen Antikörper, die in einem Enzymimmunoassay eingesetzt werden sollen, gewisse Anforderungen erfüllen. Zu allererst muss sichergestellt werden, dass die Antikörper in ausreichender Menge zu Verfügung stehen und ihre Bindungsspezifität reproduzierbar ist. D.h. zu einem späteren Zeitpunkt hergestellte Antikörper besitzen dennoch dieselben Eigenschaften wie die ursprünglich produzierten. Den Einflüssen, denen der Antikörper in einem Test ausgesetzt ist, muss er eine ausreichende Stabilität entgegenbringen, ebenso sollte er möglichst lange lagerfähig sein, um einem Testkit eine hohe Haltbarkeitsdauer zu geben. Die wichtigste Eigenschaft ist natürlich die Spezifität gegenüber dem nachzuweisenden Antigen. Demnach sollte der Antikörper keine oder zumindest nur eine sehr geringe Kreuzreaktion mit ähnlichen Antigenen aufweisen und dabei dennoch eine hohe Affinität zu dem gesuchten Antigen in Verbindung mit einer hohen Bindungsstärke besitzen. Bei Verwendung von Antikörpern mit diesen Eigenschaften können Methoden entwickelt und durchgeführt werden, die sensitiv, spezifisch und robust in der Routineanalytik eingesetzt werden können (CANDLISH 1988, HAAIJMANN und EGBERTS 1999).

WHITTAKER et al. (1982) arbeiteten zum Nachweis von Tierarten mit polyklonalen Antisera, die mittels Affinitätschromatographie gereinigt wurden um kreuzreagierende Antikörper zu entfernen. Die Reinigung polyklonaler Antisera mittels eines Immunadsorptions-Schrittes, um falsch-positive Resultate bei der Analyse durch Kreuzreaktionen zu vermeiden, hielten auch andere Autoren für wichtig (GRIFFITHS und BILLINGTON 1984, MARTÍN et al. 1988a). Trotz der Aufreinigung stellen diese Seren eine Gruppe heterogener Antikörper dar, die von monoklonalen Antikörpern in ihrer qualitativen Homogenität und ihrer quantitativen Verfügbarkeit übertroffen werden (GOERLICH und GREUEL 1986). Einige Autoren (MORALES et al. 1994, CHEN et al. 1998, HSIEH et al. 1998, SHEU und HSIEH 1998, CHEN und HSIEH 2000, BUCHHOLZ 2003) haben bereits mit monoklonalen Antikörpern gearbeitet, um tierartspezifische Antigene nachzuweisen. Dennoch basiert der Großteil der Publikationen in diesem Anwendungsgebiet (vgl. Tab. 9) auf polyklonalen Antisera. MARTÍN et al. (1991) verwendeten in einem Testkit sowohl mono- als auch polyklonale Antikörper.

### 2.3.3 Proteine als Antigene

Proteine, die eine definierte Abfolge aus Aminosäuren, die sogenannte Peptidkette, in einer spezifischen räumlichen Anordnung darstellen, können durch zahlreiche Ursachen denaturiert werden. Hitze, Säure, Torsionskräfte, chemische Substanzen, hydrostatischer Druck und weitere Einwirkungen, die zur Denaturierung von Proteinen führen, treten auch bei der Herstellung und Verarbeitung von Lebensmitteln auf. Bei diesen Vorgängen ist der Verlust vieler spezifischer Eigenschaften der Proteine möglich. Physikalisch-chemische Eigenschaften wie z.B. die Löslichkeit oder die elektrophoretische Beweglichkeit, aber auch biologisch-physiologische Eigenschaften wie beispielsweise die Aktivität von Enzymen kann sich verändern oder ganz verloren gehen. Für die Immunanalyse am bedeutendsten ist jedoch die Änderung von immunchemischen Eigenschaften. Der Verlust antigener Determinanten oder die Entstehung neuer Epitope kann zu einer Änderung der Affinität zwischen Antigen und Antikörper führen, mit Folgen für die Sensitivität und Spezifität einer auf Antikörpern basierenden Analyse. Immunochemisch gesehen handelt es sich bei einer Denaturierung um eine Änderung in der räumlichen Struktur des Proteins (BAUDNER und DREHER 1991).

Bei technologischen Behandlungen von Lebensmitteln wie beispielsweise der Einwirkung von hohem Druck oder extremen Temperaturen kann es sogar zu einer Fragmentierung der Peptidkette kommen. Die weniger von der Sequenz der Aminosäuren als von der räumlichen Anordnung definierten Epitope können so ihre Antigenität einbüßen. Jedoch ist bereits bei einer Denaturierung ohne Fragmentierung der Peptidkette mit einer Reduktion der antigenen Eigenschaft der Epitope eines Proteins zu rechnen. Die Auswirkungen von Hitzedenaturierung auf die Antigenität von Fleischproteinen wurden von MARÍN et al. (1992) untersucht. Schon bei einer Erhitzung auf 70°C für 30 min gehen 50% der antigenen Eigenschaften der Proteine verloren. Beim Nachweis von Protein-Inhaltsstoffen aus Lebensmitteln ist daher zu beachten, welches Ziel das Verfahren detektieren soll, native oder durch Prozessierung veränderte Antigene. Hierfür können Antiseren einerseits gegen intakte Proteine und andererseits gegen bei bestimmten Bedingungen denaturierte Proteine durch die Immunisierung von Tieren mit entsprechenden Antigenen hergestellt werden (BAUDNER und DREHER 1991).

Für die Tierartenidentifizierung finden häufig Muskelproteine als nachzuweisende und zu differenzierende antigene Strukturen Anwendung. Die Proteine der Muskulatur können

grob in kontraktile, lösliche und unlösliche Fraktionen eingeteilt werden. Die lösliche Fraktion kann mit Wasser oder Salzlösungen aus dem Muskel extrahiert werden und besteht hauptsächlich aus Enzymen des Intermediärstoffwechsels, dem Muskelfarbstoff Myoglobin und den Serumalbuminen. Die lösliche Proteinfraction aus dem Muskel wird auch als sarkoplasmatischer Extrakt bezeichnet. Im Gegensatz zu den kontraktilen Proteinen der Skelettmuskulatur von Wirbeltieren, die eine universale Ähnlichkeit aufweisen und damit keine Rückschlüsse auf ihren tierartlichen Ursprung zulassen, variieren die löslichen Proteine des sarkoplasmatischen Extrakts in Quantität und Qualität je nach Spezies, sogar bei nahverwandten Arten (HOFMANN 1987, KING und KURTH 1982, SCOPES 1968, SLATTERY und SINCLAIR 1983). Nach MARÍN et al. (1988) eignen sich polyklonale Antiseren gegen Sarkoplasma-Extrakte demnach zur Identifizierung der Tierart in nicht erhitzten Fleischgemischen.

Neben den am häufigsten als Antigene verwendeten löslichen Proteinen (MARTÍN et al. 1988a,b, 1991), speziell den Serumalbuminen (KANGÈTHE et al. 1982, WHITTAKER et al. 1982, JONES und PATTERSON 1985, DINCER et al. 1987), hitzedenaturierten (MANZ 1983, 1985) oder hitzeresistenten Muskelproteinen (KANGÈTHE und GATHUMA 1987, KANGÈTHE und LINDQUIST 1987, BERGER et al. 1988, CHEN et al. 1998, CHEN und HSIEH 2000), sind ebenfalls als Antigene Myoglobin (HAYDEN 1979) und Troponin (SCHWEIGER et al. 1983, CHEN et al. 2002, LIU et al. 2006) geeignet, sowie ein troponinähnliches thermostabiles Protein aus der Nebenniere (SHERIKAR et al. 1988, BHILENGAONKAR et al. 1990). Ferner fand Lactat-Dehydrogenase als Antigen Verwendung (WANG und SMITH 1995). Daneben wurde ein ELISA mit monoklonalen Antikörpern gegen Desmin aus der glatten Muskulatur vom Huhn von BILLET et al. (1996) beschrieben.

#### **2.3.4 Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay (ELISA)**

Der ELISA stellt eine Kombination zweier analytisch wesentlicher Teilschritte dar. Auf eine Substanz-spezifische Antigen-Antikörper-Reaktion folgt die Detektion derselben mittels einer Enzym-Substrat-Reaktion. Eventuell wird ein weiterer immunchemischer Schritt eingefügt, wodurch ein Mehrschritt-Test oder Sandwich-ELISA erhalten wird (Abb. 5).

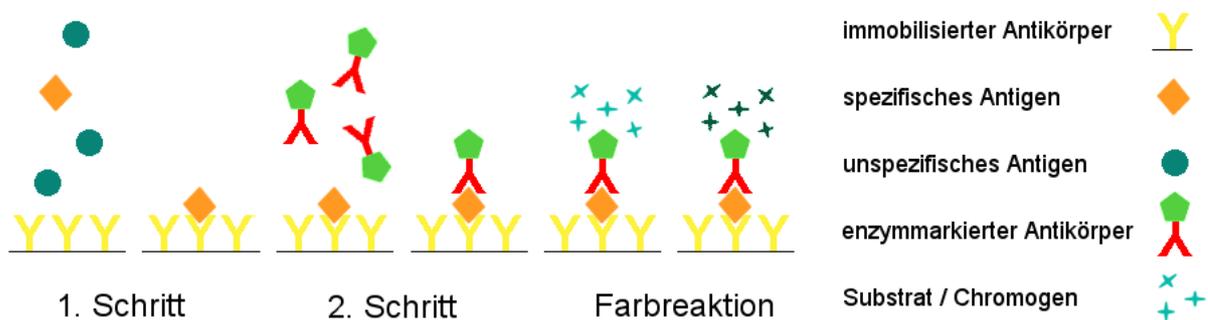


Abb. 5: Reaktions-Schema eines Sandwich-ELISAs

Für den ersten immunchemischen Schritt benötigt man für die nachzuweisende Substanz spezifische Antikörper. Diese sind an Kunststoffträger, wie z.B. Mikrotiterplatten gebunden. Nach Zugabe einer Probenlösung wird das korrespondierende Antigen bzw. Hapten, falls es in der Lösung vorhanden ist, an diese Antikörper binden. Nicht gebundene Probenbestandteile werden durch einen Waschschrift entfernt. Im zweiten immunchemischen Schritt werden Antikörper zugegeben, an die kovalent ein Enzym gekoppelt ist. Diese zweiten spezifischen Antikörper reagieren nun ihrerseits mit den am ersten Antikörper gebundenen Antigenen/Haptene. Je mehr Antigene im ersten Schritt an die festphasen-gekoppelten Antikörper fixiert sind, desto mehr enzymmarkierte Antikörper werden im zweiten Schritt binden und so den namensgebenden Sandwich-Komplex formen. Um nicht gebundene Antikörper zu entfernen, folgt erneut ein Waschschrift. Die Detektion mittels Enzym-Substrat-Reaktion wird durch Zugabe eines durch das Enzym umgesetzten Substrates ausgelöst. Dies führt zu einer Veränderung der Farbe und/oder der Farbintensität des im Substrat enthaltenen Chromogens. Nach einer bestimmten Zeitspanne wird durch Zugabe einer Stopp-Lösung die Reaktion zum Stillstand gebracht. Die Farbstoff-Reaktion kann je nach Substrat mit unterschiedlichen Analysemethoden wie z.B. der Photometrie bei spezifischen Wellenlängen gemessen werden. Die Farbintensität ist annähernd proportional der Menge an gebundenem Antigen. Bevorzugt werden Antigene mit größerem Molekulargewicht ( $MG > 10.000D$ ) mittels Sandwich-ELISA untersucht. Für die Qualität des ELISAs ist die Epitop-Spezifität des ersten und zweiten Antikörpers von entscheidender Bedeutung (BAUDNER und DREHER 1991, CROWTHER 2001).

## 2.3.5 Der ELISA in der Tierartenidentifizierung

### 2.3.5.1 Nicht-kommerzielle ELISA-Anwendungen

In der Vergangenheit wurde eine große Zahl an Versuchen zur Tierartidentifizierung mit dem Prinzip des ELISAs durchgeführt. Eine Übersicht von diesbezüglichen Publikationen mit Angaben der untersuchten Tierarten, der verwendeten Antiseren und Probenmaterialien, sowie der Sensitivitäten gibt Tabelle 9.

Die ersten Publikationen eines ELISAs zur Tierartenidentifizierung stammten von KANGÈTHE et al. (1982) und WHITTAKER et al. (1982). WHITTAKER et al. (1982) beschrieben einen ELISA für Rind, Schaf, Pferd, Känguru, Schwein und Kamel. Hierfür kamen affinitäts-chromatographisch gereinigte Antiseren aus Kaninchen gegen das Serum der verschiedenen Tierarten zum Einsatz. KANGÈTHE et al. (1982) verwendeten ebenfalls Serumalbumin verschiedener Spezies als Antigen, wegen der kommerziellen Verfügbarkeit. Pferdefleisch war hier von Rind, Schwein und Schaf differenzierbar und in rohem Rindfleisch konnte Pferd in Konzentrationen zwischen 3 und 80 % nachgewiesen werden. Ein Ansatz zur Quantifizierung von Pferdefleischzusätzen scheiterte an dem Problem des Restblutgehaltes (WARRISS 1977). Der Versuch von GRIFFITHS und BILLINGTON (1984), eine quantitative Bestimmung von Rindfleisch mit Antiseren gegen Blutserum durch zu führen, scheiterte ebenfalls an der unbekanntem Restblutmenge der Proben.

Das Hauptanliegen der Entwicklung von ELISAs zum Tierartnachweis galt zunächst der Möglichkeit, die verwendeten Tierarten qualitativ in **rohem Ausgangsmaterial** nachzuweisen, wobei sich verschiedene Sensitivitäten ergaben. PATTERSON et al. (1984) publizierten einen Sandwich-ELISA zur Differenzierung von rohem Fleisch von Rind, Schaf, Pferd, Känguru, Schwein, Kamel, Büffel und Ziege. Die Nachweisgrenze wurde mit 1% angegeben. Durch Gewinnung der Antiseren gegen Büffel in Rind, gegen Ziege in Schaf und gegen Esel in Pferd konnten PATTERSON und SPENCER (1985) nah verwandte Arten in Zusätzen von 0,1 bis 1% differenzieren. Ein Sandwich-ELISA zur Detektion kleinster Mengen an Schwein in Rind wurde von JONES und PATTERSON (1985) publiziert. Antikörper gegen porcines Serumalbumin konnten noch 0,5% Schwein in Rind anzeigen. MARTÍN et al. (1988a) wiesen mit Antikörpern gegen porcines Sarkoplasma-Extrakt definierte Mengen an Schweinefleisch von 1-50% in rohem Rindfleisch durch

einen Sandwich-ELISA nach. MARTIN et al. (1998) konnten rohes Schweine- in rohem Rindfleisch in Gehalten von 1 bis 75% detektieren. MORALES et al. (1994) nutzten stabile Hybrid-Zelllinien, um monoklonale Antikörper gegen porcines Muskelprotein zu gewinnen. In einem ELISA eingesetzt konnte so 1-100% Schweinefleisch in Rind und Huhn nachgewiesen werden. MARTÍN et al. (1991) verwendeten monoklonale Antikörper gegen lösliche Muskelproteine vom Huhn als Festphasen-Antikörper, um Hühnerproteine auch aus komplexen Gemischen zu binden. Desweiteren kamen im zweiten Schritt polyclonale Antikörper gegen die selben Proteine zum Einsatz, die in Kaninchen gewonnen wurden. Mit einem kommerziellen, Peroxidase-markierten Anti-Kaninchen-Antikörper konnte 1-100% Hühnerfleisch in Rind-Schweinefleisch-Gemischen festgestellt werden. Bei DINCER et al. (1987) wurde unter anderem ein indirekter ELISA für die Detektion von Spezies-spezifischen Albuminen beschrieben. Bis zu einer Grenze von 5% konnten Schwein oder Schaf in Rind nachgewiesen werden. Eine Erhitzung der Proben reduzierte bzw. verhinderte den Nachweis der genannten Tierarten.

Die Problematik des Verlustes der Antigenität spezifischer Proteine im Verlauf einer **Erhitzung** führte zu weiteren Veröffentlichungen, in denen Lösungsansätze für dieses Problem gesucht wurden. MANZ (1983, 1985) stellte in Kaninchen Antiseren gegen hitzedenaturierte Muskelproteine von Känguru, Rind und Schwein her. Damit konnte in gebrühten und hochehitzten Fleischerzeugnissen Kängurufleisch eindeutig identifiziert werden. Für Schwein und Rind gelang ein mit dem Ausgangsmaterial gut übereinstimmender Nachweis nur bis zu einer Erhitzung von 80°C Kerntemperatur. HEMPEL und BUSCH (2000) nutzten dieses ELISA-Verfahren für die Überprüfung von hitzebehandeltem Muskelfleisch vom Rind. Zusätzlich zu Rind wurde die Methode für Schwein, Geflügel und Pferd validiert. Auf 121°C erhitztes Schweinefleisch wurde von PATTERSON und JONES (1989) zur Gewinnung von spezifischem Muskel-Antiserum genutzt. Es ermöglichte die Identifizierung von Muskelfleisch, Innereien und Fett vom Schwein. Bei den experimentell erzeugten Proben wurde ein **Sensitivität** von 1% Zusatz an magerem erhitztem Schweinefleisch zu magerem Fleisch anderer Tierarten ermittelt. ANDREWS et al. (1992) beschrieben einen Nachweis von Schaf, Rind, Pferd und Reh in erhitzten Fleischprodukten. Die Antiseren wurden nach der Methode von BERGER et al. (1988) hergestellt. Mit Ausnahme von Babynahrung und einer Konserve, die keine Ergebnisse lieferten, konnten die Tierarten mit einem Detektionslimit von 0,13% nachgewiesen werden.

BERGER et al. (1988) veröffentlichten einen ELISA mit Spezies-spezifischen polyklonalen Antikörpern gegen hitzeresistente Antigene aus rohem Skelettmuskelgewebe von Huhn und Schwein. Dieser sogenannte indirekte ELISA zeichnete sich durch Verwendung eines biotinylierten Antikörpers als zweiten Antikörper im Sandwich-ELISA aus, der stabiler ist als ein Antikörper-Enzymkonjugat. Als zusätzlicher dritter Schritt folgte dann die Reaktion mit einem streptavidin-konjugierten Enzym, welches vor der anschließenden Farbreaktion über Streptavidin an die Biotin-Komponente des zweiten Antikörpers bindet (vgl. Abb. 6). Streptavidin ersetzte das aus Hühnereiweiß gewonnene Avidin, da es eine höhere Spezifität gegen Biotin aufweist. Der Geflügel-ELISA zeigte bei diesem indirekten Sandwich-ELISA ein deutliches Signal bei Huhn und Pute, in rohen und erhitzten (120°C, 15 min) Proben. Die Nachweisgrenze für Huhn und Pute lag bei 126 ppm. Für den Schweine-ELISA ergab sich eine Nachweisgrenze von 250 ppm. Die Verwendung eines kommerziell erhältlichen Antikörpers gegen Hühner-IgG in einem Sandwich-ELISA von ROSSMANITH und BAUER (1994) ergab eine Nachweisgrenze von Hühnerfleisch in mäßig erhitzten Fleischwaren (Brühwurst) von 5%, die auf 10% bei hochehitzten Fleischkonserven anstieg.

Monoklonale Antikörper gegen hitzestabile Muskelproteine vom Schwein wurden von CHEN et al. (1998) eingesetzt. Es gelang mit verschiedenen Antikörpern, Schwein bis zu 10 g/kg in rohen und gekochten heterogenen Fleischgemischen nachzuweisen. CHEN und HSIEH (2000) nutzten den monoklonalen Antikörper 5H9 aus den vorherigen Versuchen und erreichten damit eine Sensitivität von 0,5% für Schwein in erhitzten Proben. Dieselbe Arbeitsgruppe stellte auch monoklonale Antikörper gegen erhitztes Schweine-Protein und Hühner-Protein her. In einem ELISA eingesetzt konnten so 0,5% Schwein, Rind, Lamm und Pferd in Gemischen mit Huhn detektiert werden und 0-100% Geflügel war in Schwein nachweisbar (HSIEH et al. 1998, SHEU und HSIEH 1998).

Auch die **Spezifität** der einzelnen Methoden unterschied sich. PATTERSON et al. (1984) beobachteten mit dem von ihnen publizierten ELISA Kreuzreaktionen zwischen nah verwandten Spezies wie Rind und Büffel sowie Ziege und Schaf. KANGÈTHE und GATHUMA (1987) untersuchten die Spezifität u.a. einer großen Anzahl Huftier-Antiseren. Vor allem die Anti-Rind und Anti-Elend-Antilopen Seren wiesen zahlreiche Kreuzreaktionen auf. Ebenso waren je 1% und 10% von Büffel, Wildschwein und Impala in Rind, Schwein bzw. Ziege nicht nachweisbar. Der Geflügel-ELISA von BERGER et al. (1988)

zeigte keine Kreuzreaktionen mit anderen getesteten Spezies (Pferd, Rind, Schwein, Reh, Känguru), während der Schweine-ELISA derselben Autoren einige Kreuzreaktionen mit Extrakten aus rohem Material von Pferd, Rind, Schwein und Reh aufwies. MARTÍN et al. (1991) stellten zu 80% geringere Absorptionsraten bei 405 nm von Hühner-Innereien im Vergleich zu reinem Hühnerfleisch fest. Bei MORALES et al. (1994) traten keine signifikanten Kreuzreaktionen der porzinen Antikörper mit Rind-, Pferd-, Huhn- oder Sojaprotein auf. Der Säugetier-ELISA von HSIEH et al. (1998) reagierte spezifisch positiv auf Rind, Schaf, Reh, Pferd und Schwein ohne Kreuzreaktionen mit Huhn, Pute oder Ente zu zeigen. CHEN und HSIEH (2000) konnten spezifisch Skelettmuskel vom Schwein nachweisen, wobei auch Schweine-Zunge reagierte. Keine Reaktionen wurde dagegen mit Herzmuskel, glatter Muskulatur, Blut und anderen Organen erhalten. Auch traten keine Kreuzreaktionen zu üblichen Lebensmittelproteinen (Milch, Hühnereialbumin, Sojaprotein, Gelatine) auf.

Tab. 9 Überblick über verschiedene ELISA-Methoden zur Tierartenidentifizierung

Quelle	Antikörper	Tierarten	Material	NWG
<b>ANDREWS et al. 1992</b>	nach BERGER et al. 1988	<u>Schf, Rd, Pf, Reh</u>	erhitzte Fleischprodukte	0,13%
<b>BERGER et al. 1988</b>	polyklonale Ak / hitze-resistente Skelettmuskel-Ag, indirekter ELISA	<u>Hu, Sw</u> , Pu, Pf, Rd, Reh, Känguru	rohe und erhitzte Proben (120°C, 15min)	126 ppm Hu, Pu 250 ppm Sw
<b>CHEN et al. 1998</b>	Ak / hitzestabile Muskelproteine	<u>Sw</u> , Rd, Schf, Hu, Pu, Ente, Pf, Reh	rohe und erhitzte Fleischgemische	1%
<b>CHEN und HSIEH 2000</b>	Ak / hitzestabile Muskelproteine	<u>Sw</u> , Rd, Hu, Pu, Sw-Innereinen, Milch, Hu-eiweiß, Gelatine, Soja,..	erhitzte Proben	0,5%
<b>DINCER et al. 1987</b>	Ak / Spezies-spezifische Albumine	<u>Sw, Schf</u> , Rd	rohe und erhitzte Proben	5%
<b>GRIFFITHS und BILLINGTON 1984</b>	polyklonale Ak / Blutserum	<u>Rd</u> , Soja	Modellproben-gemische	
<b>HEMPEL und BUSCH 2000</b>	nach MANZ 1983,1985 modifiziert	<u>Rd</u> , Sw, Gf, Pf	hitzebehandeltes Muskelfleisch	
<b>HSIEH et al. 1998</b>	monoklonale Ak / erhitzte Sarkoplasmproteine	<u>Sw, Rd, Lamm, Pf</u> , Hu	erhitztes Fleisch	0,5%
<b>JONES und PATTERSON 1985</b>	Ak / Serumalbumin	<u>Sw</u> , Rd	rohes, mageres Fleisch, Modellwürste	< 0,5% Fleisch > 0,6% Würste
<b>KANGÈTHE et al. 1982</b>	Ak / kommerzielles Serumalbumin	<u>Pf</u> , Rd, Sw, Schf	rohes Fleisch	3-80% in Rd, 0,2% als Extrakt

Quelle	Antikörper	Tierarten	Material	NWG
<b>KANGÈTHE und GATHUMA 1987</b>	Ak / thermostabile Muskelantigene {Zg}	<u>Hu</u> ftiere ( <u>Sw</u> , <u>Rd</u> , <u>Schf</u> , <u>Pf</u> , <u>Antilopen</u> , <u>Büffel</u> , <u>Impala...</u> ), <u>Kamel</u>	erhitzte und autoklavierte Muskelproben	
<b>MANZ 1983, 1985</b>	Ak / hitzedenaturierte Muskelproteine {Kan}	<u>Känguru</u> , <u>Rd</u> , <u>Sw</u>	gebrühte und hocherhitzte Fleisch-erzeugnisse	Rd, Sw bis 80°C
<b>MARTÍN et al. 1988a</b>	Ak / Sarcoplasmproteine {Kan}	<u>Sw</u> , <u>Rd</u> , <u>Pf</u> , <u>Hu</u>	rohe Proben	1-50% in Rd
<b>MARTÍN et al. 1991</b>	monokl. und polykl. Ak {Kan} / lösliche Muskelproteine, enzymkonj. Ak / Kan-IgG {Zg}	<u>Hu</u> , <u>Rd</u> , <u>Sw</u>	rohe Fleischgemische	1-100%
<b>MARTIN et al. 1998</b>	nach BERGER et al. 1986, Ak / Albumin	<u>Sw</u> , <u>Rd</u>	rohe Proben	1-75%
<b>MORALES et al. 1994</b>	monoklonale Ak / Muskelprotein	<u>Sw</u> , <u>Rd</u> , <u>Pf</u> , <u>Hu</u> , <u>Soja</u>	Fleischgemische	1-100% in Rd/Hu
<b>PATTERSON et al. 1984</b>	polyklonale Ak / Serumproteine {Schf, Rd}	<u>Rd</u> , <u>Schf</u> , <u>Pf</u> , <u>Sw</u> , <u>Zg</u> , <u>Kanguruh</u> , <u>Kamel</u> , <u>Büffel</u>	rohes Fleisch	≤1%
<b>PATTERSON und JONES 1989</b>	Ak / 121°C erhitztes Fleisch	<u>Sw</u>	mageres, erhitztes Fleisch	1%
<b>PATTERSON und SPENCER 1985</b>	Ak / Büffel {Rd}, Zg {Schf}, Esel {Pf}	<u>Esel</u> , <u>Pf</u> , <u>Büffel</u> , <u>Rd</u> , <u>Zg</u> , <u>Schf</u>	Fleischproben	0,1-1%
<b>ROSSMANITH und BAUER 1994</b>	kommerzieller Ak / Hu-IgG {Kan}	<u>Hu</u> , <u>Rd</u> , <u>Sw</u>	erhitzte und hocherhitzte Fleischwaren	5% erhitzt, 10% hocherhitzt
<b>SHEU und HSIEH 1998</b>	monoklonale Ak / erhitzte Muskelproteine	<u>Gf</u> , <u>Sw</u>	erhitztes Säugetierfleisch	0-100%
<b>WHITTAKER et al. 1982</b>	polyklonale Ak / Serumalbumine {Kan}	<u>Rd</u> , <u>Schf</u> , <u>Pf</u> , <u>Sw</u> , <u>Känguru</u> , <u>Kamel</u>	Fleischproben	

{ } - immunisierte Tierart, \_\_\_ - nachzuweisende Tierart, Ag - Antigen, Ak / - Antikörper gegen, IgG - Immunglobulin G, Hu - Huhn, Pu - Pute, Rd - Rind, Sw - Schwein, Gf - Geflügel, Kan - Kaninchen, Pf - Pferd, Schf - Schaf, Zg - Ziege

Eine allgemeine Übersicht mit vergleichender Betrachtung von Methoden der Tierartidentifizierung liefern HOFMANN (1997a und b) und ZIERLER et al. (2004). HITCHCOCK und CRIMES (1985), sowie PATTERSON und JONES (1990) geben eine umfassende Übersicht über immunologische Techniken zum Tierartennachweis in rohem sowie erhitztem Fleisch und Fleischwaren. Ebenso bieten SAMARAJEEWA et al. (1991) und HERNANDÉZ et al. (1994) weitere Angaben über immunologische Methoden in der Lebensmitteluntersuchung.

### 2.3.5.2 Kommerzielle ELISA-Testkits

Kommerziell verfügbare ELISA-Testkits zur Tierartenbestimmung bei Fleisch stehen von zahlreichen Herstellern zur Verfügung, unter anderen von ABC Research (USA) oder in Form des CHECKMEAT (Australien) (HOFMANN 1997a). In Deutschland sind die ELISA-Testkits von Tepnel BioSystems, Ltd. (UK) (Vertrieb in Deutschland durch die Firma Coring System Diagnostix GmbH) und von ELISA Technologies, Inc. (USA) (Vertrieb in Deutschland durch die Firma TRANSIA GmbH) erhältlich. Die Vertriebsfirma TRANSIA hatte gegen Ende des Jahres 2000 bis Anfang des Jahr 2001 fließend einen Wechsel der Hersteller für die Tierarten-ELISA, vom englischen Hersteller CORTECS DIAGNOSTICS zum amerikanischen Hersteller ELISA Technologies vorgenommen. Ein Überblick über publizierte Untersuchungen zum Tierartennachweis mit kommerziellen Testkits wird nachfolgend dargestellt (vgl. Tab. 10).

GIOVANNACCI et al. (2004) verwendeten den Tierarten ELISA-Testkit von Tepnel für den Nachweis von geringen Konzentrationen verschiedener Tierarten (Schwein, Rind, Schaf, Geflügel) in stark prozessierten Lebensmitteln. Kreuzreaktionen mit Hühner-Ei oder Milch konnten nicht festgestellt werden. GENSSLER et al. (2004) senkten die Nachweisgrenze des Tepnel-Testkits in Zusammenarbeit mit Coring System Diagnostix auf unter 1% durch Austausch des Farbstoffes ABTS (Azinodisethylbenzthiazolinsulfonsäure) gegen TMB (Tetramethylbenzidin). Bei gleichbleibender Sensitivität konnte die lange Analysedauer von 3,5 Stunden, bezogen auf die Inkubationszeiten, um etwa 50% reduziert werden.

Tab. 10 Überblick über Arbeiten mit kommerziellen ELISA-Testkits

Quelle	Hersteller	Tierarten	Material	NWG
<b>BENEKE und HAGEN 1998</b>	CORTECS	Hu, Pu, Rd, Schf, Sw	Mischproben (Max.121°C)	2% Gf/Rd/Sw, 5% Schf
<b>GENSSLER et al. 2004</b>	Tepnel	Sw, Rd, Hu, Pu, Zg, Schf	versch. Proben, Fleischerzeugnisse ( $F_c = 3-5$ )	< 1%
<b>GIOVANNACCI et al. 2004</b>	Tepnel	Gf, Rd, Sw, Schf	stark prozessierte Lebensmittel	niedrige Gehalte
<b>HAFKE 1994</b>	CORTECS	Rd, Sw, Gf	Fleischsalatgrundlage, Brühwürste (Handel)	o.A.
<b>HOFMANN 1994</b>	CORTECS	Ente, Fasan, Gans, Hu, Pu, Srauß, Wildente	Brüh-u. Kochwürste (Handelsproben)	0,2% Hu in Rd/Sw

Quelle	Hersteller	Tierarten	Material	NWG
<b>HOFMANN et al. 1994</b>	CORTECS	Gf, Rd, Sw	erhitzte Mischproben	0,20%
<b>HOFMANN et al. 1995</b>	CORTECS	Rd, Sw, Gf, Schf	erhitzte Fleischproben	0,5% Hu, 2% Rd/Sw
<b>HOFMANN et al. 1997</b>	CORTECS	Rd, Sw, Gf, Schf	rohe (nacherhitzte), erhitzte Proben	0,2-0,5% Sw/Gf
<b>HONIKEL et al. 2002</b>	Testkit o.A. des Herstellers	Pu, Rd, Sw	erhitzte und behandelte Fleischerzeugnisse	0,5-1%
<b>HSIEH et al. 1995</b>	ELISA Technologies	Rd, Sw, Gf, Pf, Schf	rohe und erhitzte Handelsproben Florida, Vglstandards	~1% Gf/Rd/Sw
<b>HSIEH et al. 1996</b>	ELISA Technologies	Gf, Rd, Schf, Sw	rohe Sw-Handelsproben Alabama, Vglstandards	0,5 % Gf/Rd/Sw/Schf
<b>N. N. 2002</b>	„L 06.00-47“	Gf, Rd, Schf, Sw	erhitztes Fleisch und Fleischerzeugnisse	0,2-0,5 Gf/Sw, 2 % Rd, >2% Schf
<b>MIFEK und GLAWISCHNIG 1990</b>	CORTECS	Rd, Sw, Gf	erhitzte Mischproben	1% (Fleisch), 1% Gf/Sw, 4% Rd (Würste)
<b>TRANSIA 2003</b>	ELISA Technologies	Rd, Sw, Gf, Schf	erhitzte Fleischwaren	2% Gf/Rd/Sw, 5% Schf nach L 06.00-47; <1% Gf/Rd/Sw/Schf nach USDA-FSIS
<b>POSER et al. 2000</b>	CORTECS	Hu, Pu, Schf, Rd, Sw	Brüh- und Kochwürste	1% Sw, 2% Gf/Rd, 5% Schf, tlw. geringer
<b>SPERNER et al. 2002</b>	ELISA Technologies	Rd	Modellwürste, Gewürzzubereitungen, Einzelgewürze	o.A.

\_\_\_ - nachzuweisende Tierart, o.A. - ohne Angaben, tlw. - teilweise, Vgl – Vergleich, Hu – Huhn, Pu – Pute, Rd – Rind, Sw – Schwein, Gf – Geflügel, Pf – Pferd, Schf – Schaf

Bezüglich der Anwendung des Tierarten-ELISA-Testkits von **TRANSIA** (CORTECS DIAGNOSTICS, ELISA Technologies) liegen zahlreiche Publikationen vor (MIFEK und GLAWISCHNIG 1990, HAFKE 1994, HOFMANN 1994,1996, HOFMANN et al. 1994, 1995, 1997, HSIEH et al. 1995, 1996, BENEKE und HAGEN 1998, SPERNER und SCHROETER 1999, POSER et al. 2000, SPERNER et al. 2002, AYAZ et al. 2006). Die folgenden Absätze beziehen sich daher auf den von TRANSIA vertriebenen Testkit zum Tierarten-nachweis in erhitzten Fleischerzeugnissen.

Das Prinzip gleicht dem unter Kapitel 2.3.4 beschriebenen Sandwich-ELISA. Als Hauptunterschied ist die Verwendung eines zusätzlichen Zwischenschrittes zu nennen, wodurch ein indirekter ELISA entsteht. Hierbei ist der zweite Spezies-spezifische Antikörper mittels Biotin markiert und bindet im dritten Schritt die an Avidin gekoppelte Peroxidase,

bevor es zur Farbreaktion durch die Peroxidase kommt (Abb. 6). Da es sich um ein qualitatives Nachweisverfahren handelt, wird ein Grenzwert, der sogenannte Cut-Off-Wert, genutzt, um eine Probe als positiv oder negativ zu beurteilen. Der Cut-Off-Wert wird aus dem Mittelwert der Absorptionen der mitgeführten Negativ-Kontrollen multipliziert mit einem festgelegten Faktor berechnet. Für die Tierarten Rind, Schwein und Geflügel beträgt der Faktor 2,5 und für Beurteilung des Schaf-Nachweises wird mit dem Faktor 3 multipliziert (TRANSIA 2003). Der genaue Ablauf des Testverfahrens ist in Kapitel 3.2.8. beschrieben.

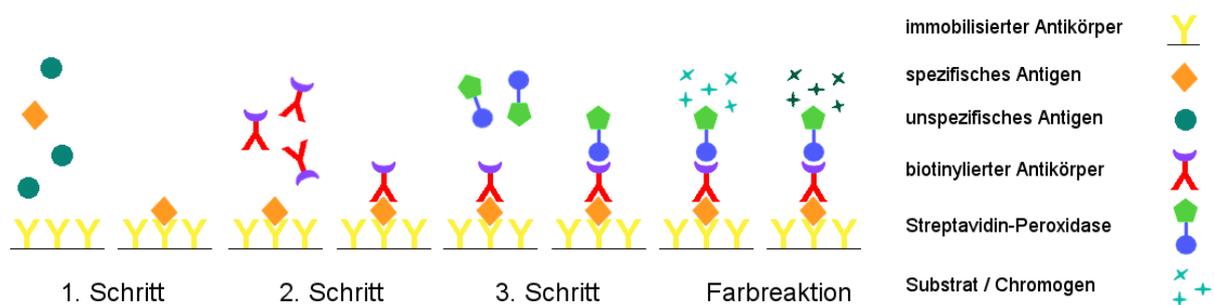


Abb. 6: Reaktions-Schema des ELISA-Testkits von ELISA Technologies

Eine umfassende Übersicht über den kommerziellen ELISA-Testkit des englischen Herstellers CORTECS DIAGNOSTICS bot HOFMANN (1997a). Der Test ist in drei Ausführungen erhältlich: 1. als Schnelltest, dem sogenannten F.A.S.T. („fast screening system“), für rohes Fleisch von Rind, Schwein, Schaf, Huhn, Pute, Hirsch, Ziege, Känguru und Büffel, 2. als Mikrotiterplatten-Test für rohes Fleisch von Rind, Schwein, Schaf, Geflügel, Kaninchen und Pferd und 3. als Mikrotiterplatten-Test für erhitztes Fleisch und Fleischerzeugnisse der Tierarten Rind, Schwein, Geflügel und Schaf. Rohe Produkte können nach Hitzebehandlung ebenfalls mit dem Testkit für erhitzte Produkte untersucht werden. Von ELISA Technologies können fünf Produktgruppen bezogen werden: 1. der DTEK™ Immunostick für den schnellen Nachweis von Rind, Schwein, Geflügel, Schaf und Pferd, 2. ein Mikrotiterplatten-Test für rohes Fleisch von Rind, Schwein, Geflügel, Pferd und Schaf, 3. ein Mikrotiterplatten-Test für erhitztes Fleisch und Fleischerzeugnisse von Rind, Schwein, Geflügel, Schaf, Pferd und Reh, 4. ein Mikrotiterplatten-Test für Tiermehle vom Schwein und 5. der sogenannte MELISA-TEK™ Mikrotiterplatten-Test für den Nachweis von Muskelgewebe von Wiederkäuern (ELISA TECHNOLOGIES 2007).

HOFMANN et al. (1997) berichteten über zwei mit dem ELISA-Testkit (Mikrotiterplatten-Test für erhitztes Fleisch und Fleischerzeugnisse) des Herstellers CORTECS DIAGNO-

STICS durchgeführte Ringversuche, die zur Aufnahme des ELISA-Spezies-Tests in die amtliche Methodensammlung (L 06.00-47) führten. Desweiteren wurde daraufhin die Arbeitsanleitung der Firma TRANSIA bezüglich des Bewertungsfaktors aktualisiert, sodass nun die Tierartzugehörigkeit der als Negativ-Kontrollen dienenden Antigene festgelegt ist und der Cut-Off-Wert für Schaf-Proben mit dem Faktor 3 berechnet wird.

Nach Methode L 06.00-47 der Amtlichen Sammlung von Untersuchungsverfahren nach § 64 LFGB (N. N. 2002), die auf den Ergebnissen der oben genannte Ringversuche basiert, kann mittels ELISA je nach Vorerhitzung der Probe Schwein und Geflügel ab 0,2% bis 0,5%, Rind ab 2% und Schaffleisch erst ab über 2% sicher nachgewiesen werden. TRANSIA gibt für den Tierarten-ELISA in erhitzten Fleischerzeugnissen **Sensitivitäten** in Abhängigkeit des Durchführungsprotokolls an. So können bei der Durchführung nach Methode L 06.00-47 der Amtlichen Sammlung von Untersuchungsverfahren nach § 64 LFGB Zusätze von 2% Rind, Schwein und Geflügel bzw. 5% Schaf sicher nachgewiesen werden. Nach dem Protokoll des United States Department of Agriculture - Food Safety and Inspection Service (USDA-FSIS) sind sogar Zusätze unter 1% detektierbar (TRANSIA 2003).

MIFEK und GLAWISCHNIG (1990) konnten die Tierarten Rind, Schwein und Geflügel ab 1% Zusatz in erhitzten Fleischproben mit dem CORTECS-ELISA eindeutig nachweisen. Für Standardwürste galt für Schwein und Geflügel ebenfalls eine Nachweisgrenze von 1%, wohingegen Rind erst ab 4% detektierbar war. HOFMANN (1994) untersuchte Handelsproben auf den Zusatz von Geflügelfleisch unter Verwendung des gleichen Testkits. Es konnten Zusätze von bis zu 0,2% Hühnerfleisch zu Rind- oder Schweinefleisch festgestellt werden. In weiteren Versuchen wurden unterschiedlich stark erhitzte Modellproben, Handelsproben sowie Fleisch, Innereien und Fettgewebe verschiedener Spezies mit dem CORTECS-ELISA untersucht und eine Nachweisgrenze für Geflügel von 0,2% erreicht (HOFMANN et al. 1994). POSER et al. (2000) verglichen zwei DNA-basierende Methoden mit dem Tierarten-ELISA-Testkit von TRANSIA in einer Untersuchung unterschiedlich hitzebehandelter Fleischerzeugnisse. Es wurde lediglich angegeben, dass die Nachweisgrenzen des ELISA-Herstellers (1% Schwein, 2% Rind und Geflügel, 5% Schaf) in Brühwürsten für jede Tierart unterschiedlich stark unterschritten wurden. In handelsüblichen Produkten konnte der ELISA nur bis zu einer maximalen Erhitzung der Proben von 127°C (F-Wert max. 50) die Tierart bestimmen.

Die Abnahme der Nachweisgrenze mit zunehmender Hitzeeinwirkung ist bei den einzelnen Spezies unterschiedlich (HOFMANN et al. 1995, HOFMANN 1996). In bei einem F-Wert von 5 sterilisierten Fleischkonserven konnten Rind- und Schweinefleisch in 2% Zusatz nachgewiesen werden und Hühnerfleisch bis zu einem Anteil von 0,5%. Nach einer Erhitzung auf 133°C (F-Wert = 310) waren Tests auf Rind, Schwein und Geflügel negativ oder schwach positiv. Der Schafnachweis wurde erst mit einer Erhitzung auf 138°C negativ, wobei F-Werte von 980 erreicht wurden. Da bei der vorschriftsmäßigen Erhitzung von Tiermehlen demnach keine Immunantwort mehr vorhanden ist, kann der ELISA auch zur Überprüfung der Effektivität der Tiermehlerhitzung dienen. BENEKE und HAGEN (1998) nutzten den CORTECS-ELISA-Testkit zur Untersuchung von erhitzter, gemischter Fleischwaren der Tierarten Rind, Schwein, Schaf und Geflügel. Für auf 121°C erhitztes Probenmaterial war der ELISA ausreichend selektiv und sensitiv, ebenso bei Mischproben. Als Nachweisgrenzen wurden für Schwein, Rind und Geflügel 2%, sowie für Schaf 5% angegeben. HSIEH et al. (1995) nutzten diesen ELISA-Testkit, um Proben aus dem Handel zu untersuchen und mit selbst hergestellten Standards zu vergleichen. Mittels der Vergleichsstandards konnte die Größenordnung von Verfälschungen eingeschätzt werden und Zusätze unter 1% detektiert werden, wobei nur solche, die über 1% lagen, als Verfälschung bewertet wurden. Die verbesserte Sensitivität wurde durch eine verlängerte Extraktion erreicht. In einer nachfolgenden Untersuchung (HSIEH et al. 1996) wurde die Sensitivität des ELISAs sogar mit 0,5% angegeben. Bei dem Tierarten-ELISA-Testkit (o.A. des Herstellers), den HONIKEL et al. (2002) verwendeten, wurde die Nachweisgrenze bei 0,5-1,0% angesetzt, ohne eine weitere Erniedrigung dieses Detektionslimits auszuschliessen.

Die gute Empfindlichkeit und **Spezifität** des von TRANSIA vertriebenen ELISA-Tests haben mehrere Untersuchungen bestätigt (MIFEK und GLAWISCHNIG 1990, CHURCH et al. 1991, HAFKE 1994, HOFMANN et al. 1994 , 1995, HSIEH et al. 1995). MIFEK und GLAWISCHNIG (1990) beobachteten zwar Kreuzreaktionen des Geflügel-ELISAs mit Vollei, jedoch führte Milch im Rind- und Schaf-ELISA zu keinen Kreuzreaktionen. HAFKE (1994) hielt die fehlende Spezifität für Muskelprotein als nachteilig trotz Tierart-Spezifität des ELISAs. Auch in der Methode L 06.00-47 der Amtlichen Sammlung von Untersuchungsverfahren nach § 64 LFGB (N. N. 2002) wird auf den muskelunspezifischen Nachweis aller durchbluteten Gewebe und die Problematik größerer Mengen Ge-

latine hingewiesen. Von TRANSIA wird angegeben, dass es ab einem Gelatine-Gehalt von 2,5% zu falsch positiven Ergebnissen kommen kann. Ebenso wird auf verschiedene Kreuzreaktivitäten zwischen Geflügelarten bzw. anderen nah verwandten Tierarten hingewiesen. Blutfreies Ei und Milch sollen dagegen im Test nicht reagieren, während Muskulatur und andere Innereien, wie z.B. Darm, als positiv nachgewiesen werden (TRANSIA 2003). HOFMANN (1994) stellte die Unterschiede im Nachweis verschiedener Geflügelarten mit dem ELISA fest. Strauß reagierte dabei deutlich schwächer als Huhn, Pute, Fasan, Ente und Wildente, sodass die Gefahr besteht, ein falsch-negatives oder schwaches Resultat bei anderen „exotischen“ Vogelspezies zu bekommen. Durch weitere Untersuchungen wurde festgestellt, dass der Testkit sowohl Muskelfleisch einer bestimmten Spezies, als auch innere Organe, wie Herz, Zunge, Leber, Niere, Pansen und Fettgewebe detektierte und auch Blut in frischem oder getrocknetem Zustand sowie Trockenpräparate von Blutplasma von Rind und Schwein positiv reagierten. Ein negatives Ergebnis lieferten dagegen Kuhmilch, Eier und ausgelassenes Fett. Durch Gallertbildung in den Kavitäten waren falsch-positive Befunde bei Produkten mit einem hohen Anteil an Gelatine möglich (HOFMANN et al. 1994, 1996, 1998). POSER et al. (2000) erhielten in handelsüblichen Produkten ebenfalls mit Gelatinezusätzen falsch positive Resultate.

