



Universität für Bodenkultur Wien

# DIPLOMARBEIT

## Validierung von quantitativen Real-time PCR-Methoden zur Differenzierung von Tierarten in Lebensmitteln

angestrebter akademischer Grad

Diplom-Ingenieurin (DI)

Verfasserin:	Maral Khoshknabi, BSc.
Studienrichtung:	Lebensmittelwissenschaft und - technologie
Betreuer:	Richard Strasser, Assoc. Prof. Dr. Mag. Rupert Hohegger
Ort der Durchführung:	Agentur für Gesundheit und Ernährungssicherheit GmbH, Spargelfeldstraße 191, 1220 Wien
Wien, im Oktober 2018	



# INHALTSVERZEICHNIS

ABBILDUNGSVERZEICHNIS .....	I
TABELLENVERZEICHNIS .....	II
ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS .....	IV
ZUSAMMENFASSUNG .....	1
ABSTRACT .....	2
1 EINLEITUNG .....	4
1.1 Gesetzeslage – Verbot der Irreführung .....	4
1.2 Gesundheitsrisiko .....	5
1.3 Religiöse Gründe .....	5
1.4 Methoden zur Speziesidentifikation .....	5
1.4.1 Protein-basierte Methoden .....	5
1.4.2 DNA-Basierte Methoden .....	7
2 ZIELSETZUNG .....	10
3 THEORETISCHE GRUNDLAGEN .....	11
3.1 DNA-Extraktion .....	11
3.2 Polymerasekettenreaktion (PCR) .....	12
3.3 Reaktionskomponenten .....	12
3.4 Ablauf der PCR .....	15
3.5 Hot-Start-PCR .....	15
3.6 Real Time PCR .....	16
3.6.1 Detektionsmethoden der Real-time PCR .....	16
3.6.1.1 TaqMan-Sonde .....	16
3.6.1.2 SYBR Green .....	17

<b>3.7</b>	<b>Duplex-Assay .....</b>	<b>17</b>
<b>3.8</b>	<b>Begriffe der Real-time PCR .....</b>	<b>18</b>
<b>4</b>	<b>MATERIAL UND METHODEN.....</b>	<b>21</b>
<b>4.1</b>	<b>Probenmaterial.....</b>	<b>21</b>
4.1.1	Fleischproben.....	21
4.1.2	Modellwürste.....	21
4.1.3	Kommerziell erhältliche Lebensmittelprodukte .....	21
<b>4.2</b>	<b>Herstellung der Probenaufschlüsse .....</b>	<b>21</b>
4.2.1	Prinzip .....	21
4.2.2	Geräte .....	22
4.2.3	Chemikalien und Reagenzien .....	22
4.2.4	Durchführung.....	22
<b>4.3</b>	<b>Herstellung der Probenaufschlussmischungen und Kalibrator-Lösungen mit unterschiedlicher Zusammensetzung an zwei verschiedenen Tierarten .....</b>	<b>23</b>
4.3.1	Prinzip .....	23
4.3.2	Geräte .....	23
4.3.3	Durchführung.....	23
<b>4.4</b>	<b>DNA-Extraktion .....</b>	<b>23</b>
4.4.1	Prinzip .....	23
4.4.2	Geräte .....	24
4.4.3	Chemikalien und Reagenzien .....	24
4.4.4	Durchführung.....	24
<b>4.5</b>	<b>Konzentrations- und Reinheitsbestimmung der DNA .....</b>	<b>25</b>
4.5.1	Prinzip .....	25
4.5.2	Geräte .....	25
4.5.3	Chemikalien und Reagenzien .....	25
4.5.4	Durchführung.....	26
<b>4.6</b>	<b>Einstellung der DNA-Konzentration.....</b>	<b>26</b>
4.6.1	Prinzip .....	26
4.6.2	Geräte .....	26
4.6.3	Chemikalien und Reagenzien .....	26
<b>4.7</b>	<b>Real Time PCR .....</b>	<b>27</b>

4.7.1	Prinzip .....	27
4.7.2	Geräte .....	27
4.7.3	Chemikalien und Reagenzien .....	27
4.7.4	Durchführung.....	28
4.7.5	Temperatur-Zeit-Programm .....	28
4.7.6	Mastermix.....	28
4.7.7	Primer und Sonden .....	29
4.7.8	Pipettierschema.....	30
4.7.9	Erstellung der Standardkurve .....	31
4.7.10	Auswertung der PCR-Ergebnisse.....	34
<b>4.8</b>	<b>Validierung.....</b>	<b>35</b>
<b>5</b>	<b>ERGEBNISSE .....</b>	<b>36</b>
<b>5.1</b>	<b>Schwein.....</b>	<b>36</b>
5.1.1	Konzentrations- und Reinheitsbestimmung der DNA.....	36
5.1.2	Validierung.....	37
5.1.2.1	Bestimmungsgrenze (LOQ = limit of quantification) .....	37
5.1.2.2	Wiederfindung und Wiederholbarkeit .....	41
5.1.2.3	Robustheit .....	44
<b>5.2</b>	<b>Pferd .....</b>	<b>49</b>
5.2.1	Konzentrations- und Reinheitsbestimmung der DNA.....	49
5.2.2	Validierung.....	49
5.2.2.1	Bestimmungsgrenze .....	49
5.2.2.2	Wiederfindung und Wiederholbarkeit .....	52
5.2.2.3	Robustheit .....	55
<b>5.3</b>	<b>Pute.....</b>	<b>59</b>
5.3.1	Konzentrations- und Reinheitsbestimmung der DNA.....	59
5.3.2	Validierung.....	59
5.3.2.1	Bestimmungsgrenze .....	59
5.3.2.2	Wiederfindung und Wiederholbarkeit .....	61
5.3.2.3	Robustheit .....	65
<b>5.4</b>	<b>Anwendbarkeit .....</b>	<b>67</b>
5.4.1	Modellwürste.....	67
5.4.1.1	Konzentrations- und Reinheitsbestimmung der DNA .....	68
5.4.1.2	Quantitative Real-time PCR.....	68

5.4.2	Kommerziell erhältliche Lebensmittelprodukte .....	71
5.4.2.1	Konzentrations- und Reinheitsbestimmung der DNA .....	72
5.4.2.2	Qualitative Real-time PCR .....	72
5.4.2.3	Quantitative Real-time PCR .....	78
6	DISKUSSION.....	79
7	LITERATURVERZEICHNIS .....	82
8	APPENDIX.....	85
8.1	<b>Validierungsplan: Real-time PCR Methode zur Quantifizierung von Schwein .....</b>	<b>85</b>
8.2	<b>Validierungsplan: Real-time PCR Methode zur Quantifizierung von Pferd .....</b>	<b>92</b>
8.3	<b>Validierungsplan: Real-time PCR Methode zur Quantifizierung von Pute.....</b>	<b>99</b>

## ABBILDUNGSVERZEICHNIS

<i>Abbildung 1: Amplifikationskurve [Thermo Fisher Scientific, 2014] .....</i>	<i>19</i>
<i>Abbildung 2: Standardkurve [Thermo Fisher Scientific, 2014].....</i>	<i>20</i>
<i>Abbildung 3: Programm von Maxwell DNA-Extraktionsroboter .....</i>	<i>25</i>
<i>Abbildung 4: Standardkurve der Target-PCR für Probe Pute in Schwein.....</i>	<i>32</i>
<i>Abbildung 5:Amplifikationskurve der Target-PCR für Probe Pute in Schwein .....</i>	<i>33</i>
<i>Abbildung 6: Standardkurve der Referenz-PCR für Probe Pute in Schwein .....</i>	<i>33</i>
<i>Abbildung 7: Amplifikationskurve der Referenz-PCR für Probe Pute in Schwein.....</i>	<i>34</i>
<i>Abbildung 8: Amplifikationskurve der Probe Putenextrawurst mit Detektor Huhn .....</i>	<i>75</i>
<i>Abbildung 9: Amplifikationskurve der Probe Pferdecabanossi mit Detektor Pferd.....</i>	<i>75</i>
<i>Abbildung 10: Amplifikationskurve der Proben Putenextrawurst und Pferdecabanossi mit Detektor Pute.....</i>	<i>76</i>
<i>Abbildung 11: Amplifikationskurve der Probe Schweinesalami mit Detektor Rind.....</i>	<i>77</i>
<i>Abbildung 12: Amplifikationskurve der Proben Schweinesalami, Pferdecabanossi und Putenextrawurst mit Detektor Schwein .....</i>	<i>77</i>

## TABELLENVERZEICHNIS

<i>Tabelle 1: Schema von prozentueller Zusammensetzung der Probenaufschlussmischungen .....</i>	<i>23</i>
<i>Tabelle 2: Temperatur-Zeit-Programm der Real-time PCR .....</i>	<i>28</i>
<i>Tabelle 3: Pipettierschema der regulären Real-time PCR Läufe.....</i>	<i>31</i>
<i>Tabelle 4: Pipettierschema der Real-time PCR Läufe zur Prüfung der Robustheit.....</i>	<i>31</i>
<i>Tabelle 5: Konzentrations- und Reinheitsbestimmung des Probensystems Schwein.....</i>	<i>36</i>
<i>Tabelle 6: Bestimmungsgrenze der Probe Schwein in Huhn .....</i>	<i>39</i>
<i>Tabelle 7: Bestimmungsgrenze der Probe Schwein in Pute .....</i>	<i>40</i>
<i>Tabelle 8: Bestimmungsgrenze der Probe Schwein in Rind.....</i>	<i>40</i>
<i>Tabelle 9: Wiederfindung und Wiederholbarkeit der Probe Schwein in Huhn Teil 1 .....</i>	<i>41</i>
<i>Tabelle 10: Wiederfindung und Wiederholbarkeit der Probe Schwein in Huhn Teil 2 .....</i>	<i>42</i>
<i>Tabelle 11: Wiederfindung und Wiederholbarkeit der Probe Schwein in Pute Teil 1 .....</i>	<i>42</i>
<i>Tabelle 12: Wiederfindung und Wiederholbarkeit der Probe Schwein in Pute Teil 2 .....</i>	<i>43</i>
<i>Tabelle 13: Wiederfindung und Wiederholbarkeit der Probe Schwein in Rind Teil 1.....</i>	<i>43</i>
<i>Tabelle 14: Wiederfindung und Wiederholbarkeit der Probe Schwein in Rind Teil 2.....</i>	<i>44</i>
<i>Tabelle 15: Robustheit der Probe Schwein in Huhn.....</i>	<i>46</i>
<i>Tabelle 16: Robustheit der Probe Schwein in Pute.....</i>	<i>47</i>
<i>Tabelle 17: Robustheit der Probe Schwein in Rind .....</i>	<i>48</i>
<i>Tabelle 18: Konzentrations- und Reinheitsbestimmung des Probensystems Pferd .....</i>	<i>49</i>
<i>Tabelle 19: Bestimmungsgrenze der Probe Pferd in Huhn .....</i>	<i>50</i>
<i>Tabelle 20: Bestimmungsgrenze der Probe Pferd in Rind .....</i>	<i>51</i>
<i>Tabelle 21: Bestimmungsgrenze der Probe Pferd in Schwein .....</i>	<i>51</i>
<i>Tabelle 22: Wiederfindung und Wiederholbarkeit der Probe Pferd in Huhn Teil 1.....</i>	<i>52</i>
<i>Tabelle 23: Wiederfindung und Wiederholbarkeit der Probe Pferd in Huhn Teil 2.....</i>	<i>53</i>
<i>Tabelle 24: Wiederfindung und Wiederholbarkeit der Probe Pferd in Rind Teil 1 .....</i>	<i>53</i>
<i>Tabelle 25: Wiederfindung und Wiederholbarkeit der Probe Pferd in Rind Teil 2 .....</i>	<i>54</i>
<i>Tabelle 26: Wiederfindung und Wiederholbarkeit der Probe Pferd in Schwein Teil 1 ....</i>	<i>54</i>
<i>Tabelle 27: Wiederfindung und Wiederholbarkeit der Probe Pferd in Schwein Teil 2 ....</i>	<i>55</i>
<i>Tabelle 28: Robustheit der Probe Pferd in Huhn .....</i>	<i>56</i>
<i>Tabelle 29: Robustheit der Probe Pferd in Rind.....</i>	<i>57</i>
<i>Tabelle 30: Robustheit der Probe Pferd in Schwein.....</i>	<i>57</i>

<i>Tabelle 31: Konzentrations- und Reinheitsbestimmung des Probensystems Pute</i> .....	59
<i>Tabelle 32: Bestimmungsgrenze der Probe Pute in Huhn</i> .....	60
<i>Tabelle 33: Bestimmungsgrenze der Probe Pute in Rind</i> .....	60
<i>Tabelle 34: Bestimmungsgrenze der Probe Pute in Schwein</i> .....	61
<i>Tabelle 35: Wiederfindung und Wiederholbarkeit der Probe Pute in Huhn Teil 1</i> .....	62
<i>Tabelle 36: Wiederfindung und Wiederholbarkeit der Probe Pute in Huhn Teil 2</i> .....	62
<i>Tabelle 37: Wiederfindung und Wiederholbarkeit der Probe Pute in Rind Teil 1</i> .....	63
<i>Tabelle 38: Wiederfindung und Wiederholbarkeit der Probe Pute in Rind Teil 2</i> .....	63
<i>Tabelle 39: Wiederfindung und Wiederholbarkeit der Probe Pute in Schwein Teil 1</i> .....	64
<i>Tabelle 40: Wiederfindung und Wiederholbarkeit der Probe Pute in Schwein Teil 2</i> .....	64
<i>Tabelle 41: Robustheit der Probe Pute in Huhn</i> .....	66
<i>Tabelle 42: Zusammensetzung der Modellwürste A, B und C</i> .....	67
<i>Tabelle 43: Konzentrations- und Reinheitsbestimmung der Modellwürste A, B und C</i> ..	68
<i>Tabelle 44: Quantitative Real-time PCR der Modellwürste A, B und C mit Kalibrator 20% Schwein in 80% Rind</i> .....	69
<i>Tabelle 45: Quantitative Real-time PCR der Modellwurst B mit Kalibrator 20% Pferd in 80% Schwein</i> .....	70
<i>Tabelle 46: Quantitative Real-time PCR der Modellwürste A und C mit Kalibrator 20% Pute in 80% Schwein</i> .....	71
<i>Tabelle 47: Konzentrations- und Reinheitsbestimmung der kommerziell erhältlichen Lebensmittelproben</i> .....	72
<i>Tabelle 48: Qualitative Real-time PCR der kommerziell erhältlichen Lebensmittelproben</i> .....	74
<i>Tabelle 49: Quantitative Real-time PCR der Probe Pferdecabanossi mit Kalibrator 50% Pferd in 50% Schwein</i> .....	78

## ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

A <sub>260</sub>	Absorption bei 260 nm
A <sub>280</sub>	Absorption bei 280 nm
Abb	Abbildung
BG	Bestimmungsgrenze
BHQ	Black hole quencher
BLAST	Basic Local Alignment Search Tool
bp	Basenpaare
c	Konzentration
Ct	Threshold cycle
CTAB	Cetyltrimethylammoniumbromid
DNA	Desoxyribonucleinsäure
dNTPs	Desoxynucleosidtriphosphate
ELISA	Enzyme-linked Immunosorbent Assay
FAM	Fluorescein amidite
Fw	Forward-Primer
GC	Guanin-Cytosin
GVOs	Gentechnisch veränderte Organismen
Mg	Magnesium
MGBQ	Minor groove binding nonfluorescent quencher
Min	Minute
NGS	Next Generation Sequencing
NTC	No Template Control
PCR	Polymerase Kettenreaktion
rpm	rounds per minute
Rt-PCR	Real-time Polymerase Kettenreaktion
Rv	Reverse-Primer
SD	Standardabweichung
SDS	Sodium dodecyl sulfate
Sek	Sekunde
Tab	Tabelle
UV	Ultraviolett
VIS	visable, sichtbares Licht
VK	Variationskoeffizient
WDF	Wiederfindung

## Zusammenfassung

In den letzten Jahren ist das Bedürfnis der Konsumenten, über Herkunft und Zusammensetzung der von Ihnen verzehrten Lebensmitteln informiert zu sein, enorm gestiegen. Vor allem seit dem Pferdefleischskandal, welcher im Jänner 2013 publik wurde, ist die Angst vor der Anwesenheit von nicht deklarierten Tierarten in Fleischprodukten groß. Für die Identifizierung von Tierarten in Fleischprodukten werden daher schnelle und effiziente Methoden benötigt, die bereits geringe Mengen einer bestimmten Tierart nachweisen und sogar auch quantifizieren können.

Ziel dieser Diplomarbeit war es, eine quantitative Real-time PCR Methode, angewendet auf verschiedene Tierarten-Kombinationen, zu validieren, um diese in die Routine-Analytik aufnehmen zu können. Aus Fleischproben von Huhn, Pferd, Pute, Rind und Schwein wurde mittels DNA-Extraktionsroboter die DNA isoliert und die Konzentration photometrisch bei 260 nm gemessen. Dabei lieferte der Quotient  $A_{260}/A_{280}$  Informationen über die Qualität, im engeren Sinne über die Reinheit der extrahierten DNA. Als Primer- und Sondengemische wurden Duplex-Systeme verwendet.

Ausgehend von einer Nachweisgrenze bei 0.1%, welche bereits laborintern ermittelt worden war, wurde festgelegt, als Bestimmungsgrenze  $\leq 1\%$  anzupeilen. Lediglich beim System Pferd in Schwein konnte die Tierart Pferd erst bei 1.5% quantifiziert werden; die restlichen Tierarten-Kombinationen wiesen Bestimmungsgrenzen zwischen 0.6 – 1% auf. Die quantitative Real-time PCR Methode erwies sich bei der Mehrheit der Tierarten-Kombinationen als sehr robust, da die Voraussetzung von  $\leq 1$  Ct-Wert-Abweichung eingehalten werden konnte.

Um die Anwendbarkeit der quantitativen Real-time PCR Methode zu testen, wurden, nach einer Rezeptur hergestellten, Modellwürste und kommerziell erhältliche Lebensmittel analysiert. Bei den gekauften Produkten handelte es sich um Schweinesalami, Pferdecabanossi und Putenextrawurst. Dabei bestand einzig die Schweinesalami ausschließlich aus der offensichtlichen Tierart; bei der Putenextrawurst konnte Huhn qualitativ an der Nachweisgrenze ermittelt werden.

Die Pferdecabanossi bestand lediglich zu ungefähr 38.6% aus Pferdefleisch, den restlichen Fleischgehalt machte Schweinefleisch aus.

## **Abstract**

In recent years, consumers' need to know the origin and composition of the food they eat has increased enormously. Especially since the horsemeat scandal, which became public in January 2013, the fear of the presence of undeclared animal species in meat products is great. The identification of animal species in meat products therefore requires fast and efficient methods that can detect and even quantify even small amounts of a specific animal species.

The aim of this diploma thesis was to validate a quantitative real-time PCR method, applied to different animal species combinations, in order to include them in routine analysis. From meat samples of chicken, horse, turkey, beef and pork DNA were isolated using an automated liquid handler and the concentration was measured photometrically at 260 nm. The quotient  $A_{260}/A_{280}$  provided information on the quality and the purity of the extracted DNA. The primer and probe mixtures used were duplex systems.

Based on a detection limit at 0.1%, which had already been determined in-house, it was determined that the limit of quantification should be  $\leq 1\%$ . Only in the system horse in pig, the species horse could be quantified at 1.5%; the remaining animal species combinations had limits of determination between 0.6 - 1%. The quantitative real-time PCR method proved to be very robust in most animal species combinations, as the requirement of  $\leq 1$  Ct value deviation could be maintained.

To test the applicability of the quantitative real-time PCR method, model sausages and commercially available foods, prepared according to a recipe, were analyzed. The purchased products were pig salami, horse cabanossi and turkey sausage. Only the pig salami consisted of the animal species it was declared to consist of; in the turkey sausage chicken was determined at the detection limit. The horse cabanossi consisted only of approximately 38.6% horse meat, the remaining meat content consisted of pork.



## 1 Einleitung

### 1.1 Gesetzeslage – Verbot der Irreführung

Nicht nur die Lebensmittelsicherheit, sondern auch die Authentizität von Lebensmitteln spielt für den Verbraucher und dessen Schutz eine große Rolle. Das Lebensmittelsicherheits- und Verbraucherschutzgesetz (LMSVG) regelt diverse Anforderungen an Lebensmittel und gemäß diesem Gesetz, ist es verboten, verfälschte oder in ihrem Wert geminderte Lebensmittel in Verkehr zu bringen. Des Weiteren soll es Konsumenten vor Irreführung aufgrund von falschen Angaben über das Lebensmittel und dessen Zusammensetzung schützen. Das Irreführungsverbot bezieht sich auf jede Information, die ein Lebensmittel betrifft und dem Konsumenten durch jegliche Art der Darbietung, sei es durch das Etikett oder über die Werbung, bereitgestellt wird.