Die Versuche von HONIKEL et al. (2002) ergaben für den Nachweis von Rind, Schwein und Pute durch eine übliche Erhitzung oder Beimengungen von Kräutern, Gewürzen oder Salz bis auf Extremfälle keine nachteilige Beeinflussung. Auch SPERNER et al. (2002) fanden keinen Hinweis für falsch-positive Befunde des Rind-ELISAs bedingt durch Gewürzzubereitungen, empfahlen jedoch, fragliche Probenzusätze im Zweifelsfall getrennt zu untersuchen. Eine Überprüfung unerwartet positiver Proben riet auch WIJNGAARDS (2001) und wies auf die Probleme in der ELISA-Technologie hin. Einerseits wurde die Möglichkeit von falsch-negativen Ergebnissen durch eine Hitzedenaturierung, andererseits falsch-positive Ergebnisse aufgrund der Muskelunspezifität der Antikörper oder verschiedener Produktions-Chargen erörtert. Die von MIFEK und GLAWISCHNIG (1990) festgestellte Möglichkeit einer visuellen Auswertung des ELISA-Testkits von CORTECS und die diesbezügliche Aussage des Herstellers konnten HOFMANN et al. (1996) auf Grund des häufigen Auftretens falsch-negativer Ergebnisse nicht bestätigen.

### 2.3.5.3 Zeit- und Kostenaufwand

Angaben zu den finanziellen Aspekten einer Untersuchung zur Tierartenidentifikation wurden von den wenigsten Autoren spezifiziert. Manche bezeichneten ein Verfahren als günstig und leicht durchzuführen (GIOVANNACCI et al. 2004, MARTIN et al. 1998), während andere auf einen hohen finanziellen und zeitlichen Aufwand für die Gewinnung spezifischer Antiseren hinwiesen (MARTÍN et al. 1988a, MARTÍN et al. 1991). BAUDNER und DREHER (1991) machten beispielsweise für einen ELISA zur Aflatoxin M1-Bestimmung genauere Angaben. Die Investitionskosten wurden mit umgerechnet ca. 12.500 € veranschlagt und die Reagenzienkosten pro Probe mit Entsorgung von Lösungsmitteln gaben die Autoren mit einer Spanne von umgerechnet 6,- bis 12,50 € an. Für eine Probe wurde der Zeitaufwand eines Laboranten mit 3,5 min angegeben, wobei zugleich auf die hohen Personalkosten verwiesen wurde. STENGEL (1992) bewertete einen kommerziellen Sandwich-ELISA (ohne Angabe des Herstellers) zum Tierartenachweis im Vergleich zu anderen Verfahren als gering im Zeit- und Geräteaufwand verbunden mit einer einfacheren Durchführung und Auswertung, was als günstig für einen möglichen Einsatz als Screening-Methode für erhitzte Fleischerzeugnisse angesehen wurde.

Desweiteren bezeichneten einige Autoren Untersuchungen mittels ELISA nur als zeitaufwendig und laborintensiv oder als teuer, ohne dies genauer auszuführen (HSIEH et al. 1998, JONES und PATTERSON 1985, MARTÍN et al. 1988a). WHITTAKER et al. (1982, 1983) gaben an, mittels ELISA Ergebnisse in 2-3 Stunden zu erhalten und wiesen auf einen minimalen Einarbeitungsaufwand für Laborpersonal zur Durchführung der Analyse hin. Später gelang es, die Dauer erst auf knapp 2 Stunden zu verkürzen, und schließlich genügte eine Stunde, um Resultate zu erhalten (PATTERSON et al. 1984, PATTERSON und SPENCER 1985). Ein modifizierter indirekter ELISA von JONES und PATTERSON (1986) benötigte dagegen wieder knapp 3 Stunden für die Bearbeitung von Proben. BERGER et al. (1988) und ANDREWS et al. (1992) setzten die Durchführung der Analyse mit einem ELISA mit insgesamt 5 Stunden an. MARTIN et al. (1998) bezeichneten die Durchführung eines verwendeten ELISAs als schnell, reproduzierbar und einfach in der Handhabung. Für den CORTECS-Testkit-ELISA waren 5-6 Stunden zu investieren bis zum Erhalt von Ergebnissen (HOFMANN 1994, HOFMANN et al. 1994). Die Analyse von bis zu 96 Tests mit dem ELISA von ELISA Technologies wurde

von HSIEH et al. (1996) mit einer Dauer von weniger als 2 Stunden beschrieben. AYZAZ et al. (2006) erhielten innerhalb von 5 Stunden Resultate mit dem ELISA-Testkit von ELISA Technologies. Ohne Probenaufbereitung soll die Testdauer laut SCHWÄGELE (1999) ca. 3,5 Stunden für einen ELISA betragen, wobei für 10 Proben inklusive der Aufbereitung ein voller Arbeitstag angesetzt wurde. Die Firma TRANSIA gibt selbst für ihren rein qualitativen Testkit eine Analysedauer von ca. 3,5 Stunden ohne Probenaufbereitung an (TRANSIA 2003, 2006). Die unterschiedlichen Zeitspannen hängen hauptsächlich von der unterschiedlichen Anzahl und Dauer der Inkubations-Schritte ab (HITCHCOCK und CRIMES 1983), bzw. werden häufig keine Angaben gemacht, ob die Probenaufbereitung in die Berechnung mit einbezogen wurde oder nicht. Einen Überblick über die in der Literatur gefundenen Angaben zeigt Tabelle 11.

Tab. 11 Zeit- und Kosten-Aufwand für verschiedene ELISA

Quelle	ELISA	Zeit	Preis
<b>ANDREWS et al. 1992</b>	nicht-kommerziell	5 h	
<b>AYAZ et al. 2006</b>	ELISA Technologies	5 h	
<b>BAUDNER und DREHER 1991</b>	Aflatoxin M1	3,5 min / Probe	12.500 € Investition, 6,- bis 12,50 € Reagenzien
<b>BERGER et al. 1988</b>	nicht-kommerziell	5 h	
<b>HOFMANN 1994</b>	CORTECS	≥ 5 h	
<b>HOFMANN et al. 1994</b>	CORTECS	5-6 h	
<b>HSIEH et al. 1996</b>	ELISA Technologies	< 2 h	
<b>JONES und PATTERSON 1986</b>	nicht-kommerziell	< 3 h	
<b>PATTERSON et al. 1984</b>	nicht-kommerziell	~ 2 h	
<b>PATTERSON und SPENCER 1985</b>	nicht-kommerziell	1 h	
<b>SCHWÄGELE 1999</b>	kommerziell o.A.	3,5 h ohne Ex 1 Tag für 10 Proben mit Ex	
<b>TRANSIA 2003, 2006</b>	ELISA Technologies	3,5 h ohne Ex	616,- bis 697,50 € pro Testkit
<b>WHITTAKER et al. 1982</b>	nicht-kommerziell	2-3 h	
<b>WHITTAKER et al. 1983</b>	nicht-kommerziell	~ 3 h	

Ex - Extraktion

## **2.4 Vergleich verschiedener Methoden zur Tierartenidentifizierung**

### **2.4.1 Überblick über vorhandene Methoden**

Im Folgenden sind die häufigsten Verfahren, die zur Tierartenidentifizierung herangezogen werden, kurz erläutert. Es wird nur auf das grundlegende Prinzip der Methoden und einige interessante Aspekte eingegangen. Detailinformationen können beispielsweise HOFMANN (1997a,b), MEYER und CANDRIAN (1996) und LOCKLEY und BARDSLEY (2000) entnommen werden.

#### **2.4.1.1 DNS-basierende Methoden**

##### **2.4.1.1.1 DNS-Sonden Hybridisierung**

Die Methode der DNS-Sonden Hybridisierung wurde von LEIGHTON JONES (1991) ausführlich dargestellt. Das Prinzip beruht auf der spezifischen Bindung einer DNS-Sonde mit ihrer komplementären Sequenz einer einzelsträngigen Proben-DNS. Die aus einer Probe gewonnene DNS wird denaturiert und auf eine Nitrozellulose- oder Nylonmembran fixiert. Nach Zugabe der tierartspezifischen Sonden und bei Vorhandensein der entsprechenden Sequenz in der Proben-DNS, kann durch die Markierung der Sonden (z.B. Fluoreszenz, Radioaktivität) und deren Hybridisierung mit der Proben-DNS die vorliegende Tierart nachgewiesen werden. Wird die Proben-DNS vor der Fixierung auf einer Membran durch Gel-Elektrophorese nach ihrer Fragmentgröße aufgetrennt und anschließend von dem Gel auf eine Membran übertragen, spricht man von Southern Blotting. Beim direkten Auftragen der DNS auf einen „Punkt“ der Membran ohne Auftrennung, handelt es sich um einen Dot-Blot. Diese relativ zeitaufwendige Methode, die aber auch für hitzebehandelte Proben einsetzbar ist (CHIKUNI et al. 1990, HUNT et al. 1997), kann teilweise zum Auftreten von Kreuzreaktionen nah verwandter Arten führen (EBBEHØJ und THOMSEN 1991b, BUNTJER et al. 1999).

##### **2.4.1.1.2 Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD)**

Bei der random amplified polymorphic DNA (RAPD) Analyse wird mit kurzen, willkürlich gewählten Primern eine PCR durchgeführt (WILLIAMS et al. 1991). Hierbei entstehen

Amplifikations-Produkte zahlreicher DNS-Abschnitte unterschiedlicher Länge. Mittels Gelelektrophorese lassen sich tierartspezifische Bandenmuster auftrennen und zum Tierartennachweis mit Referenzen (DNS der nachzuweisenden Tierart) vergleichen (KOH et al. 1998, MARTINEZ und YMAN 1998).

#### **2.4.1.1.3 PCR mit spezifischen Primerpaaren**

Das Prinzip der Anwendung von spezifischen Primern in der PCR, wobei für jede nachzuweisende Spezies eigene Primer benötigt werden, um ein spezifisches Fragment zu amplifizieren, wurde bereits in Kapitel 2.2.3.2 ausführlich besprochen.

#### **2.4.1.1.4 Forensically Informative Nucleotide Sequencing (FINS)**

Die Tierartenidentifikation basiert beim forensically informative nucleotide sequencing (FINS) auf der Sequenzierung amplifizierter DNS-Abschnitte. Universale Primer für konservierte Regionen des *Cytb*-Gens ermöglichen die gleichzeitige Amplifikation eines Abschnittes des Genoms verschiedener Tierarten. Durch anschließende Sequenzierung und einen Datenbank-Abgleich mit bekannten DNS-Sequenzen verschiedener Tierarten kann die in Frage kommende Spezies ermittelt und die Tierart nachgewiesen werden (BARTLETT und DAVIDSON 1992, FORREST und CARNEGIE 1994).

#### **2.4.1.1.5 Restriktions-Fragment-Längen-Polymorphismus (RFLP)**

Eine in zahlreichen Untersuchungen eingesetzte Methode ist die Restriktions-Fragment-Längen-Polymorphismus (RFLP) Analyse (MEYER et al. 1995, BENEKE und HAGEN 1998, HOPWOOD et al. 1999, WOLF et al. 1999, PARTIS et al. 2000, FAJARDO et al. 2006). Hierbei werden Amplikons aus einer PCR mit universalen Primern oder aus Proben extrahierte Gesamt-DNS mittels Restriktions-Endonukleasen in unterschiedliche Fragmente geschnitten. Diese Enzyme erkennen spezifische Basenfolgen in Form von Palindromen auf dem DNS-Doppelstrang als Schnittstellen. Die durch die Restriktion entstehenden enzyspezifischen Fragmente können elektrophoretisch aufgetrennt werden und bilden für die jeweilige Spezies genetische Fingerabdrücke durch ein spezifisches Bandenmuster. Durch Vergleiche von DNS mit bekanntem tierartlichen Ursprung (Referenzen) kann die verwendete Tierart bestimmt werden. Auch nah verwandte Spezi-

es sind mit Restriktionsverdau differenzierbar. Allerdings können individuelle Mutationen oder intraspezifische Unterschiede einzelner Tierarten für neue Schnittstellen sorgen oder vorhandene eliminieren, so dass immer unterschiedliche Enzymprofile verschiedener Restriktionsendonukleasen betrachtet werden sollten (ZIMMERMANN et al. 1998).

#### **2.4.1.1.6 Hybridisierung**

Für die Identifikation von *Cytb*-Gen-Abschnitten verschiedener Spezies mittels Hybridisierung an komplementäre, trägergebundene Sonden (DNS-Chip) wird auf Kapitel 2.2.3.3 verwiesen. Beim sogenannten PCR-ELISA findet ebenfalls das Prinzip der Hybridisierung Anwendung. Nach der Amplifikation eines in allen Tierarten vorkommenden Gen-Abschnittes durch universale Primer werden diese in einer Mikrotiterplatte an immobilisierte Sonden Spezies-spezifisch gebunden, um die Tierartzugehörigkeit der Probe zu ermitteln. Es stehen für dieses Verfahren kommerzielle Testkits zur Verfügung (CONGEN 2006).

#### **2.4.1.1.7 Single Strand Conformational Polymorphism (SSCP)**

Die single strand conformational polymorphism (SSCP) Analyse erzeugt tierartspezifische Bandenmuster. Durch universale Primer können entsprechende Regionen eines Gens von verschiedenen Spezies mittels PCR vervielfältigt werden. Anschließend erfolgt eine Denaturierung zu einzelsträngigen Abschnitten, welche jeweils sequenz-abhängig eine neue Sekundär-Struktur annehmen. Sequenzunterschiede führen somit zu verschiedenen räumlichen Strukturen, welche sich in differenzierten Laufeigenschaften und in daraus resultierenden unterschiedlichen Banden in der Gelelektrophorese widerspiegeln und mit Referenzen verglichen werden können. Hierbei ist es möglich, Unterschiede in der Sequenz von nur einer Base zu erkennen (HAYASHI 1996, REA et al. 1996).

### **2.4.1.2 Protein-basierende Methoden**

#### **2.4.1.2.1 Elektrophoretische Verfahren**

Das Prinzip beruht auf der Auftrennung von Markerproteinen in Matrices, wie beispielsweise Polyacrylamid, nach ihrem jeweiligen Molekulargewicht oder isoelektrischen Punkt, durch Anlegen eines elektrischen Feldes. Das sich nach Färbung (u.a. mit Coomassie-Blue, Silber, Peroxidase) ergebende Bandenmuster kann anhand von Referenz-

material tierartspezifisch zugeordnet werden (SCHWÄGELE 2005). Als Referenzen dienen Extrakte von Fleisch einzelner, bekannter Tierarten und das daraus resultierende Bandenmuster.

#### **2.4.1.2.1.1 Polyacrylamid-Gel-Elektrophorese (PAGE)**

Zum Tierartennachweis in nativem Muskelfleisch werden mittels Polyacrylamid-Gel-Elektrophorese (PAGE) sarkoplasmatische Proteine nach ihrer unterschiedlichen Nettoladung und Molekülgröße aufgetrennt. Bei Auftrennung rohen Fleisches kann durch die Eigenfarbe der Myoglobin-Banden eine Beurteilung der Tierart ohne Anfärbung stattfinden (HOFMANN und BLÜCHEL 1986). Zur Steigerung der Empfindlichkeit der Visualisierung der Myoglobin-Banden werden spezifische Färbungen mit Peroxidase eingesetzt (BAUER und HOFMANN 1987). Für den Nachweis der Tierart in rohem Muskelfleisch ist der genaue Ablauf in der Amtlichen Sammlung von Untersuchungsverfahren nach § 64 LFGB zu finden (L 06.00-27, 1990). Hierbei besteht die Möglichkeit, mit Coomassie Blue Lösung unspezifisch alle in der Elektrophorese aufgetrennten Proteine anzufärben.

#### **2.4.1.2.1.2 Isoelektrische Fokussierung (IEF)**

Bei der isoelektrischen Fokussierung (IEF) wird mittels Ampholytzusatz in einem Gel ein pH-Gradient aufgebaut. Werden Polyacrylamid-Gele verwendet, spricht man von einer PAGIF. Proteine wandern im Gel bis zu dem Ort, an dem der pH-Wert ihrem isoelektrischen Punkt entspricht. Da hier die Nettoladung der Proteine gleich Null ist, werden die Proteine im elektrischen Feld auf diesen Punkt fokussiert (TINBERGEN und OLSMAN 1976). Durch eine empfindliche Silberfärbung kann mittels PAGIF auch in erhitztem Muskelfleisch eine Tierartidentifizierung stattfinden (Amtliche Sammlung von Untersuchungsverfahren nach § 64 LFGB L 06.00-29, 1990). Für den Nachweis der Tierart in nativem Muskelfleisch mit anschließender Coomassie-Blue Färbung kann die Methode nach L 06.00-17 (1988) der Amtlichen Sammlung von Untersuchungsverfahren nach § 64 LFGB herangezogen werden. Auch hier ist das Mitführen von Referenzproben für die Ergebnisinterpretation notwendig (BAUER 1991, BAUER und HOFMANN 1987).

## **2.4.1.2.2 Immunologische Verfahren**

### **2.4.1.2.2.1 Doppelte Geldiffusion nach Ouchterlony**

In einem Trägergel diffundieren in nebeneinander liegende Kavitäten einpipettierte Antigene und Antikörper und bilden beim Aufeinandertreffen, im Falle einer Affinität zueinander, eine Präzipitationsbande aus Antigen-Antikörper-Komplexen (OUCHTERLONY 1962, 1985). Die Banden entstehen nur, wenn die tierartsspezifischen Antikörper in der Lage sind, die antigenen Proteine aus einer Probe zu binden, bzw. wenn Proteine der nachzuweisenden Tierart darin vorliegen. Häufige Probleme stellen Kreuzreaktionen bei nahe verwandten Spezies und der Antigenitätsverlust erhitzter Produkte dar (DOBERSTEIN und GREUEL 1982, HOFMANN 1997a,b). Als Nachweismethode von Proteinen ist die doppelte Geldiffusion nach Ouchterlony in der Amtlichen Sammlung von Untersuchungsverfahren nach § 64 LFGB zu finden (L 07.00-35, 1986), wobei dieses Verfahren hier nicht zur Detektion tierartsspezifischer Proteine sondern zum Nachweis von Fremdprotein vorgesehen ist.

### **2.4.1.2.2.2 Countercurrent Immunelektrophorese (CIE)**

Die Countercurrent Immunelektrophorese (CIE) oder Überwanderungselektrophorese basiert ebenfalls auf unlöslichen Präzipitaten durch Bildung von Antigen-Antikörper-Komplexen und auf dem Prinzip der Elektrophorese (ALBER 2000). In Vertiefungen eines Gels wird auf der Seite der Anode tierartsspezifisches Antiserum einpipettiert. Auf der Kathoden-Seite des Gels werden die Proben-Antigene aufgetragen. Durch Anlegen einer Spannung wandern Antigene und Antikörper entsprechend ihrer Ladung im Gel. Durch Färbung mit Coomassie-Blue können die entstehenden Präzipitationsbanden dann als Nachweis der jeweiligen Tierart, je nach verwendeten Antikörpern, dienen (WINTERØ et al. 1990).

### **2.4.1.2.2.3 ELISA**

Das Verfahren des Enzyme-Linked-Immuno-Sorbent-Assays zum Nachweis der Tierart in erhitztem Fleisch und Fleischerzeugnissen ist Bestandteil der Amtlichen Sammlung von Untersuchungsverfahren nach § 64 LFGB (L 06.00-47, 2002) und wurde bereits ausführlich in Kapitel 2.3.4 beschrieben.

### **2.4.1.3 Sonstige Methoden**

#### **2.4.1.3.1 Fettsäuremuster**

Zur Identifikation der Tierart kann die unterschiedliche Zusammensetzung der Fette, insbesondere die Relation zwischen gesättigten, einfach und mehrfach ungesättigten Fettsäuren herangezogen werden. Durch Gaschromatografie alleine oder in Kombination mit Massenspektrometrie können die ermittelten Verhältnisse Aufschluss über die zugehörige Tierart geben. Da die Zusammensetzung der Fette auch von Faktoren wie der Fütterung, der Haltung und der Körperregion abhängig ist (KÜHNE et al. 1985, 1986), sind Aussagen bezüglich des Vorliegens einer Tierart nur bedingt verlässlich (HONIKEL et al. 2002). Dennoch können bei Vorliegen von rohem oder erhitztem Rind- und Schweinefleisch über Fettextraktion mit anschließender Veresterung und Kapillargaschromatografie als Screening-Verfahren Unterschiede zwischen Rind und Schwein aufgedeckt werden (Amtliche Sammlung von Untersuchungsverfahren nach § 64 LFGB, L 06.00-12, 1996).

#### **2.4.1.3.2 Verhältnis histidinhaltiger Peptide**

Durch eine high pressure liquid chromatography (HPLC) Analyse kann das Verhältnis verschiedener histidinhaltiger Peptide zueinander bestimmt werden. Fleisch enthält die seltenen Dipeptide Anserin, Carnosin und Balenin. Das Mengenverhältnis dieser Dipeptide kann zur Bestimmung der Tierart herangezogen werden. Sowohl Schweine- als auch Rindfleisch enthält relativ viel Carnosin und wenig Anserin. Anserin kommt dagegen in hoher Konzentration in Schaffleisch vor. Balenin ist vorwiegend in Schweinefleisch in hohen Konzentrationen zu finden. Diese Unterschiede können durch die Verhältnisse von Carnosin/Anserin und Balenin/Anserin zur Differenzierung der Tierart von Fleisch genutzt werden. Das im Vergleich zu anderen Tierarten hohe Balenin/Anserin Verhältnis von Schwein kann als Indikator für Schweinefleisch dienen. Niedrige Carnosin/Anserin Verhältnisse sprechen dagegen für Tierarten wie z.B. Schaf, Huhn, Känguru und Kaninchen (CARNEGIE et al. 1982, HOFMANN 1997b).

### **2.4.2 Direkte Vergleiche verschiedener Methoden**

Literaturvergleiche zur Bewertung verschiedener Verfahren der Tierartenidentifizierung wurden unter anderem von PATTERSON und JONES (1990), BAUDNER und DREHER

(1991), MEYER und CANDRIAN (1996), HOFMANN (1997a, b), LOCKLEY und BARDSLEY (2000), SCHWÄGELE (1999, 2001a) und HONIKEL et al. (2002) veröffentlicht. Arbeiten, in denen verschiedene Methoden in praxi an Proben miteinander verglichen wurden, sollen nachfolgend näher erläutert werden. Tabelle 12 zeigt derartige direkte Vergleiche von verschiedenen Methoden im Überblick.

Tab. 12 Direkte Vergleiche verschiedener Methoden der Tierartenidentifizierung

Quelle	Methoden	Tierarten	Material	Ergebnis
<b>HAFKE 1994</b>	IEF (L 06.00-29), ELISA (CORTECS)	<u>Rd, Sw, Hu,</u> <u>Pu</u>	Vorversuchsbrät, roh und erhitzt (95°C, 45 min), 92 Handelsproben	NWG: 10-40% Rd, Sw, Hu (Vorversuch), Handelsproben: 32% nkd, IEF tlw. fraglich
<b>HSIEH et al. 1996</b>	Ouchterlony, ELISA (ELISA Technologies)	<u>Sw, Rd, Gf,</u> <u>Schf</u>	129 rohe Sw- Handelsprodukte (Alabama): 87 Würste, 42 Hack, Standards	ELISA nkd: 91% Hack + 54% Würste, NWG 0,5%, Ouchterlony nkd: 71% Hack, 0% Würste, NWG 0,2-80%
<b>MEYER et al. 1994b</b>	ssp PCR, Ouchterlony (Testkit), ELISA (CORTECS)	<u>Sw, Rd, Pf,</u> <u>Schf, Zg, Hu,</u> <u>Pu</u>	rohe und erhitzte Proben (Max. 121°C, 10 min)	NWG: PCR <2%, keine KR, Ouchterlony 10% roh, ELISA > 20% erhitzte Gemische
<b>PETER 2003</b>	DNS-Biosensor, DNS-Chip	<u>Hu, Pu, Rd,</u> <u>Schf, Sw, Zg,</u> <u>Pf, Mensch</u>	Modell- und Handelsproben	NWG Sensor: 0,1-1%, auch Gemische, Chip: 0,1%
<b>POSER et al. 2000</b>	RFLP, DNS- Sonden (Hanse Analytik), ELISA (CORTECS), ssp PCR (Alcum)	<u>Sw, Rd, Hu,</u> <u>Pu</u>	RFLP-Primer <i>Cytb-1/-2</i> + <i>Mel-1/-2</i> , 359 bp <i>Av-</i> <i>f/Mel-r</i> , <i>Gal-r</i> , 300 bp; RE: o.A.; Southern-Blot / erhitzte Fleischerzeugnisse	Brühwürste: NWG: 1% RFLP, Sonden, ELISA: Herstellerangaben 1-5% tlw. unterschritten, Hoherhitztes: ELISA und RFLP bis 127°C möglich, ssp PCR ≤130°C
<b>RÜGGE- BERGER et al. 1997</b>	DNAAnimal PCR- Kit, DNAAnimal DNS-Sonden-Kit (beide Hanse Analytik), IEF (L 06.00-29)	<u>Rd, Sw, Hu,</u> <u>Pu, Schf</u>	PCR-Kit mit RFLP: <i>Cytb-</i> Primer, 359 bp, RE: <i>Hae</i> III / gekochte und vermengte Fleischproben	NWG: RFLP 1% Sw, Pu, 1- 5% Rd, 10% Schf Sonde 1% alle IEF 1-5% Rd, 5% Schf, 25% Sw, Pu
<b>SAWAYA et al. 1990</b>	HPLC (Histidine, TG), ELISA, GC (Fettsäuren)	<u>Sw, Rd, Schf</u>	rohe und erhitzte Probengemische	NWG: 1-2% Sw ELISA, GC, HPLC (TG), 5% Sw HPLC (Histidine)
<b>WAIBLING- ER und KLEINERT 1998</b>	RFLP, Ouchterlony, PAGIF	<u>Hirsch,</u> <u>Reharten,</u> <u>Känguru,</u> <u>Springbock</u>	<i>Cytb-1/-2</i> Primer, 359 bp, Antiseren: Hirsch, europ. Reh, asiat. Gazelle / rohe Proben	Ouchterlony Hirsch/Reh Nachweis ohne Diff., IEF Diff. möglich, RFLP mit Referenz + Erfahrung mögliche Diff.
<b>WINTERØ et al. 1990</b>	Ouchterlony, CIE, IEF, DNS- Hybridisierung	<u>Sw, Rd</u>	Sonden: komplette genomische Sw-DNS, geklontes Sw-spezif. Fragment, Slot-Blot / rohe Proben	NWG: Ouchterlony 1,0%, CIE 0,4%, IEF 5,0%, Hybridisierung 0,5%

\_\_ - nachzuweisende Tierart, nkd. - nicht korrekt deklariert, Diff. - Differenzierung, KR - Kreuzreaktion, NWG - Nachweisgrenze, o.A. - ohne Angabe, RE - Restriktionsenzym, ssp - Spezies-spezifische Primer, TG - Triglyceride, tlw. - teilweise, Sw - Schwein, Hu - Huhn, Pu - Pute, Rd - Rind, Gf - Geflügel, Schf - Schaf

### 2.4.2.1 Vergleich DNS-basierender Methoden

In der Arbeit von PETER (2003) wurde eine Echtzeit-Hybridisierung auf einem sogenannten Bio-Sensor mit der Endzeit-Hybridisierungsmessung eines DNS-Chips verglichen. Für die Realzeit-Hybridisierung war ein aufwendiges Auslesegerät, das bisher nur als Prototyp existiert, nötig. Dagegen konnte der DNS-Chip mittels konventioneller Microarray-Scanner ausgelesen werden. Für beide Verfahren wurde mittels universaler Primer ein 377 bp langes Fragment des mitochondrialen *Cytb*-Gens amplifiziert, welches sequenzabhängig an tierartsspezifische Sonden hybridisierte. Auf dem Bio-Sensor traten Kreuzhybridisierungen der Ziegen-Sonden mit PCR-Produkten von Schweine-DNS auf, obwohl es dabei zu neun Mismatches kam. Die Vorteile des Bio-Sensors lagen in der Spezies und Proben unabhängigen Verfahrensweise, die somit immer nach dem gleichen Schema durchlaufen wurde. Zudem stellte sich der Sensor zeitlich weniger aufwendig dar als andere üblicherweise eingesetzte Methoden der PCR mit tierartsspezifischen Primern und PCR-RFLP Analysen. Das Standardverfahren der Hybridisierung mittels DNS-Chip gestaltete sich zeitlich aufwendiger, es traten stärkere unspezifische Reaktionen auf und es war schlechter reproduzierbar. Dennoch konnten, unter Beachtung auftretender Kreuzhybridisierungen, auch Realproben gut untersucht werden. Die Nachweisgrenze lag bei 0,1% mit dem DNS-Chip und zwischen 0,1 und 1% mit dem Bio-Sensor.

### 2.4.2.2 Vergleich DNS-basierender mit Protein-basierenden Methoden

MEYER et al. (1994b) verglichen eine spezifische PCR für Schwein mit der Detektion von Schwein durch einen Ouchterlony-Testkit (the Binding Site, UK) bzw. einen ELISA-Testkit (Cortecs Diagnostics, UK). Desweiteren wurden Daten aus der Literatur für den Vergleich mit der DNS-Hybridisierung miteinbezogen (EBBHØJ und THOMSEN 1991a). Die spezifischen Primer für Schweine-DNS amplifizierten ein 108 bp langes Fragment aus dem *Wachstumshormon*-Gen. Damit konnte sowohl in rohen als auch in bis zu 121°C für 10 min erhitzten Proben eine Nachweisgrenze von unter 2% für den Zusatz von Schweinefleisch erreicht werden, ohne dass Kreuzreaktionen mit anderen Spezies (Rind, Huhn, Pute, Ziege, Schaf) festgestellt wurden. Mittels des Ouchterlony-Tests konnten 10% Schwein in rohen Gemischen nachgewiesen werden. Der ELISA-Testkit

mit polyklonalen Antikörpern gegen porcine hitzestabile Antigene konnten in autoklaviertem Schweinefleisch die Tierart Schwein bestätigen, jedoch wurde in erhitzten (100°C, 20 min und 121°C, 10 min) Fleischgemischen von 20% Schweinefleisch in Rindfleisch Schwein nicht korrekt detektiert. Desweiteren seien Kreuzreaktionen hier nicht auszuschließen. MEYER et al. (1994b) kamen zu dem Schluss, dass die Vorteile der PCR mit spezifischen Primern in ihrer Spezifität, Sensitivität, Schnelligkeit und in den geringen Kosten zu finden sind. Dagegen erschien die DNS-Hybridisierung zu zeitaufwendig und weniger sensitiv.

POSER et al. (2000) untersuchten unterschiedlich stark erhitzte Fleischerzeugnisse mit DNS- und Protein-basierenden Methoden. Für Brühwurst-Modelle ergaben sowohl die RFLP als auch die Southern-Blot-Hybridisierung (Hanse-Analytik, Bremen) Nachweise im Bereich von 1% und der ELISA-Testkit (TRANSIA, Ober-Mörlen) unterschritt die vom Hersteller angegebenen Nachweisgrenzen von 5% für Schaf, 2% für Geflügel und Rind sowie 1% für Schwein unterschiedlich stark. Handelsübliche Fleischerzeugnisse mit Gelatine führten zu falsch-positiven Resultaten beim Schweine-ELISA. Durch eine zu starke Fragmentierung der DNS in Handelsproben mit Aspik und in Gulaschsoße konnte andererseits bei diesen Proben eine Untersuchung mittels der RFLP nicht durchgeführt werden. In hochoerhitzten Konserven konnten sowohl der ELISA als auch die RFLP Analyse nur bis zu 127°C ( $F_C$ -Wert bis 50) verwendet werden. Für Temperaturen bis 130°C ( $F_C$ -Wert bis 373) war eine PCR mit spezifischen Primern einsetzbar, da hierbei kürzere, nicht hitzedenaturierte DNS-Fragmente als mit den universalen Primern der RFLP-PCR amplifiziert wurden. POSER et al. (2000) kamen zu dem Schluss, dass DNS- und Protein-basierende Methoden parallel angewendet werden sollten und dass für die Reproduzierbarkeit der Verfahren ausreichend Erfahrung vorhanden sein sollte.

RÜGGEBERGER et al. (1997) verglichen die Testkits der Firma Hanse Analytik auf Basis einer RFLP Analyse (DNAnimal PCR-Kit) bzw. spezifischer DNS-Sonden (DNAnimal DNS-Sonden-Kit) mit der IEF nach der Amtlichen Sammlung von Untersuchungsverfahren nach § 64 LFGB (L 06.00-29). Mit keiner der Methoden wurde ein falsch-positives Ergebnis erhalten. Falsch-negative Resultate traten nur bei der PAGIF und der PCR für Schaf bei der Untersuchung geringer Konzentrationen auf. Die Nachweisgrenzen lagen bei der RFLP zwischen 1% und 10% in Abhängigkeit der nachzuweisenden Spezies. Für die DNS-Sonden konnte 1% als Nachweisgrenze für alle getesteten Spezies ermittelt

werden und mittels IEF wurden wiederum in Abhängigkeit der nachzuweisenden Spezies Gehalte von 1-25% nachgewiesen. Die Vorteile der PAGIF lagen im Einsatz für ein großes Spektrum an Tierarten, bei einfacher Handhabung der Methode. Die komplexe Bandenauswertung kann jedoch noch durch starke Erhitzung und Verarbeitung, sowie durch Tierartengemische zusätzlich erschwert werden. Bei der hier angewendeten PCR der Firma Hanse Analytik GmbH (Bremen) war ebenfalls das, auch erweiterbare, große Tierartenspektrum vorteilhaft, sowie eine einfache Auswertung der erhaltenen Fragmentbanden und der Einsatz bei hochehitzten oder gelatinehaltigen Proben. Nachteilig für die DNS-Sonden der selben Firma war die aufwendige Verfahrensweise und ein geringes Spektrum an nachweisbaren Spezies. Auf der anderen Seite hatte die Probenzusammensetzung keinen Einfluss auf die Sensitivität und Spezifität dieses Verfahrens.

Einen Vergleich zwischen Immundiffusion nach Ouchterlony, Countercurrent Immunelektrophorese (CIE), IEF und DNS-Hybridisierung in Bezug auf den Nachweis von Schweinefleisch stellten WINTERØ et al. (1990) an. Kreuzreaktionen des Anti-Schwein-Antiserum waren in der Immundiffusion nicht nachweisbar, dagegen war das Signal der Rindprobe in der CIE vergleichbar mit dem Modell 0,2% Rind in Schwein. Dennoch wurden beide Verfahren als günstige, einfache und für Screening-Untersuchungen geeignete Methoden beschrieben, deren Nachweisgrenze für Schweinefleisch in Rindfleisch bei 1,0% (Ouchterlony) bzw. 0,4% (CIE) lag. Die IEF hatte eine Nachweisgrenze von 5,0% (Schwein in Rind) und war schnell durchzuführen. Die hohen Kosten für die Differenzierung roher Proben und das obligatorische Mitführen von Standards war dagegen von Nachteil. Die DNS-Hybridisierung mit einer Nachweisgrenze für Schweinefleisch in Rindfleisch von 0,5% war auch für die Untersuchung erhitzter Proben möglich und lies damit auf eine verlässliche und sensitive Methode schließen, die jedoch kompliziert und zeitaufwendig in der Durchführung war.

WAIBLINGER und KLEINERT (1998) führten Untersuchungen mittels der RFLP-Methode (*Mbo* I, *Mbo* II, *Hinf* I), dem Ouchterlony und der PAGIF durch. Sie rieten zur Absicherung der erhaltenen Fragmente bei der RFLP zur Verwendung weiterer Restriktionsenzyme (*Xba* I und *Hae* III). Für die Interpretation der Ergebnisse ist nach ihren Angaben eine gewisse Erfahrung im Umgang mit der Methode erforderlich. Desweiteren ist vor allem bei Mischungen verschiedener Spezies eine Auswertung problematisch. Ferner wären geeignete Referenzmaterialien für die Zuordnung nicht definierter Proben erforder-

lich. Alle drei Methoden zeigten übereinstimmende Ergebnisse im Rahmen ihrer jeweiligen Möglichkeiten. Vorteil der molekularbiologischen Methoden war die trotz aufwendiger Durchführung und Einarbeitung mögliche Untersuchung von erhitzten und verarbeiteten Erzeugnissen.

#### **2.4.2.3 Vergleich Protein-basierender Methoden**

Bei der Untersuchung von Handelsproben fand HAFKE (1994) einen Anteil von 32%, die nicht korrekt deklariert oder zusammengesetzt waren. Die eingesetzten Methoden waren der Tierarten-ELISA-Testkit von Cortecs Diagnostiks und die IEF nach der Amtlichen Sammlung von Untersuchungsverfahren nach § 64 LFGB (L 06.00-27). Mittels IEF wurden einige fragliche Resultate erhalten, die jedoch mittels ELISA als negativ oder positiv für eine Tierart zugeordnet werden konnten. Von Vorteil für den Nachweis mittels IEF war die Muskelspezifität des Verfahrens. Für den ELISA-Testkit wurden eine einfache Handhabung, eine höhere Empfindlichkeit und das Erhalten schneller, eindeutiger Resultate als positive Merkmale angeführt. Nachteilig war jedoch der muskelprotein-unspezifische Nachweis. Für beide Methoden ergaben sich Grenzen, wenn die nachzuweisenden Proteine durch Erhitzung und/oder Marinieren ihre Wasserlöslichkeit verloren hatten.

HSIEH et al. (1996) untersuchten Handelsproben aus Alabama (USA) mittels ELISA (ELISA Technologies, USA) und einem Agargel-Immundiffusions Test nach Ouchterlony. Es konnten zwischen den beiden Methoden deutliche Unterschiede in der Nachweishäufigkeit verschiedener Tierarten festgestellt werden. Beispielsweise wurden in 42 Schweinefleisch-haltigen Würsten mittels ELISA 54% als nicht korrekt etikettiert nachgewiesen, während die Quote beim Ouchterlony bei 0% lag. Bei der Untersuchung hergestellter Standards bekannter Tierartzusammensetzung wurden keine falsch-positiven oder falsch-negativen Resultate mit dem ELISA-Testkit gewonnen und somit konnte auf eine 100%ige Spezifität dieses Assays geschlossen werden. Die Nachweisgrenze wurde durch Vergleiche mit den Standards bei 0,5% angegeben. Durch die Spezifität und die niedrige Nachweisgrenze wurde der ELISA als sensitiver und besser geeignet für das Monitoring der verwendeten Tierarten in verschiedenen Erzeugnissen beurteilt als die ebenfalls eingesetzte Gelddiffusion. Desweiteren konnten mittels des ELISA in weniger als 2 Stunden für bis zu 96 Proben Resultate erzielt werden. Der Ouchterlony lieferte dagegen keine zufriedenstellenden Ergebnisse, da die Tierartbestimmung in einigen Proben

nicht gelang und die über die Standards ermittelte Sensitivität schlechter als beim ELISA ausfiel (0,2% Schwein in Rind, 5% Rind in Schwein, 50-80% Geflügel in Schwein). Durch den Mangel kommerziell verfügbarer Antisera für erhitzte Antigene und die erforderliche Inkubation über Nacht wurde die Geldiffusion daher als ungeeignet für den Routineeinsatz bewertet.

#### **2.4.2.4 Vergleich Protein-basierender mit sonstigen Methoden**

Einen Vergleich eines kompetitiven ELISAs mit der high pressure liquid chromatography (HPLC) Analyse von Triglyceriden und Histidinen, sowie mit einer gaschromatographischen (GC) Analyse der Fettsäure-Zusammensetzung lieferten SAWAYA et al. (1990). Die HPLC Analyse der Triglyceride erlaubte einen Nachweis von 2% Schwein in Rind. Der Hauptnachteil dieses Verfahrens lag in der aufwendigen und langwierigen Extraktion der Proben, so dass für sechs Probenanalysen ein Zeitraum von drei Tagen benötigt wurde. Für chemisch veränderte Fette konnte das Verfahren nicht verwendet werden und die Kontaminationsgefahr während der langen Probenaufreinigung kann die Reproduzierbarkeit stören. Die HPLC Analyse der Histidine für den Schweine-Nachweis mit einer Nachweisgrenze von 5% Schwein in Rind oder Schaf stellte sich als einfach und schnell dar, da für die Probenaufbereitung nur 90 min und für die Durchführung der Analyse nur 10 min benötigt wurden. Mit der GC-Fettsäuren Analyse konnte bis zu 1% Schwein in Modellgemischen mit Rind und Schaf nachgewiesen werden, jedoch war keine Konzentrationsbestimmung möglich. Der kompetitive ELISA wies Kreuzreaktionen mit heterologen Spezies auf, wodurch geringe Konzentrationen nicht nachgewiesen werden konnten. Die Vorteile dieses Verfahrens lagen dagegen in der einfachen Durchführung, der kurzen Dauer und den niedrigen Kosten. Nachteilig aufgrund der biologischen Variabilität des Assays ist die notwendige Standardisierung und die fehlende Möglichkeit, tierisches Fett zu differenzieren. Dennoch sollten bei Fleisch-Proben die schnelleren Protein-basierenden Methoden aus Einfachheit und Kostengründen eingesetzt werden.

## 3 Eigene Untersuchungen

### 3.1 Material

#### 3.1.1 Proben

##### 3.1.1.1 Vorversuchsproben

Zur Etablierung des CIB-A-Kit und für die Einarbeitung in den ELISA- und den CarnoCheck®-Testkit wurden verschiedene Proben willkürlich aus dem Handel ausgewählt. Tabelle 13 zeigt die einzelnen Proben mit Angabe der nach dem Zutatenverzeichnis verwendeten Tierart.

Tab. 13 Zusammensetzung der Vorversuchs-Wurstproben

Wurstart	Verkehrsbezeichnung	Nr.	Huhn	Pute	Rind	Schwein
Brühwurst	Schinkenwurst	02			x	x
Brühwurst	Mortadella	21				x
Rohwurst	Truthahn Salami	29		x		x
Kochwurst	Geflügel-Leberwurst	42		x		x
Kochwurst	Leberwurst fein	43				x
Kochwurst	Zungenwurst	44				x
Rohwurst	Mettwurst fein	50				x
Rohwurst	Teewurst fein	51				x
Kochwurst	Leberwurst grob	55				x
Brühwurst	Geflügel-Lyoner	58	x	x		

##### 3.1.1.2 Hauptversuchsproben

Für den Hauptversuch wurden Modellwürste im hauseigenen Technikum hergestellt. Sie enthielten übliche Zutaten (24,2% Eis, 1,4% Nitritpökelsalz, 0,2% Kutterhilfsstoffe), sowie 24,2% Rapsöl als Fettanteil und zu 50% ein Gemisch aus Fleisch verschiedener Tierarten (Tab. 14). Zum Einsatz kamen Oberschenkelfleisch vom Huhn, gebaaderte Unterkeulen von Puten sowie Schweine- und Rindfleisch der GEHA-Sortierung S2/S3 bzw. R2/R3. Abgefüllt wurde das Brät in Nalo Top Kunststoffdärme Kaliber 45 (Firma Kalle GmbH).

Tab. 14 Zusammensetzung des 50%igen Fleischanteils der Hauptversuchsproben

Modell	Huhn [%]	Pute [%]	Rind [%]	Schwein [%]
0,1RS	-	-	0,10	99,90
0,5RS	-	-	0,50	99,50
1RS	-	-	1,00	99,00
0,1HS	0,10	-	-	99,90
0,5HS	0,50	-	-	99,50
1HS	1,00	-	-	99,00
0,1PS	-	0,10	-	99,90
0,5PS	-	0,50	-	99,50
1PS	-	1,00	-	99,00
0,1SHP	49,95	49,95	-	0,10
0,5SHP	49,75	49,75	-	0,50
1SHP	49,50	49,50	-	1,00

RS – Rind in Schwein, HS – Huhn in Schwein, PS – Pute in Schwein, SHP – Schwein in Huhn/Pute

### 3.1.2 Testkits und Polymerasen

Für die Vor- und Hauptversuche wurden folgende Testkits und Polymerasen verwendet (Tab. 15). Deweiteren kamen zahlreiche Reagenzien zum Einsatz, die in Tabelle 46 im Anhang zu finden sind.

Tab. 15 Testkits und Polymerasen

Produkt	Hersteller, Ort	Artikelnummer
CarnoCheck® Testkit	Greiner Bio-One, Frickenhausen	462060
CIB-A-Kit Standard 40 Huhn	Cibus, Gütersloh	5007031
CIB-A-Kit Standard 40 Pute	Cibus, Gütersloh	5007032
CIB-A-Kit Standard 40 Rind	Cibus, Gütersloh	5007033
CIB-A-Kit Standard 40 Schwein	Cibus, Gütersloh	5007034
DNeasy® Tissue Kit	Qiagen, Hilden	69506
ELISA-Testkit CM Rind a	Transia, Ober-Mörlen	DT-5021
ELISA-Testkit CM Schwein a	Transia, Ober-Mörlen	DT-5022
ELISA-Testkit CM Geflügel a	Transia, Ober-Mörlen	DT-5023
ELISA-Testkit CM Rd/Sw/Gf b	Transia, Ober-Mörlen	DT-5025
Hot Star Taq Polymerase	Qiagen, Hilden	203203
MasterMix 2,5x	Eppendorf, Wesseling-Berzdorf	0032 002.250
Taq Polymerase	Qiagen, Hilden	201205
Taq Polymerase	Cibus, Gütersloh	Batch 619

a – eine -Tierart pro Testkit, b – drei Tierarten pro Testkit

### 3.1.3 Geräte

Die für die Versuche benötigten Geräte sind komplett in Tabelle 47 im Anhang aufgelistet. Tabelle 16 enthält Geräte, die nicht zur üblichen Laborausstattung gezählt werden und speziell für die in dieser Arbeit beschriebenen Methoden notwendig sind.

Tab. 16 Spezielle Geräte

Bezeichnung	Hersteller, Ort	Typenbezeichnung	Artikelnr.
Eis-Rack	Eppendorf, Wessling-Berzdorf	PCR-Cooler, blau	3881 000.031
Gel-Form	Bio-Rad, München	Mini Comb Holder	170-4331
Gel-Pressen	Bio-Rad, München	Gel cast	170-4412
Gellaufkammer	Bio-Rad, München	Mini Sub® Cell GT	170-4466
Gradientencycler	Bio-Rad, München	iCycler, Block 1x 96 wells	170-8720
Hybridisierungskammer	Greiner Bio-One, Frickenhausen	Gelbes Standard rack	973-202
Gel-Kamm 8 Zinken	Bio-Rad, München	Combs 0,75 x 5,5 x 11 mm	170-4462
Gel-Kamm 15 Zinken	Bio-Rad, München	Combs 0,75 x 3 x 10 mm	170-4464
Microarray Reader	Axon instruments, Union City, CA, USA	Gene Pix Personal 4100A	----
Mikroplatten Reader	Bio-Rad, München	Modell 680	168-1000
Mikroplatten Filter	Bio-Rad, München	405 nm	168-1011
Power Supply	Bio-Rad, München	Power Pac Basic™	164-5050
Software Agarosegel	Bio-Rad, München	Quantity One 4.5.0. 1-D Analysis Software	170-9600
Software CarnoCheck®	MicroDiscovery, Berlin, Greiner Bio-One, Frickenhausen	Check Report™ 2.0.3.	----
Software Microarray	Axon instruments, Union City, CA, USA	Gene Pix Pro 4.1.1.4.	----
Software Mikroplatten	Bio-Rad, München	Microplate Manager Software version 5.2 PC	170-9520
Thermocycler	Bio-Rad, München	iCycler, Dual Block 2x 48 wells	170-8722
UV-Kammer	Bio-Rad, München	Molecular Imager® Gel Doc™	170-8170

### 3.1.4 Verbrauchsmaterialien

Als Verbrauchsmaterialien wurden sämtliche Artikel bezeichnet, die nicht nach Waschen oder Autoklavieren wieder verwendet werden konnten. Tabelle 17 gibt einen Überblick über die zur Anwendung gekommenen Materialien.

Tab. 17 Verbrauchsmaterial

<b>Material</b>	<b>Hersteller, Ort</b>	<b>Typenbezeichnung</b>	<b>Artikelnr.</b>
Latexhandschuhe	Meditrade, Kiefersfelden	Gentle Skin®, grip, puderfrei	1221 GRIP-M
Nitrilhandschuhe	Roth, Karlsruhe	Rotiprotect	P777.1
Papierfilter	Whatman, Dassel	No 4, Roundfilters, Ø 90 mm	1004096
Papierfilter	Whatman und S&S, Dassel	604, Roundfilters, Ø 90 mm	10312709
Papierfilter	S&S, Dassel	595 ½ Folded Filters, Ø 90 mm	311642
Paraffinfilm	Pechiney Plastic Packaging, Menasha, Wisconsin, USA	Parafilm "M", 10x38 cm	PM-996
Pipettenspitzen	Eppendorf, Wesseling-Berzdorf	ep T.I.P.S. Standard, 2-200 µl	0030 000.870
Pipettenspitzen	Eppendorf, Wesseling-Berzdorf	ep T.I.P.S. Standard, 50-1000 µl	0030 000.919
Pipettenspitzen	Eppendorf, Wesseling-Berzdorf	ep T.I.P.S. Filter, 10 µl	0030 077.040
Reaktionsgefäße	Greiner Bio-One, Frickenhausen	CELLSTAR®, PP-tubes, 50ml, steril	227 261
Reaktionsgefäße	peQLab, Erlangen	Thermo Strip™ standard strip, 0,2ml, farblos dünnwandig	82-0266
Reaktionsgefäße	Eppendorf, Wesseling-Berzdorf	Eppendorf Tubes safelock, farblos 1,5 ml	0030 120.086
Skalpellklingen	C. Bruno Bayha, Tuttlingen	BAYHA Nr. 24, steril	233-5548

## 3.2 Methoden

### 3.2.1 Etablierung des CIB-A-Kit

Im Zuge der Vorversuche wurden die Testkits der Firma Coring System Diagnostix GmbH (Vertrieb Deutschland: CIBUS-Biotech GmbH) für den Nachweis von Huhn, Pute, Rind und Schwein basierend auf den Gegebenheiten des Labors, in dem die Untersuchungen durchgeführt wurden, etabliert. Das Prinzip des Nachweises ist hier eine PCR mit Spezies-spezifischen Primern. Da eine Vielzahl von Polymerasen und Thermocyclern auf dem Markt sind, musste eine Anpassung des PCR-Programmes, insbesondere der Annealingtemperatur, und des Reaktionsansatzes an die zur Anwendung kommende Polymerase erfolgen. Im Folgenden wird dieser Vorgang nach Arbeitsschritten getrennt näher erläutert.

#### 3.2.1.1 Komponenten des Premix

##### Theorie

In den CIB-A-Kits sind für den Reaktionsansatz der PCR, im Folgenden als Premix bezeichnet, die Hälfte der Komponenten bereits enthalten. Nötig ist vor allem der Zusatz einer Polymerase, mit zugehörigem Puffer und Magnesiumchloridlösung. In der im Kit enthaltenen dNTP-Lösung befinden sich in ausreichender Menge alle der vier DNS-Basen. Um die Grenzen der zu amplifizierenden Sequenz zu bestimmen, muss ein Primerpaar zugegeben werden (forward und reverse), welches ebenfalls Bestandteil der Kits ist. Wasser dient zur Erreichung des Ansatzvolumens und als Reaktionsmedium. Die wichtigste Zutat des Premixes ist die hitzestabile DNS-abhängige DNS-Polymerase. Für diesen Testkit sollte, wie in der Anleitung des Herstellers empfohlen, eine Taq-Polymerase zum Einsatz kommen, um unspezifische Produkte zu vermeiden. Zur Einstellung eines idealen pH-Wertes für das Enzym dient eine 10x Pufferlösung, die im Lieferumfang der jeweiligen Polymerase enthalten ist.

Magnesiumionen werden in Form von  $MgCl_2$  (2,5mM) ebenfalls mit der Polymerase geliefert. Diese bilden mit den dNTPs einen löslichen Komplex und erhöhen die Schmelztemperatur der Primer. Außerdem benötigt die Polymerase für ihre Aktivität freies  $Mg^{2+}$  (SAMBROOK et al. 2001). Zuletzt wird noch eine Matrize benötigt. Hierfür dienen zur

Ermittlung der Annealingtemperaturen die jeweiligen Kontroll-DNS aus dem Testkit in einer 1:100 Verdünnung mit Wasser für molekularbiologische Zwecke. Zur Überprüfung der ermittelten Temperaturen wurden anschließend die DNS-Extrakte der Vorversuchsproben verwendet.

Je nach eingesetzter Polymerase ergaben sich unterschiedliche Reaktionsansätze. Bei Verwendung des Eppendorf MasterMix 2,5x wurden nur das Wasser, die Primer und die Kontroll-DNS aus dem Kit benötigt. Alle anderen Komponenten sind bereits in der Lösung des MasterMix enthalten. Dagegen mussten mit der Qiagen-Taq-Polymerase und mit der CIBUS-Taq-Polymerase auch die dNTPs aus dem CIB-A-Kit, sowie der Puffer und die Magnesiumchlorid-Lösung einzeln zugesetzt werden.

Nach Versuchen mit 50 und 25 µl Ansatzvolumen wurde zur Einsparung von Reagenzien das in der Gebrauchsanweisung (CIBUS 2001) angegebene Volumen (50 µl) um die Hälfte reduziert, wobei das eingesetzte Template-Volumen gleich blieb und durch ein noch weiter reduziertes Wasservolumen ausgeglichen wurde. Die Endkonzentrationen an Polymerase betragen 1 U/Ansatz für die CIBUS- und die QIAGEN-Taq Polymerase und 1,25 U/Ansatz durch die Vormischung beim Eppendorf MasterMix. Die Magnesiumkonzentration sollte bei 1,5 mM liegen, dies war sowohl beim CIBUS-Premix als auch beim Eppendorf-MasterMix der Fall. Beim Qiagen-Premix wurde durch Verwendung der gleichen Volumina wie beim CIBUS-Premix eine Magnesiumkonzentration von 1,875 mM erreicht.

### Chemikalien

CIB-A-KIT ST/40 (CO, PI, TU, CH) (Abb. 11)	Primer Rind-ST, Schwein-ST, Huhn-ST, Pute-ST  dNTP-Lösung  H <sub>2</sub> O dest.  Kontroll-DNA Rind, Schwein, Huhn, Pute (25 ng/µl)
Cibus	Taq Polymerase 10x Puffer MgCl <sub>2</sub> (25 mM)
Eppendorf	MasterMix 2,5x

Qiagen Taq Polymerase  
 10x Puffer  
 MgCl<sub>2</sub> (25 mM)

Water molecular biological grade (Aqua<sub>PCR</sub>)

### Durchführung

Unter dem Premix-Abzug wurden die einzelnen Komponenten zusammen gegeben (Schema s. Tab. 18 - 19) und vermischt. Anschließend kam der Premix im Probenraum unter einer Arbeitshaube in ein Kühlrack. Nach Zugabe der Kontroll-DNS wurde der Ansatz gleichmäßig auf 0,2 ml Reaktionsgefäße aufgeteilt. Es war darauf zu achten, dass sich die gesamte Flüssigkeit luftblasenfrei am Boden des Reaktionsgefäßes befand.

Die verwendeten Verbrauchsmaterialien wurden vorschriftsmäßig entsorgt und der Abzug bzw. die Arbeitshaube mit den enthaltenen Gerätschaften mit UV-Licht dekontaminiert.

Tab. 18 Pipettierschema für Premix mit Qiagen- bzw. Cibus-Taq-Polymerase

<b>PCR-Komponenten</b>	<b>Konzentration</b>	<b>Volumina</b>	<b>Endkonzentration</b>
H <sub>2</sub> O <sub>dest.</sub>		15,8 µl	
Puffer	10 x	2,5 µl	1 x
MgCl <sub>2</sub>	25 mM	1,5 µl	1,5 mM
dNTP Lösung	o.A.	1,0 µl	
Primer (r+f)	o.A.	2,5 µl	
Polymerase	5 U/µl	0,2 µl	1 U
Kontroll-DNS (Template)	25 ng/µl	1,5 µl	75 ng
Endvolumen		25,0 µl	

Tab. 19 Pipettierschema für Premix mit dem Eppendorf MasterMix 2,5x

<b>PCR-Komponenten</b>	<b>Konzentration</b>	<b>Volumina</b>	<b>Endkonzentration</b>
H <sub>2</sub> O <sub>dest.</sub>		11,0 µl	
MasterMix 2,5x	2,5 x	10,0 µl	1 x
Primer (r+f)	o.A.	2,5 µl	
Kontroll-DNS (Template)	25 ng/µl	1,5 µl	75 ng
Endvolumen		25,0 µl	

### 3.2.1.2 Temperaturprogramm

#### Theorie

Der Zyklus der PCR bestehend aus den mehrfach sich wiederholenden Denaturierungs-, Annealing- und Elongationsphasen ist eingerahmt von einem Startabschnitt und einem Endabschnitt. Die Temperatur und die Dauer der jeweiligen Phase sind nach Anweisung des Testkits durchzuführen. Der in der Erläuterung zum Testkit empfohlene Wert für die Annealingtemperatur wird dagegen nur als Anhaltspunkt gewählt, da verschiedene Polymerasen verwendet wurden. Zur Ermittlung der optimalen Annealingtemperatur wurde ein Thermocycler mit einem 96well Block verwendet, der innerhalb des Heizblocks einen Temperaturgradienten aufbaut. Der Temperaturgradient wird über das Cycler-Programm gesteuert.

#### Durchführung

Zur Ermittlung der optimalen Annealingtemperatur wurden Temperaturgradienten gewählt, die sich an den Temperaturen in der Anleitung des Testkits orientierten oder an vorhergehende Untersuchungsergebnisse angelehnt waren. Die einzelnen Temperaturen des Gradienten konnten nicht festgelegt werden, nach Eingabe der maximalen und minimalen Temperatur wählte der Cycler die übrigen dazwischen liegenden Temperaturen selbstständig. Die Temperatur nahm hierbei von Reihe A zu Reihe H hin ab. Nach Eingabe des PCR-Programms (Tabelle 20) wurden die PCR-Ansätze in den Heizblock gestellt und der Deckel geschlossen. Die Amplifikation lief automatisch ab.

Tab. 20 PCR-Programm zur Ermittlung der idealen Annealingtemperatur

Prozess	Vorgang	Zeit [min]	Temperatur [°C]	Zyklen
Start	Aufschmelzen	5	95	1
Denaturierung	Aufschmelzen	0,75	95	
Annealing	Primer-Anlagerung	0,75	H-A	34
Elongation	Fortführung	1	72	
End	Vervollständigung	5	72	1
Hold	Kühllagerung	∞	4	1

### 3.2.1.3 Agarose-Gelelektrophorese

#### Theorie

Die aus der PCR gewonnenen DNS-Amplifikate werden nach ihrer Molekülgröße in einem Agarosegel durch Anlegung einer Spannung aufgetrennt. Vor dem Auftragen werden die DNS-Proben mit einem Gel-Ladepuffer im Verhältnis 1:5 vermischt. Dieser besteht aus Glycerin, TBE-Puffer und Bromphenolblau. Er dient der besseren Handhabung beim Pipettieren sowie der Verfolgung des Laufs der Elektrophorese, erhöht die Dichte der Probe und sorgt damit für ihr Absinken in den Slots.

Die Spannung wird in Abhängigkeit zum Abstand der Elektroden gewählt (ca. 7 V/cm). Die Elektrophorese wird beendet, sobald der Farbstoff dreiviertel des Gels durchlaufen hat. Durch Färbung mit Ethidiumbromid können die aufgetrennten DNS-Abschnitte im UV-Licht sichtbar gemacht werden. Zur Größenbestimmung der DNS-Moleküle werden DNS-Längenstandards gemeinsam mit den Proben elektrophoretisch aufgetrennt. Anhand der Laufstrecke und der bekannten Molekülformel bzw. Größe dieser Marker können die Längen der entstandenen DNS-Fragmente bestimmt werden (NEWTON und GRAHAM 1997, LAUBE 2002).

#### Chemikalien

Agarose

Aqua bidest.

Bromphenolblau-Lösung	0,05% Bromphenolblau 50% Glycerin 49,95% TBE 10x
CIB-A-KIT ST/40 (CO, PI, TU, CH)	DNA Längenstandard = Marker
Ethidiumbromid-Lösung (0,5 µg/ml)	25 µl Ethidiumbromid (10 mg/ml) 500 ml Aqua dest.
TBE-Puffer 1x	89 mM Tris 89 mM Borat 2 mM EDTA pH 8,3

### Durchführung

Es wurden 1-2%ige Agarosegele hergestellt (Tab. 21). Hierzu wurden 0,3-0,6 g Agarose in 30 ml 0,5x Tris-Borsäure-EDTA(TBE)-Puffer suspendiert (1,5 ml TBE 10x, ad 30 ml Aqua bidest.). Nach kurzem Aufkochen in der Mikrowelle und einem Ausgleich des verdampften Wassers mit Aqua bidest. wurden die Gele in den Gelträger gegossen und 8er bzw. 15er Kämmen je nach Probenzahl für die Formung der Slots eingehängt. Nach dem Polymerisieren wurden die Gele mit Gelträger in die Elektrophoresekammer gelegt. Diese war maximal mit TBE-Puffer 0,5x befüllt.

Auf einem Stück Paraffinfilm wurden entsprechend der Probenzahl jeweils 0,8-2 µl der Bromphenolblau-Lösung vorgelegt. Es wurden je 4-10 µl der PCR-Produkte zugegeben, vermischt und in die entsprechenden Slots pipettiert. In die äußeren Slots wurden jeweils 4-10 µl des Längenstandards pipettiert. Das Proben- und Längenstandardvolumen variierte in Abhängigkeit der Anzahl und Größe der Zinken der verwendeten Gel-Kämme und damit der Slots und ihrer Volumina, um scharfe Banden im Gel zu erhalten.

Sofort im Anschluss wurde der Elektrophorese-Lauf gestartet. Die Einstellung des Gerätes sorgte für eine konstante Spannung von 100 V, während die Stromstärke zwischen 25 und 27 mA schwankte. Der Lauf wurde nach 20-40 min beendet und das Gel für 15 min in Ethidiumbromid-Lösung gefärbt. Nach einem kurzen Bad in Aqua dest. (ca. 1 min), um überschüssiges Ethidiumbromid zu entfernen, wurde das Gel in die UV-Kammer gelegt. Die Aufnahme erfolgte nach Einstellung des Bildausschnittes, der Schärfe und der Blende. Das Bild konnte mittels Quantity One Software in Kontrast und Helligkeit optimiert werden und als Tiff-Datei exportiert werden. Die Auswertung erfolgte visuell mit Hilfe der Längenstandards bzw. der Kontroll-DNS, ein Beispiel zeigt Abbildung 7. In dieser Arbeit werden die angefertigten Agarosegele in farblich-invertierter Form dargestellt.

Tab. 21 Gewählte Laufzeit in Abhängigkeit der Agarose-Konzentration

<b>Agarose [%]</b>	<b>Agarose [g]</b>	<b>Laufzeit [min]</b>
1,0	0,3	20
1,5	0,45	30
2,0	0,6	40

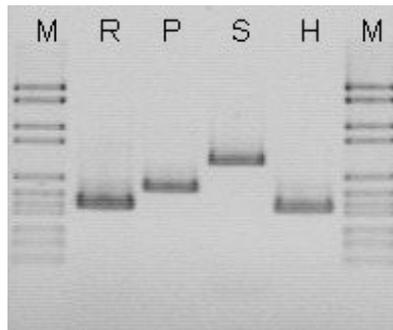


Abb. 7: Tierartspezifische Banden mit dem CIB-A-Kit

H – Huhn, P – Pute R – Rind, S – Schwein, M – Marker (vgl. Abb. 21)

### 3.2.2 Herstellung der Modellwürste für den Hauptversuch

Für den Hauptversuch wurden von vier verschiedenen Tierartengemischen je drei verschiedene Konzentrationsverhältnisse hergestellt, d.h. je 0,1%, 0,5% und 1,0% Rind, Huhn und Pute in Schwein und je 0,1%, 0,5% und 1,0% Schwein in einem Huhn-Pute-Gemisch. Von diesen 12 Modellen wurden jeweils 20 Würste gefertigt (Tab. 14).

Die Zutaten wurden nach dem Aufbauverfahren gekuttert und anschließend in ca. 200 g Portionen in 45 Kaliber Kunststoffdärme abgefüllt. Die Brühwürste wurden zunächst für 20 min auf + 50°C erhitzt und nachfolgend 45 min lang bei + 75°C gegart. Nach einer 15minütigen Abkühlung im Eisbad kamen die Würste über Nacht in den Kühlraum (+ 6°C) und wurden im Anschluss daran bei -20°C bis zur Untersuchung tiefgefroren gelagert. Um eine Kontamination zu vermeiden, wurden neben gründlichen Zwischen- und Endreinigungen und Fertigung an verschiedenen Tagen die Würste nach aufsteigender Konzentration der Beimengung hergestellt.

### 3.2.3 Probenaufbereitung

Die Wahl der Aufarbeitungsmethode richtete sich nach der gewünschten zu extrahierenden Zielsubstanz. Da hier drei verschiedene Methoden zur Untersuchung der Proben Anwendung fanden mit zwei unterschiedlichen Nachweissubstanzen, mussten auch zwei verschiedene Methoden zur Gewinnung der Zielsubstanz durchgeführt werden, zum einen eine Protein-Extraktion zur Gewinnung tierartspezifischer Proteine und zum anderen eine DNS-Extraktion (Abb. 8).

Für beide Aufarbeitungen war zunächst eine Homogenisierung erforderlich. Hierzu wurden ca. 100 g der zu untersuchenden und über Nacht aufgetauten Probe mittels Moulinette® zu einer homogenen Masse zerkleinert.

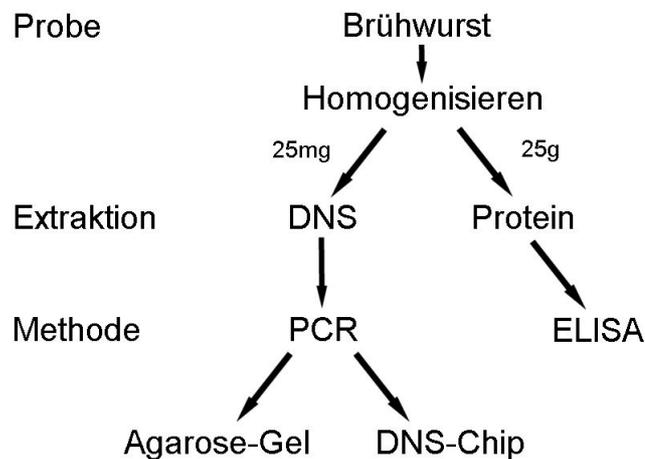


Abb. 8: Schema des Versuchsablaufs

### 3.2.4 DNS-Extraktion

#### Theorie

Die homogenisierte Probe wird mit Hilfe des Dneasy® Tissue Kit nach Anleitung weiter bearbeitet (Abb. 9). Zunächst wird die Probe mit Proteinase K verdaut und anschließend an eine Silica-Gel-Membran gebunden. Spezielle Puffer sorgen für optimale Bedingungen für die Reaktionen. In anschließenden Waschschrinen wird die DNS von weiteren Zellbestandteilen sowie Zutaten des Lebensmittels befreit. Die gereinigte DNS wird dann mit Hilfe eines Eluat-Puffers von der Silica-Gel-Membran gelöst und liegt zur weiteren Verwendung im Eluat vor (QIAGEN 2005).

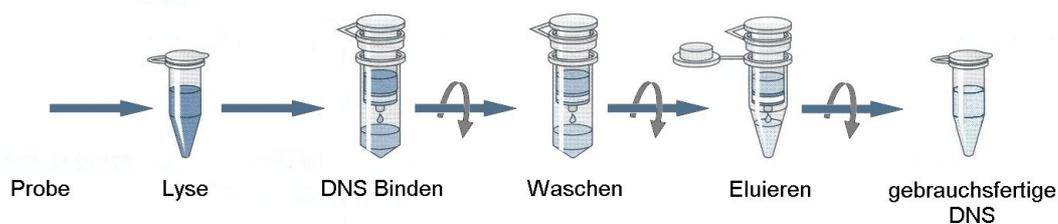


Abb. 9: Schema der DNS-Extraktion

### Chemikalien

DNeasy® Tissue Kit (Abb. 10)    Proteinase K (600 mAU/ml Lösung)  
Puffer ALT (Lysispuffer)  
Puffer AL (Adsorptionspuffer)  
Puffer AW1 (Waschpuffer)  
Puffer AW2 (Waschpuffer)  
Puffer AE (Elutionspuffer)

Ethanol für molekularbiologische Arbeiten > 99,8%



Abb. 10: DNeasy® Tissue Kit

### Durchführung

25 mg des Homogenisats wurden mit Hilfe einer Einweg-Skalpellklinge in ein 1,5 ml Eppendorf Tube eingewogen und anschließend mit 180  $\mu$ l ALT-Lysispuffer und 20  $\mu$ l Proteinase K vermischt. Die Zellyse erfolgte 2-3 h lang in einem Blockthermostat bei einer Temperatur von + 55°C und mit einer Intervall-Schüttelung von 14.000 rpm für 30 sec alle 15 min. Vor und nach der darauf folgenden Zugabe von 200  $\mu$ l AL-Adsorptionspuffer wurde die Probe auf einem Vortexer gemischt und anschließend 10 min bei + 70°C permanent bei 300 rpm in einem Blockthermostat inkubiert. Nach der Zugabe von 200  $\mu$ l Ethanol und Mischen auf dem Vortexer wurde die Lösung in eine Spin Säule, die sich in einem 2 ml Auffanggefäß befindet, überführt.

Die bei Raumtemperatur (RT) abzentrifugierte (8.000 rpm für 1 min) Flüssigkeit wurde verworfen und die Säule in ein neues Auffanggefäß gegeben. Die Säule wurde mit 500  $\mu$ l AW1-Waschpuffer gewaschen und hierzu 1 min bei 8.000 rpm bei RT zentrifugiert. Erneut wurde die abzentrifugierte Flüssigkeit verworfen und die Säule wieder auf ein neues Auffanggefäß gesetzt. Mit 500  $\mu$ l AW2-Waschpuffer wurde die Säule nochmals gewaschen und anschließend bei 13.200 rpm für 3 min (RT) zentrifugiert. Nun wurde die

Säule, sofern ihr keine Flüssigkeit mehr anhaftete, in ein 1,5 ml Eppendorf-Tube umgesetzt. Für die DNS-Elution wurde 100 µl AE-Eluatpuffer direkt auf die Silica-Membran gegeben, eine Minute bei RT stehen gelassen und im Anschluss 1 min bei 8.000 rpm und RT zentrifugiert. Die DNS lag nun im Eluat als gebrauchsfertige Lösung vor.

### 3.2.5 PCR und Elektrophorese mit CIB-A-Testkit

#### Theorie

Die Reagenzien aus dem CIB-A-Testkit zusammen mit der Qiagen-Taq-Polymerase und Magnesiumchloridlösung, sowie der zugehörige 10x Puffer ergeben den Premix, der Grundlage für den Tierartennachweis ist. Von zugegebenen Proben-Templates werden mittels PCR tierartspezifische Sequenzabschnitte vervielfältigt. Da für jede Tierart, die nachgewiesen werden soll, ein spezielles Primerpaar notwendig ist, werden insgesamt vier verschiedene Premix-Ansätze benötigt. Die erhaltenen PCR-Produkte werden anschließend im Agarose-Gel durch Elektrophorese nach ihrer Größe aufgetrennt. Durch eine mitgeführte Kontroll-DNS und einen Längenstandard ist die Auswertung, nach Färbung der DNS mittels Ethidiumbromid und Sichtbarmachung im UV-Licht, durch einen Vergleich der Kontrollbande mit der Probenbande möglich.

#### Chemikalien

Agarose

Aqua bidest.

Bromphenolblau-Lösung	0,05% Bromphenolblau 50% Glycerin 49,95% TBE 10x
CIB-A-KIT ST/40 (CO, PI, TU, CH) (Abb. 11)	Primer Rind-St, Schwein-ST, Huhn-ST, Pute-ST dNTP-Lösung H <sub>2</sub> O dest. Kontroll-DNA Rind, Schwein, Huhn, Pute (25 ng/µl), 1:10 mit Aqua <sub>PCR</sub> verdünnt DNA Längenstandard = Marker
Ethidiumbromid-Lösung (0,5 µg/ml)	25 µl Ethidiumbromid (10 mg/ml) 500 ml Aqua dest.

Qiagen	Taq Polymerase
	10x Puffer
	MgCl <sub>2</sub> (25 mM)
TBE-Puffer 1x	89 mM Tris
	89 mM Borat
	2 mM EDTA
	pH 8,3

Water molecular biological grade (Aqua<sub>PCR</sub>)



Abb. 11: CIB-A-Standard 40-Testkit

### Durchführung

In einem separaten Raum für die Herstellung der Reaktionsansätze wurde unter einem Flow der Premix für die PCR zum Tierartnachweis hergestellt. Es wurden immer zwei verschiedene Ansätze gleichzeitig vorbereitet, zuerst die Premixe für Rind und Huhn, im Anschluss für Pute und Schwein. Pro Probe und Kontrolle (1 positive, 2 negative) und n+1 Pipettierverlust wurden 15,8 µl H<sub>2</sub>O, 2,5 µl 10x Puffer, 1,5 µl MgCl<sub>2</sub>, 1 µl dNTPs, 2,5 µl Primer und 0,2 µl Polymerase in ein Eppendorf Tube pipettiert (Tab. 22). Nach kurzem Vortexen wurden je 23,5 µl in 0,2 ml Stripes pipettiert. Anschließend wurde im nächsten Raum unter einer Arbeitshaube in einem Kühlrack je 1,5 µl Template bzw. Kontrolle hinzu pipettiert. Die Kontroll-DNS der jeweiligen Spezies diene als Positiv-Kontrolle und Wasser für molekularbiologische Zwecke (Aqua<sub>PCR</sub>) bzw. die Extraktions-Kontrolle wurden als Negativ-Kontrollen verwendet. Der Flow und die Arbeitshaube wurden anschließend mit UV-Licht dekontaminiert. In einem Thermocycler wurden nach 5 min bei + 95°C 34 Zyklen angesetzt. Jeder Zyklus (Tab. 23) bestand aus + 95°C für 45 sec zur Denaturierung, einer Annealingtemperatur von + 62°C bei Huhn und Rind, + 63°C bei Pute und + 60°C bei Schwein für jeweils 45 sec und + 72°C für 1 min zur Elongation.

Im Anschluß folgten noch weitere 5 min bei + 72°C und ein Abkühlen auf + 4°C. Je 4 µl der PCR-Produkte wurden in einem 2% Agarose-Gel (0,6 g Agarose, 1,5 ml TBE 10x, ad 30 ml Aqua bidest.) bei 100 V für 40 min einer Elektrophorese unterzogen. Als Laufpuffer diente eine in der Gebrauchsanweisung zum Testkit beschriebene Bromphenolblaulösung. Nach 15 min Färbung in einer 0,5 µg/ml konzentrierten Ethidiumbromid-Lösung und anschließendem kurzem Waschen (ca. 1 min) in destilliertem Wasser wurde ein Foto in einer UV-Kammer angefertigt. Die digitale Aufnahme des Gels wurde durch Vergleich der Positivkontroll-Banden mit den Probenbanden visuell ausgewertet. Die einzelnen Spezies-spezifischen Fragmentlängen sind in Tabelle 24 angegeben. Es wurden nur deutliche Banden als positiv gewertet.

Tab. 22 Premix für 12 Proben zuzüglich 3 Kontrollen und 1 Pipettierverlust

PCR-Komponenten	Konzentration	Qiagen-Ansatz	Endkonzentration
H <sub>2</sub> O <sub>dest.</sub>		252,8 µl	
Puffer	10 x	40,0 µl	1 x
MgCl <sub>2</sub>	25 mM	24,0 µl	1,5 mM
dNTP Lösung	o.A.	16,0 µl	
Primer (r+f)	o.A.	40,0 µl	
Qiagen Taq Polymerase	5 U/µl	3,2 µl	1 U
Gesamt (16 Ansätze)		376 µl	
15 Ansätze je		23,5 µl	
Template	25 ng/µl	1,5 µl	75 ng
Endvolumen		25,0 µl	

Tab. 23 CIB-A-Kit-PCR-Programm für den Hauptversuch

Prozess	Zeit [min]	Temperatur [°C]	Zyklen
Start	5	95	1
Denaturierung	0,75	95	
Annealing	0,75	H / R 62, P 63, S 60	34
Elongation	1	72	
End	5	72	1
Hold	∞	4	1

H - Huhn, P - Pute, R - Rind, S - Schwein

Tab. 24 Spezies-spezifische Fragmentgrößen mit CIB-A-Kit

<b>Tierart</b>	<b>Fragmentgröße [bp]</b>
Huhn	416
Pute	550
Rind	431
Schwein	769

### 3.2.6 PCR und Hybridisierung mit CarnoCheck®-Testkit

#### Theorie

Aus der extrahierten DNS wird ein 389 bp großes Fragment des *Cytochrom b*-Gens aller in der Probe enthaltenen Tierarten mit Hilfe einer PCR amplifiziert. Dies wird durch die Verwendung eines universalen Primer-Paares möglich, das an zwei hoch konservierten Sequenzen ansetzt. In einer einzigen Reaktion kann so für alle Tierarten ein Fragment amplifiziert werden. Durch Koppeln eines Primers mit dem Fluoreszenzfarbstoff Cy5 werden die Amplifikate markiert. Die so gekennzeichneten Fragmente werden anschließend auf den CarnoCheck® DNS-Chip hybridisiert. Die markierten Amplifikationsprodukte hybridisieren an tierartsspezifische komplementäre DNS-Sonden, die an einer definierten Position auf dem Chip fixiert sind. Orientierungskontrollen auf dem Chip und im Hybridisierungspuffer zur Kontrolle der Hybridisierung enthaltene DNS sind mit dem Fluoreszenzfarbstoff Cy3 markiert.

Die Detektion der gebundenen, Cy5-markierten PCR-Produkte, sowie der Cy3-markierten Kontrollen erfolgt mittels eines Mikroarray-Scanners. Durch Messung der Extinktionen bei ~532 nm (Cy3) und ~635 nm (Cy5) und der entsprechenden Lokalisation auf dem Chip kann mit Hilfe der CheckReport™ Software das erhaltene Ergebnis über die enthaltenen Tierarten ausgewertet werden und die korrekte Durchführung der einzelnen Arbeitsschritte anhand der Kontrollen überprüft werden. Ein Träger bietet 12 DNS-Chips für 12 Proben Platz (GREINER BIO-ONE 2005).

## Chemikalien

Aqua bidest.

CarnoCheck® Testkit (Abb. 12) Mastermix

Hybridisierungs-Puffer

Puffer A-Konzentrat (Waschpuffer)

Puffer B-Konzentrat (Waschpuffer)

Druckluft 67

Hot Star Taq Polymerase



Abb. 12: CarnoCheck®-Testkit

## Durchführung

Im Premix-Raum wurden unter einem Flow entsprechend den Herstellerangaben je Probe zuzüglich n+1 Pipettierverlust 23,8 µl des Mastermixes mit 0,2 µl einer Hot-Start-Taq-Polymerase vermischt und anschließend in einem anderen Raum unter einer Arbeitshauben je 1 µl der extrahierten DNS-Lösungen dazu pipettiert. Nach einer 15minütigen Aktivierung der Polymerase bei + 95°C folgten 40 Zyklen von + 94°C für 30 sec, + 53°C für 30 sec, + 72°C für 30 sec und eine anschließende 5minütige Schlusselongation bei + 72°C in einem Thermocycler wie in Tabelle 25 angegeben. Je 13 µl der Amplifikate wurden sofort im Anschluss an die PCR mit je 24 µl Hybridisierungs-Puffer in einem 1,5 ml Eppendorf Tube gemischt und kurz im MiniSpin® zentrifugiert. 30 µl des Gemisches wurden dann auf je einen der 12 DNS-Chips des Objektträgers pipettiert. Dieser wurde zuvor 10 min in einer mit Wasserdampf gesättigten Atmosphäre an RT angepasst, dazu diente eine mit destilliertem Wasser gefüllte Pipettenbox, wobei der Träger auf der Halterung ohne direkte Wasserberührung platziert wurde. Die 20minütige Hybridisierung wurde ebenfalls in dieser als Hybridisierungskammer dienenden Box, mit geschlossenem Deckel bei RT durchgeführt. Im Anschluß an die Hybridisierung erfolgten die Waschschritte. Die Waschlösungen I und II wurden aus Aqua bidest., Puffer A und Puffer B in

50 ml Reaktionsgefäßen hergestellt (Tab. 26). Waschlösung II wurde vor Gebrauch auf + 50°C im Thermostat erwärmt, während Waschlösung I bei RT belassen wurde. Nach 20 sec in Waschlösung I wurden die Chips ebenfalls 20 sec in Waschlösung II gereinigt. Mittels Druckluft wurde die Feuchtigkeit entfernt und der Objektträger konnte gescannt werden. Der Scan wurde mit einem Personal 4100A Microarray Scanner und der GenePix Software durchgeführt. Der erhaltene Scan wurde zur Auswertung in die Check-Report™ Software importiert. Nach Eingabe der entsprechenden Probennummern für die einzelnen Chips in das Samplesheet und einer Justierungskontrolle der Auswertungs-schablone, wertete das Programm das Scan-Image automatisch aus.

Tab. 25 CarnoCheck®-PCR-Programm

Prozess	Zeit [min]	Temperatur [°C]	Zyklen
Start	15	95	1
Denaturierung	0,5	94	
Annealing	0,5	53	40
Elongation	0,5	72	
End	5	72	1

Tab. 26 Zusammensetzung der CarnoCheck®-Waschlösungen

	Waschlösung I	Waschlösung II
Aqua bidest.	40,0 ml	49,0 ml
Puffer A	4,0 ml	0,6 ml
Puffer B	0,5 ml	0,4 ml

### 3.2.7 Protein-Extraktion

#### Theorie

Die nach Kapitel 3.2.3 homogenisierte Probe wird in physiologischer Kochsalzlösung gelöst und zum Sieden gebracht. Nach Aufschluss der Probenstruktur und Sedimentation bei Abkühlung auf Raumtemperatur werden die zu untersuchenden gelösten Proteine als Filtrat gewonnen (N. N. 2002).

### Chemikalien

Aqua dest.

Natriumchlorid

### Durchführung

25 g der vorzerkleinerten Probe wurden in ein verschließbares 250 ml Schraubglas abgewogen. Nach Zugabe von 100 ml physiologischer Kochsalzlösung wurde mechanisch für eine gründliche Durchmischung gesorgt. Für 15 min wurde das Gemisch im siedenden Wasserbad erhitzt und anschließend auf Raumtemperatur abgekühlt. Nach Sedimentation der Probe wurde der Überstand mittels Papierfilter und Trichter in ein 100 ml Becherglas abfiltriert. Das Filtrat kam sofort zur Untersuchung.

Aus lieferungsbedingten Gründen wurde in den Vorversuchen der Faltenfilter 595½ verwendet und in den Hauptversuchen wurden die Rundfilter Nr. 604 (Restposten) bzw. Nr. 4 eingesetzt.

## **3.2.8 ELISA mit Transia-Testkit**

### Theorie

Die aus der Probe extrahierten spezifischen Proteine werden in den mit tierartsspezifischen Antikörpern beschichteten Kavitäten der Mikrotiterplatte gebunden. Nicht gebundene Anteile werden durch einen Waschschrift entfernt. Ein weiterer, biotinylierter, tierartsspezifischer Antikörper bindet im Anschluss an die fixierten Proteine. Durch ein Streptavidin-Peroxidase-Konjugat und die nachfolgende Zugabe von Chromogen-Lösung entsteht eine petrolfarbene Reaktionslösung. Eine anschließende Messung der Mikrotiterplatte bei 405 nm und der Vergleich mit mitgeführten Negativ-Kontrollen ermöglicht eine qualitative Aussage über die Tierartzugehörigkeit der Probe (TRANSIA 2003).

### Chemikalien

Aqua dest.

ELISA-Testkits (Abb. 13) tierartsspezifische Proteine (Positiv- bzw. Negativ-Kontrolle)

Anti-Spezies-Biotinylat

Avidin-Peroxidase-Konjugat

ABTS®-Konzentrat (25x)

Peroxid-Citrat-Puffer

Waschpuffer-Konzentrat (10x)

Stopp-Lösung (Natriumfluorid)



Abb. 13: ELISA-Testkit

### Durchführung

Vor Beginn der Durchführung wurde der Testkit auf Raumtemperatur gebracht. Je zwei Mikrotiter-Streifen für den Nachweis von Rind, Schwein und Geflügel wurden bereitgelegt. Jeweils in die erste Kavität des ersten Streifens einer Tierart wurden 100 µl der mitgelieferten tierartspezifischen Proteine als Positiv-Kontrollen einpipettiert. Als Negativ-Kontrollen dienten je 100 µl der beiden anderen tierartspezifischen Proteine, welche in Kavität B und C des ersten Streifens pipettiert wurden. Folglich dienten die rinder- und geflügelspezifischen Proteine als Negativ-Kontrollen für den Schweinenachweis, die schweine- und geflügelspezifischen Proteine wurden für den Rindernachweis als Negativ-Kontrolle genutzt und als Negativ-Kontrollen für den Geflügelnachweis wurden die rind- und schweinespezifischen Proteine eingesetzt. Da der Einzel-Testkit für den Nachweis von Rind als vorgesehene zweite Negativ-Kontrolle Schaf-Proteine enthält, die aber für höhere Hintergrundfärbungen bekannt ist, wurde hier Geflügel-Protein aus dem Einzel-Testkit für den Schweine-Nachweis als Negativ-Kontrolle verwendet.

In die noch freien Kavitäten wurden je 100 µl der extrahierten Proben gegeben. Während der Inkubation über 60 min bei RT auf einem Orbitalschüttler bei 750 rpm wurde die Waschlösung aus 900 ml destilliertem Wasser und 100 ml Waschpuffer-Konzentrat hergestellt. Diese war für mehrere Versuchsdurchläufe ausreichend und wurde daher zwi-

schenzeitlich bei + 4°C gelagert. Nach der Inkubation wurden die Extrakt- und Kontrollflüssigkeiten entfernt und die Mikroplattenstreifen in drei aufeinander folgenden Waschschrritten mit je 400 µl Waschlösung gewaschen. Nach jedem Waschschrritt wurden die Streifen ausgeklopft und zum Schluss trocken geklopft. Nun wurden in jede Kavität 25 µl der zum Streifen passenden Anti-Spezies-biotinylierten Antikörper gegeben und weitere 60 min bei RT und 750 rpm inkubiert. Auch an diesen Schritt schlossen sich drei Waschschrritte nach oben beschriebem Muster an. Anschließend wurden je 25 µl Konjugat einpipettiert und für 30 min bei RT mit 750 rpm gerüttelt. Derweil wurde das ABTS®-Konzentrat mit dem Peroxid-Citrat-Puffer im Verhältnis 1:25 vermischt und bis zur Verwendung im Dunklen gelagert. Der sich nun anschließende Waschschrritt wurde diesmal mit sechs Wiederholungen durchgeführt. Nachdem je 50 µl Chromogenlösung in jede Kavität pipettiert waren und 30 min unter einer Abdunkelung inkubiert hatten (RT, 750 rpm), wurden je 50 µl Stopp-Lösung einpipettiert. Sofort im Anschluss wurde die Absorption mittels Photometer bei 405 nm gemessen.

Für jede Tierart wurden aus den jeweiligen zwei Negativ-Kontrollen die Mittelwerte der gemessenen Absorptionen berechnet. Deren zweieinhalbfache Wert ergab den Cut-Off-Wert zur Beurteilung der Probenextinktionen. Lag die Absorption einer Probe oberhalb des Cut-Offs, wurde der Nachweis für die jeweilige Tierart als positiv bewertet, lag er darunter, als negativ. Aus haltbarkeits- und versuchsplanungstechnischen Gründen wurden für die ersten 18 Versuchsdurchläufe Einzelspezies-Testkits verwendet, während in den letzten beiden Versuchen der ELISA-Testkit für alle drei Spezies zum Einsatz kam.

## 3.3 Ergebnisse

### 3.3.1 Etablierung des CIB-A-Kit

Im Folgenden werden die Ergebnisse der einzelnen Punkte der Etablierung der PCR mit dem CIB-A-Kit näher erörtert.

#### 3.3.1.1 Polymerase

Zunächst wurde der CIB-A-Kit mit dem MasterMix 2,5x von Eppendorf getestet. Die verwendeten Volumina der einzelnen Komponenten waren an die Herstellerangaben angelehnt und finden sich im Methodenteil unter Kapitel 3.2.1.1. Trotz Ermittlung von Annealingtemperaturen für jede Tierart (s. Kapitel 3.3.1.2.) waren die Ergebnisse mit den Vorversuchsproben nicht zufriedenstellend. Mit der CIB-A-Kit-PCR für Rind ergaben sich vor allem mit Proben, die kein Rindfleisch enthielten, Schwierigkeiten in Hinblick auf Doppelbanden und andere unspezifische PCR-Produkte (Abb. 14). Bei den anderen drei CIB-A-Kit-Primern und dem Eppendorf MasterMix traten diese Probleme bei keiner Probe auf. Auf Anfrage bei Coring System Diagnostix wurde zum Wechsel der Polymerase geraten, nachdem verschiedene Verdünnungsstufen des Templates und verschiedene Annealingtemperaturen keinerlei Effekt auf die unspezifischen Produkte hatten.

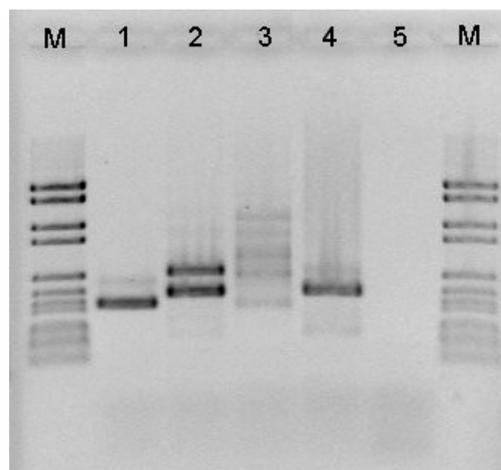


Abb. 14: Unspezifische Banden mit Rind-ST Primern und Eppendorf MasterMix

M – Marker (vgl. Abb. 21), 1 – Kontroll-DNS-Rind, 2 – Probe 50, 3 – Probe 58, 4 – Probe 55,  
5 – Negativ-Kontrolle (Aqua<sub>PCR</sub>)

Im Anschluss an den Eppendorf MasterMix wurde die Taq-Polymerase von Qiagen getestet. Nachdem in einigen Versuchen mit dem CIB-A-Kit für Rind ersichtlich wurde, dass keine unspezifischen Produkte mehr zu erwarten waren oder deren Auftreten sehr

stark reduziert wurde (Abb. 15), wurden auch hier die Annealingtemperaturen für die jeweiligen tierartspezifischen Primer ermittelt, die im folgenden Kapitel beschrieben sind. Auch wurde ein Vergleich durchgeführt bezüglich der Magnesiumchlorid-Konzentration. Da die Konzentration von 1,5 mM unspezifische Produkte in Form von Schlieren verursachte, wurde die höhere Konzentration von 1,875 mM für die weiteren Versuche gewählt (Abb. 16).

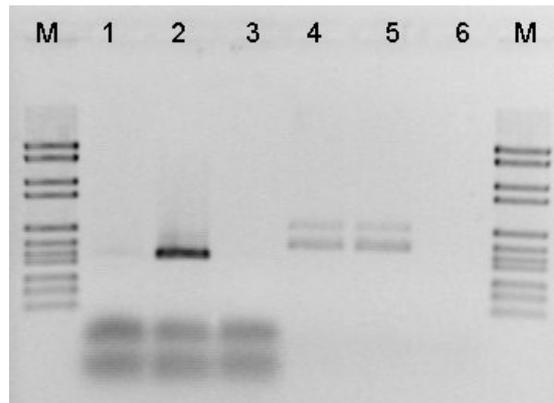


Abb. 15: Vergleich Qiagen(Q, 62°C)-Polymerase und Eppendorf (E, 60°C) MasterMix

M – Marker (vgl. Abb. 21), 1 – Probe 50 Q, 2 – Kontroll-DNS-Rind Q, 3 – Negativ-Kontrolle (Aqua<sub>PCR</sub>) Q, 4 – Probe 50 E, 5 – Probe 50 E, 6 – Negativ-Kontrolle (Aqua<sub>PCR</sub>) E

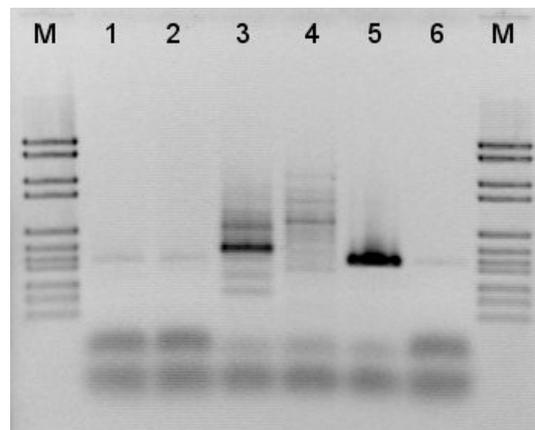


Abb. 16: Qiagen-Polymerase mit verschiedenen Magnesiumkonzentrationen

M – Marker (vgl. Abb. 21), 1 – Probe 50 MgCl<sub>2</sub>: 1,875 mM, 2 – Probe 58 MgCl<sub>2</sub>: 1,875 mM, 3 – Probe 50 MgCl<sub>2</sub>: 1,5 mM, 4 – Probe 58 MgCl<sub>2</sub>: 1,5 mM, 5 – Kontroll-DNS-Rind MgCl<sub>2</sub>: 1,5 mM, 6 – Negativ-Kontrolle (Aqua<sub>PCR</sub>) MgCl<sub>2</sub>: 1,875 mM

Als dritte Variante wurde die Taq-Polymerase von CIBUS getestet. Da diese bisher nicht kommerziell erhältlich ist, beschränkten sich die Versuche mit der Cibus-Taq-Polymerase auf die Ermittlung der Annealingtemperaturen (s. Kapitel 3.3.1.2.). Sie wurde

entsprechend dem Pipettierschema der Qiagen-Taq-Polymerase eingesetzt, wobei keinerlei Probleme auftraten.

### 3.3.1.2 Annealingtemperatur

Die Temperaturgradienten, um ideale Temperaturen für das Annealing der verschiedenen Primer in Zusammenhang mit den unterschiedlichen Polymerasen zu ermitteln, wurden durch grobe Schätzung des nötigen Temperaturbereiches und durch schrittweise Annäherung bestimmt. Die Abbildungen 17–20 zeigen einen Teil der durchgeführten Gradienten getrennt nach den einzelnen nachzuweisenden Tierarten. Die Stärke der Banden kann nur innerhalb eines Gels verglichen werden, da für die verschiedenen Gele teilweise andere Volumina der PCR-Produkte verwendet wurden und die Ethidiumbromidfärbelösung nur alle zwei Wochen erneuert wurde. Für die Ermittlung der Annealingtemperatur wurde eine Verdünnung von 1:100 der Kontroll-DNS eingesetzt, daher wurden schwächere Banden bei höheren Temperaturen teilweise ausser Acht gelassen.