„Als verfälscht (§ 5 Abs. 5 Z 3 LMSVG) <sup>1</sup> ist ein Lebensmittel zu beanstanden, wenn ihm entweder wertbestimmende Bestandteile, deren Gehalt vorausgesetzt wird, nicht oder nicht ausreichend hinzugefügt oder zur Gänze oder zum Teil entzogen werden oder wenn durch Zusatz oder Nichtentzug wertvermindernder Stoffe seine Verschlechterung bewirkt oder ihm durch irgendwelche Zusätze oder Manipulationen der Anschein einer besseren Beschaffenheit verliehen oder eine vorhandene Minderwertigkeit überdeckt wird. Auch ein Lebensmittel, welches nach einer unzulässigen Verfahrensart hergestellt wurde, ist als verfälscht zu beanstanden.“

Für Frischfleisch und Fleischerzeugnisse spielen Angaben von Tierart, Herkunft und Zusammensetzung eine große Rolle. Ein zu hoher Wassergehalt, die Verarbeitung von minderwertigem Gewebe oder die Anwesenheit von Separatorenfleisch, ohne dessen eindeutige Angabe, sind Fälle von Irreführung und Verbrauchertäuschung. Auch falsch deklarierte Fleischwaren, oder auch nur der geringste Zusatz an nachweisbarem, nicht-deklariertem Fleisch verstoßen gegen das LMSVG und gelten als Verfälschung. [Österreichisches Lebensmittelbuch, 2018]

---

<sup>1</sup> § 5 Abs. 5 Z 3 Lebensmittelsicherheits- und Verbraucherschutzgesetz

Ein wichtiges Beispiel für den Verstoß gegen das LMSVG aufgrund von Zusatz an nicht-deklariertem Fleisch stellt der Pferdefleischskandal aus dem Jahre 2013 dar. Damals wurde in einem britischen und irischen Fleischverarbeitungsbetrieb nicht-deklariertes Pferdefleisch in diversen Fertigprodukten gefunden, welche laut Deklaration Rindfleisch enthalten sollten. Daraufhin wurden europaweit weitere Betrugsfälle aufgedeckt; betroffen waren vor allem Tiefkühl- und Fertigprodukte wie Lasagne und Tortellini. [O`MAHONY, 2013]

## **1.2 Gesundheitsrisiko**

Das Inverkehrbringen von nicht-deklariertem Fleisch kann das Gesundheitsrisiko erhöhen, wenn die tierartenspezifische Erhitzungstemperatur nicht mehr gewährleistet wird. Weiters besteht bei importiertem Fleisch die Gefahr der Einschleppung von Parasiten, wie zum Beispiel Trichinen. Zusätzlich werden Fertiggerichte meist in der Mikrowelle aufgewärmt, wodurch sich das Produkt oft nur inhomogen erhitzt und selten eine Kerntemperatur von 70°C erreicht. [GERBER und ZITNIK, 2013]

## **1.3 Religiöse Gründe**

Ein weiterer Grund, die Authentizität von Fleisch und Fleischwaren zu gewährleisten, ist die religiös begründete Verweigerung, Fleisch bestimmter Tierarten zu verzehren. Der Verzehr von Schweinefleisch ist im Islam (haram) sowie im Judentum (nicht kosher) verboten. Im Hinduismus hingegen ist es ein religiöses Tabu, Rindfleisch zu konsumieren. [BALLIN, 2010]

## **1.4 Methoden zur Speziesidentifikation**

Für die Identifikation von Tierarten werden DNA-basierte oder Protein-basierte Methoden angewendet. Zu den Protein-basierten Methoden gehören elektrophoretische, immunologische und chromatographische Techniken. [ALIKORD et al., 2017]

### **1.4.1 Protein-basierte Methoden**

Bei den elektrophoretischen Methoden werden Proteine aus Muskelgewebe auf einem Polyacrylamidgel (PAGE) aufgetrennt. Dabei kann auch ein Detergens

verwendet werden (SDS-PAGE), um die Eigenladung der Proteine zu überlagern und sie dadurch ihrer Größe nach aufzutrennen. Faktoren wie Fleischqualität, Alter des Tieres und Stress können das Bandenmuster beeinflussen. Bei dieser Methode ist zu beachten, dass hitzebehandelte Proben nicht untersucht werden können. Ein Vorteil dieser Methode ist, dass mehrere Tierarten gleichzeitig in einem Lauf nachgewiesen werden können. [MONTOWSKA and POSPIECH, 2007]

Immunologische Methoden sind ebenfalls Protein-basierte Anwendungen zur Speziesidentifikation und beruhen auf der Wechselwirkung zwischen Antikörper und Antigen. Die wichtigste quantitative immunologische Methode stellt der Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA) dar, da er besonders schnell und mit geringem Geräteaufwand Ergebnisse liefert. Allerdings ist ELISA nicht so spezifisch und sensitiv wie DNA-basierte Methoden. Es kann alles quantifiziert werden, was als Antigen zum Antikörper fungiert. Wichtig ist, dass vor der Durchführung die Spezifität kontrolliert wird, um auszuschließen, dass andere, für die Quantifizierung unerwünschte Bestandteile mit dem Antikörper wechselwirken. Mittlerweile gibt es, neben den klassischen Methoden wie Sandwich-ELISA und kompetitiver ELISA, auch spezielle ELISA-Testkits. [BELITZ, 2008]

Der kompetitive ELISA ist nicht geeignet für die Analyse von unbekanntem Proben. Sandwich-ELISA wird besonders häufig in Testkits verwendet, da hier die Probe direkt auf die Platte pipettiert werden kann. Ein Vorteil von ELISA gegenüber elektrophoretischen Methoden ist, dass bereits geringe Mengen einer Spezies nachgewiesen werden können. Viele Sandwich ELISA Testkits werden speziell für die Analyse von hitzebehandeltem Fleisch, basierend auf Glykoproteinen, entwickelt. [ALIKORD et al., 2017] [LIU et al., 2006]

Giovannacci et al. (2006) konnten mit einem kommerziellen ELISA Testkit geringe Mengen von Schwein, Rind, Schaf und Geflügel in Konserven-Produkten nachweisen. [GIOVANNACCI et al., 2006]

Chromatographische Methoden wie High Performance Liquid Chromatography (HPLC) und Gaschromatographie (GC) können ebenfalls zur Tierartenidentifizierung, genauer gesagt zur Proteinidentifizierung, verwendet werden. Allerdings ist eine direkte Analyse mittels GC nicht möglich, da

Aminosäuren eine geringe Flüchtigkeit aufweisen. Basierend auf der Differenzierung von Profilen von Peptiden, Proteinen und Aminosäuren verschiedener Tierarten, wurden mehrere HPLC-Methoden entwickelt. Aufgrund ihrer Empfindlichkeit und Reproduzierbarkeit ist die HPLC weit geeigneter zur Tierartenbestimmung als die GC. [ALIKORD et al., 2017]

#### **1.4.2 DNA-Basierte Methoden**

Im Vergleich zu Proteinen ist die DNA etwas stabiler gegenüber thermischen Behandlungen. Außerdem unterscheidet sich DNA, im Gegensatz zu Proteinen, von Gewebe zu Gewebe nicht; sie ist in allen Zelltypen gleich. Daher werden DNA-basierte Methoden den Protein-basierten Methoden meist vorgezogen. Zu den bedeutendsten DNA-basierten Methoden gehören die konventionelle PCR, auch Endpunkt-PCR genannt, die Real-time PCR und die DNA-Sequenzierung. [DOWNEY, 2016]

Die Methode der DNA-Sequenzierung beruht auf dem Abgleich der DNA-Sequenz der Probe mit Sequenz-Einträgen aus einer Datenbank, wobei als Suchmaschine der Basic Local Alignment Search Tool (BLAST) verwendet werden kann. Dadurch kann die Nukleotid-Abfolge eines DNA-Moleküls bestimmt werden. Die Kettenabbruchmethode ist die am weitesten verbreitete Methode zur Sequenzierung. Hierfür muss die DNA als Einzelstrang vorliegen. Ein Universalprimer legt den Startpunkt der Polymerisation fest. Als Baustoffe dienen die kettenverlängernden Nukleotide, wobei pro Ansatz zusätzlich ein modifiziertes Nukleotid hinzugefügt wird. Bei modifizierten Nukleotiden ist anstatt einer OH-Gruppe ein H-Molekül eingebaut. Dadurch kann sich kein neues Nukleotid an die Kette anhaften und es kommt zum Kettenabbruch. Dieses modifizierte Nukleotid wird auch als Abbruch-Nukleotid bezeichnet. Dieser Vorgang wird immer wieder wiederholt, wobei sich die Typen der Abbruch-Nukleotide abwechseln sollten. Die entstandenen Teilbruchstücke werden gelektrophoretisch analysiert und getrennt. [SANGER et al, 1977]

Hellberg et al. (2017) untersuchten die Methode des DNA-Barcoding's auf Säugetier- und Geflügelproben und machten es sich zusätzlich zum Ziel, die Ergebnisse von DNA-Barcoding (658 bp) und Mini-DNA-Barcoding (127 bp)

miteinander zu vergleichen. Verwendet wurden 60 verschiedene Fleischprodukte in folgenden Zuständen: Wurstaufschnitt, Faschiertes, Fleischkonserve und Trockenfleisch. Alle Proben durchliefen die „normale“ sowie die Mini-Variante vom Gen der Untereinheit 1 der Cytochrom c Oxidase. Folgend wurden die erhaltenen Sequenzen im Barcode of Life Database (BOLD) und der GenBank eingegeben, um die jeweiligen Tierarten zu identifizieren. „Normales“ DNA-Barcoding wies eine deutlich höhere Erfolgsrate auf als Mini-Barcoding, wobei Mini-Barcoding sich als geeigneter für Konservenfleisch erwies. [HELLBERG et al., 2017]

Die moderne Sequenzierungsmethode Next Generation Sequencing (NGS) wurde noch nicht allzu häufig für die Tierartendifferenzierung angewandt. Tillmar et al. (2013) konnten, mit der Verwendung von Referenzsequenzen aus 300 Säugetierarten und binären DNA-Lösungen, 99.9% der Säugetierarten differenzieren. Außerdem ist es ihnen gelungen, Komponenten ab 1% Anwesenheit in einer gemischten Probe zu detektieren. [TILLMAR et al., 2013]

Bertoloni et al. (2015) analysierten das Potential von NGS zur Identifizierung von DNA verschiedener Tierarten in DNA-Mischungen, welche sowohl Säugetier- als auch Geflügel-DNA enthielten. Es gelang ihnen, aus einer DNA-Lösung, in welcher Schwein und Pferd jeweils in einem Verhältnis von 1:10 und 1:50, bezogen auf alle anderen Säugetiere, anwesend waren, zu detektieren. [BERTOLONI et al., 2015]

Die vorherrschende DNA-basierte Methode stellt die PCR dar, welche als Endpunkt-PCR mit anschließender Gel-Elektrophorese oder als Real-time PCR angewandt werden kann. [BALLIN, 2010]

Die Theorie und Funktionsweise der Endpunkt-PCR und Real-time PCR wird in Kapitel 3 ausführlich dargestellt.

Amaral et al. (2017) untersuchten die Anwesenheit von Schweinefleisch in verarbeiteten Fleischprodukten, unter anderem in als Halal bezeichneten Produkten, mittels Real-time PCR. Es wurde eine spezifische, hoch-sensitive Methode mit Detektion mittels EvaGreen® entwickelt und validiert. Es gelang ihnen, Schweinefleisch in Konzentrationen bis zu 0.0001% zu detektieren und bis

zu 0.1% zu quantifizieren. Die Validierung erfolgte mit thermisch behandelten Rindfleischproben, welche mit bekannten Konzentrationen an Schweinefleisch angereichert wurden und weiters mit kommerziell erhältlichen Fleischprodukten. 54% der Proben enthielten undeklariertes Schweinefleisch und 40% der Halal-Proben wiesen Spuren von Schweinefleisch auf. [AMARAL et al., 2017]

## 2 Zielsetzung

Ziel dieser Diplomarbeit ist die umfassende Validierung, laut selbst erstelltem Validierungsplan, einer Duplex Real-time PCR zur Identifizierung und Quantifizierung von Tierarten, damit die Methode in die Routineanalytik aufgenommen werden kann. Zur Prüfung der Authentizität von Fleischwaren werden zuverlässige, robuste und schnelle Methoden benötigt, um eine eindeutige Tierartenidentifizierung als auch –Quantifizierung zu gewährleisten. Außerdem sollen möglichst niedrige Bestimmungsgrenzen erreicht werden, wobei  $\leq 1\%$  optimal wäre, da ab 1% eines nicht deklarierten Tierarten-Anteils beanstandet wird. Dieser inoffizielle Grenzwert wurde nach dem Pferdefleischskandal 2013 zwischen dem Ministerium, der AGES und anderen Lebensmittelgutachtern ausgemacht. Daher sollte die Bestimmungsgrenze einer Methode zumindest bei 1% oder niedriger liegen.

### 3 Theoretische Grundlagen

#### 3.1 DNA-Extraktion

Die Qualität der extrahierten DNA ist ausschlaggebend für die Effizienz der nachfolgenden molekularbiologischen Analysen. Bestandteile der Lebensmittelmatrix wie Fette, Zucker, Proteine und sekundäre Inhaltsstoffe können die PCR inhibieren und müssen daher mittels geeigneten Extraktionsverfahren entfernt werden. Außerdem soll die DNA-Extraktion DNA-abbauende Enzyme, sogenannte DNasen, in ihrer Aktivität hemmen. Auch die Lebensmittelproduktion kann durch chemische und physikalische Parameter die Qualität der DNA beeinflussen. So führen hohe Temperaturen und ein saurer pH zur Fragmentierung der DNA und folglich zu weniger DNA-Ausbeute. Die Qualität der extrahierten DNA ist daher von der DNA-Konzentration und der Reinheit abhängig. [BUSCH, 2010]

Grundsätzlich beinhaltet die DNA-Extraktion folgende Schritte:

##### (1) Zellaufschluss (Lysis)

Meist werden Cetyltrimethylammoniumbromid (CTAB) und Natriumchlorid verwendet, um die Membranen aufzulösen und Polysaccharide zu entfernen. Dabei bildet CTAB mit der DNA einen Komplex.

##### (2) Schutz der DNA | Inaktivierung von DNasen

Um die DNA vor dem Abbau durch DNasen zu schützen, wird der Komplexbildner Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA) hinzugefügt, der den DNasen ihren Cofaktor (zweiwertige Ionen) entzieht, indem er mit Ihnen einen Chelat-Komplex eingeht. Weiters wird Proteinase K dazugegeben, um Proteine abzubauen. Auch die Zugabe von RNase kann erfolgen.

##### (3) Extraktion und Zentrifugation

Die DNA kann entweder durch eine Flüssig-Flüssig-Extraktion mit Chloroform oder einer Phenol-Chloroform-Lösung von Matrixresten und Zellbestandteilen getrennt werden. Die DNA befindet sich nun in der wässrigen Phase, während die

„Verschmutzungen“ sich in der organischen Phase und an der Grenzschicht befinden.

#### (4) Präzipitation

Im nächsten Schritt wird die DNA durch die Zugabe von Ethanol gefällt, indem ihre Hydrathülle entfernt wird. Die DNA liegt nun als Pellet vor.

#### (5) Aufnahme in einen Puffer

Die gefällte DNA kann nun in einem Puffer gelöst werden. [SCHMIDT, 2017]

### 3.2 Polymerasekettenreaktion (PCR)

Die Polymerasekettenreaktion ist ein zyklischer Prozess, bei dem ein bestimmter DNA-Abschnitt amplifiziert wird – ähnlich dem Ablauf der natürlichen Replikation. Schon geringe DNA-Mengen können vervielfältigt und dadurch analysiert werden. Den jeweiligen Startpunkt für die Doppelstrangsynthese bilden zwei Oligonukleotide mit definierter Basenfolge (ein Forward Primer und ein Reverse Primer). Sie lagern sich an die ihnen homologe Sequenz der einzelsträngigen Ziel-DNA an. Das Enzym DNA-Polymerase verlängert den Primer, indem es Desoxyribonukleotidtriphosphate (dATP, dTTP, dCTP und dGTP) homolog zur Nukleotid-Sequenz der Ziel-DNA einbaut. Dieser neu synthetisierte Gegenstrang und der ursprüngliche DNA-Einzelstrang stellen nach ihrer Trennung neue Ziel-DNA für den nächsten Syntheseschritt dar. Durchgeführt wird die PCR in einem sogenannten Thermocycler, welcher aus einem Reaktionsraum besteht, in dem die Reaktionsgefäße hineingestellt werden. Das zyklische Temperatur-Zeit-Programm wird automatisch gesteuert, wobei Temperatur und Zeit für die jeweilige Reaktion und auch die Zyklusanzahl individuell einstellbar sind. [MÜLHARDT, 2013]

### 3.3 Reaktionskomponenten

#### - DNA

Die Reinheit der Templat-DNA wird durch den Wert  $A_{260/280}$  angegeben, welcher zwischen 1,8 und 2,0 liegen sollte.

- **Primer**

Primer sind Oligonukleotide, die für jede Amplifikation eines DNA-Abschnittes spezifisch sind und daher speziell entworfen werden. Forward- und Reverse-Primer bilden den jeweiligen Startpunkt für die Doppelstrangsynthese. Der Forward-Primer bindet am 3'-Ende des einen Einzelstranges und der Reverse-Primer am 3'-Ende des anderen Einzelstranges. Diese Anlagerung der zwei Primer an die DNA-Stränge wird als Hybridisierung beziehungsweise Annealing bezeichnet. Die Länge der Primer variiert von 18-30 Basenpaaren (bp) und der GC-Anteil liegt meist bei 40-60%. Primer werden üblicherweise im Überschuss eingesetzt.

- **DNA-Polymerase**

Die Aufgabe der DNA-Polymerase ist es, Desoxynukleotidtriphosphaten zu einer langen Polynukleotidkette zu verknüpfen – sie ist der Katalysator der Kettenreaktion. Je nach Aufgabenstellung können verschiedene DNA-Polymerasen für die PCR eingesetzt werden. Im Rahmen dieser Diplomarbeit wird die hitzestabile Taq-Polymerase verwendet, die aus dem Bakterienstamm *Thermus aquaticus* gewonnen wird. Neben ihrer 5'-3'-DNA-Polymeraseaktivität besitzt diese Polymerase eine 5'-3'-Exonukleaseaktivität, eine 3'-Adenylierungsaktivität und eine reverse Transkriptaseaktivität. Ihr Arbeitsoptimum liegt bei einer Temperatur von 72°C und einem pH-Wert von 8. Dieser pH-Wert wird durch den Zusatz von einem Puffer, meist Tris-HCl-Puffer, gewährleistet.

- **MgCl<sub>2</sub>**

Mg<sup>2+</sup> in Form von MgCl<sub>2</sub> spielt eine wichtige Rolle für die Enzymaktivität der Polymerase. Zum einen fungiert Mg<sup>2+</sup> als Cofaktor und bindet an die Phosphatgruppe der dNTPs und bildet dadurch unlösliche Komplexe. Zum anderen hat Mg<sup>2+</sup> einen positiven Effekt auf die Fehlerrate, indem es Primerannealing und die Trennung der DNA-Doppelstränge beeinflusst. Je höher die Mg<sup>2+</sup>-Konzentration, desto stärker sind die Bindungen der Basenpaare beim Annealing und desto schlechter denaturiert der DNA-Doppelstrang bei 95°C. Die Mg<sup>2+</sup>-Konzentration beeinflusst die PCR auch hinsichtlich der Ausbeute. Während zu

hohe  $Mg^{2+}$ -Konzentrationen die Polymeraseaktivität erhöhen und dadurch die Bildung unspezifischer Produkte verstärken, führen niedrige  $Mg^{2+}$ -Konzentrationen zu einer geringen Ausbeute, aber zu spezifischeren Produkten. Daher wird sie für jede PCR individuell bestimmt.

- **Desoxyribonukleosidtriphosphate (dNTPs)**

Die dNTPs bilden mit  $MgCl_2$  Komplexe, die von der Taq-Polymerase erkannt und komplementär in den DNA-Strang eingebaut werden. [MÜLHARDT, 2013]

### 3.4 Ablauf der PCR

Ein Zyklus besteht aus den Phasen Denaturierung, Annealing und Elongation und kann mehrmals wiederholt werden. Solange genug Primer und dNTPs vorhanden sind, werden nach jedem Zyklus die DNA-Fragmente verdoppelt. Bei der konventionellen PCR sind 25-30 Zyklen üblich, bei der Real Time PCR bis zu 50.

Anzahl der Kopien =  $2^n$  (n...Anzahl der Zyklen)

#### - Denaturierung

Die Temperatur wird auf 95°C erhöht, um die DNA-Doppelstränge an ihren Wasserstoffbrückenbindungen voneinander zu trennen. Die DNA-Doppelhelix wird dadurch zu zwei Einzelsträngen denaturiert.

#### - Annealing

Die Temperatur wird auf die Annealingtemperatur der jeweiligen Primer, welche meist zwischen 50°C und 60°C liegt, gesenkt. Meist liegt die Annealingtemperatur 2-3°C unter der Schmelztemperatur der Primer. Die Primer können sich nun spezifisch an DNA-Einzelstränge anlagern. Neben den Primern lagern sich auch fluoreszenzmarkierte DNA-Sonden an diese DNA-Stränge.

#### - Elongation

Bei diesem Schritt wird die Temperatur auf das Arbeitsoptimum der Taq-Polymerase erhöht (72°C). Die Polymerase beginnt am 3' Ende der Primer die fehlenden Stränge mit komplementären Nukleotiden in 5'-3'-Richtung aufzufüllen. Dadurch entsteht aus zwei Einzelsträngen wieder ein Doppelstrang. [MÜLHARDT, 2013]

### 3.5 Hot-Start-PCR

Die Taq-Polymerase ist schon bei Raumtemperatur und daher auch bei der anfänglichen Aufheizphase aktiv. Um die Verlängerung von unspezifisch gebundenen Primern und die Bildung von Primer-Dimeren zu verhindern, kann eine sogenannte Hot-Start-PCR angewandt werden. Hier beginnt die Polymerisation erst, wenn die gewünschte Temperatur erreicht wurde und die

Primer spezifisch an die DNA-Stränge gebunden haben. Dadurch wird die Spezifität erhöht und es werden weniger unspezifische Nebenprodukte gebildet. Hierfür wird eine hot-start-Taq-Polymerase verwendet, die Antikörper gebunden hat, welche die Enzymaktivität bei Raumtemperatur hemmen. Die Antikörper sind temperaturempfindlich und denaturieren bei Erhitzung. [COLEMAN et TSONGALIS, 2016]

Bei der im Rahmen dieser Diplomarbeit angewandten Real-time PCR Methode findet eine 15-minütige Denaturierung der Antikörper und Aktivierung der Taq-Polymerase statt.

### **3.6 Real Time PCR**

Das Besondere an der Real Time PCR ist, dass die Detektion und die Quantifizierung der amplifizierten DNA direkt während des PCR-Laufes erfolgt. Ermöglicht wird dies durch Fluoreszenzmarker, die in die PCR-Produkte eingebaut werden. Es wird kontinuierlich für eine oder mehrere PCR-Reaktionen über mehrere Zyklen hinweg ein Fluoreszenzsignal gemessen. Die Fluoreszenz nimmt mit der Menge an gebildeten PCR-Produkten proportional zu. Im Gegensatz zur herkömmlichen PCR wird hier kein Gel benötigt. [MÜLHARDT, 2013]

#### **3.6.1 Detektionsmethoden der Real-time PCR**

##### **3.6.1.1 TaqMan-Sonde**

Es gibt unterschiedliche Methoden, um die Fluoreszenz zu detektieren. Da es sich bei der hier verwendeten Real-time PCR Methode um einen Duplex-Assay handelt, kommt für diese Diplomarbeit die TaqMan-Sonde zum Einsatz. Die TaqMan-Sonde ist eine mit einem Fluorophor markierte Oligonukleotidsonde, die die komplementäre Basensequenz zum gesuchten Gen enthält und sich daher an den DNA-Abschnitt, der amplifiziert werden soll, anlagert. An einem Ende der Sonde befindet sich ein fluoreszierender Farbstoff (Reporter), auf der anderen Seite ein sogenannter Quencher, der die Fluoreszenz unterdrückt. Da die Taq-Polymerase außer der Polymerase-Aktivität auch noch eine 5'-3'-Exonuklease-Aktivität besitzt, kann sie die Sonde, während der Synthese des Komplementärstranges, am 5'Ende abbauen. Dadurch werden Reporter und Quencher voneinander getrennt und das

Fluoreszenzsignal des Reporters kann gemessen werden. Je mehr Reporter-moleküle getrennt sind, desto höher ist das Fluoreszenzsignal. Daher steigt nach jedem Zyklus mit der Anzahl an getrennten Reporter-molekülen auch das Fluoreszenzsignal. Meist werden als Fluorophore FAM und Cy5 und als Quencher BHQ 1 und BHQ 2 verwendet. [MATISSEK et al., 2018] [THERMO FISHER SCIENTIFIC, 2014]

### **3.6.1.2 SYBR Green**

Eine weitere Detektionsmethode wäre mithilfe des Interkalationsfarbstoffes SYBR Green, welcher sich in doppelsträngige DNA einlagert. Je mehr doppelsträngige DNA gebildet und mit Farbstoff gebunden wird, desto höher das Fluoreszenzsignal. Der Nachteil dieser Methode ist, dass jede Art von doppelsträngiger DNA gebunden wird – daher auch Primer-Dimere und nicht-spezifische PCR-Produkte. Eine Schmelzpunktanalyse im Anschluss an die PCR liefert Informationen über die Spezifität der gebundenen DNA. [SOARES et al. 2013]

Aufgrund dieser fehlenden Spezifität eignet sich diese Detektionsmethode nicht für Multiplex-Real-time PCRs. [THERMO FISHER SCIENTIFIC, 2014]

## **3.7 Duplex-Assay**

Bei einem sogenannten Duplex-Assay können zwei spezifische DNA-Abschnitte gleichzeitig in einem PCR-Ansatz amplifiziert werden. Dafür benötigt man für jeden der zwei DNA-Abschnitte spezifische Primer und Sonden, die nicht miteinander hybridisieren und unter ähnlichen Bedingungen arbeiten. Die Sonden werden mit unterschiedlichen Fluorophoren und Quenchern markiert, damit es nicht zu einer Überlappung der Emissionsspektren kommt. [THERMO FISHER SCIENTIFIC, 2014]

Durch die Duplex-PCR ist es möglich, in einer Probe oder in einem Lebensmittelprodukt zwei Tierarten gleichzeitig zu erfassen. Dies spart zum einen Zeit, da mit einem PCR-Ansatz zwei Fragestellungen beantwortet werden können und zum anderen Kosten, da weniger Mastermix benötigt wird. [DORAK, 2007]

Allerdings ist die Entwicklung eines geeigneten Duplex-Assays wesentlich zeitaufwendiger als die eines Singleplex-Assays. Da es sich um zwei verschiedene DNA-Abschnitte handelt, sind weit mehr Optimierungsschritte notwendig, um die optimalen Einstellungen für beide Sequenzen zu evaluieren. [THERMO FISHER SCIENTIFIC, 2014]

### **3.8 Begriffe der Real-time PCR**

#### **- Amplifikationskurve**

Zur Quantifizierung wird die sogenannte Amplifikationskurve herangezogen, welche durch die folgenden vier Phasen charakterisiert ist:

#### **- Baseline-Phase**

Während den anfänglichen PCR-Zyklen bleibt trotz laufender Amplifikation das Fluoreszenzsignal nahezu unverändert. Diese niedrigen Fluoreszenzsignale werden als Hintergrundrauschen bezeichnet.