Die Werte für die Rind-ST Primer lagen alle um die 60°C. Hier befand sich die Temperatur für den Eppendorf MasterMix mit 59,4°C nah an der Vorgabe von 60°C. Mit der Cibus-Taq-Polymerase wurden 63,3°C und mit der Qiagen-Taq-Polymerase 61,8°C als Annealingtemperaturen herausgefunden.

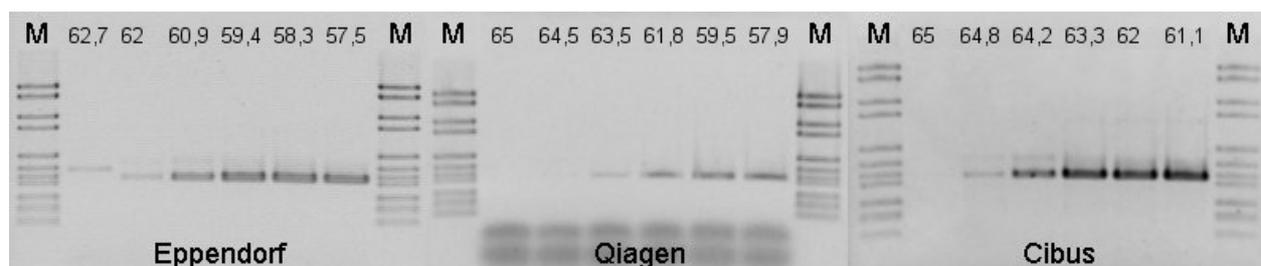


Abb. 17: Temperaturgradienten (°C) der Rind-ST Primer

M – Marker vgl. Abb. 21

Für die Primer Huhn-ST benötigte man mit der Qiagen-Taq-Polymerase eine Temperatur von 61,7°C während der Anlagerungsphase. Mit 58,5°C lag die Annealingtemperatur mit der Cibus-Taq-Polymerase um einiges tiefer, aber deutlich über dem von Coring vorgegebenen Wert von 51°C. An diese Temperatur kam man angenähert nur mit dem Eppendorf MasterMix mit 52,8°C.

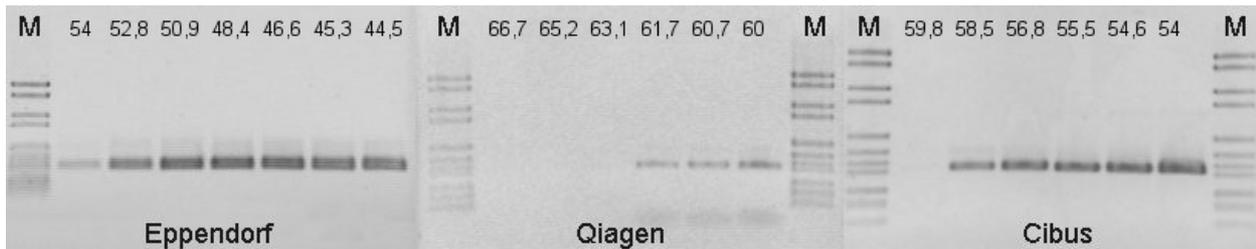


Abb. 18: Temperaturgradienten (°C) der Huhn-ST Primer

M – Marker vgl. Abb. 21

Auch mit den Primern Pute-ST lagen die gefundenen Temperaturen nicht bei den angegebenen 60°C. Für die Qiagen-Taq-Polymerase waren 63,1°C Annealingtemperatur nötig. Bei Verwendung der Cibus-Taq-Polymerase waren es noch 56,8°C und beim Eppendorf MasterMix wurde eine Temperatur von nur noch 56,1°C ermittelt.

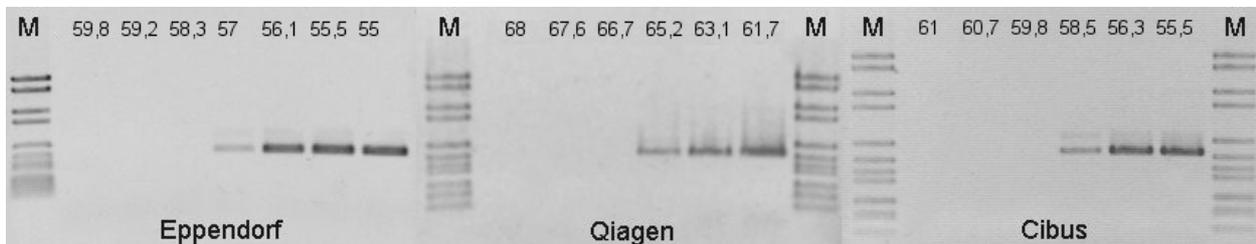


Abb. 19: Temperaturgradienten (°C) der Pute-ST Primer

M – Marker vgl. Abb. 21

An die Vorgabe von 56°C für die Anlagerungstemperatur mit den Primern Schwein-ST kam die Cibus-Taq-Polymerase mit 55,5°C am nächsten heran. Der Eppendorf MasterMix lag mit 50,9°C unter dem vorgegebenen Wert und die Qiagen-Taq-Polymerase erreichte mit 60,3°C eine höhere Temperatur.

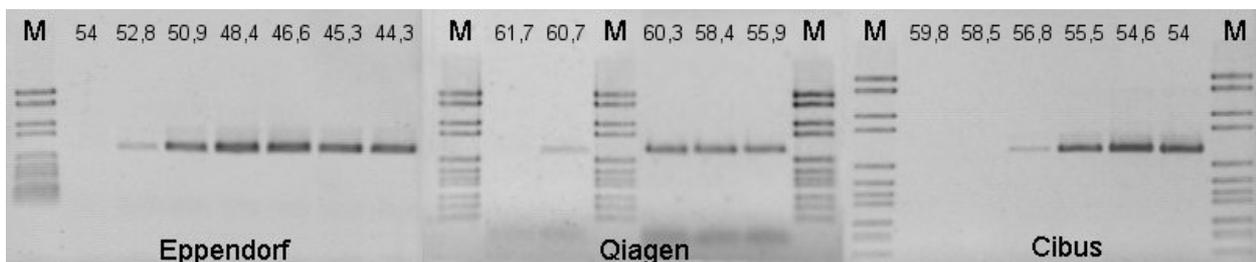


Abb. 20: Temperaturgradienten (°C) der Schwein-ST Primer

M – Marker vgl. Abb. 21

Tabelle 27 fasst die ermittelten Werte für die Annealingtemperaturen der einzelnen Primer und Polymerasen in gerundeter Form zusammen, um die Unterschiede zu den Vorgaben bzw. untereinander nochmal hervorzuheben. Die Rundung wurde nicht mathematisch vorgenommen, sondern orientierte sich an den Erfahrungen, die im Laufe der Versuche im Umgang mit den Primern gemacht wurden.

Tab. 27 Annealingtemperaturen mit verschiedenen Polymerasen

Primer für	CIB-A-Kit Vorgaben	Eppendorf MasterMix	Qiagen Taq Polymerase	Cibus Taq Polymerase
Rind	60,0°C	60,0°C	62,0°C	63,5°C
Huhn	51,0°C	52,5°C	62,0°C	58,5°C
Pute	60,0°C	56,0°C	63,0°C	57,0°C
Schwein	56,0°C	50,5°C	60,0°C	55,5°C

### 3.3.1.3 Gelkonzentration

Zur Erlangung einer optimalen Auftrennung der DNS im Agarosegel wurden verschiedene Agarose-Konzentrationen getestet. Entscheidend für die Auswahl der optimalen Konzentration war die Darstellung der Längenstandards und ihrer einzelnen Banden. Zunächst wurde mit einem 1% Gel begonnen. Wie in Abbildung 21 zu sehen, war die Auftrennung der Marker nur in den längeren DNS-Fragmentbereichen ausreichend, die kürzeren Fragmente waren dagegen nicht zu differenzieren. Eine deutlich verbesserte Trennung der einzelnen Längenmarker ergab sich mit der in der Anleitung des CIB-A-Kits empfohlenen Konzentration von 1,5%. Doch auch hier war die Auftrennung im unteren Bereich noch nicht optimal, da besonders die Längenfragmente mit 394 bp und 453 bp zur Differenzierung des 416 bp langen Huhn-Fragments und des 431 bp langen Rind-Fragments von Interesse sind. Nach Rücksprache mit der Vertriebsfirma über Coring System Diagnostix wurde daher ein 2% Agarosegel zur Durchführung der Elektrophorese gewählt, um einen noch deutlicheren Abstand zwischen den 394 bp und 453 bp Fragmenten zu bekommen.

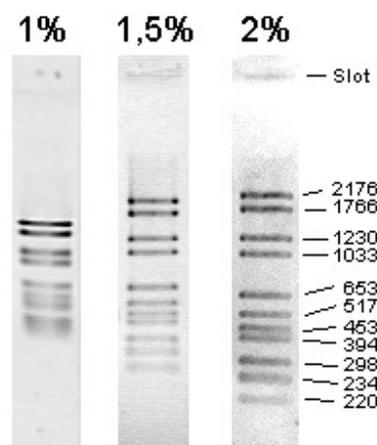


Abb. 21: Längenstandard in Abhängigkeit der Agarosekonzentration [bp]

### 3.3.2 Untersuchung der Vorversuchsproben

Zufällig ausgewählte Proben aus dem Handel wurden untersucht, um den Umgang mit dem Transia-ELISA-Testkit und dem CarnoCheck®-Testkit zu erlernen und den CIB-A-Kit zu etablieren. Desweiteren konnte durch die Durchführung der Vorversuche der zeitliche Ablauf des Hauptversuches festgelegt werden, mit dem Ziel die einzelnen Proben möglichst zeitnah mit den verschiedenen Methoden zu untersuchen.

Durch die bereits erwähnten Schwierigkeiten in Hinblick auf den **CIB-A-Kit** gestaltete sich der Testablauf kompliziert. Da mit dem Eppendorf MasterMix zu viele unspezifische Produkte bei einigen Proben auftraten, wurden die übrigen Vorversuchsproben sowie die Modellwürste des Hauptversuchs mit der Qiagen-Taq-Polymerase untersucht. Damit je zwei CIB-A-Kit-Tierarten-PCRs parallel zueinander bzw. zum CarnoCheck® durchgeführt werden konnten, wurde von den ermittelten Annealingtemperaturen in den Vorversuchen mit dem Eppendorf MasterMix geringfügig abgewichen. Die Ansätze für Huhn und Schwein liefen zusammen bei einer Annealingtemperatur von 50°C ab, während die Ansätze für Pute mit 55,5°C Annealingtemperatur und Rind mit 60°C Annealingtemperatur auf verschiedene Thermocycler-Blöcke verteilt wurden. Mit der Qiagen-Taq-Polymerase entsprachen die Temperaturen denen aus Tabelle 27.

Neben den erwähnten unspezifischen Banden mit den Primern Rind-ST, war bei einigen Proben der Tierartennachweis für nicht deklarierte Spezies positiv. Probe 21 wurde für die deklarierte Tierart Schwein und zusätzlich für Rind positiv getestet. Bei Probe 02 zeigte sich neben dem zu erwartenden Nachweis von Schwein und Rind, auch eine positive Bande für Puten-DNS. Ferner wurde für Probe 50 in Ergänzung zum deklarierten Schweine-Nachweis ein positives Resultat für Huhn erhalten. In der erwartungsgemäß für Huhn und Pute positiven Probe 58 fand sich zudem noch Schwein (Tab. 28).

Tab. 28 Vorversuchsergebnisse des CIB-A-Kit

Verkehrsbezeichnung, enthaltene Tierarten laut Zutatenliste	Nr.	Polymerase	Huhn	Pute	Rind	Schwein
Schinkenwurst, Rind, Schwein	02	MasterMix (E)		+	+	+
Mortadella, Schwein	21	Taq (Q)			+	+
Truthahn Salami, Pute, Schwein	29	MasterMix (E)		+		+
Geflügel-Leberwurst, Pute, Schwein	42	Taq (Q)		+		+
Leberwurst fein, Schwein	43	Taq (Q)				+
Zungenwurst, Schwein	44	Taq (Q)				+
Mettwurst fein, Schwein	50	MasterMix (E)	+		//	+
Teewurst fein, Schwein	51	Taq (Q)				+
Leberwurst grob, Schwein	55	Taq (Q)				+
Geflügel-Lyoner, Huhn, Pute	58	MasterMix (E)	+	+	//	+

■ - „falsch positiv“, // - unspezifische Banden, E – Eppendorf, Q - Qiagen

Der **CarnoCheck®** verursachte keine größeren Schwierigkeiten in der Erlernung der Durchführung. Anhand der Herstellerinstruktionen konnte der Testablauf leicht nachvollzogen werden. Alle Ansätze, einschließlich die des Hauptversuchs wurden mit der Qiagen-Hot-Star-Taq-Polymerase durchgeführt. Die Mehrzahl der Proben entsprach der Etikettierung, wie Tabelle 29 zu entnehmen ist. Probe 58 ergab zusätzlich zu den erwarteten Tierarten Huhn und Pute einen positiven Befund für die Spezies Schwein. Bei Probe 21 wurde auch hier entgegen der Zutatenliste neben der Tierart Schwein eine positive Bande für Rind gefunden.

Tab. 29 Vorversuchsergebnisse des CarnoCheck®

Verkehrsbezeichnung, enthaltene Tierarten laut Zutatenliste	Nr.	Polymerase	Huhn	Pute	Rind	Schwein
Schinkenwurst, Rind, Schwein	02	Hot Star Taq (Q)			+	+
Mortadella, Schwein	21	Hot Star Taq (Q)			+	+
Truthahn Salami, Pute, Schwein	29	Hot Star Taq (Q)		+		+
Geflügel-Leberwurst, Pute, Schwein	42	Hot Star Taq (Q)		+		+
Leberwurst fein, Schwein	43	Hot Star Taq (Q)				+
Zungenwurst, Schwein	44	Hot Star Taq (Q)				+
Mettwurst fein, Schwein	50	Hot Star Taq (Q)				+
Teewurst fein, Schwein	51	Hot Star Taq (Q)				+
Leberwurst grob, Schwein	55	Hot Star Taq (Q)				+
Geflügel-Lyoner, Huhn, Pute	58	Hot Star Taq (Q)	+	+		+

■ - „falsch positiv“, Q - Qiagen

Die Durchführung des **ELISA** führte ebenfalls zu keinerlei Problemen und unterschied sich nur durch die Verwendung der Papierfilter 595½ von der Methode im Hauptversuch. Die erhaltenen Ergebnisse für die 10 Proben sind in Tabelle 30 wiedergegeben. Bis auf zwei Proben stimmten die laut Zutatenverzeichnis enthaltenen Tierarten mit den Testergebnissen überein. Bei Probe 44 war der ELISA für Schwein und für nicht deklariertes Geflügel positiv. Probe 21 war, neben der Spezies Schwein, sowohl für Geflügel, als auch für Rind zusätzlich positiv.

Tab. 30 Vorversuchsergebnisse des ELISA

Verkehrsbezeichnung, enthaltene Tierarten laut Zutatenliste	Nr.	Geflügel	Rind	Schwein
Schinkenwurst, Rind, Schwein	02		+	+
Mortadella, Schwein	21	+	+	+
Truthahn Salami, Pute, Schwein	29	+		+
Geflügel-Leberwurst, Pute, Schwein	42	+		+
Leberwurst fein, Schwein	43			+
Zungenwurst, Schwein	44	+		+
Mettwurst fein, Schwein	50			+
Teewurst fein, Schwein	51			+
Leberwurst grob, Schwein	55			+
Geflügel-Lyoner, Huhn, Pute	58	+		

■ - „falsch positiv“

### 3.3.3 Untersuchung der Modellwürste im Hauptversuch

Die 240 zur Untersuchung anstehenden Modell-Brühwürste wurden in 20 Versuchsgruppen bzw. Versuchsläufe mit je einer Wurst pro Modell eingeteilt. Die nun aus 12 Brühwürsten bestehenden Gruppen wurden jeweils in zwei aufeinander folgenden Tagen auf die vier Tierarten Huhn, Pute, Rind und Schwein untersucht.

An Tag 1 (Tab. 31) fand die Homogenisierung mit anschließender Protein- und Nukleinsäure-Extraktion statt. Zusätzlich wurde der ELISA durchgeführt. An Tag 2 folgten, wie in Tabelle 32 zu sehen, die Durchführung des CarnoCheck® und des CIB-A-Kit. Da nur ein Thermocycler, mit 2 separaten Blöcken, zur Verfügung stand und die Proben möglichst zeitnah zueinander untersucht werden sollten, wurde wie folgt vorgegangen.

Zuerst wurde der Premix-Ansatz für die CarnoCheck®-PCR vorbereitet und die PCR im linken Cyclerblock gestartet. Eine halbe Stunde später wurden die Ansätze für Huhn und

Rind mit dem CIB-A-Kit vorbereitet und zusammen im rechten Block gestartet. Nach Beendigung der CarnoCheck®-PCR wurden die DNS-Chips hybridisiert, währenddessen wurden die ersten beiden Agarose-Gele gegossen. Im Anschluss wurde der CarnoCheck® gescannt und nach Ablauf der ersten CIB-A-Kit-PCR für Huhn und Rind wurde die zweite CIB-A-Kit-PCR diesmal für Schwein und Pute vorbereitet und in je einem Block gestartet. Nun folgte der Gellauf für Rind und Huhn, die Färbung mit Ethidiumbromid und die Aufnahme unter UV-Licht. Anschließend wurden die nächsten beiden Gele gegossen und, nachdem die PCR für den Puten- und Schweinenachweis beendet war, die PCR-Produkte in das Gel einpipettiert und wie oben weiter verfahren. Die Auswertung der Methoden erfolgte jeweils im Laufe des Durchführungstages.

Tab. 31 Versuchsablauf an Tag 1

ELISA	DNS-Extraktion
	Homogenisierung, Abwiegen
Proben in Wasserbad (15 min)	Proteinase K-Verdau ansetzen
Abkühlen auf RT	Verdau 2-3 h
Filtrieren	
Kontrollen und Proben in Kavitäten pipettieren	
Inkubationsphase	Inaktivierung (10 min) der Proteinase K starten
Inkubationsphase	restliche Extraktion und Lagerung bei -20°C
ELISA beenden und auswerten	

Tab. 32 Versuchsablauf an Tag 2

<b>CarnoCheck®</b>	<b>CIB-A-Kit H/R</b>	<b>CIB-A-Kit S/P</b>
Premix 20 min PCR ca. 140 min	Premix H/R 30 min PCR H/R ca. 145 min	
Chip auf RT Waschlösungen herstellen PCR Ende		
Hybridisierung 20 min Waschschritte Scan starten	2 Gele gießen	Premix S/P 30 min PCR S/P ca. 145 min
<u>Auswertung</u>	PCR Ende Gel pipettieren Gellauf 40 min Färben 15 min Wasserbad 1 min Foto in UV-Kammer	2 Gele gießen PCR Ende Gel pipettieren Gellauf 40 min Färben 15 min Wasserbad 1 min Foto in UV-Kammer <u>Auswertung</u>

H - Huhn, P - Pute, R - Rind, S – Schwein, RT - Raumtemperatur

Die Ergebnisse der Versuchsläufe wurden in den Tabellen 48 bis 51 (s. Anhang) in binominaler Form eingetragen. Jeder Test wurde demnach nur als „Tierart nachgewiesen“ oder „Tierart nicht nachgewiesen“ beurteilt, dabei stand die 1 für nachgewiesen und die 0 für nicht nachgewiesen. Bei der CIB-A-Kit-PCR galt eine deutliche Bande als nachgewiesen und das Fehlen einer entsprechenden Bande oder nur ein Schatten galt als nicht nachgewiesen. Für den CarnoCheck® wurden die Ergebnisse übernommen, die der CheckReport™ ausgab, somit wurde ein Positiv für eine bestimmte Tierart als „Tierart nachgewiesen“ und ein Negativ als „Tierart nicht nachgewiesen“ gewertet. Entsprechend zählten beim ELISA alle Werte über dem jeweiligen Cut-Off als „Tierart nachgewiesen“ und alle Werte unter dem Cut-Off als „Tierart nicht nachgewiesen“. Da die Haupttierart der Modellwurstzusammensetzung von jeder Methode korrekt identifiziert wurde, werden im Folgenden nur die besonderen Ergebnisse bezüglich der Nebentierarten aufgeführt.

### 3.3.3.1 Allgemeine Betrachtung der Ergebnisse

Tabelle 33 zeigt, dass mit der **CIB-A-Kit**-Methode in allen 20 Versuchsgruppen in jedem Wurstmmodell die jeweilige Nebentierart stets korrekt identifiziert wurde (Abb. 22). Zudem traten aber auch falsch positive Resultate auf, vornehmlich mit den Pute-ST Primern. In dem Modell „0,1% Rind-in-Schwein“ wurde dreimal Pute nachgewiesen. Die Modelle „0,5% -“ und „1% Rind-in-Schwein“ erbrachten ebenfalls je einmal einen positiven Befund für Pute. Teilweise wurden Schattenbanden mit den Rind-ST Primern bei den Modellen, die kein Rind enthielten, beobachtet. Desweiteren zeigten sich für die Modelle „0,5% -“ und „1,0% Pute-in-Schwein“ hin und wieder äusserst schwache Banden in Verbindung mit den Huhn-ST Primern. Die Negativ-Extraktions-Kontrollen waren meist negativ. Ausnahmen stellten die Versuchsgruppe 1, die im Huhn-Nachweis positiv war, und die Versuchsgruppe 12, die im Huhn- und Pute-Nachweis positiv war, dar. Dagegen war die PCR-Negativ-Kontrolle (Aqua<sub>PCR</sub>) durchgehend negativ.

Tab. 33 Ergebnisse des CIB-A-Kit für den Nachweis der Nebentierarten

Konz.	Modell RS		Modell HS		Modell PS		Modell SHP		Probenzahl
	richtig +	falsch +	richtig +	falsch +	richtig +	falsch +	richtig +	falsch +	
0,1%	20	3 P	20	0	20	0	20	0	20
0,5%	20	1 P	20	0	20	2 H	20	0	20
1,0%	20	1 P	20	0	20	2 H	20	0	20

RS – Rind in Schwein, HS – Huhn in Schwein, PS – Pute in Schwein, SHP – Schwein in Huhn/Pute, P - Pute nachgewiesen, H - Huhn nachgewiesen, Konz. - Konzentration

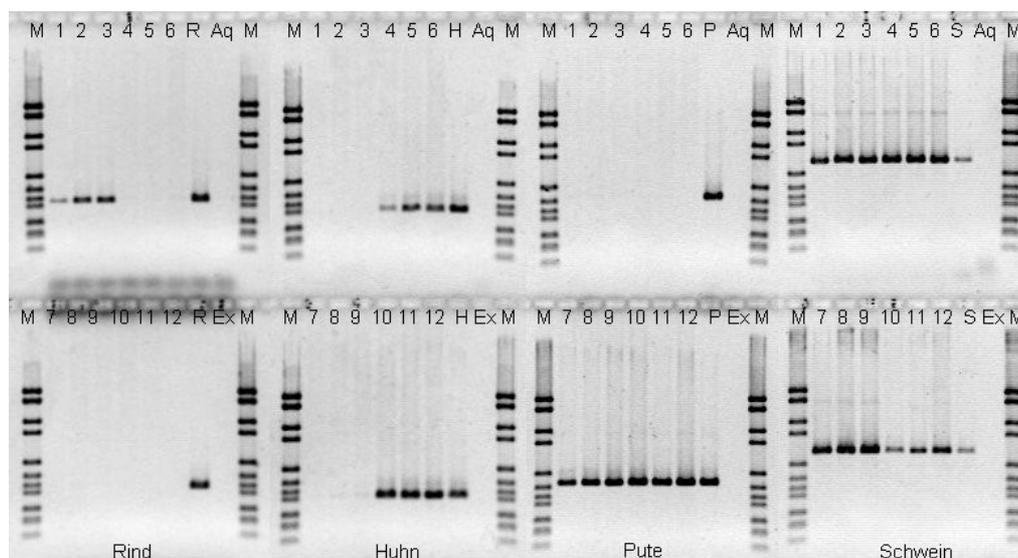


Abb. 22: Agarose-Gele aus Versuchslauf 10

Aq – PCR-Kontrolle (Aqua<sub>PCR</sub>), Ex – Extraktionskontrolle, M – Marker (vgl. Abb. 21), Positiv-Kontrollen: H – Huhn, P – Pute, R – Rind, S – Schwein, 1 – 0,1RS, 2 – 0,5RS, 3 – 1RS, 4 – 0,1HS, 5 – 0,5HS, 6 – 1HS, 7 – 0,1PS, 8 – 0,5PS, 9 – 1PS, 10 – 0,1SHP, 11 – 0,5SHP, 12 – 1SHP

Bei den Modellwürsten, die als Nebentierart Huhn enthielten, wurden alle Proben durch den **CarnoCheck®** korrekt identifiziert (Abb. 23). Bei den Modellmischungen „0,1% Pute-in-Schwein“ und „0,1% Schwein-in-Huhn/Pute“ wurde je einmal in den 20 Versuchsdurchläufen die Nebentierart nicht identifiziert. Die Nebentierart der Modelle „0,1% Rind-in-Schwein“ wurde bei 5 aus 20 Versuchen nicht gefunden. Die 0,5%ige Nebentierart Schwein wurde zweimal nicht erkannt, während die anderen 0,5%-Modelle immer korrekte Nachweise lieferten (Tab. 34). Bei sämtlichen 1,0%-Modellwürsten gab es keine falsch negativen Befunde. In Versuchsgruppe 19 zeigte der CheckReport™ im 0,5% Rind-in-Schwein“ Modell die Tierart Ziege positiv an. Dies war jedoch der einzige falsch positive Nachweis einer Tierart in 240 Proben. Sämtliche interne Kontrollen (PCR-, Hybridisierungs-, Print-Kontrolle) waren stets positiv, wodurch die einzelnen Chips mit der Report-Software ausgewertet werden konnten.

Tab. 34 Ergebnisse des CarnoCheck® für den Nachweis der Nebentierarten

Konz.	Modell RS		Modell HS		Modell PS		Modell SHP		Proben zahl
	richtig +	falsch +	richtig +	falsch +	richtig +	falsch +	richtig +	falsch +	
0,1%	15	0	20	0	19	0	19	0	20
0,5%	20	1 Z	20	0	20	0	18	0	20
1,0%	20	0	20	0	20	0	20	0	20

RS – Rind in Schwein, HS – Huhn in Schwein, PS – Pute in Schwein, SHP – Schwein in Huhn/Pute, Konz. - Konzentration, Z – Ziege nachgewiesen

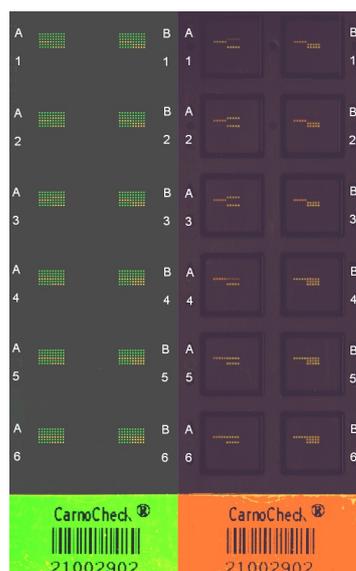


Abb. 23: Scan-Images des CarnoCheck® aus Versuchslauf 15

links – 532+635 nm, rechts – 635 nm,

A1 – 0,1RS, A2 – 0,5RS, A3 – 1RS, A4 – 0,1HS, A5 – 0,5HS, A6 – 1HS,  
B1 – 0,1PS, B2 – 0,5PS, B3 – 1PS, B4 – 0,1SHP, B5 – 0,5SHP, B6 – 1SHP

Der **ELISA** wies alle Tierarten der 0,5%igen und 1,0%igen Modelle korrekt nach, was in Tabelle 35 ersichtlich ist. Dabei traten je einmal ein falsch positiver Nachweis von Geflügel bei den Modellen „0,5% -“ und „1,0% Rind-in-Schwein“ aus Versuchsgruppe 8 auf. Von den 0,1%igen Modellwürsten wurden jeweils zwei aus 20 Versuchsläufen der Modelle „Huhn-in-Schwein“ und „Schwein-in-Huhn/Pute“ vollständig identifiziert. Bei den Modellen „0,1% Rind-in-Schwein“ wurde dreimal die Nebentierart Rind korrekt nachgewiesen. Von den „0,1% Pute-in-Schwein“ Modellen lieferten 11 Proben von 20 richtig positive Befunde. Die Positiv-Kontrollen waren stets deutlich positiv (Abb. 24). Die jeweiligen zwei Negativ-Kontrollen lagen in ihrem Extinktionwert meist nah beieinander. Eine Ausnahme stellte Versuchslauf 4 dar, bei dem die Negativ-Kontrolle Rind für den Geflügel-Nachweis visuell positiv war, so dass hier dieser nicht in die Berechnung des Cut-Off-Wertes miteinbezogen wurde.

Tab. 35 Ergebnisse des ELISA für den Nachweis der Nebentierarten

Konz.	Modell RS		Modell HS		Modell PS		Modell SHP		Probenzahl
	richtig +	falsch +	richtig +	falsch +	richtig +	falsch +	richtig +	falsch +	
0,1%	3	0	2	0	11	0	2	0	20
0,5%	20	1 G	20	0	20	0	20	0	20
1,0%	20	1 G	20	0	20	0	20	0	20

RS – Rind in Schwein, HS – Huhn in Schwein, PS – Pute in Schwein, SHP – Schwein in Huhn/Pute, Konz. - Konzentration, G – Geflügel nachgewiesen

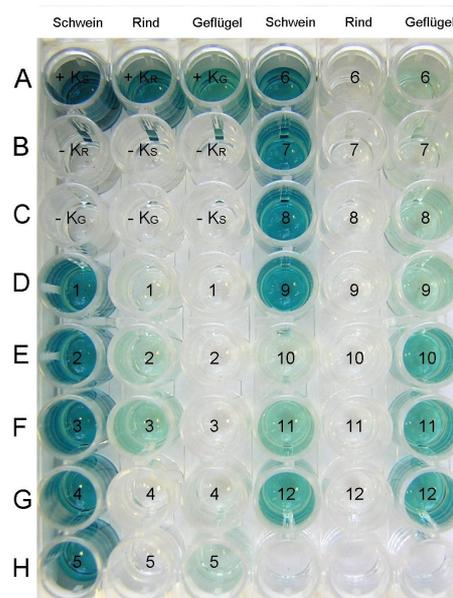


Abb. 24: Mikrotiterplatte aus Versuchslauf 2

A-H – Reihen der Mikrotiterplatte, +K – Positiv-Kontrolle, -K – Negativ-Kontrolle, H – Huhn, P – Pute, R – Rind, S – Schwein, 1 – 0,1RS, 2 – 0,5RS, 3 – 1RS, 4 – 0,1HS, 5 – 0,5HS, 6 – 1HS, 7 – 0,1PS, 8 – 0,5PS, 9 – 1PS, 10 – 0,1SHP, 11 – 0,5SHP, 12 – 1SHP

### 3.3.3.2 Statistische Betrachtung der Ergebnisse

Betrachtet man die Anzahl an richtig positiven Ergebnissen und bildet den Quotienten mit der Anzahl der insgesamt untersuchten positiven Proben, erhält man die **Sensitivität** einer Analyse. Tabelle 36 zeigt die berechneten Nachweishäufigkeiten der einzelnen Testkits. Hierbei fiel auf, dass Unterschiede der drei untersuchten Methoden in ihren Sensitivitäten fast ausnahmslos beim Nachweis der Nebentierart in Konzentrationen von 0,1% auftraten. In Hinblick auf die verwendeten Konzentrationen der Nebentierarten in den Modellwürsten, kann die Nachweisgrenze des CIB-A-Kit für den Nachweis aller getesteten Tierarten mit mindestens 0,1% angegeben werden. Die Sensitivitäten des CarnoCheck® lagen für den Nachweis der Nebentierarten Huhn, Pute und Schwein im Bereich von 95% bis 100%, so dass hier die Nachweisgrenze ebenfalls bei 0,1% veranschlagt werden kann. Beim Nachweis der Tierart Rind (75%) mit dem CarnoCheck® ist eventuell eine Nachweisgrenze im Bereich von 0,1% bis 0,5% realistischer. Dem ELISA kann für den Nachweis aller getesteten Tierarten in Zusammenhang mit im Versuch eingesetzten Konzentrationen eine Nachweisgrenze von mindestens 0,5% zugesprochen werden, da die Sensitivitäten im Bereich von 10% - 55% für die 0,1%igen Modelle lagen und stets bei 100% für die 0,5%igen Modellen betrogen.

Tab. 36 Sensitivität [%] der einzelnen Testkits

Methode	Nachweis von	Konzentration		
		0,1%	0,5%	1,0%
CIB-A-Kit	Rind	100	100	100
CarnoCheck®	Rind	75	100	100
ELISA	Rind	15	100	100
CIB-A-Kit	Huhn	100	100	100
CarnoCheck®	Huhn	100	100	100
ELISA	Huhn	10	100	100
CIB-A-Kit	Pute	100	100	100
CarnoCheck®	Pute	95	100	100
ELISA	Pute	55	100	100
CIB-A-Kit	Schwein	100	100	100
CarnoCheck®	Schwein	95	90	100
ELISA	Schwein	10	100	100

Für die **Spezifität** wird die Anzahl der richtig negativen Ergebnisse durch die Anzahl der insgesamt untersuchten negativen Proben dividiert. Für die durchgeführten Untersuchungen sind die Ergebnisse aus Tabelle 37 ersichtlich. Die Spezifität des CIB-A-Kit-Nachweises für die Tierart Rind ist 100%, für die Tierarten Huhn und Pute nimmt diese auf 97 bzw. 96% ab. Die Spezifität des CarnoCheck® für den Nachweis von Rind, Huhn und Pute beträgt 100%. Für den ELISA ist die Spezifität beim Nachweis der Tierart Rind 100%. Die Spezifitäten für die Tierarten Huhn und Pute liegen mit den ELISA-Nachweis bei 56 bzw. 63% bezogen auf die einzelnen Tierarten. Betrachtet man dagegen den Nachweis für Huhn und Pute zusammen als Geflügel-Nachweis, sowie der Testkit dies angibt, erhält man eine Spezifität von 97%. Für Schwein konnte keine Spezifität festgelegt werden, da alle Modellwürste Schwein enthielten.

Tab. 37 Spezifität der einzelnen Testkits

Method	Nachweis von	Spezifität [%]
CIB-A-Kit	Rind	100
CarnoCheck®	Rind	100
ELISA	Rind	100
CIB-A-Kit	Huhn	97
CarnoCheck®	Huhn	100
ELISA	„Huhn“	56
CIB-A-Kit	Pute	96
CarnoCheck®	Pute	100
ELISA	„Pute“	63
ELISA	Geflügel	97
CIB-A-Kit	Schwein	n.d.
CarnoCheck®	Schwein	n.d.
ELISA	Schwein	n.d.

„ - berechnet für den Nachweis von Hu bzw. Pu, n.d. - nicht durchgeführt

Die statistische Analyse der Ergebnisse wurde mit der SPSS® 15.0 Windows Evaluation Version Software und mit Unterstützung des statistischen Beratungslabors des Instituts für Statistik der Ludwig-Maximilians-Universität München durchgeführt. Als Grundlage für die Berechnungen wurden die in Tabellen 48-51 (s. Anhang) aufgeführten Ergebnisse in einer Datentabelle zusammengefasst. Für die Beurteilung der mit SPSS erhaltenen Daten wurde ein Signifikanzniveau von  $p = 0,05$  gewählt, sodass die Wahrscheinlichkeit

für das Zutreffen der getesteten Fragestellung bei 95% liegt. Um die Sensitivitäten und Spezifitäten der unterschiedlichen Methoden für verschiedene Tierarten miteinander zu vergleichen, wurde zunächst der Q-Test von Cochran durchgeführt. Dieser ermöglicht eine Aussage darüber, ob statistisch ein Unterschied zwischen den Methoden besteht. Um im signifikanten Fall eines Unterschiedes (Asymptotische Signifikanz  $< 0,05$ ) zu ermitteln, welche Methoden sich voneinander unterscheiden, wurde für die Verfahren paarweise der McNemar-Test angewendet. Um einen Fehler Typ I möglichst auszuschließen, also einen Unterschied zu finden, der nur per Zufall in dieser Stichprobe vorhanden ist, wurde die zweiseitige exakte Signifikanz für die Bewertung der einzelnen Methoden betrachtet.

Die genauen Analysedaten für den **Vergleich der Sensitivitäten auf Signifikanz** sind im Anhang unter Kapitel 8.3 zu finden, ferner gibt Tabelle 38 einen Überblick der Ergebnisse. Die Sensitivitäten wurden für jede Konzentration der nachzuweisenden Tierart gesondert verglichen. Im Folgenden sind die Ergebnisse der Vergleiche für die 0,1%igen Modelle zusammengefasst dargestellt. Für die 0,5%- und 1,0%-Konzentrationen der Nebentierart konnten keine Unterschiede bzw. keine signifikanten Unterschiede nachgewiesen werden.

Tab. 38 Vergleich der Sensitivitäten der Testkits auf Signifikanz (McNemar-Test)

Nebentierart	Konzentration	CIB-A-Kit / CarnoCheck®	CIB-A-Kit / ELISA	CarnoCheck® / ELISA
Rind	0,1%	p = 0,063	p < 0,001	p < 0,001
	0,5%	/	/	/
	1,0%	/	/	/
Huhn	0,1%	/	p < 0,001	p < 0,001
	0,5%	/	/	/
	1,0%	/	/	/
Pute	0,1%	p = 1,000	p = 0,004	p = 0,008
	0,5%	/	/	/
	1,0%	/	/	/
Schwein	0,1%	p = 1,000	p < 0,001	p < 0,001
	0,5%	p = 0,135*	p = 0,135*	p = 0,135*
	1,0%	/	/	/

Signifikanzniveau = 0,05 , \* - Cochran-Testergebnis, / - kein Unterschied feststellbar,  - signifikante Unterschiede

Für den Vergleich der Methoden bezüglich des Nachweises der Nebentierart Rind ergaben sich signifikante Unterschiede zwischen dem ELISA und den anderen beiden Methoden ( $p < 0,001$ ). Der CIB-A-Kit und der CarnoCheck® zeigten keinen signifikanten Unterschied ( $p = 0,063$ ) untereinander.

Auch der Nachweis der Nebentierart Huhn wies für den ELISA signifikante Unterschiede im Vergleich zum CIB-A-Kit ( $p < 0,001$ ) und zum CarnoCheck® ( $p < 0,001$ ) auf. Dagegen konnte zwischen den beiden letzteren Methoden kein Unterschied nachgewiesen werden.

Im Vergleich der Methoden für die Nebentierart Pute ergaben sich ähnliche Verhältnisse wie beim Nachweis der Nebentierart Rind. Zwischen ELISA und CIB-A-Kit ( $p = 0,004$ ), sowie zwischen ELISA und CarnoCheck® ( $p = 0,008$ ) wurden signifikante Unterschiede festgestellt, jedoch war kein signifikanter Unterschied zwischen CIB-A-Kit und CarnoCheck® ( $p = 1,000$ ) nachweisbar.

Die Vergleiche der Methoden für den Nachweis der Nebentierart Schwein waren wiederum ähnlich denen für Pute und Rind. Mit  $p < 0,001$  waren die Unterschiede zwischen ELISA und CIB-A-Kit, sowie zwischen ELISA und CarnoCheck® signifikant. Für den Vergleich von CIB-A-Kit und CarnoCheck® ergab sich wieder ein nicht signifikanter Wert von  $p = 1,000$ . In Zusammenhang mit der Anzahl an richtig positiven Nachweisen der einzelnen Methoden (vgl. Tab. 33-35) können der CIB-A-Kit und der CarnoCheck® als sensibler, im Vergleich zu dem ELISA bezeichnet werden.

Für den **Vergleich der Spezifitäten auf Signifikanz** sind die Ergebnistabellen ebenfalls unter Kapitel 8.3 im Anhang zu finden. Die Spezifitäten der Methoden für eine Tierart wurden getrennt nach den nicht enthaltenen Tierarten verglichen. Einen Überblick der Auswertung gibt Tabelle 39.

Für den Nachweis der Tierart Rind mittels CIB-A-Kit, CarnoCheck® und ELISA wurden daher die Ergebnisse für die Modellwürste, die Huhn, Pute bzw. Schwein als Nebentierart enthielten, einzeln betrachtet. Da keine falsch positiven Nachweise erhalten wurden, konnten für die Spezifität der drei Methoden keine Unterschiede festgestellt werden.

Beim Nachweis von Huhn wurden analog die Resultate für die Modellwürste mit der Nebentierart Rind und Pute betrachtet. Das Modell mit der Nebentierart Schwein enthielt als eine Hauptzutat Huhn und konnte deshalb nicht für den Vergleich der Spezifität herange-

zogen werden. Die Modelle mit Rind als Nebentierart zeigten keinen signifikanten Unterschied ( $p=0,135$ ) in der Spezifität der Methoden. Dagegen traten bei der Nebentierart Pute signifikante Unterschiede in der Spezifität des ELISA-Huhnnachweises mit den anderen Methoden ( $p<0,001$ ) auf. Zwischen CIB-A-Kit und CarnoCheck® war hier kein signifikanter Unterschied in der Spezifität feststellbar ( $p=0,125$ ).

Im Vergleich der Spezifität für den Nachweis von Pute zeigte die Nebentierart Rind keine signifikanten Unterschiede ( $p=0,066$ ) zwischen den verschiedenen Methoden. Bei der Nebentierart Huhn waren erneut signifikante Unterschiede zwischen dem ELISA und den anderen Methoden ( $p<0,001$ ) feststellbar. Zwischen CIB-A-Kit und CarnoCheck® konnte kein Unterschied nachgewiesen werden. Betrachtete man dagegen die Spezifität für den Nachweis von Geflügel, konnte kein signifikanter Unterschied zwischen allen drei Methoden festgestellt werden ( $p=0,066$ ).

In Anbetracht der jeweiligen Spezifitäten können die Verfahren für Rind, Huhn und Pute als spezifisch für die jeweilige Tierart angesehen werden. Eine Ausnahme bildet der Geflügel-ELISA, der einzeln für Huhn bzw. Pute, wie vom Hersteller angegeben, nicht spezifisch ist, sehr wohl aber für Geflügel.

Tab. 39 Vergleich der Spezifitäten der Testkits auf Signifikanz (McNemar-Test)

Nachweis	Nebentierart	CIB-A-Kit/ CarnoCheck®	CIB-A-Kit / ELISA	CarnoCheck® / ELISA
Rind	Huhn	/	/	/
	Pute	/	/	/
	Schwein	/	/	/
Huhn	Rind	$p = 0,135^*$	$p = 0,135^*$	$p = 0,135^*$
	Pute	$p = 0,125$	$p < 0,001$	$p < 0,001$
Pute	Rind	$p = 0,066^*$	$p = 0,066^*$	$p = 0,066^*$
	Huhn	/	$p < 0,001$	$p < 0,001$
Geflügel	Rind	$p = 0,066^*$	$p = 0,066^*$	$p = 0,066^*$

Signifikanzniveau = 0,05 , \* - Cochran-Testergebnis, / - kein Unterschied feststellbar,   - signifikante Unterschiede

Aufgrund der unterschiedlichen Nachweise für Huhn und Pute mit dem Geflügel-ELISA (Tab. 40), wurde ein gesonderter **Vergleich der Sensitivitäten des Geflügel-ELISA für Huhn und Pute** durchgeführt. Für die Konzentrationen von 0,5% und 1,0% konnten keine Unterschiede festgestellt werden. Bei den 0,1%igen Modellen konnte ein signifikanter Unterschied ( $p=0,006$ ), zwischen dem Nachweis von Huhn und dem von Pute ermittelt werden. Durch die zugrunde liegenden Nachweishäufigkeiten (Tab. 36) kann damit der Geflügel-ELISA als sensitiver in der Detektion von Pute bezeichnet werden.

Tab. 40 Anzahl der Nachweise von Huhn und Pute durch den Geflügel-ELISA

ELISA Geflügel	Nebentierart		
	Huhn	Pute	Gesamt
nicht nachgewiesen	18	9	27
nachgewiesen	2	11	13
Gesamt	20	20	40

### 3.3.4 Kostenkalkulation der Methoden im Hauptversuch

Die anfallenden Kosten für eine Tierartenidentifizierung für 12 Proben wurden für die beschriebenen Testkits gegenüber gestellt. In die Berechnung wurden nur Reagenzien und Geräte mit einbezogen, die nicht als ubiquitär in Laboren angesehen werden bzw. die speziell für diese Testkits benötigt werden. Bei den Verbrauchsmaterialien wurden dagegen alle genutzten Materialien in die Berechnung mit einbezogen. Alle Kosten sind mit den Preisangaben der Hersteller für das Jahr 2006 berechnet worden und werden ohne die gesetzliche Mehrwertsteuer von damals 16% angegeben. Die Anzahl der möglichen Untersuchungen pro Testkit hat keinen Einfluss auf die Geräte- und Verbrauchsmaterialienkosten. Daher wird eine getrennte Berechnung des CIB-A-Kit, einmal für das angegebene und einmal für das halbe Ansatzvolumen, sowie für den ELISA-Testkit zum einen bei Verwendung des Kombinationskits für den Nachweis aller drei Spezies und zum anderen bei Einsatz der Einzeltestkits für je eine Tierart nur unter Punkt 3.3.4.1 und Punkt 3.3.4.4 durchgeführt.

### 3.3.4.1 Polymerasen, Reagenzien und Testkits

Die im Anhang zu findenden Tabellen 52 und 53 stellen mit den Angaben über den Verbrauch und den Grundpreis die Berechnungsgrundlage für den Kostenaufwand für die Polymerasen, Testkits und Reagenzien dar. Daraus lassen sich die Kosten, wie in Tabelle 41 ersichtlich, für diesen Punkt berechnen und vergleichen. Die Preise für die einzelnen Testkits sind hierbei grafisch hervorgehoben. Die deutlichen Unterschiede sind in Abbildung 25 veranschaulicht.

Die Kosten für den CarnoCheck® Testkit liegen mit 129,60 € am niedrigsten, gefolgt vom CIB-A-Testkit bei halbem Ansatzvolumen mit 140 € und bei vorgesehenem 50 µl Ansatzvolumen mit 280 €. Die ELISA Testkits liegen mit 308 € (Testkit für eine Tierart) bzw. 348,75 € (Testkit für drei Tierarten) im Preis am höchsten. Zählt man die restlichen Reagenzien hinzu, wird der CIB-A-Kit mit dem 50 µl Ansatzvolumen mit 358,79 € am kostspieligsten. Betrachtet man dagegen nur die Reagenzienkosten, ergibt sich eine andere Reihenfolge. Mit 22 Cent liegen die ELISA Testkits an unterster Stelle, gefolgt von den Reagenzienkosten des CarnoCheck® Testkits mit 37,02 € und denen des CIB-A-Kits mit 56,46€ bzw. 78,79 €.

Tab. 41 Reagenzienkosten [€] für 12 Proben

Artikel	CIB-A-Kit ½	CIB-A-Kit	CarnoCheck®	ELISA a	ELISA b
Agarose	3,49	3,49			
Druckluft 67			0,62		
Ethidiumbromid	0,16	0,16			
Extraktionskit	29,69	29,69	29,69		
Testkit	140	280	129,60	308	348,75
NaCl				0,22	0,22
Polymerase	22,34	44,67	6,71		
10x TBE-Puffer	0,78	0,78			
Gesamt	196,46	358,79	166,62	308,22	348,97
Reagenzien	56,46	78,79	37,02	0,22	0,22

a – je ein Testkit pro Tierart, b – 3 Tierarten pro Testkit, ½ – halbes Ansatzvolumen

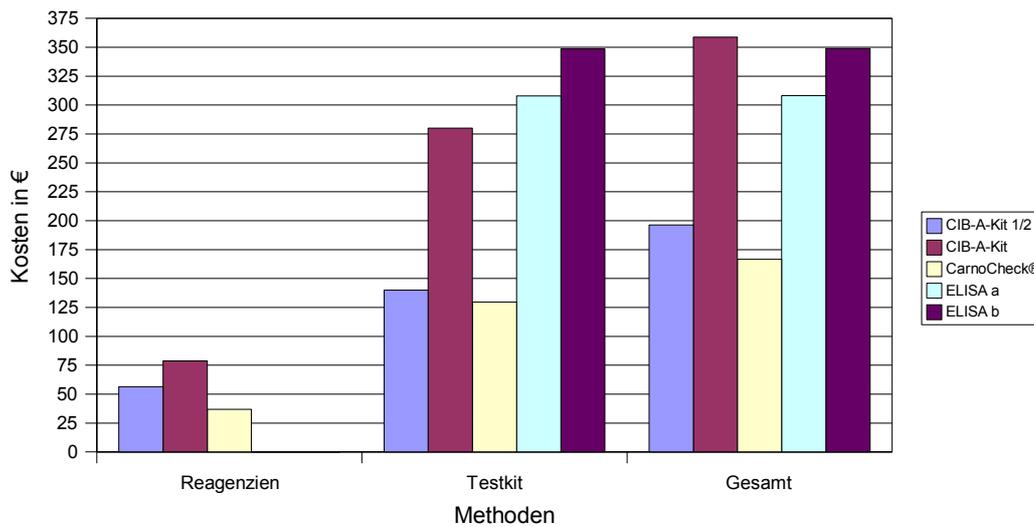


Abb. 25: Kosten für Reagenzien und Testkits

a – je ein Testkit pro Tierart, b – 3 Tierarten pro Testkit, ½ – halbes Ansatzvolumen

### 3.3.4.2 Geräte

Zur Berechnung der Investitionskosten wurden alle Utensilien herangezogen, die speziell für die Durchführung der beschriebenen Methoden notwendig sind. Als Grundlage der Kostenbildung dienten Tabelle 54 und 55 im Anhang. Die zusammengefassten Ergebnisse sind in Tabelle 42 angegeben und in Abbildung 26 veranschaulicht. Da für den CIB-A-Kit jeweils 2 Gele parallel liefen, wurden auch in die Kostenberechnung 2 Sätze Gel-Formen mit Kämmen und Laufkammern aufgenommen. Im Sinne der Übertragbarkeit der Berechnung wurde für die Kosten-Kalkulation des CarnoCheck® anstatt des verwendeten Axon-Scanner, der vom Hersteller angebotenen Microarray-Scanner herangezogen, da für ersteren nur der Gebraucht-Wert vorlag.

Die Investitionskosten für den Einsatz des CarnoCheck® Testkits belaufen sich auf 38.850,14 €, damit liegen sie im Vergleich zu den einmalig aufzuwendenden Kosten für den CIB-A-Kit mit 22.055,40 € und für den ELISA mit 5.869,00 € deutlich an oberster Stelle.

Tab. 42 Gerätekosten [€] für 12 Proben

Artikel	CIB-A-Kit	CarnoCheck®	ELISA
Eis-Rack	39,40		
2 Gel-Formen	130,00		
4 Gel-Kämme (15 Zinken)	192,00		
Gel-Presse	169,00		
2 Gellaufkammern	540,00		
Hybridisierungskammer		0,14	
Microarray Reader		25.800,00	
Mikroplatten Filter			343,00
Mikroplatten Reader			4.001,00
Power Supply	535,00		
Software Agarosegel	2.350,00		
Software CarnoCheck®		3.900,00	
Software Microarray		0,00	
Software Mikroplatten			1.525,00
Thermocycler	9.150,00	9.150,00	
UV-Kammer	8.950,00		
<b>Gesamt</b>	<b>22.055,40</b>	<b>38.850,14</b>	<b>5.869,00</b>

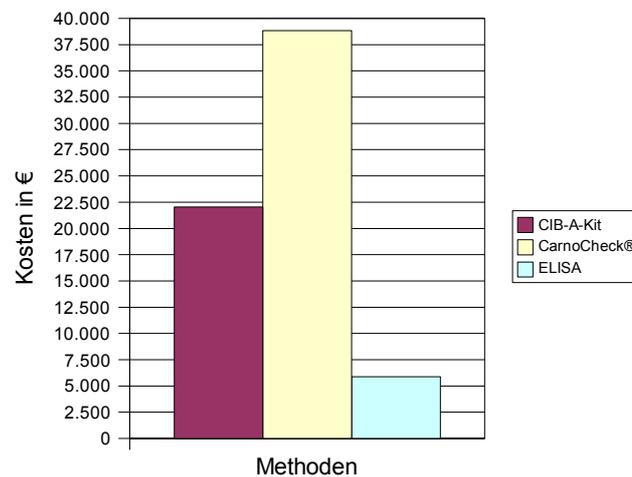


Abb. 26: Gerätekosten

### 3.3.4.3 Verbrauchsmaterial

Wie zuvor dienten Tabellen mit den Ausgangspreisen und dem verbrauchten Material als Basis zur Berechnung (s. Anhang Tab. 56, 57). Die Gesamtkosten sind auch hier zusammengefasst in Tabelle 43 und Abbildung 27 wiedergegeben.

Für benötigte Verbrauchsmaterialien muss beim ELISA-Testkit mit 1,83 € der geringste Betrag aufgewendet werden. Mit 13,54 € liegen die Materialkosten für den CarnoCheck® Testkit zwar deutlich über denen des ELISA, sind aber fast halb so teuer wie die für den CIB-A-Kit mit 26,52 €. Die Differenz zwischen CIB-A-Kit und CarnoCheck® ist vor allem durch die höhere Zahl an Premix-Ansätzen des Cib-A-Kit und den damit gesteigerten Verbrauch an Filterspitzen bzw. Reaktionsgefäßen bedingt.

Tab. 43 Materialkosten [€] für 12 Proben

Artikel	CIB-A-Kit	CarnoCheck®	ELISA
50 ml Gefäße		1,20	
Eppendorf Tubes (Dne)	0,87	0,87	
Eppendorf Tubes (Tk)	0,13	0,43	
Filter			0,98
Handschuhe (latex)	0,52	0,52	
Handschuhe (nitril)	1,10		
Paraffinfilm	0,15		
Pipettenspitzen 0,5-10 µl, filter	8,67	1,76	
Pipettenspitzen 100-1000 µl (Dne)	0,71	0,71	
Pipettenspitzen 100-1000 µl (Tk)	0,14	0,08	0,03
Pipettenspitzen 20-200 µl (Dne)	1,77	1,77	
Pipettenspitzen 20-200 µl (Tk)	2,51	0,71	0,82
Skalpellklingen	4,00	4,00	
Stripes	5,95	1,49	
<b>Gesamt</b>	<b>26,52</b>	<b>13,54</b>	<b>1,83</b>

Tk– Verbrauch für Testkits (CIB-A-Kit, CarnoCheck®, ELISA), Dne - Verbrauch für Dneasy® Tissue Kit

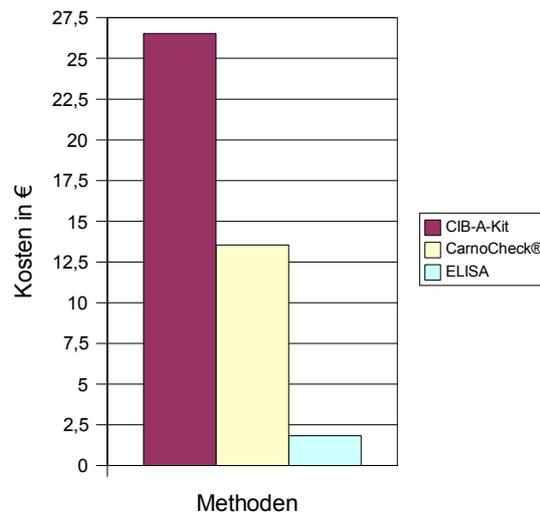


Abb. 27: Kosten für Verbrauchsmaterialien

### 3.3.4.4 Zusammenfassung des Kostenaufwandes

In Tabelle 44 und Abbildung 28 stehen die laufenden Kosten den einmaligen Investitionskosten gegenüber. Trotz hoher Investitionskosten von 38.850,14 € hat der CarnoCheck® Testkit gleichzeitig auch die niedrigsten Materialkosten (Testkit, Reagenzien, Verbrauchsmaterialien) mit 180,16 €. Der ELISA-Testkit liegt mit Gesamtkosten von 6.179,05 € bzw. 6.219,80 € am niedrigsten, während der CIB-A-Kit mit Gesamtkosten von 22.278,38 € bzw. 22.440,71 € näher an den Gesamtkosten des CarnoCheck® von 39.030,30 € liegt.

Tab. 44 Gesamtkosten [€] für die Analyse von 12 Proben

Artikel	CIB-A-Kit ½	CIB-A-Kit	CarnoCheck®	ELISA a	ELISA b
Polymerase, Reagenzien, Testkit	196,46	358,79	166,62	308,22	348,97
Verbrauchsmaterial	26,52	26,52	13,54	1,83	1,83
laufende Kosten	222,98	385,31	180,16	310,05	350,80
Gerätekosten	22.055,40	22.055,40	38.850,14	5.869,00	5.869,00

a – je ein Testkit pro Tierart, b – 3 Tierarten pro Testkit, ½ – halbes Ansatzvolumen

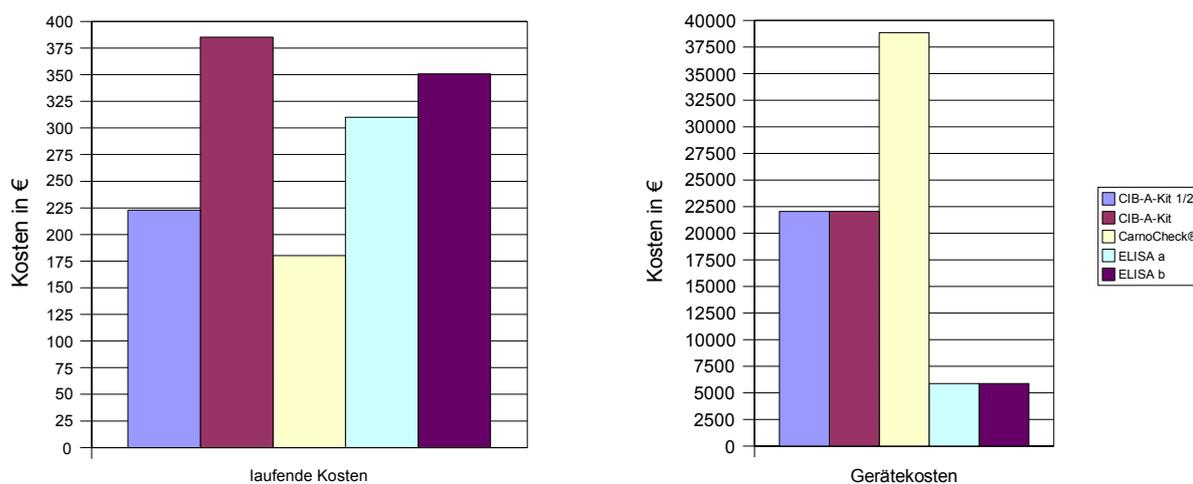


Abb. 28: Vergleich der Gesamtkosten

a – je ein Testkit pro Tierart, b – 3 Tierarten pro Testkit, ½ – halbes Ansatzvolumen

### 3.3.5 Zeitaufwand der Methoden im Hauptversuch

Zur Ermittlung des Zeitaufwandes der jeweiligen Methode wurde während der Versuche Protokoll geführt und aus den erhaltenen Daten wurden die Mittelwerte berechnet. Diese wurden für die nachfolgenden Berechnungen auf ganze Zahlen gerundet. Die Messdaten sind in Tabelle 58 im Anhang aufgelistet. Starke Schwankungen der Dauer ergaben sich u.a. durch Einstellung einer gewissen Routine als Ursache für kürzere Zeitdauern oder durch unvorhergesehene Zwischenfälle als Grund für Verzögerungen. Somit unterliegt die zeitliche Durchführung individuellen Schwankungen und die folgenden Daten stellen nur Orientierungswerte dar. Die Zeiten wurden jeweils für die Bearbeitung von 12 Proben berechnet.

#### 3.3.5.1 Homogenisierung

Vor den Extraktionen wurden alle Proben homogenisiert. Dafür wurden im Durchschnitt 64 min für 12 Probenwürste benötigt. Pro Probe müssen also ca. 5 min für Zerkleinerung, Abwiegen und gründliche Zwischenreinigung der Moulinette veranschlagt werden. Dieser Zeitaufwand ist für alle Methoden erforderlich und wird entsprechend jeweils mit eingerechnet. Die Vorbereitung, wie z.B. Bereitstellung und Beschriftung der benötigten Geräte bzw. Probengefäße ist abhängig von den Gegebenheiten, kann aber mit ca. 10 min veranschlagt werden und muss ebenfalls bei allen Methoden Berücksichtigung finden.

### 3.3.5.2 DNS-Extraktion

Für die DNS-Extraktion, die für den CarnoCheck® und den CIB-A-Kit nötig ist, ist mit einer Gesamtzeit von durchschnittlich 216 min zu rechnen. Der Großteil des Zeitaufwandes wird für den Proteinase-K-Verdau mit knapp 3 h (2 h 50 min) benötigt. Die reinen Arbeitsschritte belaufen sich dagegen nur auf durchschnittlich 46 min für 12 Proben.

### 3.3.5.3 CIB-A-Kit

Die benötigte Zeit zur Durchführung der Versuche mit dem CIB-A-Kit setzt sich aus der Zeit für die Vorbereitung, die Homogenisierung, die Extraktion und die eigentliche Nachweis-Methode zusammen. Da für die CIB-A-Kit-PCR für jede der vier Tierarten ein eigener Premix angesetzt werden musste, von denen je zwei parallel abliefen, wurde für die Berechnung der durchschnittliche Wert für den Aufwand zwei nacheinander ablaufender PCRs herangezogen. So ergab sich ein mittlerer Aufwand von ca. 490 min für vier verschiedene Ansätze und 12 Proben. Hierbei lag der Anteil an reiner Arbeitszeit bei 37 min. Zusammen mit Vorbereitung, Homogenisierung und Extraktion müssen ca. 780 min (~13 h) für die gesamte Durchführung veranschlagt werden, wobei auf den reinen Arbeitsaufwand 194 min (~3¼ h) entfallen.

### 3.3.5.4 CarnoCheck®

Um 12 Proben mit dem CarnoCheck® Testkit zu untersuchen, benötigt man im Durchschnitt 215 min, wovon man ca. 23 min reine Arbeitszeit aufwendet. In Zusammenhang mit der nötigen Vorbereitung, Homogenisierung und Extraktion ergibt sich eine Dauer von 8 h 25 min (505 min), mit einem reinen Arbeitszeitaufwand von 2 h 23 min (143 min).

### 3.3.5.5 Protein-Extraktion und ELISA

Der zeitliche Aufwand, 12 Proben mit dem Transia ELISA-Testkit zu differenzieren, beträgt ca. 3 h 35 min für den ELISA selbst. Durch die langen Inkubationsschritte beläuft sich die reine Arbeitszeit auf ca. 33 min. Auch bei dieser Methode ist eine Homogenisierung und Extraktion, bestehend aus 15minütigem Sieden, anschließendem Abkühlen und Filtrieren, nötig. Diese Extraktions-Schritte ergeben einen ca. 53minütigen Zeitauf-

wand mit 10 min reiner Arbeitszeit. Dadurch summiert sich der Aufwand auf 5 h 42 min (342 min), wovon ca. 1 h 57 min (~117 min) zur praktischen Durchführung benötigt werden.

### 3.3.5.6 Zusammenfassung des Zeitaufwandes

Einen Vergleich über die einzelnen Methoden geben Tabelle 45 und Abbildung 29. Sowohl für die Gesamtarbeitszeit, als auch für die reine Arbeitszeit benötigt der ELISA am wenigsten Zeit zur Durchführung. Der Zeitaufwand des CarnoCheck® liegt im mittleren Bereich. Dagegen ist für den CIB-A-Kit für die Untersuchung von 12 Proben auf 4 Tierarten die meiste Zeit mit insgesamt 13 h auf zuwenden.

Tab. 45 Benötigte Zeit für die Untersuchung von 12 Proben

	Arbeitsschritte	Zeit gA [min]	Zeit gA [h]	Zeit rA [min]	Zeit rA [h]
a	Vorbereitung	10	0.10	10	0.10
b	Homogenisierung	64	1.04	64	1.04
c	DNS-Extraktion	216	3.36	46	0.46
d	Protein-Extraktion	53	0.53	10	0.10
e	CIB-A-Kit	490	8.10	74	1.14
f	CarnoCheck®	215	3.35	23	0.23
g	ELISA	215	3.35	33	0.33
a+b+c+e	CIB-A-Kit	780	13.00	194	3.14
a+b+c+f	CarnoCheck®	505	8.25	143	2.23
a+b+d+g	ELISA	342	5.42	117	1.57

gA – gesamter Aufwand, rA – reine Arbeit

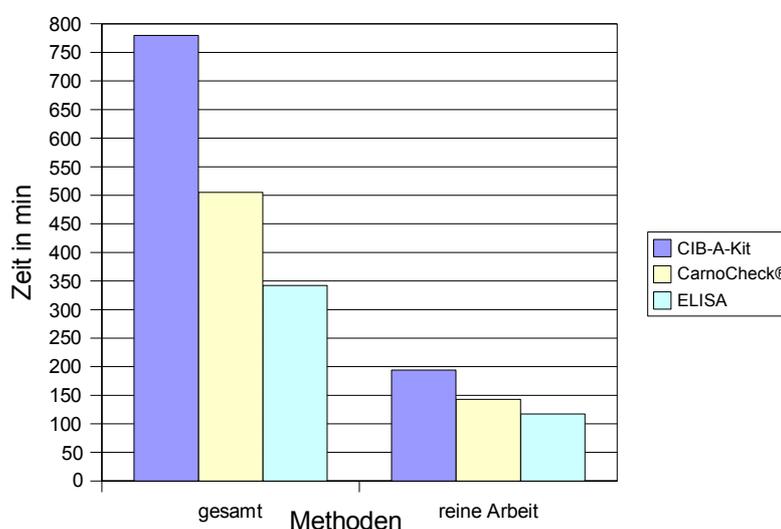


Abb. 29: Zeitaufwand der Methoden

## 4 Diskussion

Für die Durchführung einer Tierartenidentifikation gibt es eine Vielzahl von Beweggründen. Neben den religiösen, gesundheitlichen, finanziellen und qualitativen Ansprüchen, müssen natürlich auch die vorwiegend hieraus resultierenden rechtlichen Bestimmungen eingehalten werden. Durch eine verlässliche und schnelle Diagnostik der verarbeiteten Tierart in Fleisch und Fleischerzeugnissen kann diesen Anforderungen Rechnung getragen werden. Drei kommerzielle Testkits (CIB-A-Kit, CarnoCheck®, Transia-ELISA) wurden in der vorliegenden Arbeit deshalb insbesondere auf Routinetauglichkeit untersucht.

### 4.1 Vorversuch

Der Hauptzweck der durchgeführten Vorversuche bestand in der Aneignung von ersten Erfahrungen im Umgang mit den verwendeten Testkits. Desweiteren sollte hieraus der genaue Ablauf der Hauptversuchsdurchgänge geplant werden, um einen direkten Vergleich der drei jeweils parallel durchgeführten Nachweisverfahren zu gewährleisten.

Vor der Anwendung der **CIB-A-Kit-PCR** wurde diese zunächst etabliert. Hierfür musste eine geeignete Polymerase ausgewählt werden. Mit dem Eppendorf MasterMix ergaben sich unspezifische Banden für den Nachweis mit den Rind-ST Primern des CIB-A-Kit. Daher wurde auf die Qiagen-Taq-Polymerase umgestellt. Diese Polymerase, sowie die ebenfalls in den Vorversuchen getestete Cibus-Taq-Polymerase schienen für die Durchführung besser geeignet, da keine unspezifischen PCR-Produkte erkennbar waren. Die Unterschiede in der katalytischen Effizienz der Polymerasen und der Einfluss der übrigen an der Reaktion beteiligten Komponenten ist hinlänglich bekannt (ECKERT und KUNKEL 1991, CHA und THILLY 1993, NEWTON und GRAHAM 1997, SAMBROOK und RUSSELL 2001, SCHWÄGELE 2001b). Auch die verwendeten Thermocycler und die durchgeführten Temperaturprogramme können Einfluss auf die Qualität der PCR ausüben (SCHWÄGELE 2005). Da für die in den Versuchen eingesetzten Polymerasen stets der selbe Cycler Anwendung fand, ist der Grund für die unspezifischen Reaktionen des Eppendorf Mastermix vermutlich bei den Konzentrationen der enthaltenen Biochemikalien zu suchen. Durch das Vorliegen als vorgefertigter MasterMix konnten die einzelnen Komponenten wie Polymerase, dNTPs und Magnesiumionen nicht optimal an die Reaktion angepasst werden. Zudem wurde aus arbeitstechnischen Gründen und in Hin-

blick auf den Routine-Einsatz der Methode auf das Evaluieren weitere Optimierungsmöglichkeiten verzichtet und das Protokoll des CIB-A-Kits an die für die weiteren Versuche verwendete Qiagen-Taq-Polymerase angepasst.

Für die Annealingtemperaturen wurden mit jeder der verwendeten Polymerasen verschiedene Ergebnisse erzielt. Auffallend dabei war, dass die ermittelten Temperaturen bei allen eingesetzten Enzyme, für das Annealing der vier verschiedenen Spezies-spezifischen Primerpaare nicht mit den Temperatur-Vorgaben des Testkit-Herstellers übereinstimmten. Dies lässt sich mit den oben bereits erwähnten Unterschieden in der katalytischen Wirksamkeit der Polymerasen und dem Einfluss des verwendeten Thermocyclers erklären (NEWTON und GRAHAM 1997, SAMBROOK und RUSSELL 2001, SCHWÄGELE 2001b, SCHWÄGELE 2005). Da auch beim Einsatz der firmeneigenen Polymerase, deren Annealingtemperaturen in mehreren Durchgängen ermittelt werden mussten, sollten die nicht unerheblichen Mehrkosten und die zeitliche, sowie geistige Investition bei der Etablierung des CIB-A-Kits bedacht werden.

Durch die Vielzahl an notwendigen Reaktionsansätzen, zur Wahl der Polymerase und der aufwendigen Annealingtemperatur-Einstellung, gestaltete sich die Handhabung des CIB-A-Kits kompliziert. Im Vergleich dazu war die Durchführung des **CarnoCheck®**-Protokolls leicht nachzuvollziehen. Lediglich die Hybridisierung stellte hierbei einen komplizierten Punkt dar, nachdem es einige Übung und eine ruhige Hand erfordert, um die Hybridisierungslösungen luftblasenfrei auf den jeweiligen DNS-Chip zu pipettieren. Der Umgang mit dem **ELISA** war dagegen leicht und schnell zu erlernen. Von Vorteil war hierbei sowohl die wesentlich kürzere und unkompliziertere Extraktion, als auch die Tatsache, dass diese Methode bereits seit vielen Jahren für die Tierartendiagnostik eingesetzt wird und persönliche Erfahrungen der Anwendung überliefert werden konnten.

Die Untersuchung der **Vorversuchsproben** aus dem Handel mit den drei Testkits bestätigten ausnahmslos die im Zutatenverzeichnis angegebenen Tierarten. Andererseits wurden bei einigen Proben noch zusätzliche Spezies nachgewiesen (Kapitel 3.3.2). Probe 21 (Schweine-Mortadella) ergab, in Übereinstimmung aller drei Verfahren, die nicht deklarierte Tierart Rind. Für Probe 58 (Geflügel-Lyoner), die eine Zusatzbezeichnung „Garantiert nur aus Geflügelfleisch“ führte, wurde mit beiden molekularbiologischen Methoden die Tierart Schwein nachgewiesen. Dagegen war der ELISA für diese Probe im Nachweis für Schwein negativ. Desweiteren ergaben sich für den ELISA und den CIB-A-

Kit bei einigen Proben jeweils Tierarten-Nachweise, die nicht durch die anderen Methoden bestätigt werden konnten, und der Nachweis der Spezies Rind bereitete mit dem CIB-A-Kit in Verbindung mit dem Eppendorf MasterMix Probleme in Form unspezifischer Reaktionsprodukte. Mit Ausnahme der bereits erwähnten Proben 21 und 58 lieferte der CarnoCheck® keine von der Produkt-Kennzeichnung abweichenden Befunde.

Für die Abweichung der ermittelten Ergebnisse von der Deklaration der Handelsproben kommen verschiedene Gründe in Betracht. Einerseits kann es sich um absichtliche Verfälschungen durch den Zusatz einer nicht deklarierten Spezies handeln und andererseits sind Kontaminationen, sowohl während der Herstellung, als auch bei der Analyse, mögliche Ursachen. Desweiteren wären prinzipiell auch Kreuzreaktionen der Nachweissysteme denkbar. Letzteres wird hier als Ursache der „falsch positiven“ Resultate als unwahrscheinlich angesehen. Zum einen versichern die Hersteller der Testkits die spezifische Detektion der Tierarten (CIBUS 2006, GREINER BIO-ONE 2005, ELISA Technologies 2006) und zum anderen sind Angaben in der Literatur über die Spezifität der Methoden zu finden (MIFEK und GLAWISCHNIG 1990, CHURCH et al. 1991, HAFKE 1994, HOFMANN et al. 1994, 1995, HSIEH et al. 1995, BEHRENS und UNTHAN 1999, MIFEK und GLAWISCHNIG 1990, CHURCH et al. 1991, HAFKE 1994, HOFMANN et al. 1994, 1995, HSIEH et al. 1995). Weiterhin wäre auch die Möglichkeit der Beeinflussung des ELISA durch Inhaltstoffe wie beispielsweise Gelatine (HOFMANN et al. 1994, 1996, 1998, POSER et al. 2000) oder Gewürzzubereitungen denkbar. Die nachteilige Wirkung von Kräutern und Gewürzen wurde jedoch in der Literatur ausgeschlossen (HONIKEL et al. 2002, SPERNER et al. 2002), und eine Gallertbildung in den Kavitäten konnte nicht beobachtet werden, zudem wies auch keine der Proben einen deklarierten Gelatine-Zusatz auf.

Betrachtet man nun die Möglichkeit der Kontamination, muss Folgendes beachtet werden. Laborinterne Kontaminationen bei molekularbiologischen Analysen können durch strikte räumliche Trennung und sorgfältige Arbeitstechniken vermieden werden. Desweiteren kann diese Vorgehensweise durch Kontaminations-Kontrollen überprüft werden (KWOK und HIGUCHI 1989, DIEFFENBACH und DVEKSLER 1993, NEWTON und GRAHAM 1997). Für die molekularbiologische Analyse der Proben im Vorversuch wie auch anschließend im Hauptversuch wurde nicht nur eine räumliche Trennung von Homogenisation, Extraktion, Premix-Vorbereitung, Template-Zugabe, PCR und Hybridisie-

rung bzw. Gelelektrophorese vorgenommen. Ebenso ergaben die bei den Proben mitgeführten Negativ-Kontrollen für die Extraktion und die PCR keine Hinweise auf eine Kontamination. Verfälschungen bzw. Kontaminationen während des Produktionsprozesses sind dagegen nicht ungewöhnlich. 2005 beanstandete das bayerische Landesamt für Gesundheit und Lebensmittelsicherheit 11% bzw. 17% der untersuchten Wurstproben bzw. Fleischerzeugnisse u.a. wegen ihrer tierartlichen Zugehörigkeit (N. N. 2006a). Auch andere Untersuchungen zeigen, dass der Nachweis nicht deklarerter Tierarten keineswegs ungewöhnlich ist (HEMPEL und BUSCH 2000, BRODMANN et al. 2001, WEINGARTEN und KLARE 2001, AYZAZ et al. 2006). Hierzu kann es einerseits durch unsachgemäßen Umgang während des Herstellungs- und Vertriebsprozesses, beispielsweise durch mangelnde Reinigung des Kutters sowie Handkontakte des Personals kommen (SCHWÄGELE 2001b), oder aber durch absichtliche Beimengung aus finanziellen Gründen.

Aufgrund der oben dargestellten Sachverhalte und durch vergleichende Betrachtung der Vorversuchs-Ergebnisse kann Folgendes geschlossen werden. Der übereinstimmende Nachweis der Tierart Rind im Probe 21 mit allen drei Methoden lässt den Schluss zu, dass es sich hierbei um eine Verfälschung bzw. Kontamination des Produktes während der Herstellung handelt. Dies gilt möglicherweise auch für Probe 58, in der trotz des Hinweises „garantiert nur aus Geflügelfleisch“ Schwein nachgewiesen werden konnte. Da jedoch bei dieser Probe der Nachweis im ELISA negativ ausfiel, handelt es sich eher um eine Produktionskontamination in einer geringen Konzentration, die nur mit den sensitiveren molekularbiologischen Methoden nachweisbar war. Der nur mit der CIB-A-Kit-PCR in Probe 02 positive Puten-Nachweis ist vermutlich auf eine ungenügende Reinigung während der Herstellung oder aber eine Kontamination im Laufe der Analyse zurückzuführen, wenngleich auch hier die entsprechenden Kontrollen negativ waren. Selbiges ist bei den positiven Nachweis von Huhn in Probe 50 mit dem CIB-A-Kit anzunehmen. Die „falsch positiven“ Geflügelnachweise mit dem ELISA-Testkit in den Proben 21 und 44 sind möglicherweise auf eine kurzfristige Unachtsamkeit während der Filtration (Spritzkontamination) zurückzuführen, da mit keiner der anderen Methoden dieser Befund als Verfälschung oder Produktions-Kontamination bestätigt werden konnte. Aus diesem Grund wurde nicht nur bei den molekularbiologischen Methoden, sondern auch bei dem

ELISA im Hauptversuch mit verstärkter Vorsicht auf die Vermeidung von Konatminationen bei der Extraktion und der Testdurchführung geachtet.

## 4.2 Hauptversuch

Mit Hilfe der für diese Studie angefertigten Modellwürste wurde im Hauptversuch die spezielle Untersuchung der Testkits in Hinblick auf Sensitivität und Spezifität sowie Zeit- und Kostenaufwand durchgeführt. Die Modellproben wurden in 12 verschiedenen Zusammensetzungen hergestellt. Der Fleischanteil setzte sich aus je einer Nebentierart und einer bzw. zwei Haupttierarten zusammen. Die Nebentierarten Rind, Huhn und Pute wurden in den Konzentrationen 0,1%, 0,5% sowie 1,0% der Haupttierart Schwein zugesetzt. Die Nebentierart Schwein wurden in den selben Konzentrationen den Haupttierarten Huhn und Pute beigefügt. Je Modell kam in 20 Versuchsläufen eine Wurst zur Analyse, so dass insgesamt 240 Proben untersucht wurden.

### 4.2.1 Allgemeine Betrachtung der Ergebnisse

Die Haupttierarten der Modellwürste wurden mit allen drei Methoden in allen 240 Proben korrekt identifiziert. Ebenso wurde die Nebentierart in allen 1,0%igen Modellen richtig nachgewiesen. Für den Nachweis der 0,5% konzentrierten Nebentierart traf dies mit Ausnahme des CarnoCheck® ebenfalls zu. Die Nebentierart Schwein konnte hiermit zweimal in den „0,5% Schwein-in-Huhn/Pute“ Modellen nicht identifiziert werden. In Bezug auf die 0,1%igen Modelle konnte mit dem CIB-A-Kit jede Nebentierart korrekt nachgewiesen werden. Der CarnoCheck® wies ebenso einen Großteil der Nebentierarten bei dieser Konzentration nach, auffallend gering war jedoch die Nachweisrate von Rind, wobei in 5 der 20 „0,1% Rind-in-Schwein“ Modelle Rind nicht detektiert wurde. Dagegen wurde mit dem ELISA nur ein geringer Anteil der 0,1% konzentrierten Nebentierarten richtig detektiert, mit Nachweisraten zwischen 10 und 55%, je nach Nebentierart. Auf der anderen Seite traten insgesamt 12 „falsch positive“ Resultate auf. Hierbei entfiel ein unerklärlicher Nachweis der Tierart Ziege auf den CarnoCheck® und zwei Rind-Modellwürste waren im ELISA für Geflügel positiv. Die restlichen neun Fälle wurden allesamt mit dem CIB-A-Kit erhalten, der 5mal „falsch positiv“ Pute und 4mal nicht vorhandenes Huhn anzeigte.

Da durch die eigene, sorgfältige Herstellung der Würste eine absichtliche Verfälschung ausgeschlossen werden kann, kommen für die „falsch positiven“ Ergebnisse nur Kontaminationen in Frage. Nachdem jedoch nicht sämtliche Würste einer Produktionscharge dieselben Kontaminationen aufwiesen und auch keine Übereinstimmungen der „falsch positiven“ Nachweise zwischen den drei Methoden bestehen, ist auch ein Eintrag während der Produktion unwahrscheinlich. Somit wird eine Verschleppung im Laufe der Analyse wahrscheinlich. Wie oben bereits erwähnt, kann bei molekularbiologischen Verfahren durch sorgfältige Arbeitstechniken und strikte räumliche Trennung das Kontaminationsrisiko vermindert werden und zudem eine Absicherung durch parallel mitgeführte Negativ-Kontrollen erreicht werden (KWOK und HIGUCHI 1989, DIEFFENBACH und DVEKSLER 1993, NEWTON und GRAHAM 1997). Trotz bereits erwähnter Einhaltung der räumlichen Trennung sowie der erhöhten Vorsicht während der Durchführung der Versuche kam es dennoch zu unerwarteten Nachweisen. Für den CIB-A-Kit muss erwähnt werden, dass mit Ausnahme des ersten Versuchslaufes, sämtliche Kontrollen bei Auftreten von „falsch positiven“ Resultaten negativ waren.

Für die vorwiegend in der ersten Hälfte der Versuchsreihe auftretenden Nachweise der Tierart Pute in den Rind-Modellen mit dem CIB-A-Kit liegt der Verdacht nahe, durch eine anfänglich ungenügende Reinigung bzw. eine Zwischenbenutzung der Moulinette im Labor diese Kontamination bereits bei der Homogenisierung ausgelöst zu haben. Eine Änderung in der Bearbeitungs-Reihenfolge sowie die nach Feststellung des Sachverhaltes verbesserte Dekontamination des Zerkleinerungsgerätes verhinderte nämlich das Wiederauftreten derartiger Nachweise. Bei den mit dem CIB-A-Kit auf Huhn „falsch positiven“ Puten-Modellwürsten muss ebenfalls eine Kontamination als Ursache angesehen werden, deren Ursprung jedoch nicht ermittelt und auch durch sorgfältige Vorgehensweise bei der Extraktion nicht verhindert werden konnte. Für den im CarnoCheck® positiven Befund der Tierart Ziege kommt keine Kontamination in Betracht, da das Vorhandensein von Ziegenmaterial in den Laborräumen im Zeitraum der Untersuchungen und davor ausgeschlossen werden kann. Für die beiden abweichenden Befunde mit dem ELISA-Testkit wird trotz sorgfältiger Vorgehensweise eine Kreuzkontamination während der Filtration oder der Inkubationsschritte angesehen.

## 4.2.2 Sensitivität

Bereits die allgemeine Betrachtung der Ergebnisse ließ auf Unterschiede der Methoden in Sensitivität und Spezifität schließen, was durch eine statistische Auswertung abgesichert werden sollte. Die auffallendsten Unterschiede bezüglich der Sensitivität zeigten sich zwischen den Ergebnissen, die mit den einzelnen Methoden für die 0,1%igen Modelle ermittelt wurden. Durch eine statistische Analyse konnte eine Aussage über signifikante Unterschiede in der Sensitivität der drei Testkits getroffen werden. Danach können die molekularbiologischen Verfahren, der CIB-A-Kit und der CarnoCheck®, als statistisch signifikant sensitiver im Vergleich zum ELISA angesehen werden, trotz der teilweise geringeren Nachweishäufigkeit des CarnoCheck® im Vergleich zum CIB-A-Kit, da dieser Unterschied zwischen den Beiden DNS-basierenden Methoden keine Signifikanz aufwies. Somit können die Nachweisgrenzen in Zusammenhang der erhaltenen Versuchsdaten, der statistischen Auswertung, sowie der im Versuch eingesetzten Modellkonzentrationen festgelegt werden. Für den Nachweis der Tierarten Huhn, Pute, Rind und Schwein mit den CIB-A-Kit und dem CarnoCheck® ergab sich eine Sensitivität von mindestens 0,1% sowie mit dem ELISA eine Nachweisgrenze von 0,5%.

Die Sensitivitäten nicht-kommerzieller Tierartennachweise durch PCR mit Spezies-spezifischen Primern liegen nach der Literatur beispielsweise für Huhn und Pute bei 1% (LOCKLEY und BARDSLEY 2002). Schwein, Rind und Huhn konnten mit verschiedenen Spezies-spezifischen PCR-Verfahren in 1 bis 2% Konzentrationen nachgewiesen werden (MEYER et al. 1994b, OBROVSKÁ et al. 2004, RODRÍGUEZ et al. 2004a), während teilweise die Tierart Schwein auch erst ab 5% Zusatz detektiert wurde (MONTIEL-SOSA et al. 2000). Für die kommerziellen Testkits der Firmen Alcum und Coring, die ebenfalls auf Spezies-spezifischen Primern basieren, wurden Nachweisgrenzen für Huhn, Pute, Rind und Schwein von 0,1-1% in erhitzten und komplexen Fleischerzeugnissen angegeben (BEHRENS et al. 1999, CIBUS 2001, ALCUM 2006). Tierartennachweise mit Spezies-spezifischen Primern sind in der Literatur auch teilweise bis zu Mengen von Nano- bzw. Piko- und Femtogramm beschrieben (CHIKUNI et al. 1994, ZHANG et al. 1999, MATSUNAGA et al. 1999). So kann, auch in Zusammenhang mit den vom Hersteller gemachten Angaben einer Sensitivität von 0,1-1% für den **CIB-A-Kit**, mit dieser Untersuchung eine Nachweisgrenze von 0,1% bestätigt werden. Die beobachteten „falsch positiven“ Kontaminationen, die einen richtig positiven Nachweis noch geringerer

Mengen darstellen können, legen die Vermutung eines noch geringeren Detektionslimits nahe.

Die wenigen publizierten Angaben bezüglich des Detektionslimits bei tierartspezifischen DNS-Chips geben eine Nachweisgrenze von 0,1-1% für Huhn, Pute, Rind und Schwein an (PETER 2003). Für den DNS-Chip der Firma Chipron wird für diese vier Tierarten eine Sensitivität von unter 0,5% angegeben (CHIPRON 2005). Bezüglich des **CarnoCheck®** sind in der Arbeitsanleitung zum Testkit von Nachweisgrenzen zwischen 0,05-0,35% zu finden. Im Detail sind diese bei 0,05% für Rind und Schwein, sowie bei 0,1% für Pute und 0,16% für Huhn festgelegt. Die in dieser Studie für den CarnoCheck® ermittelte Sensitivität von 0,1% liegt im Rahmen der in der Literatur gemachten Angaben. Allerdings ist möglicherweise die vom Hersteller festgelegte Nachweisgrenze für die Tierart Rind von den angegebenen 0,05% auf 0,1% oder höher notwendig, da ein Viertel falsch negative Ergebnisse bei der Detektion dieser Spezies erzielt wurden. Es besteht hingegen auch die Möglichkeit, dass die reduzierte Nachweishäufigkeit der 0,1% konzentrierten Tierart Rind durch die Lokalisation des DNS-Chips auf dem Objektträger bedingt war, da das PCR-Produkt des Modells „0,1RS“ stets mit dem DNS-Chip an Position A1 hybridisiert wurde.

Die in der Literatur angegebenen Werte für die Sensitivität des **ELISA**-Testkits von TRANSIA variieren in Bereichen von 0,2% bis zu 5% in Abhängigkeit der Tierart und des Herstellers. So geben Untersuchungen mit dem Cortecs Diagnostic ELISA-Kit für Geflügel und Schwein eine Sensitivität von 1-2% und für Rind eine Nachweisgrenze von 2-4% an (MIFEK und GLAWISCHNIG 1990, BENEKE und HAGEN 1998, POSER et al. 2000). Ebenfalls für den Cortecs Diagnostic ELISA-Kit ergaben andere Studien Werte zwischen 0,2% und 0,5% für Geflügel und teilweise auch für Schwein (HOFMANN 1994, HOFMANN et al. 1994, 1995, 1997). Andere Veröffentlichungen nennen ein Detektionslimit von 2% für den Nachweis von Rind und Schwein (HOFMANN et al. 1995). In Methode L 06.00-47 der Amtlichen Sammlung von Untersuchungsverfahren nach § 64 LFGB (N. N. 2002) werden die Nachweisgrenzen, basierend auf den Ringversuchen, die mit dem Testkit von Cortecs Diagnostic durchgeführt wurden, mit 0,2-0,5% für den Geflügel- und Schweine-Nachweis und mit 2% für den Rind-Nachweis angegeben. Dagegen erreichten HSIEH et al. (1995, 1996) mit dem Testkit von ELISA Technologies mittels Vergleichsstandards und HONIKEL et al. (2002) ohne Angabe des Testkit-Herstellers für

erhitzte und behandelte Fleischerzeugnisse eine Sensitivität für Geflügel, Rind und Schwein von 0,5-1%. In der Durchführungsanweisung des mittlerweile von TRANSIA vertriebenen Testkits des Herstellers ELISA Technologies wird für Geflügel, Rind und Schwein eine Nachweisgrenze von 2% für die Analyse nach L 06.00-47 angegeben (TRANSIA 2003). Die im Vergleich zu Schwein und Geflügel höheren Detektionslimits für die Tierart Rind, die vor allem für den ELISA von Cortecs Diagnostics angegeben werden, waren in dieser Studie und in den Arbeiten die ebenfalls auf dem Testkit von ELISA Technologies basieren nicht zu beobachten. Für den Transia-ELISA können daher die Sensitivitäten die in dieser Studie ermittelt wurden mit den Angaben aus der Literatur in Einklang gebracht werden, so dass eine Nachweisgrenze im Bereich von 0,2-0,5% nach den erhaltenen Werten als möglich angesehen werden kann. Die Tatsache, dass Transia mit 2% deutlich höhere Grenzen festlegt, wird in der Gewährleistungsgarantie des Testkits seine Gründe finden, zu dem auch ein breites Analyse-Spektrum an unterschiedlich prozessierten Erzeugnissen abgedeckt wird.

### 4.2.3 Spezifität

Die Testkits CIB-A-Kit und CarnoCheck® waren für die jeweils nachzuweisende Tierart Rind, Huhn und Pute spezifisch, da sich keine signifikanten Unterschiede in der Spezifität ergaben. Der Transia-ELISA konnte dagegen nicht zwischen den Spezies Huhn und Pute differenzieren, war aber im Nachweis von Geflügel gegenüber den in den Proben enthaltenen Säugetierarten spezifisch. Durch einen speziellen Vergleich der ELISA-Ergebnisse für die „0,1% Huhn- bzw. Pute-in-Schwein“ Modelle wurde ein sensitiverer Nachweis der Tierart Pute mit dem Geflügel-ELISA festgestellt. Aufgrund der Zusammensetzung der Modellwürste war eine Beurteilung der Spezifität für die Tierart Schwein nicht möglich.

Die Spezifität verschiedener tierartspezifischer Primer für die Tierarten Rind, Schwein, Huhn und Pute konnte häufig beobachtet werden (MEYER et al. 1994b, BEHRENS et al. 1999, MATSUNAGA et al. 1999, LOCKELY und BARDSLEY 2002, HIRD et al. 2003, RODRÍGUEZ et al. 2003, 2004, ALTMANN et al. 2004, OBROVSKÁ et al. 2004). Ebenso sichern die Hersteller von auf dieser Methodik beruhenden Testkits die Spezifität der Primer zu (CIBUS 2001, ALCUM 2006, CORING 2006a). Selbiges gilt auch für den Hersteller des CarnoCheck® (GREINER BIO-ONE 2005) und auch PETER (2003) hatte mit

den vier oben genannten Tierarten keine Spezifitäts-Probleme beim Tierartnachweis mittels Hybridisierung auf DNS-Chip. Ferner wurde wie bereits mehrfach erwähnt die Spezifität des ELISA-Testkits in zahlreichen Untersuchungen bestätigt (MIFEK und GLAWISCHNIG 1990, CHURCH et al. 1991, HAFKE 1994, HOFMANN et al. 1994, 1995, HSIEH et al. 1995, MIFEK und GLAWISCHNIG 1990, HONIKEL et al. 2002, SPERNER et al. 2002). Bis auf die Arbeit von HOFMANN (1994) sind keine speziellen Aussagen über die unterschiedliche Nachweishäufigkeit des Geflügel-ELISA für verschiedene Vogelarten bekannt. Jedoch wurde in der aufgeführten Untersuchung lediglich die schwächere Reaktion von Strauß im Vergleich zu bei uns üblichen Geflügelarten, wie Huhn, Pute, Gans und Fasan, die alle gleichermaßen reagierten, dargestellt.

Die Spezifität für die verwendeten Tierarten war durch den Einsatz von kommerziell vertriebenen Testkits zu erwarten. Daher wird auch von einer Spezifität der Testkits für die Tierart Schwein ausgegangen. Der festgestellte Unterschied im Nachweis von Huhn und Pute mit dem Geflügel-ELISA ist ein interessanter Fakt, der jedoch erst unterhalb der festgelegten Nachweisgrenze, bei geringeren Konzentrationen der beiden Spezies eine Rolle spielen wird, und möglicherweise durch eine höhere Affinität der verwendeten Antikörper zu Epitopen der Puten-Proteine bedingt ist. Diese Vermutung lässt sich nicht näher erörtern, da keine Angaben über die spezielle Immunisierungslösung, insbesondere deren tierartige Herkunft und Zusammensetzung, zur Herstellung der Antiseren bekannt ist.

#### **4.2.4 Kostenaufwand**

Die laufenden Kosten für den CIB-A-Kit von 222,98 € zur Untersuchung von 12 Proben auf 4 Tierarten liegen für das hier verwendete Ansatz-Volumen zwischen den günstigsten Kosten des CarnoCheck® (180,16 €) und den, trotz minimalster Verbrauchsmaterialien-Kosten, teuersten laufenden Kosten des ELISAs (310,05–350,80 €). Für die Investitionskosten muss für den ELISA mit 5.689,- € eindeutig am wenigsten aufgewendet werden. Dagegen liegt der finanzielle Aufwand für den CIB-A-Kit (22.055,40 €) und den CarnoCheck® (38.850,14 €) in Bezug auf die notwendigen Geräte bei mehreren zehntausend Euro, wobei für letzteren die Investition noch deutlich teurer ausfällt.