#### **- Exponentielle Phase**

In dieser Phase werden die PCR-Produkte nach jedem Zyklus verdoppelt und das Fluoreszenzsignal beginnt exponentiell zu steigen.

#### **- Lineare Phase**

Die benötigten Reaktionskomponenten sind mittlerweile limitierend und das Fluoreszenzsignal steigt nicht mehr exponentiell.

#### **- Plateauphase**

Nun sind die Reaktionskomponenten aufgebraucht und es kann keine Fluoreszenz mehr gebildet werden.

#### **- Threshold | Threshold Cycle**

Der Threshold bzw. die Schwellenlinie wird in der logarithmischen Skalierung in die Mitte des linearen Bereiches der Amplifikationskurve gesetzt. Wenn Ergebnisse miteinander verglichen werden sollen, ist es ratsam, den Threshold auf derselben Höhe zu setzen. Die Software kann ebenfalls einen Threshold festlegen,

welcher meist 10 Standardabweichungen über den Fluoreszenzwert der Baseline liegt. Der Zyklus, bei dem sich das Fluoreszenzsignal deutlich von der Hintergrundfluoreszenz abhebt, wird als Threshold Cycle (Ct-Wert) bezeichnet. [THERMO FISHER SCIENTIFIC, 2014]

Wie in Abbildung 1 ersichtlich, ist der Ct-Wert der Schnittpunkt zwischen Threshold und Amplifikationskurve. Der Ct-Wert ist außerdem ein Maß für die Quantifizierung der DNA-Ausgangskonzentration. Er ist umso niedriger, je höher die DNA-Ausgangskonzentration gewesen ist. Je mehr DNA-Ausgangskonzentration vorhanden ist, desto weniger Zyklen sind notwendig, um ein Fluoreszenzsignal messen zu können.

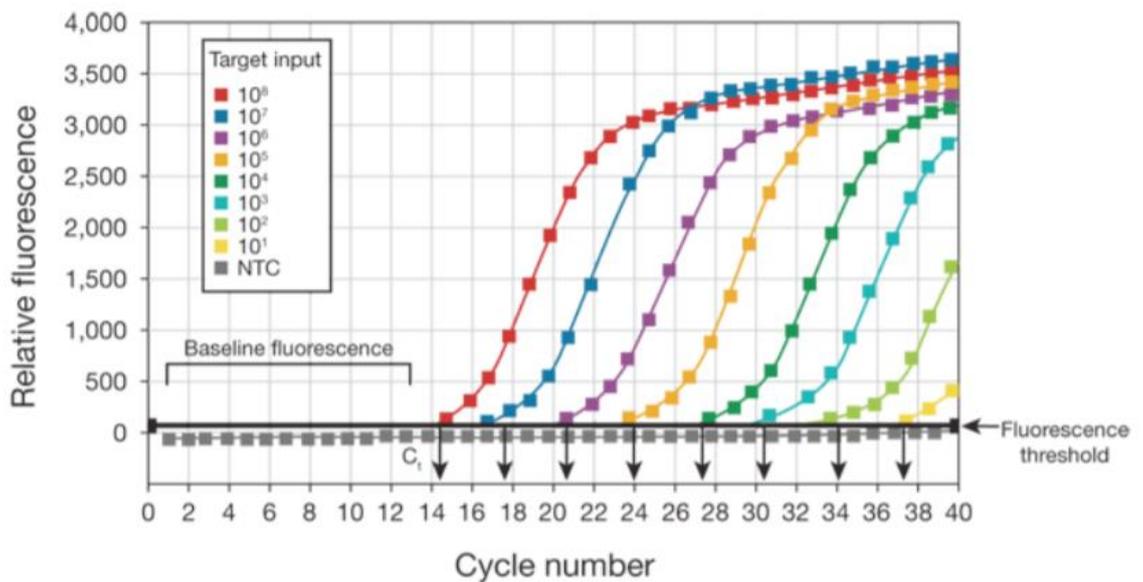


Abbildung 1: Amplifikationskurve [Thermo Fisher Scientific, 2014]

## - Standardkurve

Für die Quantifizierung der Probe wird eine Standardkurve bzw. Kalibrationsgerade, bestehend aus mindestens fünf Verdünnungsstufen, erstellt. Die Konzentration der Probe muss innerhalb der Standardkonzentrationen liegen, um adäquat quantifiziert werden zu können.

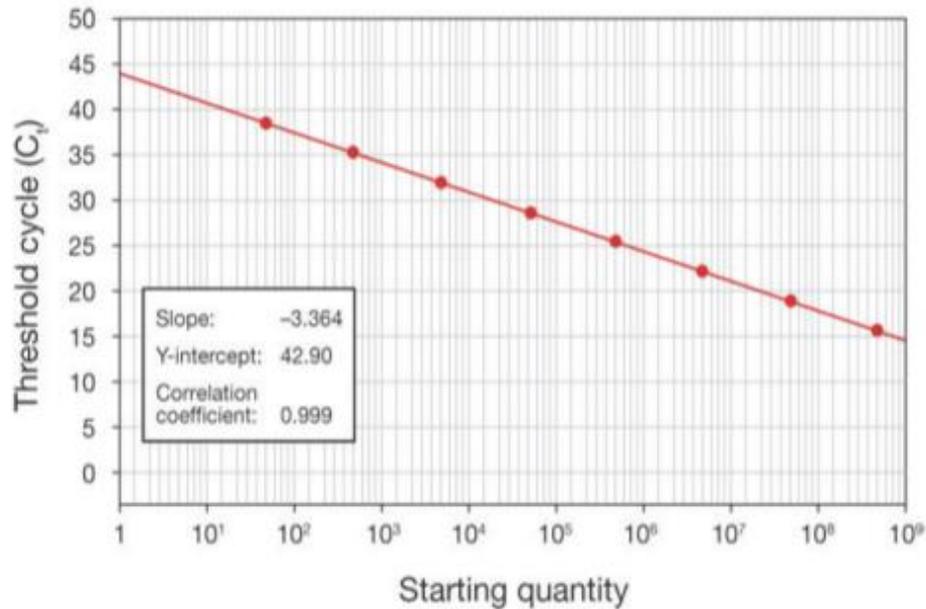


Abbildung 2: Standardkurve [Thermo Fisher Scientific, 2014]

Der Ct-Wert wird auf der y-Achse und die DNA-Ausgangskonzentration auf der x-Achse dargestellt.

- **Korrelationskoeffizient R<sup>2</sup>**

Für die Qualität der Standardkurve aussagekräftig sind die Steigung und der Korrelationskoeffizient R<sup>2</sup>. Dieser beschreibt den linearen Zusammenhang zwischen der DNA-Konzentration und der C<sub>t</sub>-Werte. Je näher dieser Wert bei 1 liegt, desto besser fügen sich die ermittelten Werte in die Standardkurve ein. Im Rahmen dieser Validierung sollte R<sup>2</sup> den Wert 0,98 auf jeden Fall überschreiten.

- **Slope | Effizienz der Amplifikation (E)**

Die Effizienz der Amplifikation wird über die Steigung der Standardkurve berechnet:

$$E (\%) = \left( 10^{-\frac{1}{\text{Steigung}}} - 1 \right) 100$$

Optimal ist eine Effizienz von E = 100%, wobei Abweichungen von ± 10% noch in Ordnung sind. Eine Effizienz von 100% würde bedeuten, dass sich die DNA bei jedem Zyklus verdoppelt hat. Die Steigung der Standardkurve sollte zwischen -3.1 und -3.6 liegen. Bei einer Effizienz von 100% würde die Steigung etwa 3.32 betragen. [DORAK, 2007] [THERMO FISHER SCIENTIFIC, 2014]

## **4 Material und Methoden**

### **4.1 Probenmaterial**

#### **4.1.1 Fleischproben**

Für die Herstellung der Probenaufschlüsse wurde rohes, homogenisiertes Muskelfleisch von fünf Tierarten verwendet. Diese Tierarten waren Schwein - *Sus scrofa domesticus*, Rind - *Bos primigenius taurus*, Huhn - *Gallus gallus domesticus*, Pute - *Melleagris gallopavo* und Pferd - *Equus ferus caballus*.

#### **4.1.2 Modellwürste**

Im Zuge der Anwendbarkeitsversuche wurden Modellwürste verwendet, welche nach den Vorgaben des Lebensmittelbuches von Mitarbeitern der AGES hergestellt worden waren. Die genaue Zusammensetzung wird in Kapitel 5.4.1 dargestellt.

#### **4.1.3 Kommerziell erhältliche Lebensmittelprodukte**

Die folgenden Produkte wurden in lokalen Supermärkten oder Fleischereien gekauft.

- ✓ Schweine-Salami (Grandi Salumifici | Italien)
- ✓ Pferde-Cabanossi (Pferdefleischer | Österreich)
- ✓ Puten-Extrawurst (Hütthaler KG | Österreich)

Sowohl bei den Modellwürsten, als auch bei den gekauften Produkten wurden die Probenaufschlüsse und DNA-Extrakte genauso hergestellt wie bei den regulären Fleischproben.

### **4.2 Herstellung der Probenaufschlüsse**

#### **4.2.1 Prinzip**

In Gegenwart von Proteinase K wird die homogene Probe in einem Detergenzhaltigen Puffer (CTAB) mit hohem Salzgehalt aufgeschlossen und die DNA in Lösung gebracht. Das zugefügte Enzym Proteinase K bewirkt den Abbau von Proteinen und die Freisetzung von Nukleinsäuren in den Extraktionspuffer. CTAB

bildet dabei einen Komplex mit der DNA, welche später durch Veränderung des Salzgehaltes gefällt werden kann.

#### 4.2.2 Geräte

- **Analysenwaage:** Anzeigegenauigkeit 0.01 mg, Sartorius
- **Kolbenhubpipetten:** 10 µl, 20 µl, 100 µl, 200 µl, 1000 µl, Gilson™
- Einmalpipettenspitzen mit Aerosolbarriere: Biotix
- **Große Pipette:** 1-10 ml, SL-Pette XE, SLG®
- **Zentrifugenröhrchen:** 50 ml, Greiner bio-one
- **Inkubationhaube:** Unihood 750, Uniequip
- **Schüttler:** Intelli-Mixer, Omnilab

#### 4.2.3 Chemikalien und Reagenzien

- Cetyltrimethylammoniumbromid (CTAB): Sigma-Aldrich
- Proteinase K Lösung: Merck

#### 4.2.4 Durchführung

Die Fleischproben waren bereits laborintern mit einem Fleischkutter homogenisiert worden. 1 g der homogenisierten Probe wurde in ein Zentrifugenröhrchen eingewogen und mit 10 ml CTAB-Extraktionspuffer und 80 µl Proteinase K versetzt. Anschließend wurde das Röhrchen auf einen Schüttler gesetzt und in den Hybridisierungsöfen gestellt, wobei bei einer Temperatur von 50°C mindestens 6 Stunden lang geschüttelt wurde.

Falls sich die Probe nach dieser Zeit nicht, beziehungsweise nicht vollständig gelöst haben sollte, wurden wieder 80 µl Proteinase K hinzugefügt und für weitere 6 Stunden inkubiert und geschüttelt.

Die Aufbewahrung der Probenaufschlüsse erfolgte im Kühlschrank bei 4°C.

### 4.3 Herstellung der Probenaufschlussmischungen und Kalibrator-Lösungen mit unterschiedlicher Zusammensetzung an zwei verschiedenen Tierarten

#### 4.3.1 Prinzip

Tabelle 1: Schema von prozentueller Zusammensetzung der Probenaufschlussmischungen

% Tier A	% Tier B	µl Tier A	µl Tier B
1	99	10	990
2	98	20	980
5	95	50	950
10	90	100	900
20	80	200	800
30	70	300	700

#### 4.3.2 Geräte

- Wasserbad
- **Kolbenhubpipetten:** 10 µl, 20 µl, 100 µl, 200 µl, 1000 µl, Gilson™
- Einmalpipettenspitzen mit Aerosolbarriere: Biotix
- Kunststoffreaktionsgefäße („Eppis“): 2 ml, Eppendorf

#### 4.3.3 Durchführung

Da es durch die Kühlung der Probenaufschlüsse zu einer Entmischung der Feststoffe und der Flüssigkeit kommt, wurden die Probenaufschlüsse vor ihrer Verwendung für 15-20 min in ein 40 - 45°C warmes Wasserbad gestellt und anschließend händisch geschüttelt.

Anschließend wurden die Probenaufschlüsse der verschiedenen Tierkombinationen laut jeweiligem prozentuellen Anteil (siehe Tabelle 1) in 2 ml Eppendorfer Tubes pipettiert.

### 4.4 DNA-Extraktion

#### 4.4.1 Prinzip

Das Prinzip des Maxwell®-Extraktionsroboters beruht auf Zelllyse und der Anlagerung von magnetisierten Silicapartikeln an Nucleinsäuren. Die aufgereinigte DNA wird in 100 µl Puffer eluiert und kann für eine konventionelle PCR direkt

weiterverwendet werden. Für die Real Time PCR müssen diese DNA-Eluate noch auf die jeweils passende Konzentration verdünnt werden.

#### 4.4.2 Geräte

- **Vortex:** Vortex Genie 2, Scientific Industries
- **Kolbenhubpipetten:** 10 µl, 20 µl, 100 µl, 200 µl, 1000 µl, Gilson™
- Einmalpipettenspitzen mit Aerosolbarriere
- Kunststoffreaktionsgefäße („Eppis“): 1.5 ml, 2 ml, Eppendorf
- Tischzentrifuge: Eppendorf 5424
- Thermomischer: Eppendorf
- Maxwell® Extraktionsroboter: AS 2000, Promega

#### 4.4.3 Chemikalien und Reagenzien

- **Chloroform:** Sigma-Aldrich
- Lysis-Puffer: Promega
- Elutions-Puffer: Promega
- RNase: Roche

#### 4.4.4 Durchführung

1 ml von der Probenaufschluss-Mischung wurden in ein 2 ml Eppendorf Tube pipettiert, mit 600 µl Chloroform versetzt, mindestens 30 sec gevortext und anschließend 10 min bei 13200 rpm zentrifugiert, um die Phasentrennung zu erreichen. 300 µl des Überstandes, 300 µl Lysis Buffer und 5 µl RNase wurden dann in ein frisches 1,5 ml Eppi pipettiert und danach bei 65°C für 15 min am Thermomixer (1000 rpm) inkubiert.

Für die Vorbereitung des Maxwell-Extraktionsroboters wurde die benötigte Anzahl an Kartuschen in das Probenrack gesetzt und jeweils die Schutzfolie entfernt. Die im Kit enthaltenen Elutions-Gefäße (0,5 ml) wurden ebenfalls in das Probenrack gesetzt und mit 100 µl des mitgelieferten Elutionspuffers befüllt. Die Stößel wurden an ihre vorgesehene Position in der Kartusche platziert und anschließend der Inhalt der inkubierten Eppi`s (mindestens 600 µl) in die erste Kammer der Kartusche pipettiert.

Folgendes Programm wurde im Gerätemenü ausgewählt:



*Abbildung 3: Programm von Maxwell DNA-Extraktionsroboter*

Nach Auswahl des Programms wurde der Lauf gestartet.

## 4.5 Konzentrations- und Reinheitsbestimmung der DNA

### 4.5.1 Prinzip

Die Konzentration der DNA wurde mithilfe eines UV/VIS-Spektrophotometers der Firma Qiagen gemessen. Dieses Spektrophotometer führt eine Nukleinsäurequantifizierung basierend auf Absorptionsspektren durch.

DNA absorbiert bei einer Wellenlänge von 260 nm und Proteine bei 280 nm. Falls der Wert  $A_{260}$  über 3 lag, wurde das DNA-Extrakt 1:10 verdünnt und anschließend noch einmal gemessen. Für die Real-time PCR wurden diese neu gemessenen Werte\*10 und die ursprünglichen DNA-Extrakte verwendet. Dies hat den Grund, dass ab einer gewissen Konzentration die Messung ihre Genauigkeit verliert und daher die DNA-Extrakte verdünnt werden müssen.

Die Reinheit der DNA wurde durch das Verhältnis  $A_{260}/A_{280}$  bestimmt, welches größer als 1.8 sein sollte, um frei von Proteinverunreinigungen zu sein. [KLEIN et al, 2014]

### 4.5.2 Geräte

- **Kolbenhubpipetten:** 10 µl, 20 µl, 100 µl, 200 µl, 1000 µl, Gilson™
- **Einmalpipettenspitzen mit Aerosolbarriere:** Biotix
- **DNA-Messgerät:** QIAxpert Spektrophotometer, Qiagen
- **Qiaxpert Slide:** Qiagen

### 4.5.3 Chemikalien und Reagenzien

- **Elutions-Puffer:** Promega

- **DNA-Extrakte**

#### **4.5.4 Durchführung**

Es wurde jeweils 2 µl Probe in eine der 16 Positionen des Slides pipettiert, der Slide ins DNA-Messgerät eingesetzt und anschließend ausgewertet. In eine Position wurde immer Elutions-Puffer als Blank pipettiert.

### **4.6 Einstellung der DNA-Konzentration**

#### **4.6.1 Prinzip**

Die DNA-Konzentration der Proben wird durch Verdünnung mit Wasser auf eine Arbeitskonzentration von 5 µg/ml eingestellt. Die DNA-Konzentration des Kalibrators wird auf 20 µg/ml eingestellt, da diese Lösung in weiterer Folge in 1:4 Schritten bis zur Konzentration von 0,078125 µg/ml verdünnt wird, um die Kalibrationsgerade darzustellen.

#### **4.6.2 Geräte**

- **Kolbenhubpipetten:** 10 µl, 20 µl, 100 µl, 200 µl, 1000 µl, Gilson™
- **Einmalpipettenspitzen mit Aerosolbarriere:** Biotix
- **Vortex:** Vortex Genie 2, Scientific Industries
- **Mikrozentrifuge:** MiniStar silverline, VWR

#### **4.6.3 Chemikalien und Reagenzien**

- **ddH<sub>2</sub>O:** MilliQ®-Wasser, Merck

## 4.7 Real Time PCR

### 4.7.1 Prinzip

Die relative Quantifizierung erfolgte über das Referenzgen Myostatin, welches sowohl in Säugetieren als auch in Geflügel vorkommt. Dafür wurde in jeder Probe, zum einen, mit einer Tierart-spezifischen PCR der DNA-Gehalt einer spezifischen Tierart gemessen und, zum anderen, mit einer Referenz-PCR der DNA-Gehalt von allen vorkommenden Säugetieren und Geflügel gemessen. Da es die Probenanzahl zuließ, konnten die Target-PCR und die Referenz-PCR in einem PCR-Ansatz durchgeführt werden.

### 4.7.2 Geräte

- **PCR-Workstation:** CBS Scientific
- **Kolbenhubpipetten:** 10 µl, 20 µl, 100 µl, 200 µl, 1000 µl, Gilson™
- **Einmalpipettenspitzen mit Aerosolbarriere:** Biotix
- **PCR-Mikrotiterplatte:** MicroAmp®Optical 96-Well Reaction Plate Life Technologies™, Thermo Fisher Scientific
- **Verschlussmembran (inklusive Werkzeug zum Glattstreichen):** MicroAmp™Optical Adhesive Film Life Technologies™, Thermo Fisher Scientific
- **Zentrifuge mit Adaptoren für PCR-Mikrotiterplatten:** Laborfuge 400, Heraeus Instruments
- **Thermocycler:** Applied Biosystems® 7500 Real-Time PCR System, Thermo Fisher Scientific; Rotor-Gene Q, Qiagen

### 4.7.3 Chemikalien und Reagenzien

- **ddH<sub>2</sub>O:** MilliQ®-Wasser, Merck
- **Primer- und Sondengemische:** Sigma Aldrich
- **QuantiTect Multiplex PCR NoRox Kit Master Mix (enthält DNA-Polymerase, dNTPs und MgCl<sub>2</sub>):** Qiagen
- **ROX Passive Reference Dye:** Thermo Fisher Scientific

#### 4.7.4 Durchführung

Die Vorbereitungen für die Real-time PCR erfolgten in strikt getrennten Räumlichkeiten in sogenannten PCR-Workstations, um jegliche Kontaminationen zu vermeiden. In Raum 1 wurde der Mastermix mit den Primer- und Sondengemischen und milliQ-Wasser vermischt und auf die Platte pipettiert. In Raum 2 wurde nur mehr die DNA dazugegeben. Nach der Benutzung wurde bei den PCR-Workstations die UV-Lampe für mindestens 10 min angedreht.

Die PCR-Läufe wurden in 96-Well-Platten angesetzt, wobei das Gesamtvolumen pro Well 25 ml betrug. Die Durchführung erfolgte im Applied Biosystems® 7500 Real-Time PCR System der Firma Thermo Fisher Scientific. Vor der Benutzung dieses Gerätes wurde die Platte 1 min bei 3000 rpm zentrifugiert.

Die PCR-Läufe, welche die Robustheit an einem anderen Gerät untersuchen sollten, wurden am Rotor-Gene Q der Firma Qiagen durchgeführt. Angesetzt wurde in einem 72-Well-Ring. Wie der Name bereits verrät, werden die Proben kontinuierlich rotiert (400 rpm), weswegen eine Zentrifugation nach dem Pipettieren nicht notwendig ist.

#### 4.7.5 Temperatur-Zeit-Programm

*Tabelle 2: Temperatur-Zeit-Programm der Real-time PCR*

Phase	Temperatur (°C)	Zeit (Min.)
Initiale Denaturierung	95	15
Denaturierung	94	1
Annealing und Elongation	60	1
45 Zyklen		

#### 4.7.6 Mastermix

Vor der Verwendung wurde der Mastermix auf 1.8 ml aliquotiert und bei -20°C gelagert. Für die PCR-Läufe am ABI 7500 wurde dem Mastermix ROX Passive Reference Dye hinzugefügt (~10 µl/ 1.8 ml Mastermix). Da sich die Fluoreszenz dieses inerten Farbstoffes während der PCR nicht verändert, kann es etwaige Unterschiede zwischen den Wells, aufgrund von systematischen Fehlern,

normalisieren. Der ROX Dye besteht aus einer 25 µM Lösung von 5-Carboxy-X-Rhodamin in 10 mM Tris-HCl, 0.1 mM EDTA und 0,01% Tween™.

#### 4.7.7 Primer und Sonden

Die verwendeten Primer und Sonden wurden von der Firma Sigma Aldrich bezogen. Die Gemische daraus wurden laut einer internen Prüfvorschrift hergestellt.