Mit Ausnahme von Verkaufspreisen lassen sich in der Literatur keine vergleichbaren Angaben zum finanziellen Aufwand derartiger Analyseverfahren finden. BAUDNER und

DREHER (1991) erwähnten für einen ELISA zur Aflatoxin M1 Bestimmung Investitionskosten von umgerechnet 12.500,- € und 6,- bis 12,50 € für Reagenzienkosten. Hierbei wurden keine spezielle Angaben bezüglich der Berechnungsgrundlagen gemacht.

Die beiden molekularbiologischen Methoden zeichnen sich durch hohe Anschaffungskosten für die notwendigen Geräte aus. Unterschiede zwischen CIB-A-Kit und CarnoCheck® liegen einerseits bei dem für letzteren benötigten Microarray Scanner, was die Differenz für die einmaligen Kosten betrifft. Andererseits ist der CIB-A-Kit im Bereich der Premix-Ansätze im Nachteil, da hier für jede Tierart und jede Probe ein eigener Ansatz notwendig wird, und es dadurch sowie durch die zahlreichen notwendigen Pipettierschritte auch zu einem gesteigerten Verbrauch an Materialien kommt. Der hier angewendete ELISA hat dagegen eindeutige Vorteile durch die geringen Verbrauchsmaterial- und Reagenzienkosten sowie durch die niedrigen einmaligen Investitionskosten. Dieser ELISA ist zudem um mehr als die Hälfte in beiden Positionen günstiger als der Aflatoxin M1 ELISA (BAUDNER und DREHER 1991). Lediglich die Testkit-Kosten des ELISA übersteigen die der molekularbiologischen Verfahren wie sie hier Anwendung fanden.

#### 4.2.5 Zeitaufwand

Für die Analyse von je 12 Proben auf 4 Tierarten wurden mit dem CIB-A-Kit insgesamt 13 Stunden benötigt. Für den Erhalt von Ergebnissen mittels CarnoCheck® waren es dagegen nur ca. 8 ½ Stunden und der ELISA lieferte schon nach knapp 5 ¾ Stunden Resultate.

Die Dauer nicht kommerzieller PCR-Methoden mit Spezies-spezifischen Primern wird teilweise mit 5-6 Stunden angegeben, wobei nur auf eine Spezies getestet wurde oder andere Visualisierungsverfahren als die in der vorliegenden Studie durchgeführte Elektrophorese eingesetzt wurden (ZHANG et al. 1999, HIRD et al. 2003). Der Analysezeitraum kommerzieller Testkits, die auf Spezies-spezifischen Primern basieren, beträgt meist einen Tag (BEHRENS et al. 1999, CORING 2006a). BEHRENS et al. (1999) gaben für die Untersuchung einer Probe mit dem Animal-Kit von Alcum dagegen einen zeitlichen Rahmen von lediglich ca. 1 ½ Stunden an, mit der Möglichkeit, dies bei gleichzeitiger Analyse mehrerer Proben weiter zu verkürzen. Die wesentlich kürzeren Angaben aus der Literatur in Bezug auf den zeitlichen Aufwand für PCR-Nachweise mit Spezies-spezifischen Primern lassen sich nicht mit den hier für den **CIB-A-Kit** ermittelten Werten ver-

gleichen, da meist nur eine Tierart detektiert wurde. Die Analyse einer Tierart wie in der Durchführungsbeschreibung für den CIB-A-Kit angegeben scheint innerhalb eines Tages einschließlich der Extraktion möglich. Sollen jedoch Proben auf mehrere Tierarten getestet werden, wird erheblich mehr Zeit, wie in dieser Arbeit dargestellt, notwendig.

Zeitliche Angaben über DNS-Chip-Analysen beziehen sich meist auf die Untersuchungsschritte nach Beendigung der PCR. So benötigte beispielsweise PETER (2003) 2 Stunden inklusive einer Stunde Inkubationszeit, um den verwendeten DNS-Chip zu hybridisieren und auszuwerten. Für den **CarnoCheck®** wird vom Hersteller ein Zeitplan angegeben, nach dem in einer Stunde die Proben homogenisiert und mittels eines Schnell-Extraktions-Verfahrens DNS gewonnen wird. Anschließend werden für die PCR 1 ½ Stunden benötigt. Danach sind nur noch 20 min Arbeitszeit und 20 min Inkubationszeit notwendig, um die Analyse abzuschließen (GREINER BIO-ONE 2005). Die ausführlichen Angaben des Herstellers zum zeitlichen Ablauf des CarnoCheck®, insbesondere für die Arbeitsschritte nach der PCR, stellen dagegen einen guten Anhaltspunkt für die tatsächlich benötigte Zeit dar. Die Probenvorbereitung sowie die DNS-Extraktion und die PCR wichen dagegen in der vorliegenden Studie von den Hersteller-Angaben ab. Dies war durch die Wahl eines länger dauernden DNS-Extraktionsverfahrens und vermutlich durch den verwendeten Thermocycler bedingt, so dass für diese Analyseschritte mehr Zeit notwendig wurde. Auch ohne die Verwendung einer "Schnell"-Extraktion in 30 min könnte die komplette Analyse mittels CarnoCheck® innerhalb eines Tages durchgeführt werden. Mittels einer schnelleren DNS-Extraktionsmethode wäre es sogar möglich, die Analyse mit Hilfe des CarnoCheck® ebenso zügig oder sogar zügiger als mittels ELISA durchzuführen.

Nicht kommerzielle ELISAs variieren mit Angaben von 1 bis zu 5 Stunden stark in ihrer Durchführungsdauer, abhängig von Inkubationsphasen und Anzahl der Reaktionsschritte (WHITTAKER et al. 1982, 1983, PATTERSON et al. 1984, PATTERSON und SPENCER 1985, JONES und PATTERSON 1986, BERGER et al. 1988, ANDREWS et al. 1992). Die Zeitdauern, die für die Untersuchung mit kommerziellen **ELISA**-Testkits angegeben werden, liegen, mit einer Ausnahme, bei ca. 5 bis 6 Stunden bzw. 3,5 Stunden ohne die Probenvorbereitung mit Extraktion (HOFMANN 1994, HOFMANN et al. 1994, SCHWÄGELE 1999, TRANSIA 2003, 2006, AYAZ et al. 2006). Die auffallende Analysedauer von weniger als 2 Stunden, die von HSIEH et al. (1996) für den Testkit

von ELISA Technologies angegeben wurde, beruht auf den damals kürzeren Inkubationsphasen des Assays (HSIEH et al. 1996). Die vom Hersteller gemachten Angaben für die Durchführung des ELISA ohne Probenaufbereitung stellen realistische Werte dar. Ferner kann eine Übereinstimmung der kompletten Analysedauer inklusive Protein-Extraktion dieser Studie mit denjenigen, die in der Literatur gemacht wurden, gefunden werden.

### 4.3 Zusammenfassende Bewertung der Testkits

Die Vorteile des **CIB-A-Kit** liegen in der niedrigen Nachweisgrenze, der visuellen Auswertung gut differenzierbarer tierartspezifischer Banden und in der flexiblen Gestaltung der Probenanzahl, die analysiert werden soll. Nachteilig sind dagegen die hohen finanziellen und zeitlichen Investitionen bei der Untersuchung auf die Anwesenheit mehrerer Spezies. Für spezielle Fragestellungen, wie beispielsweise den Nachweis der Tierart Rind oder die Bestätigung fraglicher Befunde protein-basierender Methoden, scheint der CIB-A-Kit besser geeignet zu sein als für Screening-Untersuchungen. Die Auswertung erfolgt rein visuell anhand der Positiv-Kontrollen. Durch Inhibition möglicherweise falsch negative Resultate können durch fehlende interne Kontrollen nicht ausgeschlossen werden. Ein weiterer Nachteil des CIB-A-Kits ist die aufwendige Verfahrensweise zur Ermittlung der Annealingtemperaturen, sowie die zahlreichen Pipettierschritte für die Herstellung des Premix-Ansatzes und die zur Visualisierung notwendige Gel-Elektrophorese. Hinzu kommt das gesundheitliche Risiko durch den Einsatz des kanzerogenen Stoffs Ethidiumbromid.

Auf den Einsatz von Ethidiumbromid kann dagegen bei der Analyse mittels **CarnoCheck®** verzichtet werden. Weitere Vorteile dieses Testkits liegen in der parallelen Detektion ohne Mehraufwand von acht Tierarten, wobei auch hier eine Differenzierung zwischen Huhn und Pute möglich ist. Desweiteren ist der CarnoCheck® sensitiv und unkompliziert durchzuführen. Ferner ermöglicht die spezielle Report Software eine einfache und schnelle Auswertung der Ergebnisse. Es besteht die Möglichkeit, sechs oder zwölf Proben in einem Durchgang zu analysieren, wobei interne Kontrollen Aufschluss über den PCR- und den Hybridisierungsschritt geben. Andererseits müsste im Routineeinsatz ein Chip für die Extraktionskontrolle verwendet werden, worauf in dieser Arbeit durch die parallele Untersuchung der Extrakte mit dem CIB-A-Kit verzichtet wer-

den konnte. Trotz der günstigen Kosten für den Testkit ist außerdem der finanzielle Aufwand für die notwendigen Geräte sehr hoch.

Im Gegensatz dazu sind die geringen Kosten für die benötigten Apparate und das Verbrauchsmaterial als ein Vorteil des **ELISA** zu erwähnen. Auch hier hat man ähnlich dem CIB-A-Kit die Möglichkeit, auf mehrere Tierarten parallel zu untersuchen oder gezielt nur den Nachweis einer Spezies durchzuführen. Der Umgang mit der Methode kann leicht erlernt werden und der Zeitaufwand zur Durchführung ist relativ gering, so dass man für 5 oder mehr Proben in Abhängigkeit der Zahl an eingesetzten Mikrotiterstreifen schnell ein Ergebnis erhalten wird. Die Nachweisgrenze liegt mit 0,5% über denen der beiden anderen untersuchten Methoden und ist damit weniger geeignet kleinste Kontamination zu detektieren. Die Auswertung erfolgt über einen Cuf-Off-Wert und ist damit ebenso objektiv wie die Ergebnisse der Report Software des CarnoCheck®. Der ELISA eignet sich besonders für Screening-Untersuchungen. Ebenso können auch spezielle Fragestellungen untersucht werden, sofern keine Differenzierung von Huhn und Pute notwendig wird, da diese mittels ELISA nicht möglich ist.

Zusammenfassend dargestellt, stehen die Vorteile der Sensitivität und die Möglichkeit der Differenzierung der Tierarten Huhn und Pute auf der Seite des CIB-A-Kit und des CarnoCheck®. Diese Überlegenheit der molekularbiologischen Methoden gegenüber der protein-basierenden Methode wird teilweise durch den geringeren finanziellen Aufwand und die Schnelligkeit des ELISA aufgewogen. Ebenso kann der Ablauf des ELISAs leicht und ohne besondere Vorkenntnisse erlernt werden. Im Gegensatz dazu sind für die Durchführung des CarnoCheck® bzw. des CIB-A-Kit molekularbiologische Grundkenntnisse hilfreich bzw. notwendig. Es wurde deutlich, wie kostenintensiv nukleinsäure-basierende Methoden im Vergleich zu protein-basierenden Untersuchungen sind. Zudem hat sich der ELISA im Routineeinsatz seit Jahren bewährt. Dennoch werden Forderungen nach der Verwendung der sensitiveren, modernen molekularbiologischen Methoden laut. Im Vergleich schneidet hier der CarnoCheck® durch seine Schnelligkeit, leichte Handhabung sowie durch den Vorteil der integrierten Kontrollen besser ab. Ist der CIB-A-Kit nach erheblichem Aufwand etabliert, stellt er dagegen die günstigere Möglichkeit zur Untersuchung einzelner Proben dar. So könnte der CarnoCheck® den ELISA als Screening-Verfahren ablösen, während dem CIB-A-Kit eher eine Rolle als Kontroll-Verfahren unschlüssiger ELISA-Ergebnisse zukommt.

## 5 Schlussfolgerungen

1. Die Etablierung des CIB-A-Kit gestaltete sich sehr aufwendig. Im Vergleich verschiedener Polymerasen wurde die Verwendung der Qiagen-Taq-Polymerase als geeignet für die Durchführung des CIB-A-Kits beurteilt.
2. Für den Einsatz der Qiagen-Taq-Polymerase ergaben sich folgende Annealingtemperaturen der jeweiligen tierartsspezifischen Primer. Die Rind- und Huhn-Standard Primer benötigten 62°C, für die Puten-Standard Primer war eine Temperatur von 63°C notwendig und für die Schwein-Standard Primer lag diese entsprechend bei 60°C.
3. Die Nachweisgrenzen des CIB-A-Kit und des CarnoCheck® wurden für die Tierarten Rind, Huhn, Pute und Schwein bei mindestens 0,1% festgelegt. Damit unterschieden sich diese signifikant in der Sensitivität vom ELISA-Testkit, für den ein Detektionslimit für diese Tierarten von 0,5% ermittelt wurde.
4. Der CIB-A-Kit und der CarnoCheck® waren für die Spezies Rind, Huhn sowie Pute spezifisch. Der ELISA-Testkit war für Rind spezifisch, ermöglicht jedoch keine Differenzierung zwischen verschiedenen Geflügelarten.
5. Die molekularbiologischen Methoden sind bezüglich der Investitions-Kosten wesentlich teurer als der protein-basierende ELISA. Die laufenden Kosten für Reagenzien, Testkit und Verbrauchsmaterial waren dagegen mit dem CarnoCheck® am günstigsten.
6. Der zeitliche Aufwand für den CIB-A-Kit war am größten, so dass eine Untersuchung von 12 Proben auf 4 Tierarten nicht innerhalb eines Tages möglich war. Die Analyse mittels ELISA erbrachte dagegen in durchschnittlich 5 h 42 min Ergebnisse, und war damit die schnellste der drei Methoden.
7. Der CarnoCheck® und der ELISA-Testkit können optimal als Screening-Verfahren eingesetzt werden, da kein oder nur ein geringer Mehraufwand für die Untersuchung auf mehrere Tierarten in Kauf genommen werden muss.
8. Der CIB-A-Kit eignet sich als Kontrollverfahren zur Bestätigung der Ergebnisse anderer Nachweismethoden durch die flexible Gestaltung der zu untersuchenden Proben-Anzahl und die tierartsspezifischen Premix-Ansätze.

## 6 Zusammenfassung

Drei kommerzielle Testkits wurden in Hinblick auf ihre Routinetauglichkeit zum Tierartenachweis untersucht. Den Bereich der protein-basierenden Verfahren vertrat der ELISA-Testkit von Transia. Als molekularbiologische Methoden wurden einerseits ein DNS-Chip (CarnoCheck®) und andererseits eine PCR auf Basis von Spezies-spezifischen Primern (CIB-A-Kit) eingesetzt.

In Vorversuchen wurde mittels zufällig aus dem Handel ausgewählten Wurstproben ein zeitliches Durchführungsprotokoll für den Hauptversuch ausgearbeitet und der CIB-A-Kit etabliert. Bei der Ermittlung der Annealingtemperaturen für die tierartspezifischen Primer dieses Testkits wurde die Qiagen-Taq-Polymerase als geeigneter für die Durchführung als der Eppendorf MasterMix 2,5x befunden, da mit letzterem unspezifische Banden in Zusammenhang mit den Rind-Standard Primern auftraten. Der CarnoCheck® und der Tierarten-ELISA mussten nicht weiter angepasst werden.

Mit Hilfe von Modellwürsten bekannter tierartlicher Zusammensetzung wurde im Hauptversuch die spezielle Untersuchung der Testkits in Hinblick auf Sensitivität, Spezifität, Zeit- und Kostenaufwand durchgeführt. Hierfür wurden 240 Proben in 20 Versuchsläufen à 12 Brühwürsten mit Konzentrationen der nachzuweisenden Tierarten Rind, Schwein, Huhn und Pute von 0,1% sowie 0,5% und 1,0% untersucht. Die Vorteile einer Sensitivität von 0,1% und die Möglichkeit der Differenzierung der Tierarten Huhn und Pute lagen auf Seiten des CIB-A-Kit und des CarnoCheck®. Der ELISA erreichte dagegen nur eine Sensitivität von 0,5%, ohne zwischen den Spezies Huhn und Pute differenzieren zu können, obwohl der Geflügel-ELISA signifikant ( $p=0,006$ ) sensitiver für Pute war. Allen Testkits gemeinsam war eine hohe Spezifität gegenüber den getesteten Spezies.

Die Kosten für den ELISA lagen im Bereich der Reagenzien, der Verbrauchsmaterialien und der Geräte deutlich unterhalb des finanziellen Aufwandes, der für die beiden molekularbiologischen Methoden notwendig war. Diese benötigten vor allem kostspielige Geräte wie u.a. Thermocycler, Microarray-Scanner und UV-Kamera für die Analyse. Bezüglich der laufenden Analysekosten war der CarnoCheck® dagegen äußerst preiswert im Vergleich zu den anderen beiden Verfahren.

In Hinblick des zeitlichen Aufwandes lag der ELISA mit knapp  $5 \frac{3}{4}$  Stunden vor dem CarnoCheck® mit ca.  $8 \frac{1}{2}$  Stunden für die Analyse von 12 Proben. Beide hatten einen deutlichen Abstand zum CIB-A-Kit, der für die Untersuchung von 12 Proben auf 4 Tierarten ca. 13 Stunden in Anspruch nahm. Im Routineeinsatz hat sich der ELISA seit Jahren bewährt, könnte jedoch vom CarnoCheck® als Screening Verfahren abgelöst werden, während der CIB-A-Kit eher zur Kontrolle unschlüssiger ELISA-Ergebnisse einsetzbar ist.

## 7 Summary

### **Comparison of three commercial test kits for species identification in meat products**

In order to determine their suitability for routine use, three commercial kits for the species identification of meat products were compared. On the one hand, the ELISA-Kit (Transia) was used, representing a protein-based method. On the other hand, molecular biology methods were examined, a DNA-Chip (CarnoCheck®) and a polymerase chain reaction using species specific primer pairs (CIB-A-Kit).

In preliminary experiments, randomly chosen commercial meat products were examined using these three procedures. Thus, the time table for the main experiments was determined and the CIB-A-Kit was established in the laboratory. The Qiagen-Taq-Polymerase was considered suitable for use with the CIB-A-Kit, while unspecific bands were obtained with the Eppendorf MasterMix 2.5x. An adaption of the CarnoCheck® and the ELISA was not necessary.

In the main experiment, the kits were examined for their specificity and sensitivity as well as the time and money required for each method. For this, 20 batches of model sausages heat-treated at 75°C for 45 min were tested. Each of these batches contained 12 different models resulting in a total of 240 samples. The identification of beef, chicken, turkey and pork in concentrations of 0.1, 0.5 and 1.0% was examined.

The CIB-A-Kit and the CarnoCheck® had the advantages of a detection limit of 0.1% and the ability to differentiate between chicken and turkey. With the ELISA it was only possible to reliably identify 0.5% without enabling a differentiation between chicken and turkey, although there was a significantly ( $p=0.006$ ) higher sensitivity of the poultry kit for turkey as compared to chicken meat. All three kits showed a high specificity for the species tested.

Because of the expensive equipment needed for the molecular biological methods (e.g. thermocycler, microarrayscanner, UV-camera) these expenses ranged clearly above those required for the ELISA. On the other hand, the CarnoCheck® had the lowest permanent costs.

The fastest method was the ELISA which yielded results within almost 5  $\frac{3}{4}$  hours. To examine 12 samples the CarnoCheck® required nearly 8  $\frac{1}{2}$  hours, while the CIB-A-Kit needed approximately 13 hours for the identification of four species in 12 samples.

The ELISA method has been applied in routine use for several years, yet the CarnoCheck® could replace this technique as a screening method. On the contrary, the CIB-A-Kit is suitable for the confirmation of ambiguous test results obtained with protein based methods.

## 8 Anhang

### 8.1 Material-Tabellen

Tab. 46 Reagenzien

<b>Produkt</b>	<b>Hersteller,Ort</b>	<b>Artikelnr.</b>
Agarose	Biorad, München	161-3101
Bromphenolblau	Merck, Ismaning	8122.0005
Druckluft 67	Kontakt Chemie, CRC Industries De. GmbH, Iffezheim	85513
Ethanol für Mol.biol., > 99,8%	Merck, Ismaning	1.08543.0250
Ethidiumbromidlösung 10 mg/ml	Biorad, München	161-0433
Glycerin	Merck, Ismaning	1.04094.1000
Natriumchlorid	Merck, Ismaning	1.06404.1000
10x TBE-Puffer	Biorad, München	161-0733
Water molecular biology grade	Eppendorf, Wesseling-Berzdorf	0032 006.302

Tab. 47 Sonstige Geräte

Bezeichnung	Hersteller, Ort	Typenbezeichnung	Artikelnr.
Abzug / Flow	Heraeus, Hanau	HERA Safe® HS 12	51018110
Arbeitshaube	Erlab, Köln	captair® bio Biocap DNA	135-6576
Becherglas	VWR, Schott, Mainz	Duran®, 150 ml, hohe Form	213-1156
Blockthermostat	Eppendorf, Wesseling-Berzdorf	Thermostat plus	5352 000.010
Blockaufsatz	Eppendorf, Wesseling-Berzdorf	Wechselblock für 4x 50 ml Flacon®-Gefäße	5362 000.010
Blockthermostat	Eppendorf, Wesseling-Berzdorf	Thermomixer comfort	5355 000.011
Blockaufsatz	Eppendorf, Wesseling-Berzdorf	Wechselblock für 24x 2 ml	5362 000.011
Hybridisierungs-kammer	Greiner Bio-One, Frickenhausen	Gelbes Standard rack, ST- rack	973-202
Mikrowelle	micromaxx®	MM6460	----
Minishaker (Vortexer)	VELP, Usmate, Milano, Italien	Scientifica Z x <sup>3</sup>	F20220176
Orbital-Schüttler	VWR, Heidolph, Schwabach	TITRAMAX 1000	444-1391
Pipetten	Eppendorf, Wesseling-Berzdorf	Research 0,5-10 µl	3111 000.122
Pipetten	Eppendorf, Wesseling-Berzdorf	Research 20-200 µl	3111 000.149
Pipetten	Eppendorf, Wesseling-Berzdorf	Research 100-1000 µl	3111 000.165
Präzisionswaage	Sartorius, Göttingen	MC 1 Analytic AC 2103	----
Schüttelbad	GFL®, Burgwedel	1083	4625171
Tischzentrifuge	Eppendorf, Wesseling-Berzdorf	centrifuge 5415 D	5425 000.219
Tischzentrifuge	Eppendorf, Wesseling-Berzdorf	Centrifuge MiniSpin® plus	5453 000.011
Trichter	VWR, Göttingen	PP, Ø 50 mm	221-1234
Waage	Sartorius, Göttingen	CP 3202S-OCE	----
Weithals-Flasche mit Schraubverschluss	VWR, Ismaning	Klarglas, 250 ml	215-1805
Zerkleinerer	Moulinex, Radolfzell	La Moulinette®	DPA 648

## 8.2 Ergebnis-Tabellen

Tab. 48 Ergebnisse für die Modellwürste mit Rind als Nebentierart

Probe	CIB-A-Kit				CarnoCheck®				ELISA		
	R	H	P	S	R	H	P	S	R	Gf	S
0,1RS/1	1	0	1	1	0	0	0	1	0	0	1
0,1RS/2	1	0	1	1	1	0	0	1	0	0	1
0,1RS/3	1	0	0	1	1	0	0	1	0	0	1
0,1RS/4	1	0	0	1	1	0	0	1	0	0	1
0,1RS/5	1	0	0	1	0	0	0	1	0	0	1
0,1RS/6	1	0	0	1	1	0	0	1	0	0	1
0,1RS/7	1	0	0	1	1	0	0	1	0	0	1
0,1RS/8	1	0	0	1	1	0	0	1	0	0	1
0,1RS/9	1	0	0	1	1	0	0	1	0	0	1
0,1RS/10	1	0	0	1	1	0	0	1	0	0	1
0,1RS/11	1	0	1	1	1	0	0	1	0	0	1
0,1RS/12	1	0	0	1	1	0	0	1	0	0	1
0,1RS/13	1	0	0	1	1	0	0	1	1	0	1
0,1RS/14	1	0	0	1	1	0	0	1	1	0	1
0,1RS/15	1	0	0	1	1	0	0	1	1	0	1
0,1RS/16	1	0	0	1	1	0	0	1	0	0	1
0,1RS/17	1	0	0	1	0	0	0	1	0	0	1
0,1RS/18	1	0	0	1	0	0	0	1	0	0	1
0,1RS/19	1	0	0	1	0	0	0	1	0	0	1
0,1RS/20	1	0	0	1	1	0	0	1	0	0	1
0,5RS/1	1	0	0	1	1	0	0	1	1	0	1
0,5RS/2	1	0	1	1	1	0	0	1	1	0	1
0,5RS/3	1	0	0	1	1	0	0	1	1	0	1
0,5RS/4	1	0	0	1	1	0	0	1	1	0	1
0,5RS/5	1	0	0	1	1	0	0	1	1	0	1
0,5RS/6	1	0	0	1	1	0	0	1	1	0	1
0,5RS/7	1	0	0	1	1	0	0	1	1	0	1
0,5RS/8	1	0	0	1	1	0	0	1	1	1	1
0,5RS/9	1	0	0	1	1	0	0	1	1	0	1
0,5RS/10	1	0	0	1	1	0	0	1	1	0	1
0,5RS/11	1	0	0	1	1	0	0	1	1	0	1
0,5RS/12	1	0	0	1	1	0	0	1	1	0	1
0,5RS/13	1	0	0	1	1	0	0	1	1	0	1
0,5RS/14	1	0	0	1	1	0	0	1	1	0	1
0,5RS/15	1	0	0	1	1	0	0	1	1	0	1
0,5RS/16	1	0	0	1	1	0	0	1	1	0	1
0,5RS/17	1	0	0	1	1	0	0	1	1	0	1
0,5RS/18	1	0	0	1	1	0	0	1	1	0	1
0,5RS/19	1	0	0	1	1	0	0	1	1	0	1
0,5RS/20	1	0	0	1	1	0	0	1	1	0	1
1RS/1	1	0	1	1	1	0	0	1	1	0	1
1RS/2	1	0	0	1	1	0	0	1	1	0	1
1RS/3	1	0	0	1	1	0	0	1	1	0	1
1RS/4	1	0	0	1	1	0	0	1	1	0	1
1RS/5	1	0	0	1	1	0	0	1	1	0	1
1RS/6	1	0	0	1	1	0	0	1	1	0	1
1RS/7	1	0	0	1	1	0	0	1	1	0	1
1RS/8	1	0	0	1	1	0	0	1	1	1	1
1RS/9	1	0	0	1	1	0	0	1	1	0	1
1RS/10	1	0	0	1	1	0	0	1	1	0	1
1RS/11	1	0	0	1	1	0	0	1	1	0	1
1RS/12	1	0	0	1	1	0	0	1	1	0	1
1RS/13	1	0	0	1	1	0	0	1	1	0	1
1RS/14	1	0	0	1	1	0	0	1	1	0	1
1RS/15	1	0	0	1	1	0	0	1	1	0	1
1RS/16	1	0	0	1	1	0	0	1	1	0	1
1RS/17	1	0	0	1	1	0	0	1	1	0	1
1RS/18	1	0	0	1	1	0	0	1	1	0	1
1RS/19	1	0	0	1	1	0	0	1	1	0	1
1RS/20	1	0	0	1	1	0	0	1	1	0	1

Gf - Geflügel, H - Huhn, P - Pute, R - Rind, S – Schwein, 1 – nachgewiesen, 0 – nicht nachgewiesen

Tab. 49 Ergebnisse für die Modellwürste mit Huhn als Nebentierart

Probe	CIB-A-Kit				CarnoCheck®				ELISA		
	R	H	P	S	R	H	P	S	R	Gf	S
0,1HS/1	0	1	0	1	0	1	0	1	0	0	1
0,1HS/2	0	1	0	1	0	1	0	1	0	0	1
0,1HS/3	0	1	0	1	0	1	0	1	0	0	1
0,1HS/4	0	1	0	1	0	1	0	1	0	0	1
0,1HS/5	0	1	0	1	0	1	0	1	0	1	1
0,1HS/6	0	1	0	1	0	1	0	1	0	0	1
0,1HS/7	0	1	0	1	0	1	0	1	0	0	1
0,1HS/8	0	1	0	1	0	1	0	1	0	1	1
0,1HS/9	0	1	0	1	0	1	0	1	0	0	1
0,1HS/10	0	1	0	1	0	1	0	1	0	0	1
0,1HS/11	0	1	0	1	0	1	0	1	0	0	1
0,1HS/12	0	1	0	1	0	1	0	1	0	0	1
0,1HS/13	0	1	0	1	0	1	0	1	0	0	1
0,1HS/14	0	1	0	1	0	1	0	1	0	0	1
0,1HS/15	0	1	0	1	0	1	0	1	0	0	1
0,1HS/16	0	1	0	1	0	1	0	1	0	0	1
0,1HS/17	0	1	0	1	0	1	0	1	0	0	1
0,1HS/18	0	1	0	1	0	1	0	1	0	0	1
0,1HS/19	0	1	0	1	0	1	0	1	0	0	1
0,1HS/20	0	1	0	1	0	1	0	1	0	0	1
0,5HS/1	0	1	0	1	0	1	0	1	0	1	1
0,5HS/2	0	1	0	1	0	1	0	1	0	1	1
0,5HS/3	0	1	0	1	0	1	0	1	0	1	1
0,5HS/4	0	1	0	1	0	1	0	1	0	1	1
0,5HS/5	0	1	0	1	0	1	0	1	0	1	1
0,5HS/6	0	1	0	1	0	1	0	1	0	1	1
0,5HS/7	0	1	0	1	0	1	0	1	0	1	1
0,5HS/8	0	1	0	1	0	1	0	1	0	1	1
0,5HS/9	0	1	0	1	0	1	0	1	0	1	1
0,5HS/10	0	1	0	1	0	1	0	1	0	1	1
0,5HS/11	0	1	0	1	0	1	0	1	0	1	1
0,5HS/12	0	1	0	1	0	1	0	1	0	1	1
0,5HS/13	0	1	0	1	0	1	0	1	0	1	1
0,5HS/14	0	1	0	1	0	1	0	1	0	1	1
0,5HS/15	0	1	0	1	0	1	0	1	0	1	1
0,5HS/16	0	1	0	1	0	1	0	1	0	1	1
0,5HS/17	0	1	0	1	0	1	0	1	0	1	1
0,5HS/18	0	1	0	1	0	1	0	1	0	1	1
0,5HS/19	0	1	0	1	0	1	0	1	0	1	1
0,5HS/20	0	1	0	1	0	1	0	1	0	1	1
1HS/1	0	1	0	1	0	1	0	1	0	1	1
1HS/2	0	1	0	1	0	1	0	1	0	1	1
1HS/3	0	1	0	1	0	1	0	1	0	1	1
1HS/4	0	1	0	1	0	1	0	1	0	1	1
1HS/5	0	1	0	1	0	1	0	1	0	1	1
1HS/6	0	1	0	1	0	1	0	1	0	1	1
1HS/7	0	1	0	1	0	1	0	1	0	1	1
1HS/8	0	1	0	1	0	1	0	1	0	1	1
1HS/9	0	1	0	1	0	1	0	1	0	1	1
1HS/10	0	1	0	1	0	1	0	1	0	1	1
1HS/11	0	1	0	1	0	1	0	1	0	1	1
1HS/12	0	1	0	1	0	1	0	1	0	1	1
1HS/13	0	1	0	1	0	1	0	1	0	1	1
1HS/14	0	1	0	1	0	1	0	1	0	1	1
1HS/15	0	1	0	1	0	1	0	1	0	1	1
1HS/16	0	1	0	1	0	1	0	1	0	1	1
1HS/17	0	1	0	1	0	1	0	1	0	1	1
1HS/18	0	1	0	1	0	1	0	1	0	1	1
1HS/19	0	1	0	1	0	1	0	1	0	1	1
1HS/20	0	1	0	1	0	1	0	1	0	1	1

Gf - Geflügel, H - Huhn, P - Pute, R - Rind, S – Schwein, 1 – nachgewiesen, 0 – nicht nachgewiesen

Tab. 50 Ergebnisse für die Modellwürste mit Pute als Nebentierart

Probe	CIB-A-Kit		CIB-A-Kit		CarnoCheck®		CarnoCheck®		ELISA	ELISA	ELISA
	R	H	P	S	R	H	P	S			
0,1PS/1	0	0	1	1	0	0	1	1	0	0	1
0,1PS/2	0	0	1	1	0	0	1	1	0	0	1
0,1PS/3	0	0	1	1	0	0	1	1	0	0	1
0,1PS/4	0	0	1	1	0	0	1	1	0	0	1
0,1PS/5	0	0	1	1	0	0	1	1	0	1	1
0,1PS/6	0	0	1	1	0	0	1	1	0	1	1
0,1PS/7	0	0	1	1	0	0	1	1	0	0	1
0,1PS/8	0	0	1	1	0	0	1	1	0	1	1
0,1PS/9	0	0	1	1	0	0	1	1	0	0	1
0,1PS/10	0	0	1	1	0	0	0	1	0	0	1
0,1PS/11	0	0	1	1	0	0	1	1	0	0	1
0,1PS/12	0	0	1	1	0	0	1	1	0	1	1
0,1PS/13	0	0	1	1	0	0	1	1	0	1	1
0,1PS/14	0	0	1	1	0	0	1	1	0	1	1
0,1PS/15	0	0	1	1	0	0	1	1	0	1	1
0,1PS/16	0	0	1	1	0	0	1	1	0	1	1
0,1PS/17	0	0	1	1	0	0	1	1	0	1	1
0,1PS/18	0	0	1	1	0	0	1	1	0	1	1
0,1PS/19	0	0	1	1	0	0	1	1	0	1	1
0,1PS/20	0	0	1	1	0	0	1	1	0	0	1
0,5PS/1	0	0	1	1	0	0	1	1	0	1	1
0,5PS/2	0	0	1	1	0	0	1	1	0	1	1
0,5PS/3	0	0	1	1	0	0	1	1	0	1	1
0,5PS/4	0	0	1	1	0	0	1	1	0	1	1
0,5PS/5	0	0	1	1	0	0	1	1	0	1	1
0,5PS/6	0	0	1	1	0	0	1	1	0	1	1
0,5PS/7	0	0	1	1	0	0	1	1	0	1	1
0,5PS/8	0	0	1	1	0	0	1	1	0	1	1
0,5PS/9	0	0	1	1	0	0	1	1	0	1	1
0,5PS/10	0	0	1	1	0	0	1	1	0	1	1
0,5PS/11	0	0	1	1	0	0	1	1	0	1	1
0,5PS/12	0	0	1	1	0	0	1	1	0	1	1
0,5PS/13	0	0	1	1	0	0	1	1	0	1	1
0,5PS/14	0	0	1	1	0	0	1	1	0	1	1
0,5PS/15	0	0	1	1	0	0	1	1	0	1	1
0,5PS/16	0	1	1	1	0	0	1	1	0	1	1
0,5PS/17	0	1	1	1	0	0	1	1	0	1	1
0,5PS/18	0	0	1	1	0	0	1	1	0	1	1
0,5PS/19	0	0	1	1	0	0	1	1	0	1	1
0,5PS/20	0	0	1	1	0	0	1	1	0	1	1
1PS/1	0	0	1	1	0	0	1	1	0	1	1
1PS/2	0	0	1	1	0	0	1	1	0	1	1
1PS/3	0	0	1	1	0	0	1	1	0	1	1
1PS/4	0	0	1	1	0	0	1	1	0	1	1
1PS/5	0	0	1	1	0	0	1	1	0	1	1
1PS/6	0	0	1	1	0	0	1	1	0	1	1
1PS/7	0	0	1	1	0	0	1	1	0	1	1
1PS/8	0	0	1	1	0	0	1	1	0	1	1
1PS/9	0	0	1	1	0	0	1	1	0	1	1
1PS/10	0	0	1	1	0	0	1	1	0	1	1
1PS/11	0	0	1	1	0	0	1	1	0	1	1
1PS/12	0	0	1	1	0	0	1	1	0	1	1
1PS/13	0	0	1	1	0	0	1	1	0	1	1
1PS/14	0	0	1	1	0	0	1	1	0	1	1
1PS/15	0	0	1	1	0	0	1	1	0	1	1
1PS/16	0	1	1	1	0	0	1	1	0	1	1
1PS/17	0	1	1	1	0	0	1	1	0	1	1
1PS/18	0	0	1	1	0	0	1	1	0	1	1
1PS/19	0	0	1	1	0	0	1	1	0	1	1
1PS/20	0	0	1	1	0	0	1	1	0	1	1

Gf - Geflügel, H - Huhn, P - Pute, R - Rind, S - Schwein, 1 - nachgewiesen, 0 - nicht nachgewiesen

Tab. 51 Ergebnisse für die Modellwürste mit Schwein als Nebentierart

Probe	CIB-A-Kit				CarnoCheck®				ELISA	ELISA	ELISA
	R	H	P	S	R	H	P	S	R	Gf	S
0,1SHP/1	0	1	1	1	0	1	1	1	0	1	0
0,1SHP/2	0	1	1	1	0	1	1	1	0	1	0
0,1SHP/3	0	1	1	1	0	1	1	1	0	1	0
0,1SHP/4	0	1	1	1	0	1	1	1	0	1	1
0,1SHP/5	0	1	1	1	0	1	1	1	0	1	0
0,1SHP/6	0	1	1	1	0	1	1	1	0	1	0
0,1SHP/7	0	1	1	1	0	1	1	1	0	1	0
0,1SHP/8	0	1	1	1	0	1	1	0	0	1	0
0,1SHP/9	0	1	1	1	0	1	1	1	0	1	0
0,1SHP/10	0	1	1	1	0	1	1	1	0	1	0
0,1SHP/11	0	1	1	1	0	1	1	1	0	1	0
0,1SHP/12	0	1	1	1	0	1	1	1	0	1	1
0,1SHP/13	0	1	1	1	0	1	1	1	0	1	0
0,1SHP/14	0	1	1	1	0	1	1	1	0	1	0
0,1SHP/15	0	1	1	1	0	1	1	1	0	1	0
0,1SHP/16	0	1	1	1	0	1	1	1	0	1	0
0,1SHP/17	0	1	1	1	0	1	1	1	0	1	0
0,1SHP/18	0	1	1	1	0	1	1	1	0	1	0
0,1SHP/19	0	1	1	1	0	1	1	1	0	1	0
0,1SHP/20	0	1	1	1	0	1	1	1	0	1	0
0,5SHP/1	0	1	1	1	0	1	1	1	0	1	1
0,5SHP/2	0	1	1	1	0	1	1	1	0	1	1
0,5SHP/3	0	1	1	1	0	1	1	1	0	1	1
0,5SHP/4	0	1	1	1	0	1	1	1	0	1	1
0,5SHP/5	0	1	1	1	0	1	1	1	0	1	1
0,5SHP/6	0	1	1	1	0	1	1	1	0	1	1
0,5SHP/7	0	1	1	1	0	1	1	1	0	1	1
0,5SHP/8	0	1	1	1	0	1	1	1	0	1	1
0,5SHP/9	0	1	1	1	0	1	1	1	0	1	1
0,5SHP/10	0	1	1	1	0	1	1	1	0	1	1
0,5SHP/11	0	1	1	1	0	1	1	1	0	1	1
0,5SHP/12	0	1	1	1	0	1	1	1	0	1	1
0,5SHP/13	0	1	1	1	0	1	1	0	0	1	1
0,5SHP/14	0	1	1	1	0	1	1	0	0	1	1
0,5SHP/15	0	1	1	1	0	1	1	1	0	1	1
0,5SHP/16	0	1	1	1	0	1	1	1	0	1	1
0,5SHP/17	0	1	1	1	0	1	1	1	0	1	1
0,5SHP/18	0	1	1	1	0	1	1	1	0	1	1
0,5SHP/19	0	1	1	1	0	1	1	1	0	1	1
0,5SHP/20	0	1	1	1	0	1	1	1	0	1	1
1SHP/1	0	1	1	1	0	1	1	1	0	1	1
1SHP/2	0	1	1	1	0	1	1	1	0	1	1
1SHP/3	0	1	1	1	0	1	1	1	0	1	1
1SHP/4	0	1	1	1	0	1	1	1	0	1	1
1SHP/5	0	1	1	1	0	1	1	1	0	1	1
1SHP/6	0	1	1	1	0	1	1	1	0	1	1
1SHP/7	0	1	1	1	0	1	1	1	0	1	1
1SHP/8	0	1	1	1	0	1	1	1	0	1	1
1SHP/9	0	1	1	1	0	1	1	1	0	1	1
1SHP/10	0	1	1	1	0	1	1	1	0	1	1
1SHP/11	0	1	1	1	0	1	1	1	0	1	1
1SHP/12	0	1	1	1	0	1	1	1	0	1	1
1SHP/13	0	1	1	1	0	1	1	1	0	1	1
1SHP/14	0	1	1	1	0	1	1	1	0	1	1
1SHP/15	0	1	1	1	0	1	1	1	0	1	1
1SHP/16	0	1	1	1	0	1	1	1	0	1	1
1SHP/17	0	1	1	1	0	1	1	1	0	1	1
1SHP/18	0	1	1	1	0	1	1	1	0	1	1
1SHP/19	0	1	1	1	0	1	1	1	0	1	1
1SHP/20	0	1	1	1	0	1	1	1	0	1	1

Gf - Geflügel, H - Huhn, P - Pute, R - Rind, S – Schwein, 1 – nachgewiesen, 0 – nicht nachgewiesen

### 8.3 Statistik-Tabellen

#### Nicht parametrische Tests durchgeführt mit SPSS® 15.0 Windows Evaluation Version (spss Inc.)

Zu jedem Testverfahren ist der verwendete Filter und die ausgeführte Syntax mit angegeben. Die Datentabelle bestand aus den in Kapitel 8.2 aufgeführten Tabellen. Lieferte der Cochran-Test kein signifikantes Ergebnis oder konnte er aufgrund dichotomer Werte nicht durchgeführt werden, ist kein Test nach McNemar angewendet worden. NT gibt die Nebentierart an, wobei 1 = Huhn, 2 = Pute, 3 = Rind und 4 = Schwein bedeutet. 0 definiert „nicht nachgewiesen“, 1 bedeutet „nachgewiesen“. Die Ergebnisse sind mit drei Dezimalstellen nach dem Komma angegeben. Der Wert ,000 ist daher nicht mit Null gleichzusetzen.

#### Vergleich der Sensitivität

NT= Rind

---

#### Cochran-Test

Konz = 0.1 & NT = 3 (FILTER)

NPART TESTS

/COCHRAN = ELISARd CarnoCheck®Rd CIB-A-Kit Rd  
/MISSING LISTWISE.

**Häufigkeiten**

	Wert	
	0	1
CIB-A-Kit Rind	0	20
CarnoCheck® Rind	5	15
ELISA Rind	17	3

**Statistik für Test**

N	20
Cochrans Q-Test	26,941(a)
df	2
Asymptotische Signifikanz	,000

a 0 wird als Erfolg behandelt.

#### McNemar-Test

Konz = 0.1 & NT = 3 (FILTER)

NPART TEST

/MCNEMAR= ELISARd ELISARd CIB-A-KitRd WITH CIB-A-KitRd CarnoCheck®Rd CarnoCheck®Rd  
(PAIRED)  
/MISSING ANALYSIS  
/METHOD=EXACT TIMER(5).

## Kreuztabellen

**ELISA Rind & CIB-A-Kit Rind**

ELISA Rind	CIB-A-Kit Rind	
	0	1
0	0	17
1	0	3

**ELISA Rind & CarnoCheck® Rind**

ELISA Rind	CarnoCheck® Rind	
	0	1
0	5	12
1	0	3

**CIB-A-Kit Rind & CarnoCheck® Rind**

CIB-A-Kit Rind	CarnoCheck® Rind	
	0	1
0	0	0
1	5	15

**Statistik für Test(b)**

	ELISA Rind & CIB-A-Kit Rind	ELISA Rind & CarnoCheck® Rind	CIB-A-Kit Rind & CarnoCheck® Rind
N	20	20	20
Exakte Signifikanz (2-seitig)	,000(a)	,000(a)	,063(a)
Exakte Signifikanz (1-seitig)	,000	,000	,031
Punkt-Wahrscheinlichkeit	,000	,000	,031

a Verwendete Binomialverteilung.

b McNemar-Test

## Cochran-Test

Konz = 0.5 & NT = 3 (FILTER)

NPAR TESTS

/COCHRAN = ELISARd CarnoCheck®Rd CIB-A-KitRd

/MISSING LISTWISE.

Konz = 1.0 & NT = 3 (FILTER)

NPAR TESTS

/COCHRAN = ELISARd CarnoCheck®Rd CIB-A-KitRd

/MISSING LISTWISE.

### Warnungen

Der Cochran-Test für ELISA Rind CarnoCheck® Rind CIB-A-Kit Rind wird nicht ausgeführt, da keine Variablen mit den gleichen Werten dichotom sind.

## NT= Huhn

---

### Cochran-Test

Konz = 0.1 & NT = 1 (FILTER)

NPAR TESTS

/COCHRAN = ELISAGf CIB-A-KitHuhn CarnoCheck@Huhn  
/MISSING LISTWISE.

#### Häufigkeiten

	Wert	
	0	1
CIB-A-Kit Huhn	0	20
CarnoCheck@ Huhn	0	20
ELISA Geflügel	18	2

#### Statistik für Test

N	20
Cochrans Q-Test	36,000(a)
df	2
Asymptotische Signifikanz	,000

a 0 wird als Erfolg behandelt.

### McNemar-Test

Konz = 0.1 & NT = 1 (FILTER)

NPAR TEST

/MCNEMAR= ELISAGf ELISAGf CIB-A-KitHuhn WITH CIB-A-KitHuhn CarnoCheck@Huhn  
CarnoCheck@Huhn (PAIRED)  
/MISSING ANALYSIS  
/METHOD=EXACT TIMER(5).

#### Warnungen

Der McNemar-Test für CIB-A-Kit Huhn & CarnoCheck@ Huhn wird nicht ausgeführt, da die beiden Variablen nicht bei den gleichen Werten dichotom sind.
--

### Kreuztabellen

#### ELISA Geflügel & CIB-A-Kit Huhn

ELISA Geflügel	CIB-A-Kit Huhn	
	0	1
0	0	18
1	0	2

#### ELISA Geflügel & CarnoCheck® Huhn

ELISA Geflügel	CarnoCheck® Huhn	
	0	1
0	0	18
1	0	2

**Statistik für Test(b)**

	ELISA Geflügel & CIB-A-Kit Huhn	ELISA Geflügel & CarnoCheck® Huhn
N	20	20
Exakte Signifikanz (2-seitig)	,000(a)	,000(a)
Exakte Signifikanz (1-seitig)	,000	,000
Punkt-Wahrscheinlichkeit	,000	,000

a Verwendete Binomialverteilung.

b McNemar-Test

**Cochran-Test**

Konz = 0.5 & NT = 1 (FILTER)

NPAR TESTS

/COCHRAN = ELISAGf CIB-A-KitHuhn CarnoCheck®Huhn

/MISSING LISTWISE.

Konz = 1.0 & NT = 1 (FILTER)

NPAR TESTS

/COCHRAN = ELISAGf CIB-A-KitHuhn CaCHuhn

/MISSING LISTWISE.

**Warnungen**

Der Cochran-Test für ELISA Geflügel CIB-A-Kit Huhn CarnoCheck® Huhn wird nicht ausgeführt, da keine Variablen mit den gleichen Werten dichotom sind.

**NT= Pute****Cochran-Test**

Konz = 0.1 & NT = 2 (FILTER)

NPAR TESTS

/COCHRAN = ELISAGf CIB-A-KitPute CarnoCheck®Pute

/MISSING LISTWISE.

**Häufigkeiten**

	Wert	
	0	1
CIB-A-Kit Pute	0	20
CarnoCheck® Pute	1	19
ELISA Geflügel	9	11

**Statistik für Test**

N	20
Cochrans Q-Test	16,222(a)
df	2
Asymptotische Signifikanz	,000

a 0 wird als Erfolg behandelt.

## McNemar-Test

Konz = 0.1 & NT = 2 (FILTER)

NPAR TEST

```
/MCNEMAR= ELISAGf ELISAGf CIB-A-KitPute WITH CIB-A-KitPute CarnoCheck®Pute CarnoCheck®Pute
(PAIRED)
/MISSING ANALYSIS
/METHOD=EXACT TIMER(5).
```

## Kreuztabellen

**ELISA Geflügel & CIB-A-Kit Pute**

ELISA Geflügel	CIB-A-Kit Pute	
	0	1
0	0	9
1	0	11

**ELISA Geflügel & CarnoCheck® Pute**

ELISA Geflügel	CarnoCheck® Pute	
	0	1
0	1	8
1	0	11

**CIB-A-Kit Pute & CarnoCheck® Pute**

CIB-A-Kit Pute	CarnoCheck® Pute	
	0	1
0	0	0
1	1	19

**Statistik für Test(b)**

	ELISA Geflügel & CIB-A-Kit Pute	ELISA Geflügel & CarnoCheck® Pute	CIB-A-Kit Pute & CarnoCheck® Pute
N	20	20	20
Exakte Signifikanz (2-seitig)	,004(a)	,008(a)	1,000(a)
Exakte Signifikanz (1-seitig)	,002	,004	,500
Punkt-Wahrscheinlichkeit	,002	,004	,500

a Verwendete Binomialverteilung.

b McNemar-Test

## Cochran-Test

Konz = 0.5 & NT = 2 (FILTER)

NPAR TESTS

```
/COCHRAN = ELISAGf CIB-A-KitPute CarnoCheck®Pute
/MISSING LISTWISE.
```

Konz = 1.0 & NT = 2 (FILTER)

NPAR TESTS

```
/COCHRAN = ELISAGf CIB-A-KitPute CarnoCheck®Pute
/MISSING LISTWISE.
```

### Warnungen

Der Cochran-Test für ELISA Geflügel CIB-A-Kit Pute CarnoCheck® Pute wird nicht ausgeführt, da keine Variablen mit den gleichen Werten dichotom sind.
--

## NT= Schwein

---

### Cochran-Test

Konz = 0.1 & NT = 4 (FILTER)

NPAR TESTS

/COCHRAN = ELISASw CIB-A-KitSw CarnoCheck@Sw  
/MISSING LISTWISE.

#### Häufigkeiten

	Wert	
	0	1
CIB-A-Kit Schwein	0	20
CarnoCheck@ Schwein	1	19
ELISA Schwein	18	2

#### Statistik für Test

N	20
Cochrans Q-Test	34,111(a)
df	2
Asymptotische Signifikanz	,000

a 0 wird als Erfolg behandelt.

### McNemar-Test

Konz = 0.1 & NT = 4 (FILTER)

NPAR TEST

/MCNEMAR= ELISASw ELISASw CIB-A-KitSw WITH CIB-A-KitSw CarnoCheck@Sw CarnoCheck@Sw  
(PAIRED)  
/MISSING ANALYSIS  
/METHOD=EXACT TIMER(5).

### Kreuztabellen

#### ELISA Schwein & CIB-A-Kit Schwein

ELISA Schwein	CIB-A-Kit Schwein	
	0	1
0	0	18
1	0	2

#### ELISA Schwein & CarnoCheck@ Schwein

ELISA Schwein	CarnoCheck@ Schwein	
	0	1
0	1	17
1	0	2

#### CIB-A-Kit Schwein & CarnoCheck@ Schwein

CIB-A-Kit Schwein	CarnoCheck@ Schwein	
	0	1
0	0	0
1	1	19

**Statistik für Test(b)**

	ELISA Schwein & CIB-A-Kit Schwein	ELISA Schwein & CarnoCheck® Schwein	CIB-A-Kit Schwein & CarnoCheck® Schwein
N	20	20	20
Exakte Signifikanz (2-seitig)	,000(a)	,000(a)	1,000(a)
Exakte Signifikanz (1-seitig)	,000	,000	,500
Punkt-Wahrscheinlichkeit	,000	,000	,500

a Verwendete Binomialverteilung.

b McNemar-Test

**Cochran-Test**

Konz = 0.5 & NT = 4 (FILTER)

NPAR TESTS

/COCHRAN = ELISASw CIB-A-KitSw CarnoCheck®Sw  
/MISSING LISTWISE.

**Häufigkeiten**

	Wert	
	0	1
CIB-A-Kit Schwein	0	20
CarnoCheck® Schwein	2	18
ELISA Schwein	0	20

**Statistik für Test**

N	20
Cochrans Q-Test	4,000(a)
df	2
Asymptotische Signifikanz	,135

a 1 wird als Erfolg behandelt.

**Cochran-Test**

Konz = 1.0 & NT = 4 (FILTER)

NPAR TESTS

/COCHRAN = ELISASw CIB-A-KitSw CarnoCheck®Sw  
/MISSING LISTWISE.

**Warnungen**

Der Cochran-Test für ELISA Schwein CIB-A-Kit Schwein CarnoCheck® Schwein wird nicht ausgeführt, da keine Variablen mit den gleichen Werten dichotom sind.

## Vergleich der Spezifität

### Rind-Nachweis

---

#### Cochran-Test

NT = 1 (FILTER)

NPAR TESTS

/COCHRAN = ELISARd CIB-A-KitRd CarnoCheck®Rd

/MISSING LISTWISE.

#### **Warnungen**

Der Cochran-Test für ELISA Rind CIB-A-Kit Rind CarnoCheck® Rind wird nicht ausgeführt, da keine Variablen mit den gleichen Werten dichotom sind.

#### Cochran-Test

NT = 2 (FILTER)

NPAR TESTS

/COCHRAN = ELISARd CIB-A-KitRd CarnoCheck®Rd

/MISSING LISTWISE.

#### **Warnungen**

Der Cochran-Test für ELISA Rind CIB-A-Kit Rind CarnoCheck® Rind wird nicht ausgeführt, da keine Variablen mit den gleichen Werten dichotom sind.

#### Cochran-Test

NT = 4 (FILTER)

NPAR TESTS

/COCHRAN = ELISARd CIB-A-KitRd CarnoCheck®Rd

/MISSING LISTWISE.

#### **Warnungen**

Der Cochran-Test für ELISA Rind CIB-A-Kit Rind CarnoCheck® Rind wird nicht ausgeführt, da keine Variablen mit den gleichen Werten dichotom sind.

### Huhn-Nachweis

---

#### Cochran-Test

NT = 3 (FILTER)

NPAR TESTS

/COCHRAN = CIB-A-KitHuhn CarnoCheck®Huhn ELISAGf

/MISSING LISTWISE.

**Häufigkeiten**

	Wert	
	0	1
CIB-A-Kit Huhn	60	0
CarnoCheck® Huhn	60	0
ELISA Geflügel	58	2

**Statistik für Test**

N	60
Cochrans Q-Test	4,000(a)
df	2
Asymptotische Signifikanz	,135

a 1 wird als Erfolg behandelt.

**Cochran-Test**

NT = 2 (FILTER)

NPAR TESTS

/COCHRAN = CIB-A-KitHuhn CarnoCheck®Huhn ELISAGf  
/MISSING LISTWISE.

**Häufigkeiten**

	Wert	
	0	1
CIB-A-Kit Huhn	56	4
CarnoCheck® Huhn	60	0
ELISA Geflügel	9	51

**Statistik für Test**

N	60
Cochrans Q-Test	94,627(a)
df	2
Asymptotische Signifikanz	,000

a 0 wird als Erfolg behandelt.

**McNemar-Test**

NT = 2 (FILTER)

NPAR TEST

/MCNEMAR= ELISAGf CIB-A-KitHuhn ELISAGf WITH CIB-A-KitHuhn CarnoCheck®Huhn  
CarnoCheck®Huhn (PAIRED)  
/MISSING ANALYSIS  
/METHOD=EXACT TIMER(5).

**Kreuztabellen****ELISA Geflügel & CIB-A-Kit Huhn**

ELISA Geflügel	CIB-A-Kit Huhn	
	0	1
0	9	0
1	47	4

**CIB-A-Kit Huhn & CarnoCheck® Huhn**

CIB-A-Kit Huhn	CarnoCheck® Huhn	
	0	1
0	56	0
1	4	0

**ELISA Geflügel & CarnoCheck® Huhn**

ELISA Geflügel	CarnoCheck® Huhn	
	0	1
0	9	0
1	51	0

**Statistik für Test(c)**

	ELISA Geflügel & CIB-A-Kit Huhn	CIB-A-Kit Huhn & CarnoCheck® Huhn	ELISA Geflügel & CarnoCheck® Huhn
N	60	60	60
Chi-Quadrat(a)	45,021		49,020
Asymptotische Signifikanz	,000		,000
Exakte Signifikanz (2-seitig)	,000	,125(b)	,000
Exakte Signifikanz (1-seitig)	,000	,063	,000
Punkt-Wahrscheinlichkeit	,000	,063	,000

a Kontinuität korrigiert

b Verwendete Binomialverteilung.

c McNemar-Test

**Pute-Nachweis****Cochran-Test**

NT = 3 (FILTER)

NPAR TESTS

/COCHRAN = CIB-A-KitPute CarnoCheck®Pute ELISAGf

/MISSING LISTWISE.

**Häufigkeiten**

	Wert	
	0	1
CIB-A-Kit Pute	55	5
CarnoCheck® Pute	60	0
ELISA Geflügel	58	2

**Statistik für Test**

N	60
Cochrans Q-Test	5,429(a)
df	2
Asymptotische Signifikanz	,066

a 1 wird als Erfolg behandelt.

## Cochran-Test

NT = 1 (FILTER)

NPAR TESTS

/COCHRAN = CIB-A-KitPute CarnoCheck@CPute ELISAGf  
/MISSING LISTWISE.

### Häufigkeiten

	Wert	
	0	1
CIB-A-Kit Pute	60	0
CarnoCheck® Pute	60	0
ELISA Geflügel	18	42

### Statistik für Test

N	60
Cochrans Q-Test	84,000(a)
df	2
Asymptotische Signifikanz	,000

a 0 wird als Erfolg behandelt.

## McNemar-Test

NT = 1 (FILTER)

NPAR TEST

/MCNEMAR= ELISAGf CIB-A-KitPute ELISAGf WITH CIB-A-KitPute CarnoCheck@Pute CarnoCheck@Pute  
(PAIRED)  
/MISSING ANALYSIS  
/METHOD=EXACT TIMER(5).

### Warnungen

Der McNemar-Test für CIB-A-Kit Pute & CarnoCheck® Pute wird nicht ausgeführt, da die beiden Variablen nicht bei den gleichen Werten dichotom sind.
--

## Kreuztabellen

### ELISA Geflügel & CIB-A-Kit Pute

ELISA Geflügel	CIB-A-Kit Pute	
	0	1
0	18	0
1	42	0

### ELISA Geflügel & CarnoCheck® Pute

ELISA Geflügel	CarnoCheck® Pute	
	0	1
0	18	0
1	42	0

**Statistik für Test(b)**

	ELISA Geflügel & CIB-A-Kit Pute	ELISA Geflügel & CarnoCheck® Pute
N	60	60
Chi-Quadrat(a)	40,024	40,024
Asymptotische Signifikanz	,000	,000
Exakte Signifikanz (2-seitig)	,000	,000
Exakte Signifikanz (1-seitig)	,000	,000
Punkt-Wahrscheinlichkeit	,000	,000

a Kontinuität korrigiert

b McNemar-Test

**Geflügel-Nachweis****„Cochran-Test“**

Diese Angaben entsprechen denen des Cochran-Test für den Vergleich des Pute-Nachweis (s. oben). Die Berechnung konnte so übernommen werden, da der CIB-A-Kit und der CarnoCheck® für Huhn keine „falsch positiven“ Nachweise erbrachte.

NT = 3 (FILTER)

COCHRAN = CIB-A-Kit, Gf<sup>c</sup> CarnoCheck®, Gf<sup>c</sup> ELISAGf**Häufigkeiten**

	Wert	
	0	1
CIB-A-Kit „Geflügel“	55	5
CarnoCheck® „Geflügel“	60	0
ELISA Geflügel	58	2

**Statistik für Test**

N	60
Cochrans Q-Test	5,429(a)
df	2
Asymptotische Signifikanz	,066

a 1 wird als Erfolg behandelt.

**Vergleich des Geflügel-ELISA für Huhn und Pute**

Für diese Analyse wurde ein Auszug der Gesamtdatentabelle gewählt, der nur die Ergebnisse für die Würste mit der Nebentierart Huhn und Pute enthielt. Es wurden Kreuztabellen mittels exaktem Chi-Quadrat-Test analysiert. Der verwendete Filter und die entsprechende Syntax sind angegeben. Für die Konzentrationen der Zusätze von 0,5 und 1,0% konnte wegen übereinstimmender Werte keine Analyse durchgeführt werden.

## Kreuztabellen

Konz = 0.1 (FILTER)CROSSTABS

```
/TABLES=ELISAGf BY NT
/FORMAT= AVALUE TABLES
/STATISTIC=CHISQ
/CELLS= COUNT
/COUNT ROUND CELL
/METHOD=EXACT TIMER(5).
```

### Verarbeitete Fälle

	Fälle					
	Gültig		Fehlend		Gesamt	
	N	Prozent	N	Prozent	N	Prozent
ELISA Geflügel * Nebeninhalt	40	100,0%	0	,0%	40	100,0%

### Chi-Quadrat-Tests

	Wert	df	Asymptotische Signifikanz (2-seitig)	Exakte Signifikanz (2-seitig)	Exakte Signifikanz (1-seitig)	Punkt- Wahrschein- lichkeit
Chi-Quadrat nach Pearson	9,231(b)	1	,002	,006	,003	
Kontinuitätskorrektur(a)	7,293	1	,007			
Likelihood-Quotient	9,918	1	,002	,006	,003	
Exakter Test nach Fisher				,006	,003	
Zusammenhang linear- mit-linear	9,000(c)	1	,003	,006	,003	,003
Anzahl der gültigen Fälle	40					

a Wird nur für eine 2x2-Tabelle berechnet

b 0 Zellen (,0%) haben eine erwartete Häufigkeit kleiner 5. Die minimale erwartete Häufigkeit ist 6,50.

c Die standardisierte Statistik ist 3,000.

## Kreuztabellen

Konz = 0.5 (FILTER) bzw. Konz = 1.0 (FILTER)

CROSSTABS

```
/TABLES=ELISAGf BY NT
/FORMAT= AVALUE TABLES
/STATISTIC=CHISQ
/CELLS= COUNT
/COUNT ROUND CELL
/METHOD=EXACT TIMER(5).
```

### Warnungen

Für die Kreuztabelle von ELISA Geflügel \* Nebentierart wurden keine Zusammenhangsmaße berechnet. Mindestens eine Variable in jeder 2-Wege-Tabelle, aus denen die Zusammenhangsmaße berechnet werden, ist eine Konstante.

## 8.4 Kosten-Tabellen

Tab. 52 Kosten von Polymerasen, Reagenzien und Testkits

Produkt	Hersteller, Ort	Preis
Agarose	Biorad, München	182,- € / 125 g
Carno Check® Test Kit	Greiner Bio-One, Frickenhausen	648,- € / 5x 12 DNS-Chips
CIB-A-Kit Standard 40 Huhn	Cibus, Gütersloh	525,- € / 120 Reaktionen
CIB-A-Kit Standard 40 Pute	Cibus, Gütersloh	525,- € / 120 Reaktionen
CIB-A-Kit Standard 40 Rind	Cibus, Gütersloh	525,- € / 120 Reaktionen
CIB-A-Kit Standard 40 Schwein	Cibus, Gütersloh	525,- € / 120 Reaktionen
DNeasy® Tissue Kit	Qiagen, Hilden	570,- € / 250 Stück
ELISA-Testkit DT-5021/22/23 a	Transia, Ober-Mörlen	616,- € / 96 wells
ELISA-Testkit DT-5025 b	Transia, Ober-Mörlen	697,50 € / 3x 32 wells
Druckluft 67	Kontakt Chemie, Iffezheim	12,30 € / 200 ml
Ethidiumbromidlösung 10 mg/ml	Biorad, München	64,- € / 10 ml
Hot Star Taq Polymerase	Qiagen, Hilden	129,- € / 250 U
Taq Polymerase	Qiagen, Hilden	349,- € / 1000 U
10x TBE-Puffer	Biorad, München	52,- € / 1 liter
Natriumchlorid	Merck, Ismaning	20,25 € / 1 kg

a – je ein Testkit pro Tierart, b – 3 Tierarten pro Testkit

Tab. 53 Verbrauch von Polymerasen, Reagenzien und Testkits bei 12 Proben

Artikel	CIB-A-Kit ½	CIB-A-Kit	CarnoCheck®	ELISA a	ELISA b
Agarose	2,4 g	2,4 g			
Druckluft (Dose)			1/20		
Ethidiumbromid	25 µl	25 µl			
NaCl				10,8 g	10,8 g
Extraktionskit	1/19,2	1/19,2	1/19,2		
Testkit	4x 1/15	4x 1/7,5	1/5	3x 1/6	1/2
Polymerase	64 U	128 U	13 U		
10x TBE-Puffer	15 ml	15 ml			

a – je ein Testkit pro Tierart, b – 3 Tierarten pro Testkit, ½ – halbes Ansatzvolumen

Tab. 54 Kosten der Geräte

Bezeichnung	Hersteller, Ort	Typenbezeichnung	Preis [€]
Eis-Rack	Eppendorf, Wessling-Berzdorf	PCR-Cooler, blau	39,40
Gel-Form	Bio-Rad, München	Mini Comb Holder	65,-
Gel-Kamm 15 Zinken	Bio-Rad, München	Combs 0,75 x 3 x 10 mm	48,-
Gel-Presser	Bio-Rad, München	Gel cast	169,-
Gellaufkammer	Bio-Rad, München	Mini Sub® Cell GT	270,-
Hybridisierungs-kammer	Greiner Bio-One, Frickenhausen	Gelbes Standard Rack	0,14
Microarray Reader	Greiner Bio-One, Frickenhausen	CheckScanner™,862070	25.300,-
Mikroplatten Filter	Bio-Rad, München	405 nm	343,-
Mikroplatten Reader	Bio-Rad, München	Modell 680	4.001,-
Power Supply	Bio-Rad, München	Power Pac Basic™	535,-
Software Agarosegel	Bio-Rad, München	Quantity One 4.5.0. 1-D Analysis	2.350,-
Software CarnoCheck®	MicroDiscovery, Berlin Greiner Bio-One, Frickenhausen	Check Report™ 2.0.3., 862080	3.900,-
Software Microarray	Axon instruments, Union City	Gene Pix Pro 4.1.1.4.	inklusive
Software Mikroplatten	Bio-Rad, München	Microplate Manager Version 5.2 PC	1.525,-
Thermocycler	Bio-Rad, München	iCycler, Dual Block 2x 48 wells	9.150,-
UV-Kammer	Bio-Rad, München	Molecular Imager® Gel Doc™	8.950,-

Tab. 55 Notwendige Geräte für die Testkits

Artikel	CIB-A-Kit	CarnoCheck®	ELISA
Eis-Rack	x		
Gel-Form	2x		
Gel-Kamm 15 Zinken	4x		
Gel-Presser	x		
Gellaufkammer	2x		
Hybridisierungskammer		x	
Microarray Reader		x	
Mikroplatten Filter			x
Mikroplatten Reader			x
Power Supply	x		
Software Agarosegel	x		
Software CarnoCheck®		x	
Software Microarray		x	
Software Mikroplatten			x
Thermocycler	x	x	
UV-Kammer	x		

Tab. 56 Kosten des Verbrauchsmaterials

Material	Hersteller, Ort	Typenbezeichnung	Preis
Filtertips	Eppendorf, Wessling-Berzdorf	ep T.I.P.S. Filter, 10 µl	130 € / 10x 96 Stück
Latexhandschuhe	Meditrade, Kiefersfelden	Gentle Skin®, grip, puderfrei	3,70 € / 100 Stück
Nitrilhandschuhe	Roth, Karlsruhe	Rotiprotect	13,80 € / 100 Stück
Papierfilter	Whatman, Dassel	No 4, Ø 90 mm	8,20 € / 100 Stück
Paraffinfilm	Pechiney Plastic Packaging, Menasha	Parafilm "M", PM-996, 10 cm x 38 m	28,40 € / 38 Meter
Pipettenspitzen	Eppendorf, Wessling-Berzdorf	ep T.I.P.S. Standard, 2-200 µl	27,30 € / 1000 Stück
Pipettenspitzen	Eppendorf, Wessling-Berzdorf	ep T.I.P.S. Standard, 50-1000 µl	27,30 € / 1000 Stück
Reaktionsgefäße	peQLab, Erlangen	Thermo Strip™ standard strip 0,2 ml	186,- € / 250 Stück
Reaktionsgefäße	Greiner Bio-One, Frickenhausen	CELLSTAR®, PP-tubes, 50 ml, sterile	301,15 € / 500 Stück
Reaktionsgefäße	Eppendorf, Wessling-Berzdorf	Eppendorf Tubes safelock, 1,5 ml	33,40 € / 1000 Stück
Skalpellklingen	C. Bruno Bayha, Tuttlingen	BAYHA, Nr. 24, steril	4,- € / 12 Stück

Tab. 57 Verbrauch von Materialien bei 12 Proben

Artikel	CIB-A-Kit	CarnoCheck®	ELISA
50 ml Gefäße		2	
Eppendorf Tubes (Ex)	26	26	
Eppendorf Tubes (Tk)	4	13	
Handschuhe (latex)	14	14	
Handschuhe (nitril)	8		
Papierfilter			12
Paraffinfilm [cm]	20		
Pipettenspitzen 0,5-10 µl, filter	64	13	
Pipettenspitzen 100-1000 µl (Ex)	26	26	
Pipettenspitzen 100-1000 µl (Tk)	5	3	1
Pipettenspitzen 20-200 µl (Ex)	65	65	
Pipettenspitzen 20-200 µl (Tk)	92	26	30
Skalpellklingen	12	12	
Stripes	8	2	

Tk- Verbrauch für Testkits (CIB-A-Kit, CarnoCheck®, ELISA), Ex - Verbrauch für Extraktion (Dneasy® Tissue Kit)

## 8.5 Zeit-Tabellen

Tab. 58 Zeitaufwand [min] pro Versuchsdurchlauf

Versuch	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20
Homogen.	68	69	69	62	60	58	60	58	75	70	63	63	74	64	60	60	62	58	58	60
DNS-Ex.	225	216	225	223	222	221	225	198	219	217	224	219	219	218	204	198	215	214	217	209
DNS-Ex. rA	55	53	50	53	49	46	52	41	44	42	44	44	43	44	44	44	44	48	45	44
CIB-A-Kit <sup>1</sup>	255	265	240	247	245	242	241	251	254	242	249	239	240	240	240	244	237	247	242	243
CIB-A-Kit <sup>2</sup>	243	260	240	237	243	235	245	236	253	234	239	232	240	240	238	243	280	239	280	237
CIB-A-Kit <sup>1</sup> rA	51	38	43	35	39	30	30	32	32	35	36	35	37	44	40	39	35	41	35	35
CIB-A-Kit <sup>2</sup> rA	46	42	40	36	39	31	32	33	28	29	37	38	39	35	38	37	36	37	37	39
CarnoCheck <sup>®</sup>	240	240	207	206	210	205	203	301	204	209	200	219	200	201	201	209	213	211	218	207
CarnoCheck <sup>®</sup> rA	37	34	25	20	26	20	22	17	19	24	22	23	19	21	20	23	23	24	25	22
Protein-Ex.	45	48	52	57	53	55	52	37	60	58	60	57	58	57	38	54	55	53	55	55
Protein-Ex. rA	17	24	17	17	8	8	7	9	9	7	7	10	9	9	8	8	8	8	7	8
ELISA	222	215	220	206	215	212	207	213	218	224	217	214	219	216	217	218	208	211	212	211
ELISA rA	40	33	36	34	37	39	33	33	33	31	35	32	32	33	34	29	27	28	26	31

rA - reine Arbeitszeit, Ex. - Extraktion, <sup>1</sup> - PCR von R/H, <sup>2</sup> - PCR von P/S

## 9 Verzeichnisse

### 9.1 Abbildungsverzeichnis

Abb. 1: Schematischer Bauplan der DNS-Doppelhelix.....	11
Abb. 2: Ablaufschema einer PCR.....	15
Abb. 3: Schema der immobilisierten DNS-Sonden des CarnoCheck®.....	33
Abb. 4: Schematischer Aufbau eines Immunglobulin G.....	35
Abb. 5: Reaktions-Schema eines Sandwich-ELISAs.....	39
Abb. 6: Reaktions-Schema des ELISA-Testkits von ELISA Technologies.....	47
Abb. 7: Tierartspezifische Banden mit dem CIB-A-Kit.....	75
Abb. 8: Schema des Versuchsablaufs.....	76
Abb. 9: Schema der DNS-Extraktion.....	76
Abb. 10: DNeasy® Tissue Kit.....	77
Abb. 11: CIB-A-Standard 40-Testkit.....	79
Abb. 12: CarnoCheck®-Testkit.....	82
Abb. 13: ELISA-Testkit.....	85
Abb. 14: Unspezifische Banden mit Rind-ST Primern und Eppendorf MasterMix.....	87
Abb. 15: Vergleich Qiagen(Q, 62°C)-Polymerase und Eppendorf (E, 60°C) MasterMix	88
Abb. 16: Qiagen-Polymerase mit verschiedenen Magnesiumkonzentrationen.....	88
Abb. 17: Temperaturgradienten (°C) der Rind-ST Primer.....	89
Abb. 18: Temperaturgradienten (°C) der Huhn-ST Primer.....	90
Abb. 19: Temperaturgradienten (°C) der Pute-ST Primer.....	90
Abb. 20: Temperaturgradienten (°C) der Schwein-ST Primer .....	90
Abb. 21: Längenstandard in Abhängigkeit der Agarosekonzentration [bp].....	91
Abb. 22: Agarose-Gele aus Versuchslauf 10.....	97
Abb. 23: Scan-Images des CarnoCheck® aus Versuchslauf 15.....	98
Abb. 24: Mikrotiterplatte aus Versuchslauf 2.....	99
Abb. 25: Kosten für Reagenzien und Testkits.....	107
Abb. 26: Gerätekosten.....	108
Abb. 27: Kosten für Verbrauchsmaterialien.....	110
Abb. 28: Vergleich der Gesamtkosten.....	111
Abb. 29: Zeitaufwand der Methoden.....	113

## 9.2 Tabellenverzeichnis

Tab. 1	Auszug der Untersuchungsergebnisse des Bayerischen LGL im Jahr 2005 (N. N. 2006a).....	7
Tab. 2	Spezies-spezifische Primer verschiedener Gene in der Tierartenidentifizierung	24
Tab. 3	Spezies-spezifische Primer des Cytb-Gens in der Tierartenidentifizierung.....	26
Tab. 4	Kommerzielle Spezies-spezifische Primer für die Tierartenidentifikation.....	26
Tab. 5	Tierartspezifische Fragmentlängen und Gene der PCRFast® Testkits.....	27
Tab. 6	Tierartspezifische Fragmentlängen mit kommerziellen Primern.....	29
Tab. 7	Zeit- und Kostenaufwand für Spezies-spezifische PCR-Methoden.....	30
Tab. 8	DNS-Chips in der Tierartenidentifikation.....	32
Tab. 9	Überblick über verschiedene ELISA-Methoden zur Tierartenidentifizierung.....	43
Tab. 10	Überblick über Arbeiten mit kommerziellen ELISA-Testkits.....	45
Tab. 11	Zeit- und Kosten-Aufwand für verschiedene ELISA.....	52
Tab. 12	Direkte Vergleiche verschiedener Methoden der Tierartenidentifizierung.....	59
Tab. 13	Zusammensetzung der Vorversuchs-Wurstproben.....	65
Tab. 14	Zusammensetzung des 50%igen Fleischanteils der Hauptversuchsproben....	66
Tab. 15	Testkits und Polymerasen.....	66
Tab. 16	Spezielle Geräte.....	67
Tab. 17	Verbrauchsmaterial.....	68
Tab. 18	Pipettierschema für Premix mit Qiagen- bzw. Cibus-Taq-Polymerase.....	71
Tab. 19	Pipettierschema für Premix mit dem Eppendorf MasterMix 2,5x.....	71
Tab. 20	PCR-Programm zur Ermittlung der idealen Annealingtemperatur.....	72
Tab. 21	Gewählte Laufzeit in Abhängigkeit der Agarose-Konzentration.....	74
Tab. 22	Premix für 12 Proben zuzüglich 3 Kontrollen und 1 Pipettierverlust.....	80
Tab. 23	CIB-A-Kit-PCR-Programm für den Hauptversuch.....	80
Tab. 24	Spezies-spezifische Fragmentgrößen mit CIB-A-Kit.....	81
Tab. 25	CarnoCheck®-PCR-Programm.....	83
Tab. 26	Zusammensetzung der CarnoCheck®-Waschlösungen.....	83
Tab. 27	Annealingtemperaturen mit verschiedenen Polymerasen.....	91
Tab. 28	Vorversuchsergebnisse des CIB-A-Kit.....	93
Tab. 29	Vorversuchsergebnisse des CarnoCheck®.....	93
Tab. 30	Vorversuchsergebnisse des ELISA.....	94
Tab. 31	Versuchsablauf an Tag 1.....	95
Tab. 32	Versuchsablauf an Tag 2.....	96
Tab. 33	Ergebnisse des CIB-A-Kit für den Nachweis der Nebentierarten.....	97
Tab. 34	Ergebnisse des CarnoCheck® für den Nachweis der Nebentierarten.....	98
Tab. 35	Ergebnisse des ELISA für den Nachweis der Nebentierarten.....	99
Tab. 36	Sensitivität [%] der einzelnen Testkits.....	100
Tab. 37	Spezifität der einzelnen Testkits.....	101
Tab. 38	Vergleich der Sensitivitäten der Testkits auf Signifikanz (McNemar-Test)....	102
Tab. 39	Vergleich der Spezifitäten der Testkits auf Signifikanz (McNemar-Test).....	104
Tab. 40	Anzahl der Nachweise von Huhn und Pute durch den Geflügel-ELISA.....	105
Tab. 41	Reagenzienkosten [€] für 12 Proben.....	106
Tab. 42	Gerätekosten [€] für 12 Proben.....	108
Tab. 43	Materialkosten [€] für 12 Proben.....	109
Tab. 44	Gesamtkosten [€] für die Analyse von 12 Proben.....	110
Tab. 45	Benötigte Zeit für die Untersuchung von 12 Proben.....	113

---

Tab. 46	Reagenzien.....	133
Tab. 47	Sonstige Geräte.....	134
Tab. 48	Ergebnisse für die Modellwürste mit Rind als Nebentierart.....	135
Tab. 49	Ergebnisse für die Modellwürste mit Huhn als Nebentierart.....	136
Tab. 50	Ergebnisse für die Modellwürste mit Pute als Nebentierart.....	137
Tab. 51	Ergebnisse für die Modellwürste mit Schwein als Nebentierart.....	138
Tab. 52	Kosten von Polymerasen, Reagenzien und Testkits.....	152
Tab. 53	Verbrauch von Polymerasen, Reagenzien und Testkits bei 12 Proben.....	152
Tab. 54	Kosten der Geräte.....	153
Tab. 55	Notwendige Geräte für die Testkits.....	153
Tab. 56	Kosten des Verbrauchsmaterials.....	154
Tab. 57	Verbrauch von Materialien bei 12 Proben.....	154
Tab. 58	Zeitaufwand [min] pro Versuchsdurchlauf.....	155

### 9.3 Abkürzungsverzeichnis

A	Adenin
Abb.	Abbildung
Abs.	Absatz
ABTS	Azinodisethylbenzthiazolinsulfonsäure
bidest.	zweifach destilliert
bp	Basenpaare
BSE	Bovine Spongiforme Enzephalopathie
C	Cytosin
ca.	circa
Cl	Chlorid
CIE	Countercurrent Immunoelektrophorese
cm	Zentimeter
CVUA	Chemisches Landes- und Staatliche Veterinäruntersuchungsamt
Cytb	Cytochrom b
D	Dalton
dest.	destilliert
DNA	Desoxyribonucleic acid
DNS	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxynucleosidtriphosphat
E	Eppendorf
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
ELISA	Enzyme linked immunosorbent assay
Ex	Extraktion
f	forward Primer
fg	Femtogramm
FINS	Forensically Informative Nucleotide Sequencing
g	Gramm
G	Guanin
gA	gesamter Aufwand
GC	Gaschromatography
G/Gf	Geflügel
h	Stunde
H/Hu	Huhn
HPLC	High Pressure Liquid Chromatography
H <sub>2</sub> O	Wasser
HS	Huhn in Schwein
IEF	Isoelektrische Fokussierung
Ig	Immunglobulin
K	Kontrolle
Kan	Kaninchen
kg	Kilogramm
Konz.	Konzentration
KR	Kreuzreaktion
LFGB	Lebensmittel- und Futtermittelgesetzbuch
LGL	Landesamt für Gesundheit und Lebensmittelsicherheit
LMKV	Lebensmittel-Kennzeichnungsverordnung

---

LMLFleisch	Leitsätze für Fleisch und Fleischerzeugnisse
Lsg	Lösung
M	Marker, Längenstandard
mA	Milliampere
mg	Milligramm
Mg	Magnesium
MG	Molekulargewicht
min	Minute
mM	Millimolar
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
n / N	Stückzahl
Na	Natrium
ng	Nanogramm
nm	Nanometer
NT	Nebentierart
NWG	Nachweisgrenze
o.A.	ohne Angabe
P/Pu	Pute
PAGE	Polyacrylamidgel-Elektrophorese
PAGIF	Polyacrylamidgel-isoelektrische-Fokussierung
PCR	Polymerase Chain Reaction – Polymerase Ketten Reaktion
Pf	Pferd
pg	Pikogramm
ppm	pars per million
PS	Pute in Schwein
Q	Qiagen
r	reverse Primer
R/Rd	Rind
rA	reine Arbeit
RE	Restriktionsenzym
RFLP	Restriktions-Fragment-Längen-Polymorphismus
rpm	Rounds per minute / Umdrehungen pro Minute
RS	Rind in Schwein
RT	Raumtemperatur
s.	siehe
S/Sw	Schwein
sec	Sekunde
Schf	Schaf
SHP	Schwein in Huhn/Pute
SSCP	Single Strand Conformation Polymorphism
ssp	Spezies-spezifisch
T	Thymin
Tab.	Tabelle
TBE	Tris / Borat / EDTA
Tk	Testkit
tlw.	teilweise
T <sub>m</sub>	Schmelztemperatur

---

TMB	Tetramethylbenzidin
U	Unit
USDA-FSIS	United States Department of Agriculture, Food Safety & Inspection Service
vgl.	vergleiche
V	Volt
VO	Verordnung
v R	variable Region
Wdk	Wiederkäuer
Z/Zg	Ziege

## 9.4 Literaturverzeichnis

### 9.4.1 Literatur

- AL-JOWDER O., KEMSLEY E. und WILSON R. H. (2002)  
Detection of adulteration in cooked meat products by Mid-Infrared Spectroscopy  
J. Agric. Food Chem. **50**, 1325-1329
- ALBER G. (2000)  
Lexikon der Veterinärmedizin  
Wiesner E. und Ribbeck R. (Hrsg.), Enke Verlag, Stuttgart, 4. Auflage, 1510
- ALBERTS B., BRAY D., LEWIS J., RAFF M., ROBERTS K. und WARSON J. D.  
(1990)  
Molekularbiologie der Zelle  
VCH Verlagsgesellschaft, Weinheim
- ALCUM (2006)  
alcum Animal-Kits  
<http://www.alcum.de/website/deutsch/kits.html>, Zugriff am 07.05.2006
- ALTMANN K., BINKE R. und SCHWÄGELE F. (2004)  
Qualitativer Nachweis von Ziege in Fleisch- und Milcherzeugnissen. Nachweis auf Basis  
des nukleären single-copy Gens beta-casein  
Fleischwirtsch. **84**, 115-116
- ANDERSON M. L. M. und YOUNG B. D. (1985)  
Nucleic acid hybridization: a practical approach  
Hames B. D. und Higgins S. J. (Hrsg.), IRL Press, Oxford
- ANDREWS C. D., BERGER R. G., MAGEAU R. P., SCHWAB B. und JOHNSTON R.  
W. (1992)  
Detection of Beef, Sheep, Deer, and Horse Meat in Cooked Meat Products by Enzyme-  
Linked Immunosorbent Assay  
J. Assoc. Off. Anal. Chem. Intern. **75**, 572-576
- ANTHONY R. M., BROWN T. J. und FRENCH G. L. (2000)  
Rapid detection of bacteremia by universal amplification of 23S ribosomal DNA followed  
by hybridization to an oligonucleotide array  
J. Clin. Microbiol. **38**, 781-788

AYAZ Y., AYAZ N.D. und EROL I. (2006)

Detection of species in meat and meat products using enzyme-linked immunosorbent assay

J. Muscle Foods **17**, 214-220

BARALLON R: (1998)

Species determination by analysis of the cytochrome b gene

Forensic DNA Profiling Protocols, P.J. Lincoln, J. Thomson (Hrsg.), Humana Press, Totowa, New Jersey, 251-260

BARTLETT S. E. und DAVIDSON W. S. (1991)

Identification of Thunnus Tuna species by the polymerase chain reaction and direct sequence analysis of their mitochondrial cytochrome b Genes

Can. J. Fish Aquat. Sci. **48**, 309-317

BARTLETT S. E. und DAVIDSON W. S. (1992)

FINS (Forensically Informative Nucleotide Sequencing): A Procedure for Identifying the Animal Origin of Biological Specimens

BioTechniques **12**, 408-411

BATAILLE M., CRAINIC K., LETERREUX M., DURIGON M. und DE MAZANCOURT P. (1999)

Multiplex amplification of mitochondrial DNA for human and species identification in forensic evaluation

Forensic Sci. Intern. **99**, 165-170

BAUDNER S. und DREHER R. M. (1991)

Immunchemische Methoden in der Lebensmittelanalytik – Prinzip und Anwendung  
Lebensmittelchem. **45**, 53-59

BAUER F. (1991)

Elektrophoretische Tierartenidentifizierung bei Fleisch und Fleischwaren

Diss. Vet. Med., Tierärztliche Universität Wien

BAUER F. und HOFMANN K. (1987)

Elektrophoretische Tierartenbestimmung – Steigerung der Empfindlichkeit durch Peroxidasefärbung der Myoglobine

Fleischwirtsch. **67**, 861-867

BEHRENS M. und UNTHAN M. (1999)

Tierart-spezifischer DNA-Test von Lebensmitteln

Labor Praxis **10**, 24-29

- BEHRENS M., UNTHAN M., BRINKMANN Y., BUCHHOLZ R. und LATUS N. (1999)  
Nachweis von Tierarten in erhitzten und komplexen Fleischerzeugnissen durch tierart-spezifische PCR-Reaktionen  
Fleischwirtsch. **79**, 97-100
- BELLAGAMBA F., MORETTI V. M., COMINCINI S. und VAFRE F. (2001)  
Identification of species in animal feedstuffs by polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism analysis of mitochondrial DNA  
J. Agric. Food Chem. **49**, 3775-3781
- BENEKE B. und HAGEN M. (1998)  
Eignung der PCR (Polymerase-Ketten-Reaktion). Tierartennachweis in erhitzten Fleischerzeugnissen  
Fleischwirtsch. **78**, 1016-1019
- BERGER R. G. (1986)  
Identification of animal species in cooked and canned meat and poultry products  
USDA-FSIS Laboratory Communication No. **58**, 1-7
- BERGER R. G., MAGEAU R. P., SCHWAB B. und JOHNSTON R. W. (1988)  
Detection of Poultry in Cooked and Canned Meat Foods by Enzyme-Linked Immunosorbent Assays  
J. Assoc. Off. Anal. Chem. **71**, 406-409
- BHILENGAONKAR K. N., SHERIKAR A. T., KHOT J. B. und KARKARE U. D. (1990)  
Studies on characterisation of thermostable antigens of adrenals and muscle tissue of meat animals  
J. Sci. Food Agric. **51**, 545-553
- BILLET E. E., BEVAN R., SCANLON B., PICKERING K. und GIBBONS B. (1996)  
The use of a poultry specific murine monoclonal antibody directed to the insoluble muscle protein desmin in meat speciation  
J. Sci. Food Agric. **70**, 396-404
- BINKE R., EICHNER R., ZÄH M. und SCHWÄGELE F. (2003)  
Entwicklung eines leistungsfähigen Extraktionssystems zur Isolierung von Nucleinsäure aus Fleisch und Fleischerzeugnissen für die PCR  
Arch. Lebensmittelhyg. **54**, 52-55

- BINKE R., ALTMANN K., FISCHER K., MÜLLER E. und SCHWÄGELE F. (2004)  
Semiquantitative Bestimmung von Ziegenewebe in Fleischerzeugnissen mittels PCR:  
Bestimmung auf Basis der nucleären single-copy Gene beta-Casein und Myostatin  
Mittbl. BAFF Kulmbach, 43. Jahrgang, Nr. **164**, 155-161
- BINKE R., SPIEGEL K. und SCHWÄGELE F. (2005)  
Vergleichende Untersuchung von mitochondrialen und nukleären Gensequenzen zur  
Identifizierung von tierischen Bestandteilen in Fleischerzeugnissen mittels PCR  
Mittbl. BAFF Kulmbach, 44. Jahrgang, Nr. **169**, 201-210
- BÖHMLER G. (2001)  
Nachweis von Rinderprotein in Wurstwaren  
Fleischwirtsch. **81**, 103-105
- BOWEN B. W., NELSON W. S. und AVISE J. C. (1993)  
A molecular phylogeny for marine turtles: Trait mapping, rate assessment, and conser-  
vation relevance  
Proc. Natl. Acad. Sci. **90**, 5574-5577
- BRANCIARI R., NIJMAN I. J., PLAS M. E., DI ANTONIO E. und LENSTRA J. A. (2000)  
Species origin of milk in italian mozzarella and greek feta cheese  
J. Food Prot. **63**, 408-411
- BREHMER H. (1998)  
Nachweis von Geflügelfleisch in Fleischerzeugnissen  
Fleischwirtsch. **78**, 199-200
- BRODMANN P. D. und 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 Sci. **65**, 599-607
- BRODMANN P. D., NICHOLAS G., SCHALTENBRAND P. und ILG E. C. (2001)  
Identifying unknown game species: experience with nucleotide sequencing of the mito-  
chondrial cytochrome b gene and a subsequent basic local alignment search tool search  
Eur. Food Res. Technol. **212**, 491-496

- BRUNING J. W. und VAN DEN TWEEL J. G. (1999)  
Humorale Immunität  
Immunologie, Das menschliche Abwehrsystem, van den Tweel J. G. u.a. (Hrsg.), Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg, Berlin, 39-58
- BUCHHOLZ M. (2003)  
Versuche zur Gewinnung muriner monoklonaler Antikörper zum Tierartennachweis in Lebensmitteln unter Verwendung verschiedener Immunisierungs-Antigenaufbereitungen  
Diss. Vet. Med., FU Berlin
- BUNTJER J. B. und LENSTRA J. A. (1998)  
Mammalian species identification by interspersed repeat PCR fingerprinting  
J. Ind. Microbiol. Biotechnol. **21**, 121-127
- BUNTJER J. B., LAMINE A., HAAGSMA N. und LENSTRA J. A. (1999)  
Species identification by oligonucleotide hybridization: the influence of processing of meat products  
J. Sci. Food Agric. **79**, 53-57
- BURGENER M. und HÜBNER P. (1998)  
Mitochondrial DNA enrichment for species identification and evolutionary analysis  
Z. Lebensm. Unters. Forsch. A. **207**, 261-263
- CALVO J. H., ZARAGOZA P. und OSTA R. (2001)  
A quick and more sensitive method to identify pork in processed and unprocessed food by PCR amplification of a new specific DNA fragment  
J. Anim. Sci. **79**, 2108-2112
- CALVO J. H., OSTA R. und ZARAGOZA P. (2002)  
Quantitative PCR detection of pork in raw and heated ground beef and pâté  
J. Agric. Food Chem. **50**, 5265-5267
- CANDLISH A. A. G. (1991)  
Immunological methods in food microbiology  
Food Microbiol. **8**, 1-14
- CANDRIAN U. (1994)  
Die Polymerase-Kettenreaktion in der Lebensmittelanalytik  
Mitt. Gebiete Lebensm. Hyg. **85**, 704-718

- CARNEGIE P. R., HEE K. P. und BELL A. W. (1982)  
Ophidine ( $\beta$ -alanyl-L-3-methylhistidine), Balenine and other histidine dipeptides in pig muscles and tinned hams  
J. Sci. Food Agric. **33**, 795-801
- CARR S. M. und MARSHALL D. (1991)  
Detection of intra-specific DNA sequence variation in the mitochondrial cytochrome b gene of Atlantic cod (*Gadus morhua*) by the polymerase chain reaction  
Can. J. Fish Aquat. Sci. **48**, 48-52
- CASEY J. und DAVIDSON N. (1977)  
Rates of formation and thermal stabilities of RNA:DNA and DNA:DNA duplexes at high concentrations of formamide  
Nucl. Acids Res. **4**, 1539-1552
- CHA R. S. und THILLY W. G. (1993)  
Specificity, Efficiency, and Fidelity of PCR  
PCR Methods Appl. **3**, 18-29
- CHEN F. C. und HSIEH Y. H. (2000)  
Detection of pork in heat-processed meat products by monoclonal antibody-based ELISA  
J. Assoc. Off. Anal. Chem. Intern. **83**, 79-85
- CHEN F. C., HSIEH Y. – H. P. und BRIDGMAN R. C. (1998)  
Monoclonal Antibodies to Porcine Thermal-Stable Muscle Protein for Detection of Raw and Cooked Meats  
J. Food Sci. **63**, 201-205
- CHEN F. C., HSIEH Y. – H. P. und BRIDGMAN R. C. (2002)  
Monoclonal antibodies against troponin I for the detection of rendered muscle tissue in animal feedstuffs  
Meat Sci. **62**, 405-412
- CHIKUNI K., OZUTSUMI K., KOISHIKAWA T. und KATO S. (1990)  
Species Identification of Cooked Meats by DNA Hybridization Assay  
Meat Sci. **27**, 119-128
- CHIKUNI K., TABATA T., KOSUGIYAMA M., MONMA M. und SAITO M. (1994)  
Polymerase Chain Reaction Assay for Detection of Sheep and Goat Meats  
Meat Sci. **37**, 337-345

CHIPRON (2005)

Introduction LCD-arrays

Introduction V.II-05

CHIPRON (2006)

Array Products 2006 Food Analysis – Animal

Array Products Vers. I-06

CIBUS (2001)

CIB-A-Kit M1-ST/20 Nachweis-Kit für tierartsspezifische Rind-, Schwein-, Huhn- und Pute-DNA in rohen, gebrühten und gekochten Produkten

Manual V 3/2001-D

CIBUS (2006)

CIB-A-Kits - Animal detection systems

<http://www.cibus-biotech.de/products/products.html>, Zugriff am 07.05.2006

CONGEN (2006)

SureFood® Animal

[www.congen.de/p\\_tierarten.php](http://www.congen.de/p_tierarten.php), Zugriff am 05.01.2006

CORING (2006a)

DIAGNOSTIC-KITS

Lieferprogramm und Preisliste Deutschland 2006

CORING (2006b)

CIBUS Tierarten-PCR-Kits – Verifizierung der PCR-Produkte über Restriktions-spaltungen

Informationsblatt, Zugessandt von Coring am 08.06.2006

CHRISTOPOULOS T. K. (1999)

Nucleic Acid Analysis

Anal. Chem. 425R-438R

CHURCH P. N., PERKIN J. C. und KNIGHT M. K. (1991)

Short Evaluation of Cortecs Diagnostics Cooked Meat Species Identification Kit.