##### Duplexsystem Rind-Schwein

###### **Primer**

Rind\_Fw: 5` GTA GGT GCA CAG TAC GTT CTG AAG `3

Rind\_Rv: 5` GGC CAG ACT GGG CAC ATG `3

Schwein\_Fw: 5` gac GAG GCT GCC GTA AAG G `3

Schwein\_Rv: 5` TGC AAG GAA CAC GGC TAA GTG `3

###### **Sonden**

Rind: 5`**FAM** - GAA CCT CAT TCT GGG GCC CCG - **BHQ1**`3

Schwein: 5`**Cy5** - TGC AAG GAA CAC GGC TAA GTG - **BHQ2**`3

##### Duplexsystem Pferd-Schaf

###### **Primer**

Schaf\_Fw: 5` acc cgt caa gca gac tct aac g `3

Schaf\_Rv: 5` taa ata ttt cag cta agg aaa aaa aag aag `3

Pferd\_Fw: 5` cca act tca tca tgg aca acg c `3

Pferd\_Rv: 5` gtt aaa gct tgg ctc gac acg `3

###### **Sonden**

Schaf: 5`**HEX** - cag gat ttt tgc cgc att cgc tt - **BHQ1**`3

Pferd: 5`**Cy5** - aag tgc atc ccc gtg gcc cct ca - **BHQ2**`3

### Duplexsystem Huhn-Pute

#### **Primer**

Huhn\_Fw: 5` CAG CTG GCC TGC CGG `3

Huhn\_Rv: 5` CCC AGT GGA ATG TGG TAT TCA `3

Pute\_Fw: 5` CAA AGA AAG CAG GGA AAA GGA `3

Pute\_Rv: 5` TGC ACT CTC GTT GTT AAA AAGH GA `3

#### **Sonden**

Huhn: 5`**FAM** - TCT GCC ACT CCT CTG CAC CCA GT - **BHQ1**`3

Pute: 5`**Cy5** - TGC ACT CTC GTT GTT AAA AAGH GA - **BHQ2**`3

### Referenzsystem Myostatin

#### **Primer**

My\_Fw: 5` TTG TGC ARA TCC TGA GAC TCA T `3

My\_Rv: 5` TTC ARA GAT CGR ATT CCA GTA TA `3

#### **Sonde**

My: 5`**FAM** - CCC ATG AAA GAC GGT ACA AG - **MGBQ**`3

#### **4.7.8 Pipettierschema**

Folgendes Pipettierschema wurde für alle PCR-Läufe außer denen der Robustheit verwendet:

- ✓ 12,5 µl QuantiTect Mastermix
  - ✓ 5 µl Primer- und Sondengemische
  - ✓ 2,5 µl ddH<sub>2</sub>O
  - ✓ 5 µl DNA
- = 25 µl Reaktionsmix

Tabelle 3: Pipettierschema der regulären Real-time PCR Läufe

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	NTC		Kalibrator 1:256	Kalibrator 1:64	Kalibrator 1:16	Kalibrator 1:4	Kalibrator 20 ng					
B	1% Tier A in Tier B											
C	2% Tier A in Tier B											
D	5% Tier A in Tier B											
E	NTC		Kalibrator 1:256	Kalibrator 1:64	Kalibrator 1:16	Kalibrator 1:4	Kalibrator 20 ng					
F	1% Tier A in Tier B											
G	2% Tier A in Tier B											
H	5% Tier A in Tier B											

Obere Hälfte der Platte: Target-PCR. Untere Hälfte der Platte: Referenz-PCR.

Dieses Pipettierschema wurde ausschließlich für die PCR-Läufe, die der Robustheit galten, verwendet:

- ✓ 10 µl QuantiTect Mastermix
- ✓ 4 µl Primer- und Sondengemische
- ✓ 2 µl ddH<sub>2</sub>O
- ✓ 4 µl DNA

= 20 µl Reaktionsmix

Tabelle 4: Pipettierschema der Real-time PCR Läufe zur Prüfung der Robustheit

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	NTC		Positivkontrolle 1%	Positivkontrolle 30%								
B	1% Tier A in Tier B: 4 µl Probe + 17 µl Reaktionsmix											
C	1% Tier A in Tier B: 4 µl Probe + 16 µl Reaktionsmix											
D	1% Tier A in Tier B: 3 µl Probe + 16 µl Reaktionsmix											
E	30% Tier A in Tier B: 4 µl Probe + 17 µl Reaktionsmix											
F	30% Tier A in Tier B: 4 µl Probe + 16 µl Reaktionsmix											
G	30% Tier A in Tier B: 3 µl Probe + 16 µl Reaktionsmix											
H												

Positivkontrolle: ursprünglicher Ansatz von 5 µl Probe + 20 µl Reaktionsmix.

#### 4.7.9 Erstellung der Standardkurve

Für die Bestimmung einer Probe mit unbekannter Konzentration wurde eine Standardkurve erstellt, die die unterschiedlichen Ziel-DNA-Konzentrationen darstellt. Dafür wurde die DNA-Konzentration der Standardlösung auf 20 µg/ml eingestellt und folglich in 1:4 Schritten seriell, bis zu einer Endkonzentration von 0,078125 µg/ml verdünnt.

Diese fünf Konzentrationen wurden im Doppelansatz auf die PCR-Platte aufgetragen. Die erhaltenen  $C_t$ -Werte wurden dann gegen den Logarithmus der DNA-Konzentration aufgetragen. Die daraus entstandene Standardkurve zeigte nun die Korrelation zwischen  $C_t$ -Werten und DNA-Konzentrationen.

Abbildung 4 zeigt die Kalibrierfunktion der Probe Pute in Schwein. Der Korrelationswert  $R^2$  stellt mit einem Wert von 0,9961 eine sehr gute Korrelation der Puten-DNA-Werte zu den erhaltenen  $C_t$ -Werten dar. Aufgrund der Steigung von -3,2209 ergibt sich eine Effizienz von 104,39%.

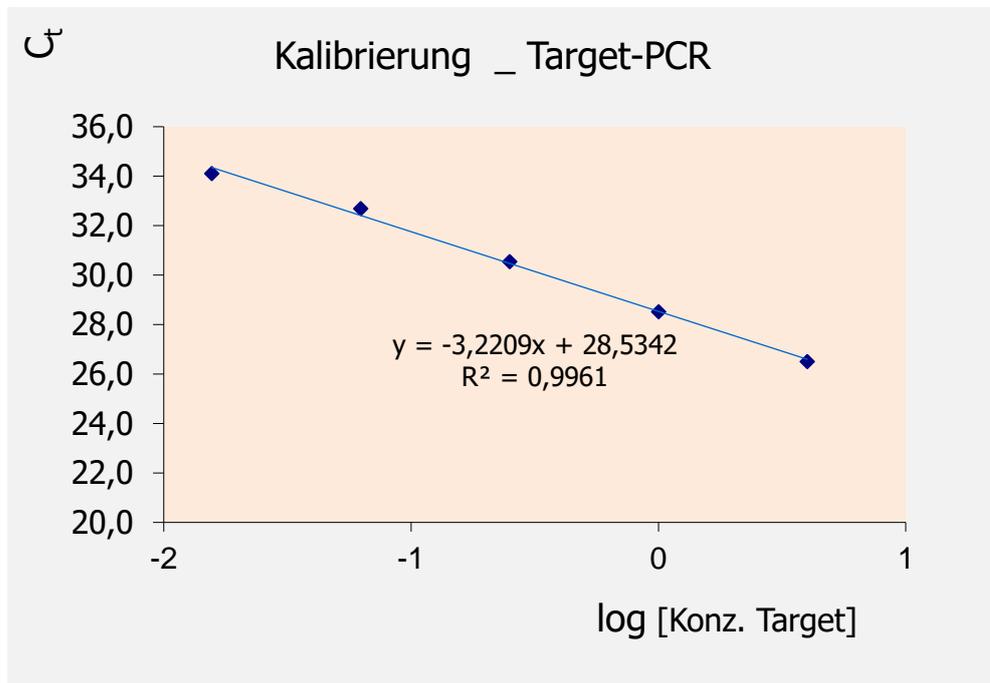


Abbildung 4: Standardkurve der Target-PCR für Probe Pute in Schwein

Kalibrierung des Probensystems. Probenmaterial: Pute in Schwein in den DNA-Konzentrationen 20  $\mu\text{g/ml}$ , 5  $\mu\text{g/ml}$ , 1,25  $\mu\text{g/ml}$ , 0,3125  $\mu\text{g/ml}$  und 0,078125  $\mu\text{g/ml}$ .

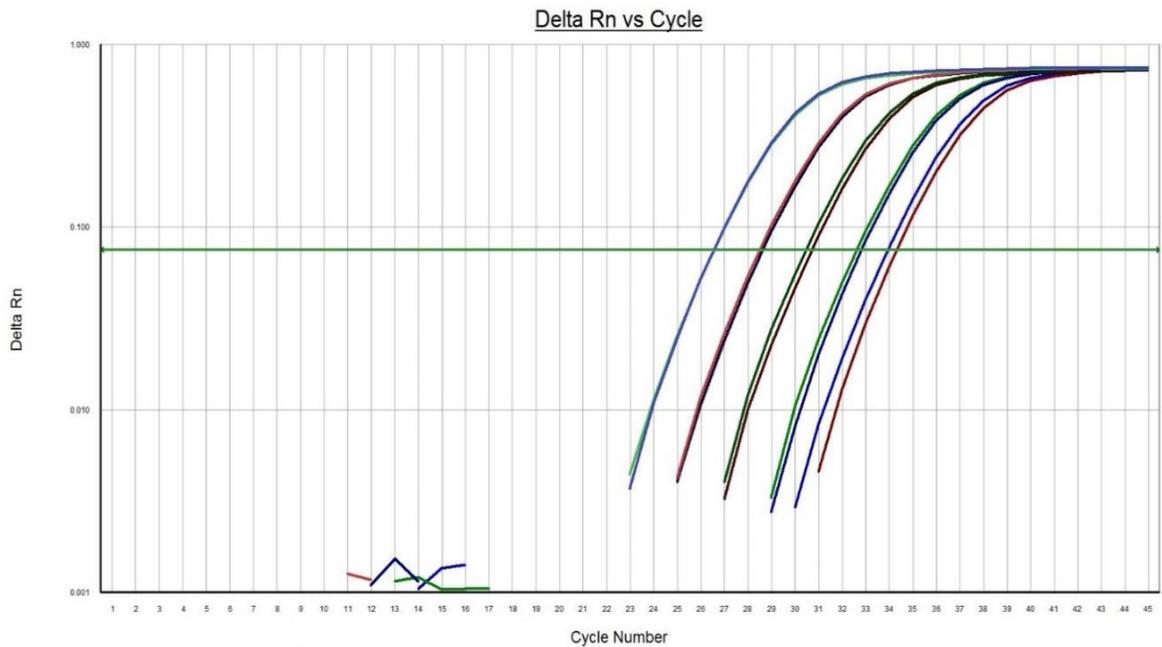


Abbildung 5: Amplifikationskurve der Target-PCR für Probe Pute in Schwein

Kalibrierung des Probensystems. Probenmaterial: *Pute in Schwein* in den DNA-Konzentrationen 20 µg/ml, 5 µg/ml, 1,25 µg/ml, 0,3125 µg/ml und 0,078125 µg/ml (von links nach rechts).

Abbildung 6 stellt die Kalibrierfunktion des Referenzsystems Myostatin dar. Die Effizienz für diesen Lauf beträgt, bei einer Steigung von -3.426, 95.83%.

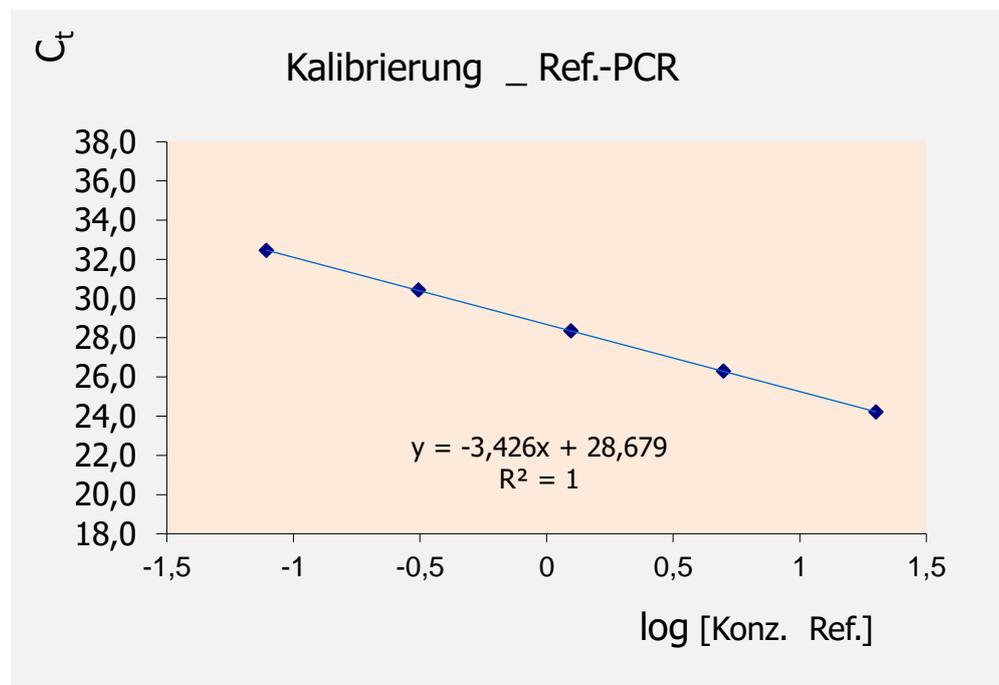


Abbildung 6: Standardkurve der Referenz-PCR für Probe Pute in Schwein

Kalibrierung des Referenzsystems Myostatin. Probenmaterial: *Pute in Schwein* in den DNA-Konzentrationen 20 µg/ml, 5 µg/ml, 1,25 µg/ml, 0,3125 µg/ml und 0,078125 µg/ml.

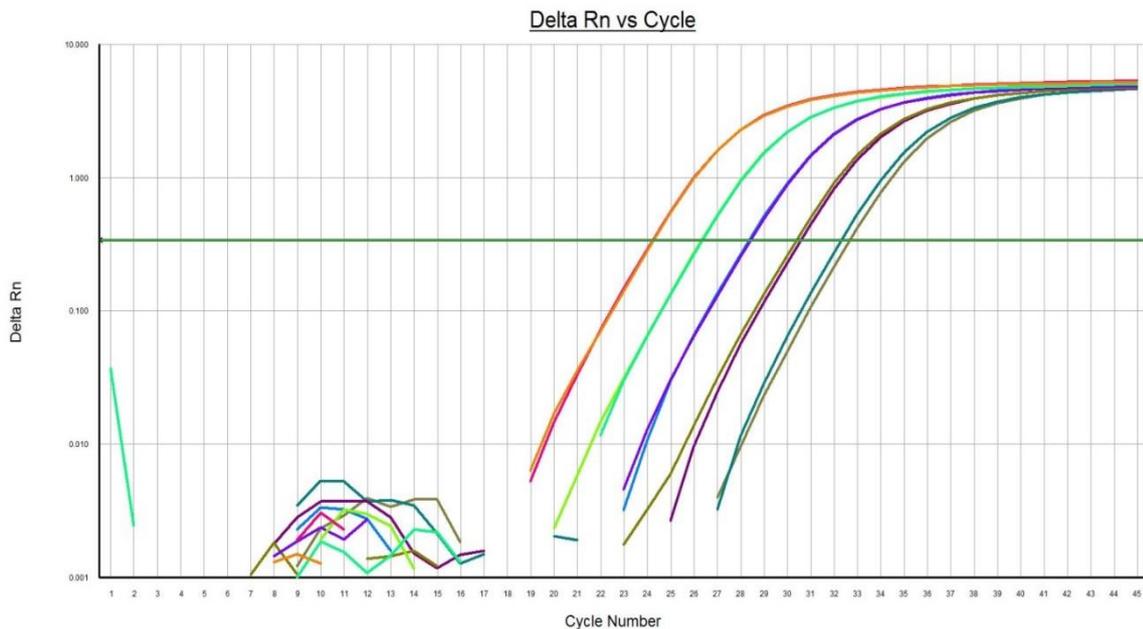


Abbildung 7: Amplifikationskurve der Referenz-PCR für Probe *Pute in Schwein*

Kalibrierung des Referenzsystems Myostatin. Probenmaterial: *Pute in Schwein* in den DNA-Konzentrationen 20 µg/ml, 5 µg/ml, 1,25 µg/ml, 0,3125 µg/ml und 0,078125 µg/ml (von links nach rechts).

#### 4.7.10 Auswertung der PCR-Ergebnisse

Die Berechnung des tierartspezifischen Fleischanteils am Gesamtfleischanteil einer Probe erfolgte mithilfe des Myostatin-Gens. Dieses Referenz-Gen kommt sowohl in Geflügel als auch in Säugetieren vor. In einem PCR-Ansatz wurde gleichzeitig mit Tierart-spezifischen Primer- und Sondengemischen die DNA-Konzentration einer bestimmten Tierart und mit Referenz-spezifischen Primer- und Sondengemischen die Gesamt-Tier-DNA-Konzentration gemessen.

Der Fleischanteil einer Tierart in der Standardlösung wurde dem DNA-Anteil dieser Tierart am Gesamt-DNA-Gehalt des Isolates gleichgesetzt. Mittels relativer Quantifizierung wurde der DNA-Gehalt einer bestimmten Tierart in einer Probenlösung auf den Gesamt-Tier-DNA-Gehalt in derselben Probenlösung bezogen.

Dadurch lässt sich das Ergebnis der quantitativen Real-time PCR wie folgt darstellen: *Fleischanteil (%) einer Tierart im Fleischanteil der Probe.*

#### **4.8 Validierung**

Das Ziel einer Methodenvalidierung ist die Evaluierung der Zuverlässigkeit einer Untersuchungsmethode, bevor diese in die Routineuntersuchung aufgenommen wird. Es werden statistische Daten ermittelt, die die Reproduzierbarkeit der Methode darstellen und dadurch zeigen, dass die Methode ihren Zweck erfüllt. Besonders wichtig ist eine vollständige Dokumentation, um die Rückverfolgbarkeit zu ermöglichen. [KROMIDAS, 2011]

Die im Zuge dieser Diplomarbeit durchgeführte Validierung lehnt sich an die auf europäischer Ebene festgelegten Leitlinien für die Analyse von gentechnisch veränderten Organismen (GVOs). [European Network of GMO Laboratories, 2015]

Im Laufe dieser Diplomarbeit wurden folgende Parameter evaluiert:

- ✓ Bestimmungsgrenze
- ✓ Wiederfindung
- ✓ Wiederholbarkeit
- ✓ Robustheit
- ✓ Anwendbarkeit

Im Rahmen dieser Validierung wurde die Nachweisgrenze nicht ermittelt, da sie bereits laborintern bei der Validierung des jeweiligen Nachweisverfahrens erfasst wurde. Sie lag bei  $\leq 0.1\%$ . Als Nachweisgrenze (LOD = limit of detection) wird jene niedrigste DNA-Konzentration bezeichnet, die gerade noch qualitativ erfasst werden kann.

Die jeweiligen Durchführungen und die festgelegten Akzeptanzkriterien werden in Kapitel 5, bei den Ergebnissen, erklärt.

## 5 Ergebnisse

### 5.1 Schwein

#### 5.1.1 Konzentrations- und Reinheitsbestimmung der DNA

Tabelle 5: Konzentrations- und Reinheitsbestimmung des Probensystems Schwein

Probe	c [ $\mu\text{g/ml}$ ]	$A_{260}/A_{280}$
0,6% S in H	457	1,96
1% S in H	278	1,93
2% S in H	430	1,95
5% S in H	421	1,98
10% S in H	398	1,92
30% S in H	327	1,98
K <sub>1</sub> (20% S in H)	329	1,97
K <sub>2</sub> (20% S in H)	372	1,95
0,6% S in P	181,2	1,96
1% S in P	133,1	1,99
2% S in P	137,2	2
5% S in P	124	2
10% S in P	157,8	1,99
30% S in P	117	2,01
K <sub>1</sub> (20% S in P)	123,9	1,99
K <sub>2</sub> (20% S in P)	96,4	1,99
0,6% S in R	144,5	1,97
1% S in R	121,4	1,95
2% S in R	126	1,97
5% S in R	84,7	1,92
10% S in R	102,6	1,96
30% S in R	100,3	1,93
K <sub>1</sub> (20% S in R)	124	1,92
K <sub>2</sub> (20% S in R)	141,4	1,95

## 5.1.2 Validierung

### 5.1.2.1 Bestimmungsgrenze (LOQ = limit of quantification)

Die Bestimmungsgrenze (BG) ist jene niedrigste DNA-Konzentration, die unter Wiederholbedingungen (mindestens 10) und gegebener Präzision quantitativ ermittelt werden kann.

Die Präzision lässt sich über den Variationskoeffizienten und folglich über diese Formel bestimmen:

$$VK (\%) = \frac{s}{\bar{x}} 100$$

s = Standardabweichung

$\bar{x}$  = Mittelwert

Die Bestimmungsgrenze für die Differenzierung von Tierarten sollte im Idealfall kleiner oder gleich 1% sein.

**Akzeptanzkriterium:  $VK \leq 25\%$**

Tabelle 6 zeigt ein Auswertungsformular der AGES, welches für die Auswertung von quantitativen Real-time PCR's verwendet wird. Durch Einfügen der Ct-Werte der Standardreihen kann die Effizienz berechnet und die Standardgeraden dargestellt werden. Außerdem werden die Konzentrationen von Ziel- und Referenz-DNA durch Einsetzen der Ct-Werte, Achsenabschnitt und der Steigung in folgende Formel berechnet:

$$10^{\frac{(\text{Target Ct} - \text{Achsenabschnitt})}{\text{Steigung}}}$$

Die benötigten statistischen Werte wie Mittelwert, Standardabweichung, Variationskoeffizient und Wiederfindung (= systematischer Fehler) sind ebenfalls ersichtlich. Aufgrund der großen Platzeinnahme der Auswertungsformulare werden dieser Tabelle folgend lediglich Tabellen dargestellt, welche die Ct- und Statistikwerte aufzeigen.

***Schwein in Huhn: BG = 1%***

Tabelle 6 zeigt, dass die Bestimmungsgrenze von Schwein in Huhn bei 1% liegt, da der VK sich mit 22.8% innerhalb des Akzeptanzkriteriums befindet. Unter den ermittelten Ct-Werten befand sich ein abweichender Wert, welcher nach Dean and Dixon als Ausreißer bezeichnet werden kann. [KROMIDAS, 2011]

Daher wurde jener Wert aus der Berechnung entfernt.

Tabelle 6: Bestimmungsgrenze der Probe Schwein in Huhn



Datum 8-Nov-17

# Real Time PCR

(Rel. Quantifizierung)

## Auswerteblatt \_ (5 Pkt. K-Std.)

Labor

Schwein in Huhn-PCR						Referenzgen-PCR					
Schwein			20 %			20 µg/ml			Fleischgemisch		
Vd. [Vd-Faktor]	Target [µg/ml]	log [Konz._Target]	C <sub>t</sub>	ΔC <sub>t</sub>	C <sub>t</sub> mittel	Ref. [µg/ml]	Vd. [Vd-Faktor]	log [Konz._Ref.]	C <sub>t</sub>	ΔC <sub>t</sub>	C <sub>t</sub> mittel
256	0,0156	-1,806179974	37,13		36,88	0,078125	256	-1,10720997	33,03		33,02
			36,62	2,10					33,02		
64	0,0625	-1,204119983	34,85		34,77	0,3125	64	-0,505149978	30,90	2,15	30,87
			34,70	1,59					30,85	2,09	
16	0,2500	-0,602059991	33,13		33,18	1,25	16	0,096910013	28,81		28,78
			33,23	2,12					28,75	2,00	
4	1,0000	0	31,07		31,06	5	4	0,698970004	26,83		26,78
			31,06	1,94					26,73	2,17	
1	4,0000	0,602059991	29,20		29,12	20	1	1,301029996	24,59		24,61
			29,04						24,63		

Steigung: -3,19165	Effizienz: 105,74%
Achsenabschnitt: 31,08162	

Steigung: -3,475966	Effizienz: 93,95%
Achsenabschnitt: 29,14979	

Probe	C <sub>t</sub> Target	Target-DNA [µg/ml]	C <sub>t</sub> Referenz	Referenz-DNA [µg/ml]	SCHWEIN-Anteil (%)
1% S in H	35,08	0,06	27,02	4,11	1,4
1% S in H	35,80	0,03	26,99	4,19	0,8
1% S in H	35,87	0,03	26,93	4,35	0,7
1% S in H	35,29	0,05	26,94	4,31	1,1
1% S in H	35,28	0,05	27,03	4,06	1,2
1% S in H	35,40	0,04	27,03	4,07	1,1
1% S in H	35,27	0,05	27,05	4,02	1,2
1% S in H	35,94	0,03	26,98	4,22	0,7
1% S in H	35,61	0,04	27,06	4,00	1,0
1% S in H	36,4442*	###	26,92	4,39	#WERT!
					Wiederfindung 101,7
0,6% S in H	35,72	0,04	26,76	4,86	0,7
0,6% S in H	35,88	0,03	26,80	4,75	0,7
0,6% S in H	37,31	0,01	26,78	4,81	0,2
0,6% S in H	35,74	0,03	26,90	4,43	0,8
0,6% S in H	36,48	0,02	26,79	4,77	0,4
0,6% S in H	37,48	0,01	26,85	4,59	0,2
0,6% S in H	36,43	0,02	26,84	4,61	0,5
0,6% S in H	36,68	0,02	26,85	4,58	0,4
0,6% S in H	35,80	0,03	26,77	4,84	0,7
0,6% S in H	35,58	0,04	26,76	4,87	0,8
					Wiederfindung 89,5

\* Ausreißer nach Dean and Dixon

**Schwein in Pute: BG = 0.6%**

Die Bestimmungsgrenze von Schwein in Pute lag mit einem VK von 20.8% sogar bei 0.6%.

Tabelle 7: Bestimmungsgrenze der Probe Schwein in Pute

Schwein in Pute	1%		0.6%	
	Ct-Wert	c (%)	Ct-Wert	c (%)
	35,00	1,1	35,09	0,7
	35,02	0,8	35,34	0,6
	34,26	1,5	35,40	0,6
	34,45	1,3	35,33	0,6
	34,78	1,1	34,94	0,8
	34,57	1,3	36,09	0,4
	35,31	0,8	35,39	0,6
	34,53	1,3	34,96	0,8
	34,27	1,7	35,25	0,6
	34,83	1,2	34,92	0,8
Mittelwert		1,2		0,6
Standardabweichung		0,28		0,14
Variationskoeffizient (%)		23,0		20,8
Wiederfindung (%)		120,9		108,0

**Schwein in Rind: BG = 1%**

In Rind konnte Schwein bei 1% adäquat bestimmt werden, wobei der VK bei 0.6% mit 27.9% recht knapp über dem Akzeptanzkriterium lag.

Tabelle 8: Bestimmungsgrenze der Probe Schwein in Rind

Schwein in Rind	1%		0.6%	
	Ct-Wert	c (%)	Ct-Wert	c (%)
	35,04	1,2	35,86	1,0
	35,03	1,3	37,10	0,4
	35,60	0,9	35,51	1,2
	35,31	1,2	36,46	0,6
	35,25	1,2	36,52	0,6
	35,12	1,3	36,53	0,6
	35,18	1,1	36,03	0,8
	34,87	1,4	35,92	0,9
	35,14	1,1	36,01	0,9
	35,17	1,2	36,02	0,8
Mittelwert		1,2		0,8
Standardabweichung		0,16		0,22
Variationskoeffizient (%)		13,2		27,9
Wiederfindung (%)		119,7		132,3

### 5.1.2.2 Wiederfindung und Wiederholbarkeit

Die Wiederfindung ist das Verhältnis des unter Wiederholbedingungen gemessenen Mittelwertes ( $\bar{x}$ ) zum wahren Wert des Analyten in der Probe. Als Rahmen für die Wiederfindung dieser Analyseverfahren wurde 70 – 130 % festgelegt.

$$WDF (\%) = \frac{\bar{x}}{\text{wahrer Wert}} \times 100$$

Die Präzision einer Untersuchungsmethode stellt das Maß der Streuung von Analyseergebnissen, demnach die Wiederholbarkeit, dar und wird über den Variationskoeffizienten (VK) ermittelt. Bei den Wiederfindungsversuchen durfte der Variationskoeffizient 30% nicht überschreiten.

**Akzeptanzkriterium: WDF zwischen 70 und 130%; VK ≤ 30%**

**Schwein in Huhn: alle Akzeptanzkriterien erfüllt**

Wie in Tabellen 9 und 10 ersichtlich, wurden bei den Wiederfindungs- und Wiederholbarkeitsversuchen von Schwein in Huhn alle Akzeptanzkriterien erfüllt. Der höchste VK wurde bei 2% Schwein in Huhn errechnet und lag bei 28.8%.

Tabelle 9: Wiederfindung und Wiederholbarkeit der Probe Schwein in Huhn Teil 1

Schwein in Huhn	1%		2%		5%	
	Ct-Wert	c (%)	Ct-Wert	c (%)	Ct-Wert	c (%)
	35,73	1,4	35,00	2,6	33,76	6,2
	36,09	1,0	35,65	1,6	34,30	4,0
	36,22	0,9	35,47	1,7	34,01	4,9
	36,38	0,8	36,22	1,0	34,12	4,6
	36,48	0,8	35,40	1,9	34,29	4,2
	36,57	0,8	35,72	1,5	34,28	4,2
	36,49	0,8	35,09	2,4	34,11	4,9
	36,31	0,9	34,82	2,7	34,13	4,6
	36,13	1,0	35,57	1,6	34,10	5,1
	36,56	0,7	35,08	2,4	34,08	4,6
	36,28	0,9	35,45	1,8	34,07	4,9
	35,79	1,2	35,90	1,3	33,92	5,1
Mittelwert		0,9		1,9		4,8
Standardabweichung		0,21		0,54		0,59
Variationskoeffizient (%)		22,1		28,8		12,3
Wiederfindung (%)		92,9		93,9		95,6

Tabelle 10:Wiederfindung und Wiederholbarkeit der Probe Schwein in Huhn Teil 2

Schwein in Huhn	10%		30%	
	Ct-Wert	c (%)	Ct-Wert	c (%)
	33,11	9,9	31,29	36,5
	33,25	8,4	32,39	15,9
	32,94	11,0	30,98	44,0
	33,28	8,5	31,43	32,7
	33,03	10,5	31,36	33,8
	33,42	7,8	31,47	34,4
	33,40	8,0	31,40	34,5
	33,12	9,5	31,44	32,2
	33,30	8,2	31,49	31,7
	32,76	11,7	31,31	34,9
	33,03	10,3	31,43	33,6
	33,09	9,6	31,30	33,3
Mittelwert		9,4		33,1
Standardabweichung		1,29		6,30
Variationskoeffizient (%)		13,7		19,0
Wiederfindung (%)		94,4		110,4

**Schwein in Pute: alle Akzeptanzkriterien erfüllt**

Tabellen 11 und 12 zeigen, dass bei Schwein in Pute alle Voraussetzungen erfüllt werden konnten. Der höchste VK wurde bei 5% Schwein in Pute errechnet und lag bei 25,3%.

Tabelle 11: Wiederfindung und Wiederholbarkeit der Probe Schwein in Pute Teil 1

Schwein in Pute	1%		2%		5%	
	Ct-Wert	c (%)	Ct-Wert	c (%)	Ct-Wert	c (%)
	35,39	1,4	34,69	2,0	32,93	7,8
	35,71	1,0	34,41	2,3	33,22	6,1
	35,51	1,1	34,69	2,0	33,36	5,8
	35,45	1,2	34,39	2,3	33,37	5,5
	35,48	1,2	34,26	2,6	33,42	5,5
	35,53	1,2	34,22	2,5	33,27	6,5
	36,02	0,8	34,51	2,3	33,69	4,6
	35,43	1,3	34,19	2,9	33,40	5,6
	35,88	0,9	34,55	2,1	33,11	5,5
	35,41	1,2	34,34	2,3	33,16	3,8
	36,02	1,0	#	#	33,41	2,3
	#	#	#	#	33,43	6,1
Mittelwert		1,1		2,3		5,4
Standardabweichung		0,18		0,28		1,37
Variationskoeffizient (%)		16,1		12,0		25,3
Wiederfindung (%)		110,7		116,2		108,2

Tabelle 12: Wiederfindung und Wiederholbarkeit der Probe Schwein in Pute Teil 2

Schwein in Pute	10%		30%	
	Ct-Wert	c (%)	Ct-Wert	c (%)
	32,54	12,9	31,03	33,1
	33,07	8,6	31,18	30,7
	32,30	14,6	31,00	34,9
	32,80	10,3	31,12	35,3
	32,73	11,0	31,20	29,3
	32,55	11,9	31,10	31,7
	32,54	13,0	31,20	36,1
	32,63	8,9	31,05	30,0
	32,39	15,8	31,02	33,0
	32,73	10,2	31,05	30,5
	32,34	13,5	31,00	31,7
	32,44	14,4	31,23	29,3
Mittelwert		12,1		32,1
Standardabweichung		2,33		2,35
Variationskoeffizient (%)		19,2		7,3
Wiederfindung (%)		120,9		107,1

**Schwein in Rind: alle Akzeptanzkriterien erfüllt**

Bei der Tierkombination Schwein in Rind wurden ebenfalls die Akzeptanzkriterien erfüllt, wobei der höchste VK mit 22,5% bei 5% Schwein in Rind errechnet wurde.

Tabelle 13: Wiederfindung und Wiederholbarkeit der Probe Schwein in Rind Teil 1

Schwein in Rind	1%		2%		5%	
	Ct-Wert	c (%)	Ct-Wert	c (%)	Ct-Wert	c (%)
	33,90	0,8	32,73	2,0	31,15	26,4
	33,93	0,8	32,92	1,7	31,10	26,3
	34,25	0,7	32,54	2,1	31,30	26,3
	33,94	0,8	33,41	2,1	31,16	26,3
	33,79	0,8	33,07	1,5	31,21	26,2
	33,43	1,1	32,89	2,0	31,11	26,2
	34,16	0,7	32,71	2,1	31,16	26,4
	33,99	0,7	32,86	1,7	31,01	26,3
	34,09	0,7	33,11	1,4	30,99	26,2
	34,23	0,6	32,88	1,7	31,03	26,3
	34,30	0,6	32,71	1,8	31,05	26,3
	33,53	0,9	33,00	1,6	30,14	26,2
Mittelwert		0,8		1,8		5,3
Standardabweichung		0,14		0,26		1,19
Variationskoeffizient (%)		17,7		14,2		22,5
Wiederfindung (%)		76,5		90,2		105,8

Tabelle 14: Wiederfindung und Wiederholbarkeit der Probe Schwein in Rind Teil 2

Schwein in Rind	10%		30%	
	Ct-Wert	c (%)	Ct-Wert	c (%)
	30,25	11,5	28,66	31,9
	30,18	11,7	28,50	30,5
	30,20	11,7	28,59	30,1
	30,27	11,1	28,59	27,2
	30,34	10,4	28,58	32,8
	30,24	11,4	28,47	30,4
	30,25	12,9	28,63	36,7
	30,32	11,5	28,53	31,5
	30,07	12,5	28,65	29,5
	30,15	11,4	28,60	28,7
	30,23	11,0	28,51	30,8
	#	#	27,78	48,9
Mittelwert		11,5		32,4
Standardabweichung		0,68		5,70
Variationskoeffizient (%)		5,9		17,6
Wiederfindung (%)		115,4		108,1

### 5.1.2.3 Robustheit

Die Robustheit ist ein Maß für die Empfindlichkeit einer Analysemethode auf geringfügige Änderungen von Laborbedingungen. Darunter fällt zum Beispiel die Durchführung der Methode bei veränderter Annealingtemperatur, auf verschiedenen Geräten oder in einem anderen Labor. Außerdem können die Konzentrationen der Primer- und Sondengemische variiert werden, um Pipettierfehler vorzutäuschen. Die Methode gilt somit als robust, wenn trotz Änderung der Laborbedingungen das Endergebnis nicht, beziehungsweise nur geringfügig ( $\Delta Ct < 1$ ), verfälscht wird.

Die Robustheit des Duplex-Systems wurde durch die Veränderung der Annealingtemperatur um  $\pm 1^\circ\text{C}$  und der Durchführung der Methode auf einem anderen Gerät bestimmt. Außerdem wurden die Volumina von Mastermix, Primer- und Sondengemische, ddH<sub>2</sub>O und DNA variiert.

Für diesen Punkt des Validierungsplanes wurden Konzentrationen von 1% Tier A in Tier B und 30% Tier A in Tier B verwendet. Der ursprüngliche Ansatz von 5  $\mu\text{l}$  Probe und 20  $\mu\text{l}$  Reaktionsmix wurde als „Kontrolle“ aufgetragen. Zusätzlich wurden, zur Vortäuschung von Pipettierfehlern, Kombinationen von 4  $\mu\text{l}$  Probe und 16  $\mu\text{l}$

Reaktionsmix, 4 µl Probe und 17 µl Reaktionsmix und 3 µl Probe und 16 µl Reaktionsmix aufgetragen.

Die Mindestvoraussetzung legt fest, dass die Ct-Wert-Differenzen zu den ursprünglichen Ansätzen von 5 µl und 20 µl den Wert 1 nicht überschreiten sollten. Anstelle des ABI 7500 von Thermo Fisher Scientific wurde der Rotorgene Q der Firma Qiagen verwendet.

**Akzeptanzkriterium:  $\Delta Ct < 1$  zum Ansatz 5 µl Probe + 20 µl Reaktionsmix**

***Schwein in Huhn: Nachweismethode ist empfindlich***

Beim Nachweis von Schwein in Huhn konnte die Mindestvoraussetzung von  $\Delta Ct < 1$  lediglich bei der Anwendung auf einem anderen Gerät erfüllt werden. Bei der ursprünglichen Annealingtemperatur von 60°C ist die Ct-Wert-Differenz beim Pipettierfehler 4 µl + 17 µl (1% S in H) mit  $\sim 1.0$  allerdings sehr knapp über dem Akzeptanzkriterium (siehe Tabelle 15).

***Schwein in Pute: Nachweismethode ist robust***

Die Nachweismethode von Schwein in Pute erweist sich als robust, da das Akzeptanzkriterium bei allen Systemänderungen erfüllt wurde. Die höchsten Ct-Wert-Differenzen wurden bei der Senkung der Annealingtemperatur um 1°C erfasst. Sowohl beim Pipettierfehler 4 µl + 7 µl als auch bei 3 µl + 16 µl (beide 1% S in P) betrug  $\Delta Ct \sim 0.7$  (siehe Tabelle 16).

***Schwein in Rind: Nachweismethode ist robust***

Auch der Nachweis von Schwein in Rind kann als eine sehr robuste Nachweismethode bezeichnet werden, da das Akzeptanzkriterium bei keinem der Änderungen an Temperatur, Pipettierschema oder Thermocycler überschritten wurde. Die Erhöhung der Annealingtemperatur auf 61°C lieferte beim Pipettierfehler 3 µl + 16 µl (1% S in R) die höchste Ct-Wert-Differenz mit  $\sim 0.74$  (siehe Tabelle 17).

Tabelle 15: Robustheit der Probe Schwein in Huhn

Pipettierfehler 60°C							
Ansatz	% S in H	Ct <sub>1</sub>	Ct <sub>2</sub>	Ct <sub>3</sub>	Ct <sub>4</sub>	Ct mittel	ΔCt von 5 + 20
4 + 16	1	35,8544	36,1771	36,7018	36,3997	36,28325	0,22655
4 + 17	1	37,3537	36,7933	37,4336	36,6546	37,0588	1,0021
3 + 16	1	36,1509	35,7875	36,1827	37,1627	36,32095	0,26425
4 + 16	30	31,635	31,6047	31,679	31,4833	31,6005	-0,1941
4 + 17	30	31,847	31,7802	31,8144	31,8424	31,821	0,0264
3 + 16	30	32,0028	32,169	32,1244	31,974	32,06755	0,27295

Ziel: Abweichungen von  $\leq 1 \Delta Ct$  bei 1% S in H und 4 + 17 nicht erfüllt

Pipettierfehler und Senkung der Annealingtemperatur auf 59°C							
Ansatz	% S in H	Ct <sub>1</sub>	Ct <sub>2</sub>	Ct <sub>3</sub>	Ct <sub>4</sub>	Ct mittel	ΔCt von 5 + 20
4 + 16	1	34,3792	36,5585	34,4385	34,4738	34,9625	-1,0147
4 + 17	1	35,8854	37	34,8946	35,214	35,7485	-0,2287
3 + 16	1	38,3704	35,9666	35,5192	34,4938	36,0875	0,1103
4 + 16	30	29,8169	29,941	29,94	29,8094	29,876825	0,017425
4 + 17	30	30,0012	30,0125	30,0247	29,8305	29,967225	0,107825
3 + 16	30	30,1907	30,1714	30,2588	30,2496	30,217625	0,358225

Ziel: Abweichungen von  $\leq 1 \Delta Ct$  bei 1% S in H und 4 + 16 nicht erfüllt

Pipettierfehler und Erhöhung der Annealingtemperatur auf 61°C							
Ansatz	% S in H	Ct <sub>1</sub>	Ct <sub>2</sub>	Ct <sub>3</sub>	Ct <sub>4</sub>	Ct mittel	ΔCt von 5 + 20
4 + 16	1	36,286	36,5178	35,7643	35,5254	36,023375	0,208175
4 + 17	1	36,2301	36,1766	35,8376	36,0933	36,0844	0,2692
3 + 16	1	36,8523	36,7514	37,2073	39,2089*	36,937	1,1218
4 + 16	30	31,5393	31,5146	31,6427	31,721	31,6044	-0,1208
4 + 17	30	31,8302	31,6002	31,6651	31,7756	31,717775	-0,007425
3 + 16	30	31,9501	32,1943	31,7701	32,047	31,990375	0,265175

Ziel: Abweichungen von  $\leq 1 \Delta Ct$  bei 1% S in H und 3 + 16 nicht erfüllt

\*aus der Bewertung herausgenommen, da Ausreißer nach Dean and Dixon

Pipettierfehler 60°C und Rotor-Gene Q Cycler							
Ansatz	% S in H	Ct <sub>1</sub>	Ct <sub>2</sub>	Ct <sub>3</sub>	Ct <sub>4</sub>	Ct mittel	ΔCt von 5 + 20
4 + 16	1	31,39	30,85	29,83	30,91	30,745	-0,015
4 + 17	1	31,23	31,99	31,28	30,65	31,2875	0,5275
3 + 16	1	30,4	31,15	30,51	30,84	30,725	-0,035
4 + 16	30	26,04	26,08	25,88	25,97	25,9925	-0,1375
4 + 17	30	25,96	26,26	26,03	26	26,0625	-0,0675
3 + 16	30	26,19	26,19	26,54	26,04	26,24	0,11

Ziel: Abweichungen von  $\leq 1 \Delta Ct$  erfüllt

Tabelle 16: Robustheit der Probe Schwein in Pute

Pipettierfehler 60°C							
Ansatz	% S in P	Ct <sub>1</sub>	Ct <sub>2</sub>	Ct <sub>3</sub>	Ct <sub>4</sub>	Ct mittel	ΔCt von 5 + 20
4 + 16	1	35,7771	37,1879	35,8875	36,6944	36,386725	0,088925
4 + 17	1	36,6693	37,1225	35,9507	36,3891	36,5329	0,2351
3 + 16	1	36,4896	36,9287	37,2798	36,6576	36,838925	0,541125
4 + 16	30	31,3906	31,4808	31,3648	31,3303	31,391625	0,023725
4 + 17	30	31,2876	31,3303	31,4198	31,4075	31,3613	-0,0066
3 + 16	30	31,4756	31,6842	31,7158	31,6608	31,6341	0,2662

Ziel: Abweichungen von  $\leq 1 \Delta Ct$  erfüllt

Pipettierfehler und Senkung der Annealingtemperatur auf 59°C							
Ansatz	% S in P	Ct <sub>1</sub>	Ct <sub>2</sub>	Ct <sub>3</sub>	Ct <sub>4</sub>	Ct mittel	ΔCt von 5 + 20
4 + 16	1	35,9565	35,8166	35,9103	36,275	35,9896	0,5135
4 + 17	1	36,0214	36,3427	36,3411	36,0324	36,1844	0,7083
3 + 16	1	36,0317	36,3833	36,1854	36,2268	36,2068	0,7307
4 + 16	30	30,9035	30,8782	30,9951	31,0409	30,954425	-0,017975
4 + 17	30	31,1453	30,9735	31,1325	31,0595	31,0777	0,1053
3 + 16	30	31,3358	31,2441	31,3512	31,3981	31,3323	0,3599

Ziel: Abweichungen von  $\leq 1 \Delta Ct$  erfüllt

Pipettierfehler und Erhöhung der Annealingtemperatur auf 61°C							
Ansatz	% S in P	Ct <sub>1</sub>	Ct <sub>2</sub>	Ct <sub>3</sub>	Ct <sub>4</sub>	Ct mittel	ΔCt von 5 + 20
4 + 16	1	35,8715	36,0552	36,2735	35,5951	35,948825	-0,565875
4 + 17	1	36,4071	36,1446	35,5473	36,1045	36,050875	-0,463825
3 + 16	1	37,0065	36,2636	36,1623	36,7408	36,5433	0,0286
4 + 16	30	30,9887	31,047	31,1702	31,133	31,084725	-0,132975
4 + 17	30	31,2067	30,2766	31,1654	31,1823	30,95775	-0,25995
3 + 16	30	31,2428	31,3924	31,4143	31,4846	31,383525	0,165825

Ziel: Abweichungen von  $\leq 1 \Delta Ct$  erfüllt

Pipettierfehler 60°C und Rotor-Gene Q Cycler							
Ansatz	% S in P	Ct <sub>1</sub>	Ct <sub>2</sub>	Ct <sub>3</sub>	Ct <sub>4</sub>	Ct mittel	ΔCt von 5 + 20
4 + 16	1	30,32	31,13	29,99	30,64	30,52	-0,16
4 + 17	1	31,66	31,31	30,96	31,09	31,255	0,575
3 + 16	1	30,7	31,25	30,6	31,08	30,9075	0,2275
4 + 16	30	26,11	26,27	26,27	26,18	26,2075	-0,1025
4 + 17	30	26,47	26,33	26,2	26,16	26,29	-0,02
3 + 16	30	26,48	26,47	26,42	26,66	26,5075	0,1975

Ziel: Abweichungen von  $\leq 1 \Delta Ct$  erfüllt

Tabelle 17: Robustheit der Probe Schwein in Rind

Pipettierfehler 60°C							
Ansatz	% S in R	Ct <sub>1</sub>	Ct <sub>2</sub>	Ct <sub>3</sub>	Ct <sub>4</sub>	Ct mittel	ΔCt von 5 + 20
4 + 16	1	35,5243	34,2739	34,0046	34,993	34,69895	0,18495
4 + 17	1	34,4389	34,5723	34,5207	34,8566	34,597125	0,083125
3 + 16	1	35,035	34,2118	35,1416	34,6909	34,769825	0,255825
4 + 16	30	29,4091	29,4774	29,3796	29,501	29,441775	-0,094425
4 + 17	30	29,4261	29,5865	29,5292	29,614	29,53895	0,00275
3 + 16	30	29,6729	29,8813	29,6106	29,795	29,73995	0,20375

Ziel: Abweichungen von  $\leq 1 \Delta Ct$  erfüllt

Pipettierfehler und Senkung der Annealingtemperatur auf 59°C							
Ansatz	% S in R	Ct <sub>1</sub>	Ct <sub>2</sub>	Ct <sub>3</sub>	Ct <sub>4</sub>	Ct mittel	ΔCt von 5 + 20
4 + 16	1	34,0683	34,1817	34,2099	34,4345	34,2236	-0,4888
4 + 17	1	34,4039	33,9941	33,6958	34,0885	34,045575	-0,666825
3 + 16	1	33,9092	33,9097	35,2139	34,0597	34,273125	-0,439275
4 + 16	30	29,1	29,2443	29,2922	29,3339	29,2426	-0,1067
4 + 17	30	29,4364	29,4591	29,3592	29,348	29,400675	0,051375
3 + 16	30	29,7138	29,5767	29,7421	29,7219	29,688625	0,339325