Technical Notes, Leatherhead Food R. A. **95**

COLOMBO F., VIACAVA R. und GIARETTI M. (2000)  
Differentiation of the species ostrich (*strutio camelus*) and emu (*Dromaius novaehollandiae*) by polymerase chain reaction using an ostrich-specific primer pair  
Meat Sci. **56**, 15-17

CROWTHER J. R. (2001)  
The ELISA Guidebook  
Methods in Molecular Biology™ Vol 149, Humana Press Inc., Totowa, New Jersey

DIEFFENBACH C. W. und DVEKSLER G. S. (1993)  
Setting Up a PCR Laboratory  
PCR Methods Appl. **3**, 2-7

DINCER B., SPEAROW J. L., CASSENS R. G. und GREASER M. L. (1987)  
The Effects of Curing and Cooking on the Detection of Species Origin of Meat Products by Competitive and Indirect ELISA Techniques  
Meat Sci. **20**, 253-263

DOBERSTEIN K.-H. und GREUEL E. (1982)  
Herstellung spezifischer Antiseren zur Identifizierung des Fleisches afrikanischer Antilopenarten im Agargelpräzipitationstest  
Fleischwirtsch. **62**, 1011-1013

EBBEHØJ K. F. und THOMSEN P.D. (1991a)  
Species Differentiation of Heated Meat Products by DNA Hybridization  
Meat Sci. **30**, 221-234

EBBEHØJ K. F. und THOMSEN P.D. (1991b)  
Differentiation of Closely Related Species by DNA Hybridization  
Meat Sci. **30**, 359-366

ECKERT K. A. und KUNKEL T. A. (1991)  
DNA polymerase fidelity and the polymerase chain reaction  
PCR Methods Appl. **1**, 17-24

ELISA TECHNOLOGIES (2007)  
Meat Species Test Kits  
<http://www.elisa-tek.com/meatkit.htm>, Zugriff am 31.01.2007

- FAJARDO V., GONZÁLEZ I., LÓPEZ-CALLEJA I., MARTÍN I., HERNÁNDEZ P. E. ,  
GARCÁ T. und MARTÍN R. (2006)  
PCR-RFLP Authentication of meats from Red Deer (*Cervus elaphus*), Fallow Deer  
(*Dama dama*), Roe Deer (*Capreolus capreolus*), Cattle (*Bos taurus*), Sheep (*Ovis aries*),  
and Goat (*Capra hircus*)  
J. Agric. Food Chem. **54**, 1144-1150
- FEHLHABER K. (2000)  
Lexikon der Veterinärmedizin  
Wiesner E. und Ribbeck R. (Hrsg.), Enke Verlag, Stuttgart, 4. Auflage, 1539
- FESSLER D. M.T. und NAVARRETE C. D. (2003)  
Meat is Good to Taboo  
J. Cognition Culture 3.1, 1-40
- FIOCCHI A., RESTANI P. und RIVA E. (2000)  
Beef allergy in children  
Nutrition **16**, 454-457
- FORREST A. R. R. und CARNEGIE P. R. (1994)  
Identification of Gourmet Meat Using FINS (Forensically Informative Nucleotide Se-  
quencing)  
BioTechniques **17**, 24-26
- FRANK R., SOMMERMANN U. und STRÖHLA G. (1997)  
NATURA, Genetik und Immunbiologie  
Ernst Klett Verlag, Stuttgart, Düsseldorf, Leipzig, 1. Auflage
- FRIES R. (2000)  
Lexikon der Veterinärmedizin  
Wiesner E. und Ribbeck R. (Hrsg.), Enke Verlag, Stuttgart, 4. Auflage, 804
- GENESCAN (2006)  
DNAnimal Consensus – Standard, - Cattle, - Poultry Test kit for the qualitative detection  
and identification of animal species in food and feed on the basis of mitochondrial  
Manual DNAnimal\_1.5
- GENSSLER V., BINKE R., SCHUSTER A. und SCHWÄGELE F. (2004)  
Optimierung von ELISA-Testsystemen für die Tierartdifferenzierung in Fleischerzeugnis-  
sen  
Lebensmittelchem. **58**, 147

GIOVANNACCI I., GUIZARD C., CARLIER M., DUVAL V., MARTIN J.-L. und DE-MEULEMESTER C. (2004)

Species identification of meat products by ELISA

Intern. J. Food Sci. Techn. **39**, 863-867

GOERLICH R. und GREUEL E. (1986)

Der Nachweis nativer und hitzedenaturierter Muskelproteine von Rind und Känguruh mit Hilfe muriner monoklonaler Antikörper

Arch. Lebensmittelhyg. **37**, 87-90

GRAHAM C. A. und HILL A. J. (2001)

Introduction to DNA sequencing

Methods Mol. Biol. **167**, 1-12

GREINER BIO-ONE (2005)

CarnoCheck® Test kit for the detection of animal species in food

Manual, Version BQ-005-03

GRIFFITHS N. M. und BILLINGTON M. J. (1984)

Evaluation of an enzyme-linked immunosorbent assay for beef blood serum to determine indirectly the apparent beef content of beef joints and model mixtures

J. Sci. Food Agric. **35**, 909-914

HAAIJMAN J. J. und EGBERTS E. (1999)

Die Vielfalt der Antikörper

Immunologie, Das menschliche Abwehrsystem, van den Tweel u.a. (Hrsg.), Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg, Berlin, 93-110

HAFKE A. (1994)

Fleischgrundlage und Brühwürste aus dem Handel. Überprüfung der Tierartspezifität mittels isoelektrischer Fokussierung und Enzyme-linked immunosorbent assay.

Fleischwirtsch. **74**, 16-17

HATEFI Y. (1985)

The mitochondrial electron transport and oxidative phosphorylation system

Annu. Rev. Biochem. **54**, 1015-1069

HAYASHI J. I. und WALLE M. J. V.D. (1985)

Absence of extensive recombination between inter and intraspecies mitochondrial DNA in mammalian cells

Exp. Cell. Res. **160**, 387-395

- HAYASHI K. (1996)  
PCR SSCP Single Strand Conformation Polymorphism Analysis of PCR Products  
Laboratory Protocols for Mutation detection, Landegren U. (Hrsg.) Oxford University  
Press, Oxford, 14-22
- HAYDEN A. R. (1979)  
Immunochemical detection of ovine, bovine and equine flesh in beef products with anti-  
sera to species myoglobin  
J. Food Sci. **44**, 494-500
- HEDGE P., QI R., ABERNATHY K., GAY C., DHARAP S., GASPARD R., HUGHES J.  
E., SNESRUD E., LEE N. und QUACKENBUSH J. (2000)  
A concise guide to cDNA microarray analysis  
BioTechniques **29**, 548-562
- HELLER M. J. (2002)  
DNA microarray technology: devices, systems and applications  
Annu. Rev. Biomed. Eng. **4**, 129-153
- HEMPEL G. und BUSCH M. (2000)  
Untersuchung von Kalbsleberwurst auf ihren Anteil an Muskelfleisch vom Rind  
Fleischwirtsch. **80**, 89-90
- HERMAN B. L. (2001)  
Determination of the animal origin of raw food by species-specific PCR  
J. Dairy Res. **68**, 429-436
- HERNÁNDEZ P. E., MARTÍN R., GARCÍA T., MORALES P., ANGUITA G., HAZA A. I.,  
GONZÁLEZ I. und SANZ B. (1994)  
Antibody-based Analytical Methods for Meat Species Determination and Detecting Adul-  
teration of Milk  
Food Agric. Immunol. **6**, 95-104
- HIRD H., GOODIER R. und HILL M. (2003)  
Rapid detection of chicken and turkey in heated meat products using the polymerase  
chain reaction followed by amplicon visualization with *vistra green*  
Meat Sci. **65**, 1117-1123
- HITCHCOCK C. H. S. und CRIMES A. A. (1985)  
Methodology for Meat Species Identification: A Review  
Meat Sci. **15**, 215-224

HOFMANN K. (1987)

Fundamental problems in identifying the animal species of muscle meat using electrophoretic methods

Fleischwirtsch. **67**, 820-826

HOFMANN K. (1996)

Proof of proper heating at meat-and-bone meals

Fleischwirtsch. **76**, 1037-1039

HOFMANN K. (1997a)

Nachweis der Tierart bei Fleisch und Fleischerzeugnissen 1. Mitteilung

Fleischwirtsch. **77**, 38-40

HOFMANN K. (1997b)

Nachweis der Tierart bei Fleisch und Fleischerzeugnissen 2. Mitteilung

Fleischwirtsch. **77**, 151-154

HOFMANN K. und BLÜCHEL E. (1986)

Bestimmung der Tierart von rohem Muskelfleisch anhand der Myoglobinmuster im pH-Gradienten-Gel

Fleischwirtsch. **66**, 916-921

HOFMANN K., BLÜCHEL E., FISCHER K., MÜLLER E. und BLUNK H.-C. (1994)

Erfahrungen mit dem ELISA-Test zur Tierartbestimmung bei erhitztem Fleisch und Fleischerzeugnissen

Mittbl. BAFF Kulmbach, 33. Jahrgang, Nr. **124**, 171-177

HOFMANN K., FISCHER K., MÜLLER E. und KEMPER V. (1995)

Versuche zum Nachweis der Erhitzungseffektivität bei Fleischkonserven und Tiermehlen

Fleischwirtsch. **75**, 1227-1231

HOFMANN K., FISCHER K. und MÜLLER E. (1997)

Tierartbestimmung mittels ELISA-Test -Ergebnis von Ringversuch II

Jahresbericht Kulmbach, BAFF, Institut für Chemie und Physik 1997, 6-7

HOFMANN K., FISCHER K., MÜLLER E. und BABEL W. (1998)

ELISA-test for cooked meat species identification on gelatine and gelatine products

Nahrung / Food **43**, 406-409

- HOLLOWAY A. J., VAN LAAR R. K., TOTHILL R. W. und BOWTELL D. D. L. (2002)  
Options available – from start to finish – for obtaining data from DNA microarrays II  
Nat. Genet. **32**, 481-489
- HOLST-JENSEN A., RONNING S. B., LOVSETH A. und BERDAL K. G. (2003)  
PCR technology for screening and quantification of genetically modified organisms (GMOs)  
Anal. Bioanal. Chem. **375**, 985-993
- HONIKEL K. O. (1999)  
Schnellanalytik, Schätz- und Messmethoden – Eine Einführung  
Kulmbacher Reihe: Analytik bei Fleisch, Schnell-, Schätz- und Messmethoden Band **16**, 1-11
- HONIKEL K. O., GEMPEL G. und SCHWÄGELE F. (2002)  
Tierartidentifikation auf Protein-, DNA-, und Fettsäure-Basis bei Fleisch, Fleischerzeugnissen und Tiermehl  
Mittbl. BAFF Kulmbach 41, Nr. **156**, 125-133
- HOPWOOD A. J., FAIRROTHER K. S., LOCKLEY A. K. und BARDSLEY R. G. (1999)  
An actin gene-related polymerase chain reaction (PCR) test for identification of chicken in meat mixtures  
Meat Sci. **53**, 227-231
- HSIEH Y. H. P., WOODWARD B. B. und HO S.-H. (1995)  
Detection of Species Substitution in Raw and Cooked Meats Using Immunoassays  
J. Food Prot. **58**, 555-559
- HSIEH Y. H. P., JOHNSON M. A., WETZSTEIN C. J. und GREEN N. R. (1996)  
Detection of species adulteration in pork products using agar gel immunodiffusion and enzyme linked immunosorbent assay  
J. Food Qual. **19**, 1-13
- HSIEH Y. H., SHEU S. C., BRIDGMAN R. C. (1998)  
Development of a monoclonal antibody specific to cooked mammalian meats  
J. Food Prot. **61**, 476-487
- HUNT D. J., PARKES H. C. und LUMLEY I. D. (1997)  
Identification of the species of origin of raw and cooked meat products using oligonucleotide probes  
Food Chem. **60**, 437-442

IFP (2007)

PCRFast®

[www.produktqualitaet.com/index.php?option=com\\_content&task=view&id=30&Itemid=213](http://www.produktqualitaet.com/index.php?option=com_content&task=view&id=30&Itemid=213), Zugriff am 03.02.2007

IRWIN D. M., KOCHER T. D. und WILSON A. C. (1991)

Evolution of the cytochrom b gene of mammals

J. Mol. Evol. **32**, 128-144

JEFFREYS A. J., WILSON V., NEUMANN R. und KEYTE J. (1988)

Amplification of human minisatellites by the polymerase chain reaction: toward DNA fingerprinting of single cells

Nucl. Acids Res. **16**, 10953-10971

JONES S. J. und PATTERSON R. L. S. (1985)

Double-Antibody ELISA for Detection of Trace Amounts of Pig Meat in Raw Meat Mixtures

Meat Sci. **15**, 1-13

JONES S. J. und PATTERSON R. L. S. (1986)

A Modified Indirect ELISA Procedure for Raw Meat Specification Using Crude Anti-species Antisera and Stabilised Immunoreagents

J Sci. Food Agric. **37**, 767-775

KANG'ETHE E. K. und GATHUMA J. M. (1987)

Species Identification of Autoclaved Meat Samples using Antisera to Thermostable Muscle Antigens in An Enzyme Immunoassay

Meat Sci. **19**, 265-270

KANG'ETHE E. K. und LINDQUIST K. J. (1987)

Species identification of internal organs using antisera to thermostable muscle antigens  
Proc. 33 rd Congress Meat Sci. and Technology, Copenhagen, Band II, 377-378

KANG'ETHE E. K., JONES S.J. und PATTERSON R.L. (1982)

Identification of the species origin of fresh meat using an enzyme-linked immunosorbent assay procedure

Meat Sci. **7**, 229-240

KING N. L. und KURTH L. (1982)

Analysis of raw beef samples for adulterant meat species by enzyme-staining of isoelectricfocusing gels

J. Food Sci. **47**, 1608-1612

- KOCHER T. D., THOMAS W. K., MEYER A., EDWARDS S. V., PÄABO S., VILLBLANCA F. X. und WILSON A. C. (1989)  
Dynamics of mitochondrial DNA evolution in mammals: application and sequencing with conserved primers  
Proc. Natl. Acad. Sci. **86**, 6196-6200
- KOH M. C., LIM C. H., CHUA S. B., CHEW S. T. und PHANG S. T. W. (1998)  
Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD) Fingerprints for Identification of Red Meat Animal Species  
Meat Sci. **48**, 275-285
- KOLB E. (2000)  
Lexikon der Veterinärmedizin  
Wiesner E. und Ribbeck R. (Hrsg.), Enke Verlag, Stuttgart, 4. Auflage, 306-307
- KOOLMAN J. und RÖHM K.-H. (1998)  
Taschenatlas der Biochemie  
Georg Thieme Verlag, Stuttgart, New York, 2. Auflage
- KREUTZIG T. (2000)  
Kurzlehrbuch Biochemie  
Urban & Fischer Verlag München, Jena, 10. Auflage
- KÜHNE D., FREUDENREICH P. und RISTIC M. (1985)  
Fettsäuremuster verschiedener Tierarten – 1. Mitteilung: Einführung und Fette von Schweinen.  
Fleischwirtsch. **65**, 201-204
- KÜHNE D., FREUDENREICH P. und RISTIC M. (1986)  
Fettsäuremuster verschiedener Tierarten – 2. Mitteilung: Fette von Wiederkäuern, Kaninchen und Hähnchen.  
Fleischwirtsch. **66**, 403-405
- KWOK S. und HIGUCHI R. (1989)  
Avoiding false positives with PCR  
Nature **339**, 237-238
- KWOK P. Y. und CHEN X. (2003)  
Detection of single nucleotide polymorphisms  
Curr. Issues Mol. Biol. **5**, 43-60

LANSMAN R. A., AVISE J. C. und HUETTEL M. D. (1983)

Critical experimental test of the possibility of "paternal leakage" of mitochondrial DNA  
Proc. Natl. Acad. Sci. **80**, 1969-1971

LAUBE I., SPIEGELBERG A., BUTSCHKE A., ZAGON J., KROH L. W. und BROLL H. (2002)

DNA-analytische Methoden zur Identifizierung der Tierarten Rind und Schwein in  
Lebensmitteln  
BgVV-Hefte, Heft 03/2002

Lebensmittel-, Bedarfsgegenstände- und Futtermittelgesetzbuch (Lebensmittel- und Futtermittelgesetzbuch - LFGB)

In der Fassung der Bekanntmachung vom 26. April 2006 (BGBl. I S. 945)

LEIGHTON JONES J. (1991)

DNA probes: applications in the food industry  
Trends Food Sci. Technol. **2**, 28-32

Leitsätze für Fleisch und Fleischerzeugnisse

Vom 27./28. November 1974 Bekanntmachung vom 20. Juni 1975 (GMBl. S. 489)

LIU L., CHEN F.-C., DORSEY J. L. und HSIEH Y.-H. P. (2006)

Sensitive Monoclonal Antibody-based Sandwich-ELISA for the Detection of Porcine Skeletal Muscle in Meat and Feed Products  
J. Food Sci. **71**, M1

LOCKLEY A. K. und BARDSLEY R. G. (2000)

DNA-based methods for food authentication  
Trends Food Sci. Technol. **11**, 67-77

LOCKLEY A. K. und BARDSLEY R. G. (2002)

Intron variability in an actin gene can be used to discriminate between chicken and turkey DNA  
Meat Sci. **61**, 163-168

MA D., ZHARIKIKH A., GRAUR D., VANDE BERG J. L. und LI W. (1993)

Structure and evolution of opossum, guinea pig and porcupine cytochrome b genes  
J. Mol. Evol. **36**, 327-334

- MALISA A., GWAKISA P., BALTHAZARY S., S. und MUTAYOBA B. (2005)  
Species and gender differentiation between and among domestic and wild animals using mitochondrial and sex-linked DNA markers  
Afr. J. Biotechnol. **4**, 1269-1274
- MANZ J. (1983)  
Nachweis hitzedenaturierter Muskelproteine mittels Enzyme-linked Immunosorbent Assay. Bestimmung von Muskelproteinen vom Känguruh.  
Fleischwirtsch., **63**, 1767-1769
- MANZ J. (1985)  
Nachweis hitzedenaturierter Muskelproteine mittels ELISA. Bestimmung von Muskelproteinen von Rind und Schwein.  
Fleischwirtsch. **65**, 497-499
- MARÍN M. L., CASAS C., CAMBERO M. I. und SANZ B. (1992)  
Study of the effect of heat (treatment) on meat protein denaturation as determined by ELISA  
Food Chem. **43**, 147-150
- MARTÍN R., AZCONA J. I., CASAS C., HERNÁNDEZ P. E. und SANZ B. (1988a)  
Sandwich ELISA for Detection of Pig Meat in Raw Beef Using Antisera to Muscle Soluble Proteins  
J. Food Prot. **51**, 790-794
- MARTÍN R., AZCONA J. I., GARCÍA T., HERNÁNDEZ P. E. und SANZ B. (1988b)  
Sandwich ELISA for Detection of Horse Meat in Raw Meat Mixtures Using Antisera to Muscle Soluble Proteins  
Meat Sci. **22**, 143-153
- MARTÍN R., WARDALE R. J., JONES S. J., HERNANDEZ P. E. und PATTERSON R. L. S. (1989)  
Production and Characterization of Monoclonal Antibodies Specific to Chicken Muscle Soluble Proteins  
Meat Sci. **25**, 199-207
- MARTÍN R., WARDALE R. J., JONES S. J., HERNÁNDEZ P. E. und PATTERSON R. L. S. (1991)  
Monoclonal antibody sandwich ELISA for the potential detection of chicken meat mixtures of raw beef and pork  
Meat Sci. **30**, 23-31

- MARTIN D. R., CHAN J. und CHIU J. Y. (1998)  
Quantitative evaluation of pork adulteration in raw ground beef by radial immunodiffusion and enzyme-linked immunosorbent assay  
J. Food Prot. **61**, 1686-1690
- MARTINEZ I. und YMAN I. M. (1998)  
Species identification in meat products by RAPD analysis  
Food Res. Intern. **31**, 459-466
- MATSUNAGA T., CHIKUNI K., TANABE R., MUROYA S., SHIBATA K., YAMADA J. und SHINMURA Y. (1999)  
A quick and simple method for the identification of meat species and meat products by PCR assay  
Meat Sci. **51**, 143-148
- McCONAUGHY B. L., LAIRD C. D. und McCARTHY B. J. (1969)  
Nucleic acid reassociation in formamide  
Biochemistry **8**, 3289-3295
- MEYER R. und CANDRIAN U. (1996)  
PCR-based DNA Analysis for the identification and Characterization of Food Components  
Lebensm. Wiss. Technol. **29**, 1-9
- MEYER A., KOCHER T. D., BASASIBWAKI P. und WILSON A. C. (1990)  
Monophyletic origin of Lake Victoria cichlid fishes suggested by mitochondrial DNA sequences  
Nature **347**, 550-553
- MEYER R., CANDRIAN U. und LÜTHY J. (1993)  
Tierartbestimmung und Sojanachweis in erhitzten Fleischprodukten mittels der Polymerase-Kettenreaktion (PCR)  
Mitt. Gebiete Lebensm. Hyg. **84**, 112-121
- MEYER G., MÜLLER M., KRUSE L., RÜGGERBERG H., KETSCHAU F. und HILDEBRANDT A. (1994a)  
DNA-Sonden zur Tierartidentifizierung in verarbeiteten Lebensmitteln- Beispiele Pute, Huhn, Rind und Schwein  
Fleischwirtsch. **74**, 1237-1238

- MEYER R., CANDRIAN U. und LÜTHY J. (1994b)  
Detection of Pork in Heated Meat Products by the Polymerase Chain Reaction  
J. Assoc. Off. Anal. Chem. Intern. **77**, 617-622
- MEYER R., HÖFELEIN C., LÜTHY J. und CANDRIAN U. (1995)  
Polymerase Chain Reaction-Restriction Fragment Length Polymorphism Analyses:  
A Simple Method for Species Identification in Food  
J. Assoc. Off. Anal. Chem. Intern. **78**, 1542-1551
- MIFEK K. und GLAWISCHNIG M. (1990)  
Tierartenspezifisierung bei hocherhitzten Fleischwaren mittels Enzymelinked immuno-  
sorbent assay (ELISA)  
Ernährung/Nutrition **14**, 273-277
- MITNIK L., NOVOTNY M., FELTEN C., BUONOCORE S., KOUTNY L. und  
SCHMALZING D. (2001)  
Recent advances in DNA sequencing by capillary and microdevice electrophoresis  
Electrophoresis **22**, 4104-4117
- MONTIEL-SOSA J. F., RUIZ-PESINI E., MONTOYA J., RONCALÉS P., LÓPEZ-  
PÉREZ M. J. und PÉREZ-MARTOS A (2000)  
Direct and Highly Species-Specific Detection of Pork Meat and Fat in Meat Products by  
PCR Amplification of Mitochondrial DNA  
J. Agric. Food Chem. **48**, 2829-2832
- MORALES P., GARCIA T., GONZALEZ I., MARTIN R., SANZ B. und HERNANDEZ P.  
E. (1994)  
Monoclonal antibody detection of porcine meat  
J. Food Prot. **57**, 146-149
- N. N. (2004)  
Fleischverbrauch 2004  
[www.fleischerhandwerk.de/front\\_content.php?client=1&lang=1&idcat=31&idart=174](http://www.fleischerhandwerk.de/front_content.php?client=1&lang=1&idcat=31&idart=174), Zu-  
griff am 06.02.2007
- N. N. (2005)  
DNS-Chips  
Forschung aktuell - Ein Service der Bayer AG für die Unterrichtsgestaltung zum For-  
schungsmagazin research, Ausgabe 17

N. N. (2006a)

Bayerisches Landesamt für Gesundheit und Lebensmittelsicherheit Untersuchungsergebnisse  
Jahresbericht 2005

N. N. (2006b)

Der Islam in Zahlen und Fakten  
<http://www.stol.it/nachrichten/artikel.asp?KatId=dd&ArtID=73732&SID=5386921926108882108>, Zugriff am 03.01.2007

N. N. (2006c)

Deutschland  
<http://www.auswaertiges-amt.de/diplo/de/Laender/Deutschland.html>, Zugriff am 07.02.2007

N. N. (2006d)

Statistisches Bundesamt Deutschland 2006 Bevölkerung nach Altersgruppen, Familienstand und Religionszugehörigkeit  
<http://www.destatis.de/basis/d/bevoe/bevoetab5.php>, Zugriff am 03.01.2007

N. N. (2007a)

Hinduismus  
<http://de.wikipedia.org/wiki/Hinduismus>, Zugriff am 03.01.2007

N. N. (2007b)

Judentum  
<http://de.wikipedia.org/wiki/Judentum>, Zugriff am 03.01.2007

N. N. (2007c)

Nahrungstabu  
<http://de.wikipedia.org/wiki/Nahrungstabu>, Zugriff am 03.01.2007

NEWTON C. R. und GRAHAM A. (1997)

PCR  
Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg, Berlin, Oxford, 2. Auflage

OBROVSKÁ I., STEINHAUSEROVÁ I. und KRKOŠKA L. (2004)

Tierart-Identifizierung beim Fleisch durch die Multiplex-Polymerasekettenreaktion  
Fleischwirtsch. **84**, 96-99

- OGDEN R. C. und ADAMS D. A. (1987)  
Electrophoresis in agarose and acrylamide gels  
Meth. Enzymol. **152**, 61-87
- OUCHTERLONY Ö. (1962)  
Diffusion-in-gel methods for immunological analysis I.  
Prog. Allergy **5**, 1-78
- OUCHTERLONY Ö. (1985)  
Diffusion-in-gel methods for immunological analysis II.  
Prog. Allergy **6**, 30-154
- PARSON W., PEGORARO K., NIEDERSTATTER H., FOGER M. und  
STEINLECHNER M. (2000)  
Species identification by means of the cytochrome b gene  
Int. J. Legal Med. **114**, 23-28
- PARTIS L., CROAN D., GUO Z., CLARK R., COLDHAM T. und MURBY J. (2000)  
Evaluation of a DNA fingerprinting method for determining the species origin of meats  
Meat Sci. **54**, 369-376
- PATTERSON R. L. S. und JONES S. J. (1989)  
Species identification in heat processed products  
Proc. 35th International Congress Meat Sci. and Technology, Copenhagen, Band II, 529-  
536
- PATTERSON R. L. S. und JONES S. J. (1990)  
Review of current techniques of the verification of the species origin of meat  
Analyst **115**, 501-506
- PATTERSON R. M. und SPENCER T. L. (1985)  
Differentiation of Raw Meat from Phylogenically Related Species by Enzyme-Linked  
Immunosorbent Assay  
Meat Sci. **15**, 119-123
- PATTERSON R. M., WHITTAKER R. G. und SPENCER T. L. (1984)  
Improved species identification of raw meat by double sandwich enzyme-linked  
immunosorbent assay  
J. Sci. Agric. **35**, 1018-1023

PAXINOS E., MCINTOSH C., RALLIS K. und FLEISCHER R. (1997)  
A non-invasive method for distinguishing among canid species: amplification and enzyme restriction of DNA from dung  
*Mol. Ecol.* **6**, 483-486

PETER C. (2003)  
Evaneszent-Feld-DNA-Biosensor zur schnellen, zeitaufgelösten Detektion multipler Hybridisierungsereignisse – Einsatz zur Tierartendifferenzierung in Lebensmitteln und für die Identifizierung von Mikroorganismen  
Diss. Chem., Mathematisch-Naturwissenschaftliche Fakultät der WU Münster

PINGOUD A. und URBANKE C. (1997)  
Arbeitsmethoden der Biochemie  
Walter de Gruyter, Berlin

PLATH A., KRAUSE I. und EINSPANNIER R. (1997)  
Species identification in dairy products by three different DNA-based techniques  
*Z. Lebensm. Unters. Forsch. A* **205**, 437-441

PODSADLOWSKI V. (2004)  
Neue Fluorophore für die Bioanalytik – Verwendung in der Tierartendifferenzierung mittels DNA-Biosensor und DNA-Chiptechnologie  
Diss. Chem., Mathematisch-Naturwissenschaftliche Fakultät der WU Münster

POSER R., DETSCH R., FISCHER K., MÜLLER W.-D., BEHRSCHEMIDT M. und SCHWÄGELE F. (2000)  
Tier- und Pflanzenarten in bei unterschiedlichen Temperaturen behandelten Fleischerzeugnissen. Identifikation mittels Polymerase-Kettenreaktion, DNA-Sondentechnik und ELISA  
*Fleischwirtsch.* **80**, 87-89

QIAGEN (2005)  
Principle and procedure  
DNeasy® Tissue Handbook

REA S., CHIKUNI K. und AVELLINI P. (1996)  
Possibility of Using Single Strand Conformation Polymorphism (SSCP) Analysis for Discrimination European Pig and Wild Boar Meat Samples  
*Ital. J. Food Sci.* **3**, 211-220

- RICHMAN A. D. und PRICE T. (1992)  
Evolution of ecological differences in the old world leaf warblers  
*Nature* **355**, 818-821
- RODRÍGUEZ M. A., GARCÍA T., GONZÁLEZ I., ASENSIO L., FERNÁNDEZ A., LOBO E., HERNÁNDEZ P. E. und MARTÍN R. (2001)  
Identification of goose (*Anser anser*) and mule duck (*Anas platyrhynchos* x *Carina moschata*) foie gras by multiplex polymerase chain reaction amplification of the 5s rDNA gene  
*J. Agric. Food Chem.* **49**, 2717-2721
- RODRÍGUEZ M. A., GARCÍA T., GONZÁLEZ I., ASENSIO L., MAYORAL B., LÓPEZ-CALLEJA I., HERNÁNDEZ P. E. und MARTÍN R. (2003)  
Identification of goose, mule duck, chicken, turkey and pork in foie gras by species-specific PCR  
*J. Agric. Food Chem.* **51**, 1524-1529
- RODRÍGUEZ M. A., GARCIA T., GONZALEZ I., ASENSIO L., HERNANDEZ P. E. und MARTÍN R. (2004a)  
PCR identification of beef, sheep, goat and pork in raw and heat-treated meat mixtures  
*J. Food Prot.* **67**, 172-177
- RODRÍGUEZ M. A., GARCÍA T., GONZÁLEZ I., ASENSIO L., HERNÁNDEZ P. E. und MARTÍN R. (2004b)  
Quantitation of mule duck in goose foie gras using TaqMan real-time polymerase chain reaction  
*J. Agric. Food Chem.* **52**, 1478-1483
- ROSSMANITH W. und BAUER F. (1994)  
Enzymimmunologischer Nachweis von Hühnerfleisch in erhitzten Fleischwaren  
*Wien. Tierärztl. Mschr* **81**, 253-258
- RÜGGERBERG H., GAEDE W., TSCHIRDEWAHN B., BOOKE A. und MÜLER M. (1997)  
Tierartidentifizierung bei gekochten Fleischproben. Ein methodischer Vergleich der PCR-Analyse, der DNA-Sonden-Technik und der isoelektrischen Fokussierung  
*Fleischwirtsch.* **77**, 732-734
- RUSSO C., TAKEZAKI N. und NEI M. (1996)  
Efficiencies of different genes and tree-building methods in recovering a known vertebrate phylogeny  
*Mol. Biol. Evol.* **13**, 525-536

SAMARAJEEWA U., WEI C. I., HUANG T. S. und MARSHALL M. R. (1991)  
Application of Immunoassay in the Food Industry  
Crit. Rev. Food Sci. Nutr. **29**, 403-434

SAMBROOK J. und RUSSELL D. W. (2001)  
In vitro Amplification of DNA by PCR  
Molecular Cloning a laboratory manual, Vol. 2, CSHL Press, New York, 3. Auflage

SAWAYA W. N., SAEED T., MAMEESH M., EL-RAYES E., HUSAIN A., AIP S. und RAHMAN A. (1990)  
Detection of Pork in Processed Meat: Experimental Comparison of Methodology  
Food Chem. **37**, 201-219

SAWYER J., WOOD C., SHANAHAN D., GOUT S. und McDOWELL D. (2003)  
Real-time PCR for quantitative meat species testing  
Food Control **14**, 579-583

SCHILDKRAUT C. und LIFSON S. (1965)  
Dependence of the melting temperature of DNA on the salt concentration  
Biopolymers **3**, 195-208

SCHWÄGELE F. (1999)  
Bewertung immunologischer und gentechnischer Methoden  
Kulmbacher Reihe: Analytik bei Fleisch, Schnell-, Schätz- und Messmethoden Band **16**,  
83-105

SCHWÄGELE F. (2001a)  
Analytik bei Fleisch. Bewertung immunologischer und gentechnischer Methoden  
Fleischwirtsch. **81**, 78-81

SCHWÄGELE F. (2001b)  
Informationen über BSE. Möglichkeiten und Grenzen der Analytik.  
Fleischwirtsch. **81**, 143-145

SCHWÄGELE F. (2004)  
Bestimmung von Herkunft und Tierart in Fleisch und Fleischerzeugnissen  
Mittbl. BAFF Kulmbach, 43. Jahrgang, Nr. **165**, 247-256

SCHWÄGELE F. (2005)  
Bestimmung von Herkunft und Tierart in Fleisch und Fleischerzeugnissen  
Fleischwirtsch. **85**, 108-112

- SCHWÄGELE F., MÜLLER E. und FISCHER K. (2002)  
Differenzierung von Schaf und Ziege mittels PCR (Polymerase Chain Reaction) in  
Fleisch- und Milcherzeugnissen  
Jahresbericht BAFF Kulmbach 2002, 79-80
- SCHWEIGER A., BRANDNER S. und GÜNTHER H. O. (1983)  
Isolation by free-flow electrophoresis and immunological detection of troponin T from tur-  
key muscle: An Application in Food Chemistry  
Electrophoresis **4**, 158-163
- SCOPES R. K. (1968)  
Methods for starch-gel electrophoresis of sarcoplasmic proteins. An investigation of the  
relative mobilities of the glycolytic enzymes from the muscles of a variety of species  
J. Biochem. **107**, 139-150
- SHERIKAR A. T., KHOT J. B., JAYARAO B. M. und PILLAI S. R. (1988)  
Use of species specific antisera to adrenal heat-stable antigens for the identification of  
raw and cooked meats by agar gel diffusion and immunoelectrophoretic Techniques  
J. Sci. Food Agric. **44**, 63-73
- SHEU S. – C. und HSIEH Y. – H. P. (1998)  
Production and partial characterization of monoclonal antibodies specific to cooked  
poultry meat  
Meat Sci. **50**, 315-326
- SINELL H.-J. (1968)  
Probleme bei der Spezies-Identifizierung von Proteinen in Lebensmitteln  
Arch. Lebensmittelhyg. **19**, 121-125
- SINELL H.-J., MENTZ I. und KLEER J. (1991)  
Versuche zur halbquantitativen Abschätzung von Rind- und Schweinefleischanteilen in  
Hackfleischgemischen mittels ELISA  
Arch. Lebensmittelhyg. **42**, 42-46
- SLATTERY W. J. und SINCLAIR A. J. (1983)  
Differentiation of meat according to species by the electrophoretic separation of muscle  
lactatdehydrogenase and sterase isoenzymes and isoelectric focusing of soluble muscle  
proteins  
Aust. Vet. J. **60**, 47-51

SMITH M. F. und PATTON J. L. (1991)

Variation in mitochondrial cytochrome b sequence in natural populations of South American akodontine rodents (Muridae: Sigmodontinae)

Mol. Biol. Evol. **8**, 85-103

SPERNER B. und SCHROETER G. (1999)

Serologischer Tierartennachweis in Fleischerzeugnissen aus dem Handel

Proc. **40**. DVG Arbeitstagung des Arbeitsgebietes Lebensmittelhygiene, Garmisch-Partenkirchen, 498-501

SPERNER B. GREIL B. und STOLLE A. (2002)

Möglichkeiten falsch positiver Ergebnisse beim Nachweis von Rind mittels ELISA

RFL **54**, 27-28

STENGEL (1992)

Tierartdifferenzierung in erhitzten Fleischerzeugnissen mittels ELISA

Referat auf **45**. Arbeitstagung des Arbeitskreises Lebensmittelhygienischer Tierärztlicher Sachverständiger 1992, Berlin

STOLLE A. (2007a)

Gutachtenerstellung für Zollakten

Persönliche Mitteilung

STOLLE A. (2007b)

Bratenfond vom Rind

Persönliche Mitteilung

STRYER L. (1999)

Biochemie

Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg, Berlin, Oxford, 4. Auflage

TH.GEYER (2007)

PCRFast® Testkits Tierarten

<http://ww2.thgeyer.de/13.htm>, Zugriff am 03.02.2007

TINBERGEN B. J. und OLSMAN W. J. (1976)

Isoelektrische Fokussierung als eine Technik zur Speziesidentifizierung in der Lebensmittelüberwachung

Fleischwirtsch. **56**, 1495-1498

TRANSIA (2003)

Immunoenzymatischer Nachweis von Tierarten in erhitzten Fleischwaren  
Manual, Version 12/03 DT-5020-DT-5026 Tierarten erhitzt

TRANSIA (2006)

Informationen zum Test DT-5020

[http://www.transis.de/de/print\\_article.php?id=55](http://www.transis.de/de/print_article.php?id=55), Zugriff am 07.05.2006

UNSELD M., BEYERMANN B., BRANDT P. und HIESEL R. (1995)

Identification of the Species Origin of Highly Processed Meat Products by Mitochondrial DNA Sequences

PCR Methods Appl. **4**, 241-243

VAWTER L. und BROWN W.M. (1986)

Nuclear and Mitochondrial DNA Comparisons Reveal Extreme Rate Variation in the Molecular Clock

Science **234**, 194-196

Verordnung (EG) Nr. 178/2002 des Europäischen Parlaments und des Rates vom 28. Januar 2002 zur Festlegung der allgemeinen Grundsätze und Anforderungen des Lebensmittelrechts, zur Errichtung der Europäischen Behörde für Lebensmittelsicherheit und zur Festlegung von Verfahren zur Lebensmittelsicherheit (ABl. Nr. L 31 S. 1)

Verordnung über die Kennzeichnung von Lebensmitteln (Lebensmittel-Kennzeichnungsverordnung – LMKV) in der Fassung der Bekanntmachung vom 15. Dezember 1999 (BGBl. I S. 2464)

WAIBLINGER H.-U., WEBER W. und KLEINERT T. (1998)

Differenzierung von Wildfleischproben mittels DNA- und Protein-Analytik  
Lebensmittelchem. **52**, 97-99

WALKER J. A., HUGHES D. A., ANDERS B. A., SHEWALE J., SINHA A. K. und BATZER M. A. (2003)

Quantitative intra-short interspersed element PCR for species-specific DNA identification  
Anal. Biochem. **316**, 259-269

WALKER J. A., HUGHES D. A., HEDJES D. J., ANDERS B. A., LAORDE M. E., SHEWALE J., SINHA S. K. und BATZER M. A. (2004)

Quantitative PCR for DNA identification based on genome-specific interspersed repetitive elements

Genomics **83**, 518-527

WANG C. H. und SMITH D. M. (1995)

Lactate Dehydrogenase Monoclonal Antibody Immunoassay for Detection of Turkey Meat in Beef and Pork

J. Food Sci. **60**, 253256

WARRISS P. D. (1977)

The residual blood content of meat - A review

J. Sci. Food Agric. **28**, 457-462

WEINGARTEN G. und KLARE H.-J. (2001)

Der Tierartennachweis bei Fleisch und Fleischerzeugnissen – eine gesicherte Vorgehensweise in der amtlichen Lebensmittelüberwachung

Arch. Lebensmittelhyg. **52**, 105-107

WEN S. Y., WANG H., SUN O. J. und WANG S. Q. (2003)

Rapid detection of the known SNPs of CYP2C9 using oligonucleotide microarray

World J. Gastroenterol. **9**, 1342-1346

WHITTAKER R. G., SPENCER T. L. und COPLAND J. W. (1982)

Enzyme-linked immunosorbent assay for meat species testing

Aust. Vet. J. **59**, 125-131

WHITTAKER R. G., SPENCER T. L. und COPLAND J. W. (1983)

An enzyme-linked immunosorbent assay for species identification of raw meat

J. Sci. Food Agric. **34**, 1143-1148

WIJNGAARDS G. (2001)

Tierartidentifizierung nicht fehlerfrei. Ergebnisse des enzymgebundenen Immunosorbent-Tests (ELISA) im Zweifel überprüfen.

Fleischwirtsch. **81**, 21-23

WILLIAMS J. G. K., KUBELIK A. R., LIVAK K. J., RAFALSKI J. A. und TING-LEY S. V. (1991)

DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful genetic markers

Nucleic Acids Res. **18**, 6531-6535

WINDHORST H.-W. (2005)

Strukturen des Globalen Handels Auswirkungen aus räumlichen Verlagerungsprozessen auf Handelsverflechtungen - Teil 2

Fleischwirtsch. **85**, 14-22

- WINDHORST H.-W. (2006)  
Dynamik bestimmt das Jahrzehnt, Prognosen für die Entwicklung von Produktion und Handel bis zum Jahr 2015 – Teil 1  
Fleischwirtsch. **86**, 14-17
- WINTERØ A. K., THOMSEN P. D. und DAVIES W. (1990)  
A Comparison of DNA-Hybridization, Immunodiffusion, Countercurrent Immuno-electrophoresis and Isoelectric Focusing for Detecting the Admixture of Pork to Beef  
Meat Sci. **27**, 75-85
- WOLF D., RENTSCH J. und HUBNER P. (1999)  
PCR-RFLP analysis of mitochondrial DNA: a reliable method for species identification  
J. Agric. Food Chem. **47**, 1350-1355
- WOLF H., GAEDE W., WOLF C., ZELLERMANN S. und HÖBER S. (2001)  
Nachweis von tierischen Bestandteilen im Mischfutter  
Fleischwirtsch. **81**, 197-201
- WÜTHRICH B. (1993)  
Zur Nahrungsmittelallergie – Häufigkeit der Symptome und der allergieauslösenden Nahrungsmittel bei 402 Patienten  
Allergologie **16**, 280-287
- ZEHNER R., ZIMMERMANN S. und MEBS D. (1998)  
RFLP and sequence analysis of the cytochrome b gene of selected animals and man: methodology and forensic application  
Int. J. Legal Med. **111**, 323-327
- ZHANG G., ZHENG M., ZHOU Z., OUYANG H. und LU Q. (1999)  
Establishment and application of a Polymerase Chain Reaction for the identification of beef  
Meat Sci. **51**, 233-236
- ZIERLER B. (2001)  
Tierartendifferenzierung und Quantifizierung mittels Real Time -PCR  
Diplomarbeit, Institut für Lebensmittelchemie und -technologie der TU Graz
- ZIERLER B., REMLER P., MÜLLEDER U., KORAIMANN C. und PFANNHAUSEN W. (2004)  
Tierartendifferenzierung in Fleisch und Fleischprodukten,  
Ernährung / Nutrition **28**, 23-29

---

ZIMMERMANN S., ZEHNER R. und MEBS D. (1998)  
Tierartenidentifizierung aus Fleischproben mittels DNA-Analyse  
Fleischwirtsch. **78**, 530-533

### **9.4.2 Amtliche Sammlung von Untersuchungsverfahren nach § 64 LFGB**

Beuth Verlag

L 06.00-12 (1996)

Nachweis von rohem und erhitztem Rind- und Schweinefleisch in Fleisch und Fleischerzeugnissen Screening-Verfahren

L 06.00-17 (1988)

Nachweis der Tierart bei nativem Muskelfleisch mit Hilfe der isoelektrischen Fokussierung (PAGIF)

L 06.00-27 (1988)

Nachweis der Tierart bei nativem Muskelfleisch in Polyacrylamid-Gelen mit Hilfe der Standard-Elektrophorese (PAGE)

L 06.00-29 (1990)

Nachweis der Tierart bei erhitztem Muskelfleisch mit Hilfe der isoelektrischen Fokussierung (PAGIF)

L 06.00-35 (1986)

Nachweis von Proteinen in Fleischerzeugnissen – Doppelte Golddiffusion nach Ouchterlony

L 06.00-47 (2002)

Nachweis der Tierart bei erhitztem Fleisch und Fleischerzeugnissen Enzymimmunologisches Verfahren (ELISA)





## Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. Dr. h. c. A. Stolle, Leiter des Instituts für Hygiene und Technologie der Lebensmittel tierischen Ursprungs, für die Überlassung des Themas, sowie für die Durchsicht der Arbeit.

Ein herzliches Dankeschön gilt auch Frau Dr. B. Sperner und Frau Dr. M. Fredriksson-Ahomaa für die freundliche Einführung in die Thematik und die fachlichen Gespräche. Darüber hinaus danke ich ihnen für ihre Unterstützung durch konstruktive Ratschläge und wertvolle Hinweise sowie für das Korrekturlesen der Arbeit.

Ferner bedanke ich mich bei allen Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern des Instituts für die Hilfsbereitschaft und die freundliche und entspannte Arbeitsatmosphäre. Besonders danke ich Frau I. Fitzek und Frau U. Demuth für die informativen Gespräche und Herrn Kollegen A. Murf für die Anfertigung der Probenmodelle.

Desweiteren bedanke ich mich auch bei allen Mitarbeitern des Bayerischen Landesamt für Gesundheit und Lebensmittelsicherheit, die mir ebenfalls mit fachlichen Gesprächen sehr weiter geholfen haben.

Darüber hinaus gilt mein Dank Frau M. Mahling und Herrn Prof. Dr. H. Küchenhoff für die ausführliche Beratung und Hilfe bei der statistischen Auswertung.

Zum Schluss danke ich meiner Familie und all meinen Freunden für ihre unermüdliche Aufmunterung und Motivation. Meinem Freund gilt besonderer Dank für so viel Verständnis und Geduld in den vergangenen Monaten.



## Lebenslauf

**Name:** Elisabeth Johanna Stüber

**Geburtsdatum:** 24. Februar 1981

**Geburtsort:** Starnberg

**Familienstand:** ledig

**Eltern:** Christine Stüber geb. Weinrich  
Dipl. Ing. FH Landschaftsarchitektin  
Arnold Stüber  
Studium der Chemie

### Schulbildung:

1987-1991 Volksschule in München (Grundschule)

1991-2000 Gymnasium Unterhaching

Mai 2000 Abitur

### Universitätsausbildung:

2000-2006 Studium der Tiermedizin an der Tierärztlichen Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität München

März 2006 Tierärztliches Staatsexamen

März 2006 Approbation als Tierärztin

### Derzeitige Tätigkeit:

seit April 2006 Promotionsvorhaben am Institut für Hygiene und Technologie der Lebensmittel tierischen Ursprungs der Ludwig-Maximilians-Universität München