Ziel: Abweichungen von  $\leq 1 \Delta Ct$  erfüllt

Pipettierfehler und Erhöhung der Annealingtemperatur auf 61°C							
Ansatz	% S in R	Ct <sub>1</sub>	Ct <sub>2</sub>	Ct <sub>3</sub>	Ct <sub>4</sub>	Ct mittel	ΔCt von 5 + 20
4 + 16	1	33,5382	34,9777	34,0261	34,0094	34,13785	0,26855
4 + 17	1	34,4242	34,0453	34,3949	33,8155	34,169975	0,300675
3 + 16	1	34,7912	34,8733	34,4079	34,3818	34,61355	0,74425
4 + 16	30	29,2956	29,2491	29,3777	29,2086	29,28275	-0,02325
4 + 17	30	29,3878	29,2358	29,2865	29,348	29,314525	0,008525
3 + 16	30	29,5706	29,6582	29,6336	29,6369	29,624825	0,318825

Ziel: Abweichungen von  $\leq 1 \Delta Ct$  erfüllt

Pipettierfehler 60°C und Rotor-Gene Q. Cycler							
Ansatz	% S in P	Ct <sub>1</sub>	Ct <sub>2</sub>	Ct <sub>3</sub>	Ct <sub>4</sub>	Ct mittel	ΔCt von 5 + 20
4 + 16	1	30,36	30,37	30,8	30,23	30,44	0,04
4 + 17	1	30,54	30,51	30,68	30,07	30,45	0,05
3 + 16	1	30,93	31,12	30,76	30,4	30,8025	0,4025
4 + 16	30	25,73	25,46	25,57	25,47	25,5575	0,1575
4 + 17	30	25,71	25,51	25,52	25,72	25,615	0,215
3 + 16	30	25,65	25,92	25,93	25,81	25,8275	0,4275

Ziel: Abweichungen von  $\leq 1 \Delta Ct$  erfüllt

## 5.2 Pferd

### 5.2.1 Konzentrations- und Reinheitsbestimmung der DNA

Tabelle 18: Konzentrations- und Reinheitsbestimmung des Probensystems Pferd

Probe	c [ $\mu\text{g}/\text{ml}$ ]	$A_{260}/A_{280}$
0,6% Pf in H	243	1,98
1% Pf in H	213	1,98
2% Pf in H	201,1	1,99
5% Pf in H	222	1,98
10% Pf in H	223,9	1,97
30% Pf in H	220,2	1,97
K <sub>1</sub> (20% Pf in H)	205,2	1,45
K <sub>2</sub> (20% Pf in H)	229,1	1,99
0,6% Pf in R	224	1,97
1% Pf in R	60,8	1,91
2% Pf in R	144,8	1,96
5% Pf in R	113,1	1,94
10% Pf in R	84	1,99
30% Pf in R	22,1	1,8
K <sub>1</sub> (20% Pf in R)	19,5	1,76
K <sub>2</sub> (20% Pf in R)	170,5	1,98
0,6% Pf in S	148,1	1,95
1% Pf in S	93,1	1,95
2% Pf in S	81	1,94
5% Pf in S	47,9	1,89
10% Pf in S	75,6	1,9
30% Pf in S	123,4	1,91
K <sub>1</sub> (20% Pf in S)	114,7	1,94
K <sub>2</sub> (20% Pf in S)	94,9	1,91

### 5.2.2 Validierung

#### 5.2.2.1 Bestimmungsgrenze

Wie bereits erwähnt, sollte die Bestimmungsgrenze für die Differenzierung von Tierarten im Idealfall kleiner oder gleich 1% sein. Dieses Ziel wurde bei der Tierkombination Pferd in Schwein leider nicht erfüllt.

**Akzeptanzkriterium:  $VK \leq 25\%$**

**Pferd in Huhn: BG = 0.6%**

Wie in Tabelle 19 ersichtlich, liegt die Bestimmungsgrenze von Pferd in Huhn mit einem VK von 22.1% bei 0.6%.

Tabelle 19: Bestimmungsgrenze der Probe Pferd in Huhn

Pferd in Huhn	1%		0.6%	
	Ct-Wert	c (%)	Ct-Wert	c (%)
	34,12	0,9	35,20	0,6
	33,88	1,1	35,12	0,6
	34,87	0,5	34,72	0,8
	34,32	0,8	35,77	0,4
	33,93	1,1	35,41	0,5
	33,91	1,1	35,43	0,5
	34,59	0,7	35,16	0,6
	33,87	1,2	35,06	0,6
	34,23	0,9	34,72	0,5
	34,77	0,6	35,81	0,4
Mittelwert		0,9		0,5
Standardabweichung		0,23		0,12
Variationskoeffizient (%)		25,6		22,1
Wiederfindung (%)		88,3		90,9

**Pferd in Rind: BG = 1%**

Die Bestimmungsgrenze von Pferd in Rind liegt zwar korrekterweise bei 1%, allerdings ist der VK bei 0.6% mit 28.4% nur leicht über dem Akzeptanzkriterium. Daher könnte man annehmen, dass die Bestimmungsgrenze von Pferd in Rind irgendwo zwischen 0.6 und 1% liegt.

Tabelle 20: Bestimmungsgrenze der Probe Pferd in Rind

Pferd in Rind	1%		0.6%	
	Ct-Wert	c (%)	Ct-Wert	c (%)
	35,67	1,4	34,59	0,9
	35,99	1,1	34,34	1,0
	36,02	1,0	34,77	0,8
	36,43	0,8	35,03	0,6
	35,66	1,4	34,33	1,0
	36,16	1,0	35,41	0,5
	35,92	1,2	35,47	0,4
	36,26	0,9	34,43	0,9
	36,07	1,1	35,01	0,6
	35,90	1,2	34,83	0,7
Mittelwert		1,1		0,7
Standardabweichung		0,19		0,21
Variationskoeffizient (%)		17,5		28,4
Wiederfindung (%)		110,9		124,0

**Pferd in Schwein: BG = 1.5%**

Da die Akzeptanzkriterien bei 1% Pferd in Schwein nicht gänzlich erfüllt werden konnten, wurde eine neue Probe mit 1.5% Pferd in Schwein hergestellt und die PCR erneut durchgeführt. Die neue Probenkonzentration erfüllte die Kriterien und daher liegt die Bestimmungsgrenze von Pferd in Schwein bei 1.5%. Genauer könnte man aber sagen, dass sich die Bestimmungsgrenze irgendwo zwischen 1 und 1.5% befindet, da die WDF bei 1% mit 66.8% nur knapp unter dem Akzeptanzkriterium liegt.

Tabelle 21: Bestimmungsgrenze der Probe Pferd in Schwein

Pferd in Schwein	1.5%		1%		0.6%	
	Ct-Wert	c (%)	Ct-Wert	c (%)	Ct-Wert	c (%)
	33,57	1,0	34,17	0,6	35,42	0,3
	33,40	1,0	33,65	0,9	35,18	0,3
	33,44	1,0	34,06	0,6	34,74	0,4
	33,59	0,9	34,16	0,6	36,56	0,1
	33,50	1,0	34,29	0,6	35,47	0,3
	33,29	1,2	33,93	0,7	34,71	0,4
	33,38	1,1	34,10	0,6	35,41	0,3
	33,11	1,3	34,08	0,6	35,44	0,3
	33,10	1,4	33,83	0,8	35,68	0,2
	33,11	1,3	34,01	0,7	36,43	0,1
Mittelwert		1,1		0,7		0,3
Standardabweichung		0,16		0,11		0,10
Variationskoeffizient (%)		14,4		15,9		35,9
Wiederfindung (%)		75,9		66,8		47,7

### 5.2.2.2 Wiederfindung und Wiederholbarkeit

**Akzeptanzkriterium: WDF zwischen 70 und 130%; VK ≤ 30%**

**Pferd in Huhn: alle Akzeptanzkriterien erfüllt**

Tabellen 22 und 23 zeigen, dass bei den Wiederfindungs- und Wiederholbarkeitsversuchen der Tierkombination Pferd in Huhn alle Akzeptanzkriterien erfüllt worden sind. Bei 5% Pferd in Huhn ist die Wiederfindung mit 69.5% doch sehr knapp ausgefallen, aber da der Wert aufgerundet 70% ergibt, kann man die Kriterien als erfüllt betrachten. Der höchste VK lag dabei mit 24.5% bei 30% Pferd in Huhn.

*Tabelle 22: Wiederfindung und Wiederholbarkeit der Probe Pferd in Huhn Teil 1*

Pferd in Huhn	1%		2%		5%	
	Ct-Wert	c (%)	Ct-Wert	c (%)	Ct-Wert	c (%)
	33,47	0,6	32,17	1,6	31,27	2,9
	33,07	0,8	32,08	1,7	30,88	3,8
	33,20	0,8	32,13	1,7	31,05	3,3
	32,63	1,1	32,27	1,6	31,17	3,4
	32,75	1,1	31,70	2,3	31,05	3,7
	32,96	0,9	32,11	1,8	31,04	3,6
	32,94	0,9	32,09	1,1	31,09	3,8
	33,10	0,8	32,03	1,8	31,19	3,3
	33,23	0,7	32,06	1,7	30,99	3,8
	32,88	0,9	32,31	1,5	30,80	4,2
	33,00	0,8	32,11	1,7	31,34	2,8
	32,47	1,2	31,75	2,1	31,14	3,1
Mittelwert		0,9		1,7		3,5
Standardabweichung		0,17		0,29		0,42
Variationskoeffizient (%)		19,7		17,0		12,2
Wiederfindung (%)		87,9		85,3		69,5

Tabelle 23: Wiederfindung und Wiederholbarkeit der Probe Pferd in Huhn Teil 2

Pferd in Huhn	10%		30%	
	Ct-Wert	c (%)	Ct-Wert	c (%)
	30,11	10,9	28,33	31,2
	30,40	8,6	28,37	28,5
	30,33	6,5	28,23	31,8
	30,22	10,8	28,31	30,9
	30,45	9,5	28,22	34,2
	30,33	10,2	28,24	36,7
	30,51	8,8	28,21	36,4
	30,40	9,2	28,18	36,4
	30,46	9,0	28,23	32,2
	30,42	6,2	28,29	16,7
	30,38	9,1	28,35	20,1
	30,39	9,0	28,35	18,1
Mittelwert		9,0		29,4
Standardabweichung		1,45		7,20
Variationskoeffizient (%)		16,2		24,5
Wiederfindung (%)		89,9		98,1

**Pferd in Rind: alle Akzeptanzkriterien erfüllt**

Wie in Tabellen 24 und 25 ersichtlich, wurden alle Akzeptanzkriterien erfüllt, wobei die Wiederfindung bei 1% Pferd in Rind mit 126.8% recht hoch war. Bei 5% Pferd in Rind wurde der höchste VK mit 26.8% errechnet.

Tabelle 24: Wiederfindung und Wiederholbarkeit der Probe Pferd in Rind Teil 1

Pferd in Rind	1%		2%		5%	
	Ct-Wert	c (%)	Ct-Wert	c (%)	Ct-Wert	c (%)
	33,49	1,5	32,47	2,5	30,71	6,0
	33,66	1,4	32,47	2,4	31,04	5,0
	34,04	1,1	32,83	2,0	30,76	5,8
	34,17	1,0	32,70	2,1	30,94	5,3
	33,67	1,4	32,36	2,6	31,01	4,9
	33,51	1,4	33,16	1,6	30,84	5,3
	34,14	1,0	32,41	2,6	31,00	4,5
	33,46	1,4	32,82	2,0	30,80	5,6
	33,52	1,4	32,48	2,4	30,67	3,2
	33,98	1,1	32,42	2,7	30,00	9,4
	33,64	1,3	32,65	2,3	31,03	5,1
	33,75	1,3	32,55	2,4	30,97	4,8
Mittelwert		1,3		2,3		5,4
Standardabweichung		0,19		0,32		1,45
Variationskoeffizient (%)		15,3		14,0		26,8
Wiederfindung (%)		126,9		114,7		108,3

Tabelle 25: Wiederfindung und Wiederholbarkeit der Probe Pferd in Rind Teil 2

Pferd in Rind	10%		30%	
	Ct-Wert	c (%)	Ct-Wert	c (%)
	29,56	11,4	27,78	34,2
	29,83	10,2	27,87	29,4
	29,74	10,7	27,79	34,9
	29,70	11,3	27,63	35,7
	29,55	12,4	27,67	35,6
	29,46	12,9	27,58	37,5
	29,62	11,5	27,55	37,7
	29,66	11,5	26,87	56,9
	29,50	12,7	27,65	34,5
	29,67	11,2	27,64	34,8
	29,58	11,9	27,80	32,4
	29,51	12,7	28,30	21,5
Mittelwert		11,7		35,4
Standardabweichung		0,85		8,06
Variationskoeffizient (%)		7,2		22,7
Wiederfindung (%)		117,0		118,1

**Pferd in Schwein: alle Akzeptanzkriterien erfüllt**

Auch bei der Tierkombination Pferd in Schwein wurden bei allen Konzentrationsstufen die Akzeptanzkriterien erfüllt. Der höchste VK lag dabei mit 27.8% bei 1% Pferd in Schwein.

Tabelle 26: Wiederfindung und Wiederholbarkeit der Probe Pferd in Schwein Teil 1

Pferd in Schwein	1%		2%		5%	
	Ct-Wert	c (%)	Ct-Wert	c (%)	Ct-Wert	c (%)
	32,06	0,6	31,25	1,4	29,27	4,9
	31,19	1,2	30,93	1,6	29,48	3,9
	32,02	0,7	30,89	1,6	29,34	4,2
	31,48	1,0	31,00	1,6	29,48	3,9
	32,17	0,6	30,73	1,8	29,64	3,5
	32,03	0,7	30,67	1,9	29,52	3,8
	32,27	0,6	31,05	1,5	29,36	4,2
	32,22	0,6	30,76	1,9	29,41	4,2
	31,99	0,7	31,12	1,4	29,38	4,0
	32,20	0,6	31,01	0,8	29,47	3,7
	31,69	0,8	31,25	1,3	29,50	4,0
			31,18	1,4	29,42	4,0
Mittelwert		0,7		1,5		4,0
Standardabweichung		0,21		0,29		0,34
Variationskoeffizient (%)		27,8		19,0		8,4
Wiederfindung (%)		74,5		75,8		80,5

Tabelle 27: Wiederfindung und Wiederholbarkeit der Probe Pferd in Schwein Teil 2

Pferd in Schwein	10%		30%	
	Ct-Wert	c (%)	Ct-Wert	c (%)
	29,23	14,0	28,01	34,8
	29,58	10,6	28,10	32,9
	29,47	11,6	28,13	33,1
	29,56	10,8	28,03	34,6
	29,42	11,9	28,08	33,9
	29,43	12,1	27,99	35,3
	29,45	11,4	28,10	32,7
	29,40	12,0	28,09	32,9
	29,40	12,1	28,09	33,1
	29,40	12,3	28,12	32,3
	29,46	11,7	28,06	32,0
	29,55	10,7	28,07	26,5
Mittelwert		11,8		32,8
Standardabweichung		0,91		2,24
Variationskoeffizient (%)		7,8		6,8
Wiederfindung (%)		117,8		109,5

### 5.2.2.3 Robustheit

**Akzeptanzkriterium:  $\Delta Ct < 1$  zum Ansatz 5  $\mu l$  Probe + 20  $\mu l$  Reaktionsmix**

**Pferd in Huhn: Nachweismethode ist robust**

Die definierte Mindestvoraussetzung wurde beim Nachweis von Pferd in Huhn bei allen vorgetäuschten Pipettierfehlern, bei Veränderung der Annealingtemperatur, als auch bei der Anwendung der Methode auf einem anderen Thermocycler erfüllt. Lediglich beim Pipettierfehler 3  $\mu l$  + 16  $\mu l$  (1% Pf in H) und der ursprünglichen Annealingtemperatur von 60°C betrug  $\Delta Ct$  mit  $\sim 0.94$  annähernd 1 (siehe Tabelle 28).

**Pferd in Rind: Nachweismethode ist robust**

Da die Nachweismethode von Pferd in Rind sich bei den vorgetäuschten Pipettierfehlern, als auch bei der Senkung der Annealingtemperatur auf 59°C, als ausgesprochen robust erwies, wurden keine weiteren Systemänderungen bei diesem Nachweis durchgeführt (siehe Tabelle 29).

## **Pferd in Schwein: Nachweismethode ist robust**

Auch der Nachweis von Pferd in Schwein wies keinerlei Empfindlichkeiten gegenüber Pipettierfehlern, veränderten Annealingtemperaturen oder der Anwendung der Methode auf einem anderen Thermocycler auf. Lediglich die Anwendung der Methode auf dem Rotor-Gene Q Cycler führte beim Pipettierfehler 4 µl + 17 µl (1% Pf in S) mit ~ 0.75 zur höchsten Ct-Wert-Differenz (siehe Tabelle 30).

Tabelle 28: Robustheit der Probe Pferd in Huhn

Pipettierfehler 60°C							
Ansatz	% Pf in H	Ct <sub>1</sub>	Ct <sub>2</sub>	Ct <sub>3</sub>	Ct <sub>4</sub>	Ct mittel	ΔCt von 5 + 20
4 + 16	1	33,8419	33,5354	33,9079	33,9886	33,81845	0,39025
4 + 17	1	33,7087	33,4605	34	33,5972	33,6916	0,2634
3 + 16	1	34,5864	33,9339	34,8671	34,0721	34,364875	0,936675
4 + 16	30	28,4746	28,425	28,5068	28,4777	28,471025	-0,015875
4 + 17	30	28,6114	28,5799	28,5797	28,4088	28,54495	0,05805
3 + 16	30	28,7817	28,91	28,9437	28,8288	28,86605	0,37915

Ziel: Abweichungen von  $\leq 1 \Delta Ct$  erfüllt

Pipettierfehler und Senkung der Annealingtemperatur auf 59°C							
Ansatz	% Pf in H	Ct <sub>1</sub>	Ct <sub>2</sub>	Ct <sub>3</sub>	Ct <sub>4</sub>	Ct mittel	ΔCt von 5 + 20
4 + 16	1	33,4802	33,8442	33,4665	34,2714	33,765575	-0,107825
4 + 17	1	34,031	33,4554	33,7971	34,2265	33,8775	0,0041
3 + 16	1	35	33,8199	34,308	34,8595	34,49685	0,62345
4 + 16	30	28,5821	28,7503	28,6318	28,7709	28,683775	0,054475
4 + 17	30	28,7379	28,6753	28,7656	28,5609	28,684925	0,055625
3 + 16	30	29,0029	29,0231	29,1183	28,9897	29,0335	0,4042

Ziel: Abweichungen von  $\leq 1 \Delta Ct$  erfüllt

Pipettierfehler und Erhöhung der Annealingtemperatur auf 61°C							
Ansatz	% Pf in H	Ct <sub>1</sub>	Ct <sub>2</sub>	Ct <sub>3</sub>	Ct <sub>4</sub>	Ct mittel	ΔCt von 5 + 20
4 + 16	1	33,031	33,1357	32,9396	33,211	33,079325	-0,031575
4 + 17	1	33,5727	33,2867	33,7517	34,0677	33,6697	0,5588
3 + 16	1	33,9384	33,6088	34	33,085	33,65805	0,54715
4 + 16	30	28,0442	28,0783	28,0088	27,9515	28,0207	-0,007
4 + 17	30	28,1594	28,1126	28,1209	28,0647	28,1144	0,0867
3 + 16	30	28,2351	28,3253	28,5021	28,2248	28,321825	0,294125

Ziel: Abweichungen von  $\leq 1 \Delta Ct$  erfüllt

Pipettierfehler 60°C und Rotor-Gene Q Cycler							
Ansatz	% Pf in H	Ct <sub>1</sub>	Ct <sub>2</sub>	Ct <sub>3</sub>	Ct <sub>4</sub>	Ct mittel	ΔCt von 5 + 20
4 + 16	1	29,54	28,86	28,55	28,39	28,835	0,035
4 + 17	1	28,64	28,81	28,77	28,88	28,775	-0,025
3 + 16	1	28,9	30,17	28,59	29,12	29,195	0,395
4 + 16	30	23,52	23,61	23,71	23,75	23,6475	-0,1025
4 + 17	30	23,54	23,48	23,53	23,57	23,53	-0,22
3 + 16	30	24,04	23,83	23,84	23,87	23,895	0,145

Ziel: Abweichungen von  $\leq 1 \Delta Ct$  erfüllt

Tabelle 29: Robustheit der Probe Pferd in Rind

Pipettierfehler 60°C							
Ansatz	% Pf in R	Ct <sub>1</sub>	Ct <sub>2</sub>	Ct <sub>3</sub>	Ct <sub>4</sub>	Ct mittel	ΔCt von 5 + 20
4 + 16	1	33,5279	33,7176	33,13	33,6863	33,51545	0,24255
4 + 17	1	33,4867	33,6659	33,3724	33,6787	33,550925	0,278025
3 + 16	1	34	33,6696	33,7673	34,3686	33,951375	0,678475
4 + 16	30	28,4012	28,6183	28,4465	28,5253	28,497825	0,042625
4 + 17	30	28,5528	28,511	28,5425	28,4584	28,516175	0,060975
3 + 16	30	28,8736	28,8782	28,8989	28,751	28,850425	0,395225

Ziel: Abweichungen von  $\leq 1 \Delta Ct$  erfüllt

Pipettierfehler und Senkung der Annealingtemperatur auf 59°C							
Ansatz	% Pf in R	Ct <sub>1</sub>	Ct <sub>2</sub>	Ct <sub>3</sub>	Ct <sub>4</sub>	Ct mittel	ΔCt von 5 + 20
4 + 16	1	33,4061	33,3243	33,6713	33,311	33,428175	0,089475
4 + 17	1	33,28	33,677	33,1548	33,8648	33,49415	0,15545
3 + 16	1	34	33,619	33,9627	33,62	33,800425	0,461725
4 + 16	30	28,3982	28,5136	28,4792	28,4418	28,4582	0,094
4 + 17	30	28,4008	28,6247	28,4386	28,457	28,480275	0,116075
3 + 16	30	28,7857	28,7036	28,8267	28,7827	28,774675	0,410475

Ziel: Abweichungen von  $\leq 1 \Delta Ct$  erfüllt

Tabelle 30: Robustheit der Probe Pferd in Schwein

Pipettierfehler 60°C							
Ansatz	% Pf in S	Ct <sub>1</sub>	Ct <sub>2</sub>	Ct <sub>3</sub>	Ct <sub>4</sub>	Ct mittel	ΔCt von 5 + 20
4 + 16	1	32,2031	32,3729	32,2278	32,3355	32,284825	-0,079775
4 + 17	1	32,4464	32,2412	32,4616	31,9237	32,268225	-0,096375
3 + 16	1	32,2022	33	32,3464	32,98	32,63215	0,26755
4 + 16	30	26,7618	26,7443	26,854	26,7028	26,765725	0,015925
4 + 17	30	26,9232	26,8864	26,8514	26,8643	26,881325	0,131525
3 + 16	30	27,0393	27,1184	27,0799	27,026	27,0659	0,3161

Ziel: Abweichungen von  $\leq 1 \Delta Ct$  erfüllt

Pipettierfehler und Senkung der Annealingtemperatur auf 59°C							
Ansatz	% Pf in S	Ct <sub>1</sub>	Ct <sub>2</sub>	Ct <sub>3</sub>	Ct <sub>4</sub>	Ct mittel	ΔCt von 5 + 20
4 + 16	1	32,0424	32,4724	32,4891	32,3304	32,333575	0,177175
4 + 17	1	32,5148	32,8504	32,2319	33	32,649275	0,492875
3 + 16	1	33,2472	32,3199	32,3503	32,9514	32,7172	0,5608
4 + 16	30	26,6166	26,6577	26,675	26,6547	26,651	0,1944
4 + 17	30	26,8419	26,7008	26,7555	26,7135	26,752925	0,296325
3 + 16	30	26,8661	27,1046	27,1021	26,9641	27,009225	0,552625

Ziel: Abweichungen von  $\leq 1 \Delta Ct$  erfüllt

Pipettierfehler und Erhöhung der Annealingtemperatur auf 61°C							
Ansatz	% Pf in S	Ct <sub>1</sub>	Ct <sub>2</sub>	Ct <sub>3</sub>	Ct <sub>4</sub>	Ct mittel	ΔCt von 5 + 20
4 + 16	1	32,579	32,2416	33	32,932	32,68815	-0,09515
4 + 17	1	32,6232	32,8479	32,4703	32,7391	32,670125	-0,113175
3 + 16	1	32,9321	32,4286	33,2555	33,1258	32,9355	0,1522
4 + 16	30	27,2651	27,3484	27,328	27,2433	27,2962	0,0798
4 + 17	30	27,3512	27,3865	27,2801	27,228	27,31145	0,09505
3 + 16	30	27,5599	27,5992	27,4724	27,5411	27,54315	0,32675

Ziel: Abweichungen von  $\leq 1 \Delta Ct$  erfüllt

Pipettierfehler 60°C und Rotor-Gene Q Cyclers							
Ansatz	% Pf in S	Ct <sub>1</sub>	Ct <sub>2</sub>	Ct <sub>3</sub>	Ct <sub>4</sub>	Ct mittel	ΔCt von 5 + 20
4 + 16	1	28,5	27,69	28,52	29,29	28,5	0,61
4 + 17	1	28,27	29	29,16	28,12	28,6375	0,7475
3 + 16	1	28,12	28,18	28,83	29,01	28,535	0,645
4 + 16	30	22,88	22,92	22,98	22,8	22,895	-0,155
4 + 17	30	23,15	22,9	22,89	23,07	23,0025	-0,0475
3 + 16	30	23,21	23,14	23,1	23,11	23,14	0,09

Ziel: Abweichungen von  $\leq 1 \Delta Ct$  erfüllt

## 5.3 Pute

### 5.3.1 Konzentrations- und Reinheitsbestimmung der DNA

Tabelle 31: Konzentrations- und Reinheitsbestimmung des Probensystems Pute

Probe	c [ $\mu\text{g/ml}$ ]	$A_{260}/A_{280}$
0,6% P in H	185,3	1,92
1% P in H	547	1,96
2% P in H	597	1,93
5% P in H	419	1,95
10% P in H	477	1,99
30% P in H	427	1,97
K <sub>1</sub> (20% P in H)	423	1,98
K <sub>2</sub> (20% P in H)	517	1,97
0,6% P in R	219,2	1,96
1% P in R	225	1,9
2% P in R	278	1,95
5% P in R	306	1,93
10% P in R	335	1,99
30% P in R	365	1,86
K <sub>1</sub> (20% P in R)	367	1,92
K <sub>2</sub> (20% P in R)	357	1,93
0,6% P in S	180	1,98
1% P in S	198	1,96
2% P in S	164,3	1,97
5% P in S	156,7	1,92
10% P in S	148	1,94
30% P in S	172	1,97
K <sub>1</sub> (20% P in S)	120	1,93
K <sub>2</sub> (20% P in S)	123,2	1,92

### 5.3.2 Validierung

#### 5.3.2.1 Bestimmungsgrenze

**Akzeptanzkriterium:  $VK \leq 25\%$**

**Pute in Huhn:  $BG = 0.6\%$**

Wie in Tabelle 32 ersichtlich, liegt die Bestimmungsgrenze von Pute in Huhn mit einem VK von 24.4% bei 0.6%.

Tabelle 32: Bestimmungsgrenze der Probe Pute in Huhn

Pute in Huhn	1%		0.6%	
	Ct-Wert	c (%)	Ct-Wert	c (%)
	35,12	0,6	34,74	0,6
	34,85	0,7	34,98	0,5
	34,65	0,9	35,01	0,5
	34,68	0,8	34,99	0,5
	34,63	0,9	34,72	0,6
	34,72	0,8	35,00	0,5
	35,12	0,6	34,21	0,9
	35,03	0,6	34,28	0,9
	34,65	0,8	34,91	0,5
	34,80	0,7	34,53	0,7
Mittelwert		0,7		0,6
Standardabweichung		0,11		0,15
Variationskoeffizient (%)		14,4		24,4
Wiederfindung (%)		73,2		104,8

**Pute in Rind: BG = 1%**

Die Bestimmungsgrenze von Pute in Rind würde, vom VK her betrachtet, bei 0.6% liegen. Allerdings hat hier die Wiederfindung einen Wert von 151.1%, was auf einen errechneten Mittelwert  $\bar{x}$  von 0.9% zurückzuführen ist. Daher ist es besser, die Bestimmungsgrenze von Pute in Rind mit 1 % festzulegen, wobei auch hier die Wiederfindung mit 137.2% etwas erhöht ist.

Tabelle 33: Bestimmungsgrenze der Probe Pute in Rind

Pute in Rind	1%		0.6%	
	Ct-Wert	c (%)	Ct-Wert	c (%)
	33,46	1,4	34,18	0,8
	33,76	1,2	34,06	0,9
	33,55	1,4	33,74	1,1
	33,34	1,6	33,70	1,1
	33,40	1,4	33,69	1,1
	33,35	1,6	34,25	0,8
	33,74	1,2	34,49	0,7
	33,49	1,5	34,27	0,8
	33,53	1,4	34,00	0,9
	33,87	1,1	34,11	0,8
Mittelwert		1,4		0,9
Standardabweichung		0,15		0,16
Variationskoeffizient (%)		10,8		18,1
Wiederfindung (%)		137,2		151,1

**Pute in Schwein: BG = 0.6%**

Mit einem VK von 17.1% und einer WDF von 129.4% hat die Konzentrationsstufe 0.6% Pute in Schwein alle Akzeptanzkriterien erfüllt.

Tabelle 34: Bestimmungsgrenze der Probe Pute in Schwein

Pute in Schwein	1%		0.6%	
	Ct-Wert	c (%)	Ct-Wert	c (%)
	33,01	1,1	33,57	0,7
	32,95	1,2	33,24	0,9
	32,75	1,3	33,41	0,8
	33,29	1,0	33,87	0,5
	32,89	1,2	33,27	0,9
	32,90	1,2	33,92	0,6
	33,06	1,1	33,28	0,9
	32,89	1,2	33,45	0,8
	33,01	1,1	33,26	0,9
	32,78	1,2	33,42	0,8
Mittelwert		1,2		0,8
Standardabweichung		0,10		0,13
Variationskoeffizient (%)		8,8		17,1
Wiederfindung (%)		115,3		129,4

**5.3.2.2 Wiederfindung und Wiederholbarkeit**

**Akzeptanzkriterium: WDF zwischen 70 und 130%; VK ≤ 30%**

**Pute in Huhn: alle Akzeptanzkriterien erfüllt**

Tabelle 35 und 36 zeigen, dass bei den Wiederfindungs- und Wiederholbarkeitsversuchen der Tierkombination Pute in Huhn alle Akzeptanzkriterien erfüllt worden sind. Die Wiederfindungen lagen alle über 100%, allerdings noch weit unter der Vorgabe von 130%. Der höchste VK lag mit 24.4% bei 1% Pute in Huhn.

Tabelle 35: Wiederfindung und Wiederholbarkeit der Probe Pute in Huhn Teil 1

Pute in Huhn	1%		2%		5%	
	Ct-Wert	c (%)	Ct-Wert	c (%)	Ct-Wert	c (%)
	33,41	1,6	32,77	2,8	31,20	6,3
	34,28	0,9	32,86	2,5	31,70	4,4
	34,15	1,0	33,03	2,3	31,37	5,5
	34,02	1,1	33,13	2,1	31,42	5,3
	34,27	1,0	32,82	2,7	31,29	6,1
	33,95	1,2	33,04	2,3	31,37	5,7
	33,99	1,2	33,04	2,4	31,35	6,0
	33,85	1,2	32,99	2,4	31,70	4,5
	33,44	1,7	32,80	2,8	31,22	6,2
	34,40	0,8	32,88	2,4	31,60	4,7
	34,02	1,1	33,11	2,1	31,48	4,9
			33,04	2,2	31,31	5,5
Mittelwert		1,1		2,4		5,4
Standardabweichung		0,28		0,24		0,67
Variationskoeffizient (%)		24,4		10,1		12,3
Wiederfindung (%)		114,4		119,9		108,6

Tabelle 36: Wiederfindung und Wiederholbarkeit der Probe Pute in Huhn Teil 2

Pute in Huhn	10%		30%	
	Ct-Wert	c (%)	Ct-Wert	c (%)
	31,25	10,1	29,50	29,0
	31,17	10,7	29,38	31,0
	31,11	9,9	29,73	24,3
	31,29	9,4	29,33	31,6
	31,16	10,9	29,57	27,0
	31,23	10,6	29,23	35,0
	31,16	10,9	29,39	31,6
	31,32	9,5	29,31	32,2
	31,16	10,0	29,31	31,8
	31,05	11,2	29,37	29,3
	31,18	9,7	29,40	29,2
	30,99	11,3	29,32	31,5
Mittelwert		10,3		30,3
Standardabweichung		0,66		2,75
Variationskoeffizient (%)		6,4		9,1
Wiederfindung (%)		103,5		101,0

**Pute in Rind: nicht alle Akzeptanzkriterien erfüllt**

Wie in Tabelle 37 ersichtlich, wurde bei der Konzentrationsstufe 1% Pute in Rind das Akzeptanzkriterium der Wiederfindung mit 136.1% überschritten. Bei 5% Pute in Rind wurde der höchste VK mit 24.7% errechnet.

Tabelle 37: Wiederfindung und Wiederholbarkeit der Probe Pute in Rind Teil 1

Pute in Rind	1%		2%		5%	
	Ct-Wert	c (%)	Ct-Wert	c (%)	Ct-Wert	c (%)
	34,51	1,3	33,76	2,0	32,15	5,4
	34,41	1,3	33,54	2,2	32,05	5,8
	34,26	1,4	33,49	2,3	31,96	5,8
	34,62	1,1	33,56	2,1	32,07	5,4
	34,42	1,3	33,30	2,5	31,99	6,4
	34,11	1,6	33,43	2,3	32,10	5,4
	34,88	1,0	33,32	2,4	32,05	5,9
	34,37	1,4	33,72	1,9	32,14	5,1
	34,10	1,6	33,34	2,5	31,11	10,7
	34,47	1,3	33,28	2,5	32,13	5,1
	34,40	1,3	33,58	1,9	32,00	5,7
	34,16	1,6	33,47	2,2	31,79	6,4
Mittelwert		1,4		2,2		6,1
Standardabweichung		0,20		0,22		1,51
Variationskoeffizient (%)		14,3		9,9		24,7
Wiederfindung (%)		136,1		110,7		121,7

Tabelle 38: Wiederfindung und Wiederholbarkeit der Probe Pute in Rind Teil 2

Pute in Rind	10%		30%	
	Ct-Wert	c (%)	Ct-Wert	c (%)
	30,27	13,1	29,00	28,2
	30,44	10,3	28,88	28,4
	30,31	11,3	28,87	28,2
	30,30	11,1	28,84	29,9
	30,52	5,3	28,77	32,8
	30,24	11,8	28,77	31,7
	30,33	11,2	28,84	30,8
	30,17	12,2	28,77	32,9
	30,58	9,0	28,73	31,1
	30,49	9,8	28,82	29,4
	30,33	10,2	28,90	28,8
	30,25	11,8	28,82	30,2
Mittelwert		10,6		30,2
Standardabweichung		2,01		1,69
Variationskoeffizient (%)		18,9		5,6
Wiederfindung (%)		106,1		100,6

**Pute in Schwein: alle Akzeptanzkriterien erfüllt**

Bei der Tierkombination Pute in Schwein wurden bei allen Konzentrationsstufen die Akzeptanzkriterien erfüllt. Diese Tierkombination lieferte sehr gute Werte für die Wiederfindungen und für die Präzision. Der höchste VK lag dabei mit 17.1% bei 2% Pute in Schwein.

Tabelle 39: Wiederfindung und Wiederholbarkeit der Probe Pute in Schwein Teil 1

Pute in Schwein	1%		2%		5%	
	Ct-Wert	c (%)	Ct-Wert	c (%)	Ct-Wert	c (%)
	33,05	1,0	32,15	2,1	31,00	5,3
	32,92	1,2	32,19	2,1	30,90	5,1
	33,05	1,1	32,22	1,9	30,95	4,8
	32,87	1,2	32,07	1,2	30,92	5,2
	32,97	1,2	31,92	2,5	30,94	5,1
	32,84	1,2	32,10	2,1	30,66	6,3
	33,14	1,0	31,81	2,6	31,05	4,8
	32,78	1,3	32,26	1,9	30,90	5,7
	32,88	1,1	32,16	2,1	31,07	4,2
	32,89	1,2	32,06	2,1	30,94	5,1
	32,94	1,1	32,15	2,0	30,89	5,3
	33,05	1,0	32,26	1,8	30,91	5,2
Mittelwert		1,1		2,0		5,2
Standardabweichung		0,09		0,35		0,50
Variationskoeffizient (%)		7,8		17,1		9,7
Wiederfindung (%)		114,7		102,3		103,3

Tabelle 40: Wiederfindung und Wiederholbarkeit der Probe Pute in Schwein Teil 2

Pute in Schwein	10%		30%	
	Ct-Wert	c (%)	Ct-Wert	c (%)
	29,78	11,1	28,39	27,4
	29,64	11,2	28,36	26,3
	29,84	10,7	28,31	27,7
	30,00	9,3	28,41	25,4
	29,67	12,1	28,30	28,9
	29,80	10,8	28,29	29,3
	29,75	11,2	28,33	28,4
	29,87	10,4	28,31	27,6
	29,72	11,5	28,41	25,8
	29,90	10,4	28,36	27,1
	29,86	10,3	28,42	25,5
	29,97	9,6	28,38	26,1
Mittelwert		10,7		27,1
Standardabweichung		0,77		1,32
Variationskoeffizient (%)		7,2		4,9
Wiederfindung (%)		107,2		90,5

### 5.3.2.3 Robustheit

**Akzeptanzkriterium:  $\Delta Ct < 1$  zum Ansatz 5  $\mu l$  Probe + 20  $\mu l$  Reaktionsmix**

***Pute in Huhn: Nachweismethode ist robust***

Der Nachweis von Pute in seinem Geflügelverwandten, Huhn, gilt als sehr robust. Keine der Systemänderungen führte zu einem  $\Delta Ct > 1$ . Bei der Anwendung der Methode auf dem Rotor-Gene Q Cyclor wies der vorgetäuschte Pipettierfehler von 3  $\mu l$  + 16  $\mu l$  (30% P in H) sogar eine Ct-Wert-Differenz von exakt 0 auf. Die Senkung der Annealingtemperatur auf 59°C führte beim Pipettierfehler 3  $\mu l$  + 16  $\mu l$  (1% P in H) mit  $\sim 0.79$  zur höchsten Ct-Wert-Differenz dieser Nachweismethode (siehe Tabelle 41).

Auf die anderen Nachweismethoden von Pute wurde verzichtet, da lediglich der Nachweis in Huhn von großer Bedeutung ist.

Zusammenfassend kann für alle Robustheitsversuche behauptet werden, dass die Nachweismethoden bei höheren Konzentrationen von Tier A weniger empfindlich gegenüber Systemänderungen sind. Keine Nachweismethode dieser Masterarbeit wies bei 30% Tier A in Tier B mangelnde Robustheit aufgrund einer Ct-Wert-Differenz von  $> 1$  auf.

Tabelle 41: Robustheit der Probe Pute in Huhn

Pipettierfehler 60°C							
Ansatz	% P in H	Ct <sub>1</sub>	Ct <sub>2</sub>	Ct <sub>3</sub>	Ct <sub>4</sub>	Ct mittel	ΔCt von 5 + 20
4 + 16	1	33,8874	34,5565	33,9982	34,5501	34,24805	-0,59255
4 + 17	1	34,1076	34,6032	35,157	34,4244	34,57305	-0,26755
3 + 16	1	34,5777	35,039	34,3555	34,6442	34,6541	-0,1865
4 + 16	30	28,8181	29,0375	29,0729	29,0513	28,99495	-0,06475
4 + 17	30	29,0412	29,241	29,1075	29,0845	29,11855	0,05885
3 + 16	30	29,3566	29,4688	29,2587	29,3232	29,351825	0,292125

Ziel: Abweichungen von  $\leq 1 \Delta Ct$  erfüllt

Pipettierfehler und Senkung der Annealingtemperatur auf 59°C							
Ansatz	% P in H	Ct <sub>1</sub>	Ct <sub>2</sub>	Ct <sub>3</sub>	Ct <sub>4</sub>	Ct mittel	ΔCt von 5 + 20
4 + 16	1	33,8078	34,2793	34,0944	33,4336	33,903775	0,035475
4 + 17	1	33,6686	33,6281	33,6241	34,0221	33,735725	-0,132575
3 + 16	1	34,4238	34,4852	35,2898	34,4157	34,653625	0,785325
4 + 16	30	28,885	29,0313	28,9604	28,7672	28,910975	-0,010125
4 + 17	30	29,0324	28,9724	29,0277	28,9839	29,0041	0,083
3 + 16	30	29,2519	29,1968	29,164	29,2521	29,2162	0,2951

Ziel: Abweichungen von  $\leq 1 \Delta Ct$  erfüllt

Pipettierfehler und Erhöhung der Annealingtemperatur auf 61°C							
Ansatz	% P in H	Ct <sub>1</sub>	Ct <sub>2</sub>	Ct <sub>3</sub>	Ct <sub>4</sub>	Ct mittel	ΔCt von 5 + 20
4 + 16	1	34,9082	34,096	33,3697	34,5459	34,22995	0,00615
4 + 17	1	33,7303	33,8749	34,2603	33,3977	33,8158	-0,408
3 + 16	1	35,0456	33,8133	33,6755	34,6479	34,295575	0,071775
4 + 16	30	29,0071	28,8035	28,9199	28,9977	28,93205	-0,06795
4 + 17	30	29,0423	28,99	29,0257	29,0208	29,0197	0,0197
3 + 16	30	29,1079	29,2358	29,2891	29,2137	29,211625	0,211625

Ziel: Abweichungen von  $\leq 1 \Delta Ct$  erfüllt

Pipettierfehler 60°C und Rotor-Gene Q Cycler							
Ansatz	% P in H	Ct <sub>1</sub>	Ct <sub>2</sub>	Ct <sub>3</sub>	Ct <sub>4</sub>	Ct mittel	ΔCt von 5 + 20
4 + 16	1	31,03	31,53	31,27	31,04	31,2175	0,1675
4 + 17	1	31,99	31,73	31,19	31,51	31,605	0,555
3 + 16	1	31,51	31,48	31,8	31,19	31,495	0,445
4 + 16	30	26,22	26,15	26,07	25,92	26,09	-0,17
4 + 17	30	26,1	26,42	26,35	26,07	26,235	-0,025
3 + 16	30	26,32	26,44	26,15	26,13	26,26	0

Ziel: Abweichungen von  $\leq 1 \Delta Ct$  erfüllt

## 5.4 Anwendbarkeit

Die Methode sollte auf die verwendeten Matrices, die Probe und deren Verarbeitungsgrad anwendbar sein. Es ist zu beachten, dass sowohl unterschiedliche Tierarten als auch unterschiedliches Gewebe derselben Tierart verschieden hohe DNA-Konzentrationen aufweisen. Dies hat einen Einfluss auf die Nachweis- und Bestimmungsgrenze. Außerdem spielt der Verarbeitungsgrad der Probe eine besonders wichtige Rolle, da erhitzte Proben einen niedrigeren DNA-Gehalt als unerhitzte Proben aufweisen.

Der im Zuge dieser Diplomarbeit aufgestellte Validierungsplan bezieht sich ausschließlich auf rohe Fleischmischungen. Es kann lediglich der Gehalt einer bestimmten Tierart im Gesamt-Tiergehalt quantifiziert werden.

### 5.4.1 Modellwürste

Es wurden drei verschiedene Modell-Extrawürste (A, B und C) der AGES für die Untersuchungen verwendet. Diese waren bereits nach Codex B14 hergestellt worden. [Österreichisches Lebensmittelbuch, 2017]

Probenaufschluss und DNA-Isolierung erfolgten nach Kapitel 4.

Es wurden absichtlich keine auf die Modellwürste angepassten Kalibrator-Lösungen hergestellt und verwendet, um nicht exakt die Werte zu bekommen, die zu erwarten waren, sondern um experimentelle Daten zu erfassen. Es wurden die Kalibrator-Lösungen (20:80) der vorangegangenen Analysen verwendet.

Die Modellwürste bestanden aus den folgenden Tierarten in angegebener Zusammensetzung:

Tabelle 42: Zusammensetzung der Modellwürste A, B und C

Tier	Anteil (%) in A	Anteil (%) in B	Anteil (%) in C
Huhn	3,33		33,1
Pferd		3,33	
Pute	3,33		26,44
Rind	33,1	33,1	3,33
Schaf		3,33	
Schwein	60,24	60,24	37,12

### 5.4.1.1 Konzentrations- und Reinheitsbestimmung der DNA

Tabelle 43: Konzentrations- und Reinheitsbestimmung der Modellwürste A, B und C

Probe	c [ $\mu\text{g/ml}$ ]	$A_{260}/A_{280}$
A <sub>1</sub>	48,9	2,38
A <sub>2</sub>	37,4	2,4
B <sub>1</sub>	50,1	2,39
B <sub>2</sub>	55,3	2,32
C <sub>1</sub>	73,4	2,23
C <sub>2</sub>	49,7	2,44

### 5.4.1.2 Quantitative Real-time PCR

#### *Schwein*

Die Quantifizierung von Schwein in den Modellwürsten erfolgte zusammen mit der Ermittlung der Bestimmungsgrenze *Schwein in Rind* in einem PCR-Ansatz. Der verwendete Kalibrator bestand demnach aus 20% Schwein in 80% Rind. Wie in Tabelle 44 ersichtlich, fällt der Anteil an quantifiziertem Schwein in der Modellwurst C deutlich geringer aus als der wahre Wert. Dies ist damit zu erklären, dass in der Modellwurst C der Geflügelanteil mit 59.54% recht hoch ist, was aufgrund der höheren Kopienzahl von Geflügel, das Referenzgen Myostatin beeinflusst. Eine matrixbezogene Kalibrierung hätte diese speziesbedingte Variation berücksichtigt.

Tabelle 44: Quantitative Real-time PCR der Modellwürste A, B und C mit Kalibrator 20% Schwein in 80% Rind

Kalibrator: 20% Schwein in 80% Rind				
Modellwurst A	A1		A2	
	Ct-Wert	c (%)	Ct-Wert	c (%)
	28,09	58,7	28,15	63,3
	28,08	60,1	28,09	56,9
Mittelwert		59,4		60,1
Standardabweichung		0,98		4,54
Variationskoeffizient (%)		1,6		7,6
Wiederfindung (%)		98,7		99,8
Wahrer Wert		60,24%		
Modellwurst B	B1		B2	
	Ct-Wert	c (%)	Ct-Wert	c (%)
	28,17	69,2	28,27	73,5
	28,10	72,6	28,24	74,3
Mittelwert		70,9		73,9
Standardabweichung		2,34		0,59
Variationskoeffizient (%)		3,3		0,8
Wiederfindung (%)		117,7		122,7
Wahrer Wert		60,24%		
Modellwurst C	C1		C2	
	Ct-Wert	c (%)	Ct-Wert	c (%)
	29,74	19,3	29,40	21,3
	29,71	19,0	29,35	20,8
Mittelwert		19,1		21,0
Standardabweichung		0,21		0,32
Variationskoeffizient (%)		1,1		1,5
Wiederfindung (%)		51,5		56,7
Wahrer Wert		37,12%		

## **Pferd**

Die Tierart Pferd war ausschließlich in der Modellwurst B enthalten und wurde mithilfe des bereits hergestellten Kalibrators *Pferd in Schwein* quantifiziert.

Tabelle 45: Quantitative Real-time PCR der Modellwurst B mit Kalibrator 20% Pferd in 80% Schwein

Kalibrator: 20% Pferd in 80% Schwein				
Modellwurst B	B1		B2	
	Ct-Wert	c (%)	Ct-Wert	c (%)
	31,05	3,0	31,00	3,2
	31,15	2,8	30,93	3,3
Mittelwert		2,9		3,2
Standardabweichung		0,15		0,07
Variationskoeffizient (%)		5,2		2,2
Wiederfindung (%)		86,7		96,7
Wahrer Wert		3,33%		

## **Pute**

Wie in Tabelle 46 ersichtlich, fällt die Wiederfindung von Pute in der Modellwurst A besonders schlecht aus. Bei der Modellwurst C ist der analysierte Wert nur etwas höher als der wahre Wert – hier ist im Gegensatz zur Modellwurst A weniger Rind und mehr Huhn enthalten.

Tabelle 46: Quantitative Real-time PCR der Modellwürste A und C mit Kalibrator 20% Pute in 80% Schwein

Kalibrator: 20% Pute in 80% Schwein				
Modellwurst A	A1		A2	
	Ct-Wert	c (%)	Ct-Wert	c (%)
	29,60	6,1	29,65	5,7
	29,46	6,3	29,44	6,3
Mittelwert		6,2		6,0
Standardabweichung		0,11		0,44
Variationskoeffizient (%)		1,8		7,4
Wiederfindung (%)		185,9		180,2
Wahrer Wert		3,33%		
Modellwurst C	C1		C2	
	Ct-Wert	c (%)	Ct-Wert	c (%)
	27,12	31,1	27,00	29,4
	27,12	31,9	26,98	29,4
Mittelwert		31,5		29,4
Standardabweichung		0,57		0,01
Variationskoeffizient (%)		1,8		0,0
Wiederfindung (%)		119,0		111,3
Wahrer Wert		26,44%		

#### 5.4.2 Kommerziell erhältliche Lebensmittelprodukte

Folgende Produkte wurden untersucht:

- ✓ Schweine-Salami (Grandi Salumifici | Italien)
- ✓ Pferde-Cabanossi (Pferdefleischer | Österreich)
- ✓ Puten-Extrawurst (Hütthaler KG | Österreich)

Die Analyse der kommerziell erhältlichen Würste wurde genauso durchgeführt, wie sie in der Routine mit unbekanntem Proben stattfinden würde. Als Erstes wurden die Proben qualitativ untersucht, um festzustellen, welche Tierarten in der Probe nachweisbar sind. Dabei wurde ein Mischstandard, der alle relevanten Tierarten enthielt, als Positivkontrolle aufgetragen. Dieser Mischstandard wurde, wie die Probenlösungen, auf 5 µg/ml verdünnt. Sowohl die Positivkontrolle als auch die Proben wurden je Primer- und Sondengemisch im Doppelansatz aufgetragen. Es wurden dieselben Primer- und Sondengemische (Duplex) verwendet wie bei den vorangegangenen Analysen.

Anhand der gemessenen Ct-Werte konnten die ungefähren Konzentrationen (%) der nachweisbaren Tierarten berechnet werden. Dazu wird die Ct-Wert-Differenz zwischen der Positivkontrolle (Konzentration von 0.1%) und der zu untersuchenden Probe herangezogen. Zur Berechnung des Tierarten-Anteils in einer Probe wird die Ct-Wert-Differenz je Tierart in folgende Formel eingesetzt:

$$c(\%) = 0,1 \times 2^{\Delta Ct}$$

Zum Beispiel: wenn die Probe und die Positivkontrolle idente Ct-Werte haben, dann ist  $\Delta Ct$  gleich Null und die Berechnung ergibt für die Probe dieselbe Konzentration wie für die Positivkontrolle.

Mit dem Wissen, zu wieviel % eine nachweisbare Tierart annähernd vorhanden ist, konnten daran angepasste Kalibrator-Lösungen hergestellt werden, um eine adäquate Quantifizierung zu ermöglichen (die verwendete Formel setzt eine 100%-ige Effizienz der PCR voraus; die ermittelten %-Anteile sind daher eine Schätzung basierend auf qualitativen Analyseergebnissen). Die daran anschließende quantitative PCR wurde, wie gehabt, mit Myostatin als Referenzgen durchgeführt.

#### 5.4.2.1 Konzentrations- und Reinheitsbestimmung der DNA

Tabelle 47: Konzentrations- und Reinheitsbestimmung der kommerziell erhältlichen Lebensmittelproben

Probe	c [µg/ml]	A <sub>260</sub> /A <sub>280</sub>
SA <sub>1</sub>	193	1,95
SA <sub>2</sub>	194	1,97
PfC <sub>1</sub>	315	1,94
PfC <sub>2</sub>	292	1,89
PE <sub>1</sub>	97	1,93
PE <sub>2</sub>	87,7	1,95

#### 5.4.2.2 Qualitative Real-time PCR

Die qualitative Untersuchung der Schweinesalami zeigte, dass sich lediglich Schweinefleisch im Produkt befand bzw nur Schwein oberhalb der Nachweisgrenze nachweisbar war.

In der Pferde-Cabanossi konnte sowohl Pferde- als auch Schweinefleisch nachgewiesen werden. Für die Ermittlung der  $\Delta Ct$ -Werte für Schwein und Pferd

wurde jeweils der Analysewert vom Ct-Wert der Positivkontrolle abgezogen und der Mittelwert aus dem Doppelansatz berechnet.

Schwein in Pferdecabanossi:

$$\left. \begin{array}{l} 35.3 - 26.4 = 8.9 \\ 35.2 - 26.3 = 8.9 \end{array} \right\} \bar{x} = 8.9$$

Pferd in Pferdecabanossi:

$$\left. \begin{array}{l} 35.2 - 26.1 = 9.1 \\ 35.3 - 26.1 = 9.2 \end{array} \right\} \bar{x} = 9.15$$

Durch das Einsetzen in die Formel aus Kapitel 5.4.2 ergab sich ein Anteil von 56.81% Pferdefleisch und 47.77% Schweinefleisch. Daher wurde für die quantitative Real-time PCR ein Kalibrator bestehend aus 50% Schweinefleischaufschluss und 50% Pferdefleischaufschluss im Doppelansatz hergestellt. Einer der Ct-Werte von Pute liegt mit 38.3 ungefähr 4 Ct-Werte über der Positivkontrolle und wurde daher korrekterweise als „nicht nachweisbar“ gewertet. Grund hierfür könnte eine unspezifische Amplifikation - verursacht durch Kontamination - sein, welche zu diesem falsch-positiven Ergebnis geführt hat.

Die Putenextrawurst enthielt laut Analyse Pute und Huhn, wobei Letzteres nur an der Nachweisgrenze nachweisbar war. Das bedeutet, dass  $\geq 0.1\%$  Hühnerfleisch in der Putenextrawurst enthalten sind, aber immer noch zu wenig, um quantifizierbar zu sein.

Tabelle 48: Qualitative Real-time PCR der kommerziell erhältlichen Lebensmittelproben



Geräte-Nr.: BIOC/PCR 14  
File Name:

Ergebnisübersicht												
	HUHN	PUTE	RIND	SCHWEIN	PFERD	SCHAF	HUHN	PUTE	RIND	SCHWEIN	PFERD	SCHAF
NTC	45,0	45,0	45,0	45,0	45,0	45,0	negativ	negativ	negativ	negativ	negativ	negativ
Ct1 & Ct2 der Positivkontrolle → Mittelwert	33,8 34,4	34,2 34,5	37,6 37,0	35,3 35,2	35,2 35,3	38,3 38,1	34,1	34,4	37,3	35,2	35,3	38,2
Schweinesalami	45,0	45,0	45,0	25,5	45,0	45,0	n.n.	n.n.	n.n.	nachw.	n.n.	n.n.
	45,0	45,0	45,0	25,5	45,0	45,0	n.n.	n.n.	n.n.	nachw.	n.n.	n.n.
Pferdecabanossi	45,0	38,3	45,0	26,4	26,1	45,0	n.n.	n.n.	n.n.	nachw.	nachw.	n.n.
	45,0	45,0	45,0	26,3	26,1	45,0	n.n.	n.n.	n.n.	nachw.	nachw.	n.n.
Putenextrawurst	34,5	24,8	45,0	38,5	45,0	45,0	nachw.1	nachw.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.
	33,9	24,7	45,0	36,8	45,0	45,0	nachw.1	nachw.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.

**nachw.** ..... nachweisbar, quantifizierbar

**nachw.1** ..... nachweisbar, an der Nachweisgrenze

Anmerkungen: .....

**n.n.** ..... nicht nachweisbar; Nachweisgrenze = 0,1%\*

\*.....bezogen auf den gesamt-DNA Gehalt der Probe

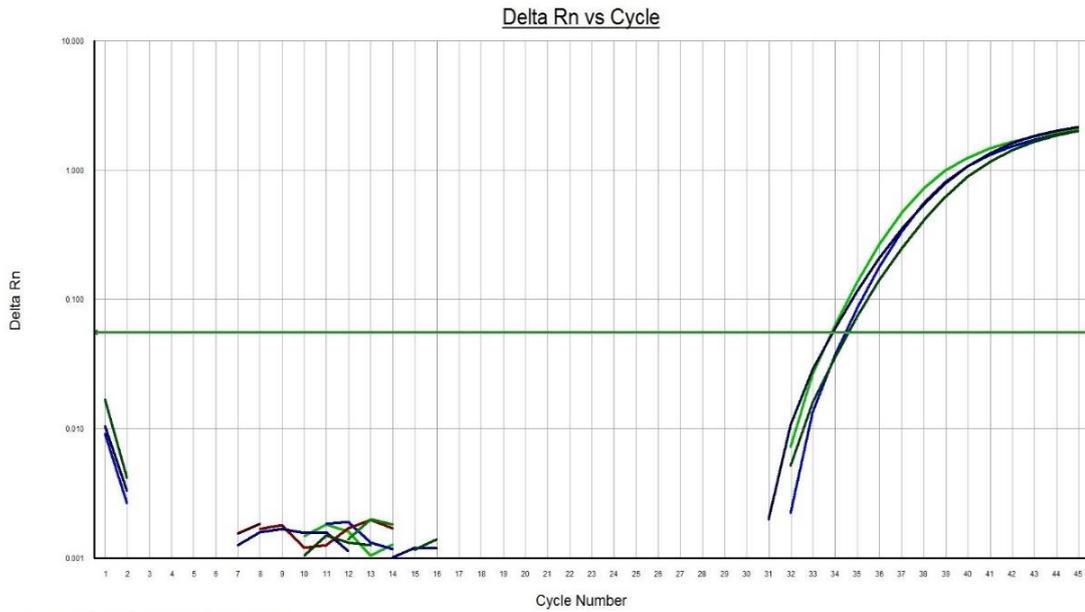


Abbildung 8: Amplifikationskurve der Probe Putenextrawurst mit Detektor Huhn

Probenmaterial: *Putenextrawurst*. Detektor: *Huhn*. Amplifikationskurven der Doppelbestimmungen der Probe sind annähernd gleich die des Mischstandards. Bei  $\sim 0.2$  Ct-Wert-Differenz ergibt sich ein Anteil von  $\sim 0.1\%$  Huhn in der Putenextrawurst. Die Doppelbestimmungen des Mischstandards sind grün und blau; die der Probe schwarz und dunkelgrau.

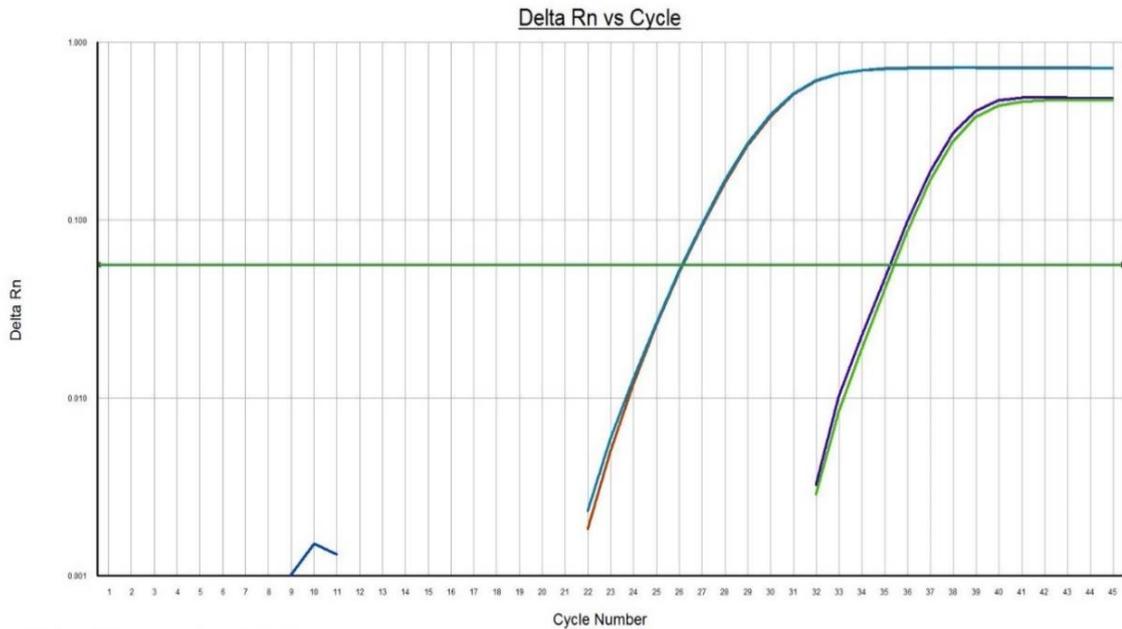


Abbildung 9: Amplifikationskurve der Probe Pferdecabanossi mit Detektor Pferd

Probenmaterial: *Pferdecabanossi*. Detektor: *Pferd*. Zwischen den Amplifikationskurven der Probe (blau und rot) und des Mischstandards (grün und schwarz) besteht ein  $\Delta Ct$  von  $\sim 9$ .

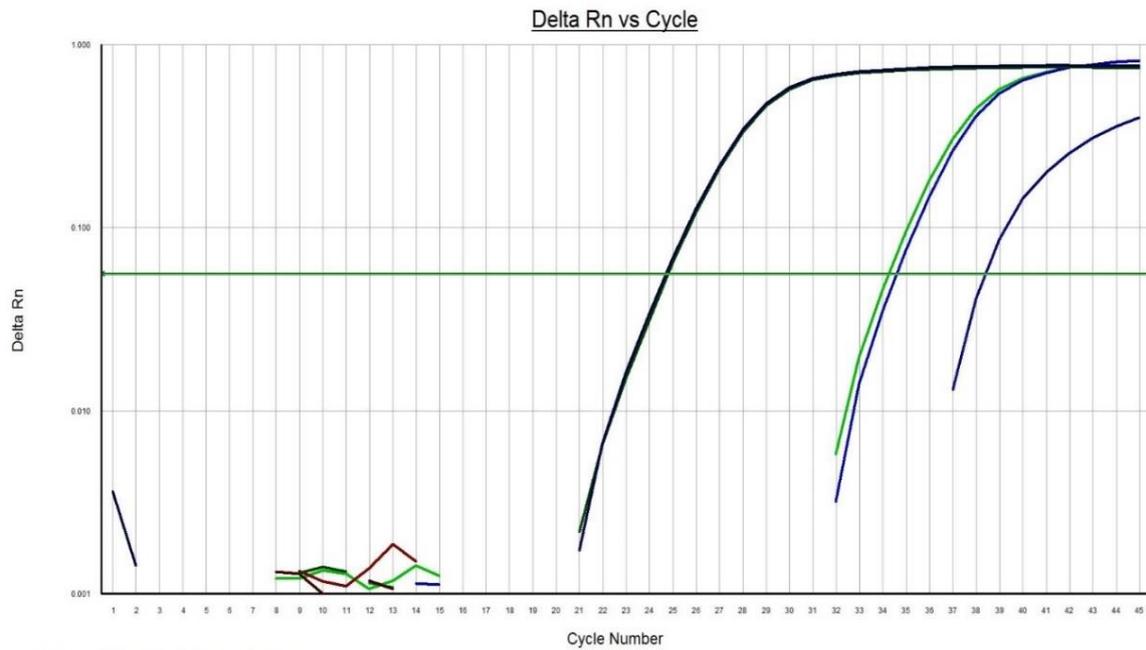


Abbildung 10: Amplifikationskurve der Proben Putenextrawurst und Pferdecabanossi mit Detektor Pute

Probenmaterial: Putenextrawurst und Pferdecabanossi. Detektor: Pute. Probe 1 (dunkelblau) vom Doppelansatz Pferdecabanossi bildete eine schwache Amplifikationskurve. Bei einem  $\Delta Ct$  von  $\sim 4$  zum Mischstandard (grün und blau) ergibt sich lediglich ein Anteil von  $\sim 1.5\%$  an Pute in der Pferdecabanossi. Zwischen den Amplifikationskurven des Doppelansatzes (dunkelgrün und schwarz) der Probe Putenextrawurst und des Mischstandards (grün und blau) besteht ein  $\Delta Ct$  von  $\sim 10$ , was einem Anteil von  $\sim 100\%$  Pute in der Putenextrawurst entspricht.

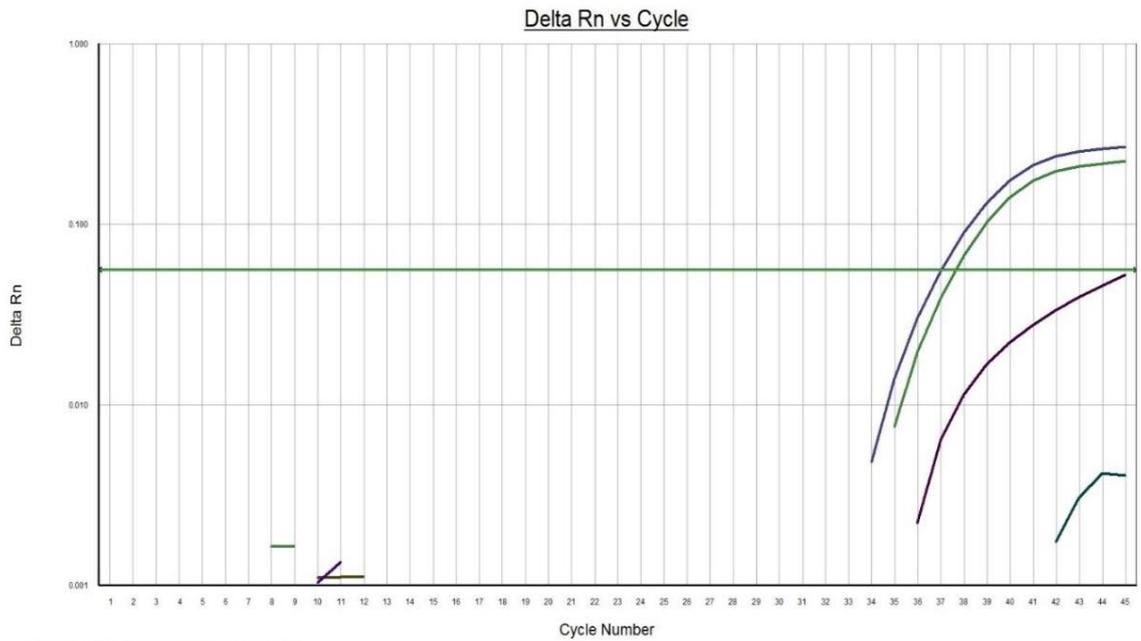


Abbildung 11: Amplifikationskurve der Probe Schweinesalami mit Detektor Rind

Probenmaterial: *Schweinesalami*. Detektor: *Rind*. Probe 2 (rot) vom Doppelansatz Schweinesalami bildete eine ganz schwache Amplifikationskurve, wobei der gelegte Threshold nicht erreicht wurde. Probe 1 der Schweinesalami (dunkelblau) kann gar nicht als Kurve wahrgenommen werden. Die Amplifikationskurven des Mischstandards sind grün und blau.

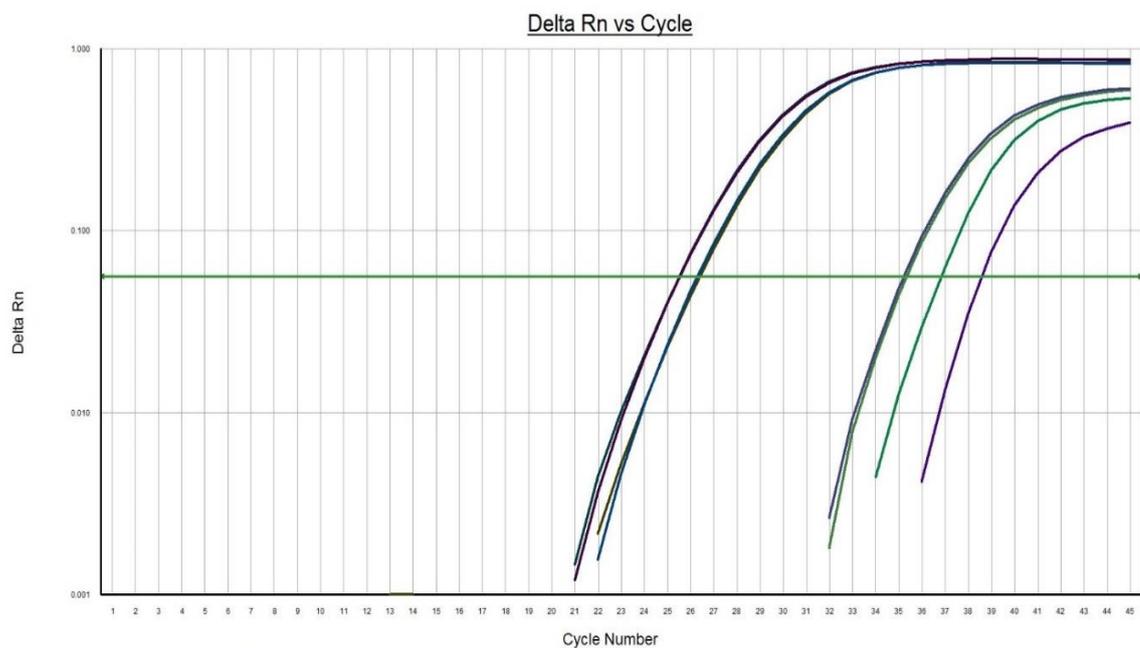


Abbildung 12: Amplifikationskurve der Proben Schweinesalami, Pferdecabanossi und Putenextrawurst mit Detektor Schwein

Probenmaterial: *Schweinesalami*, *Pferdecabanossi* und *Putenextrawurst*. Detektor: *Schwein*. Zwischen den Amplifikationskurven von Schweinesalami (dunkelgrün und rot) und die des

Mischstandards (dunkelblau und hellgrün) besteht ein  $\Delta Ct$  von  $\sim 10$ , was  $\sim 100\%$  Schweinefleischanteil entspricht. Weiters ist der Detektor Schwein (ocker und blau) bei der Pferdecabanossi angesprungen, in welcher sich  $\sim 46\%$  Schweinefleisch befinden sollen. Eine durchschnittliche Ct-Wert-Differenz von  $\sim 2.5$  ergibt einen Anteil von  $\sim 0.6\%$  Schweinefleisch in der Putenextrawurst (grün und lila).

### 5.4.2.3 Quantitative Real-time PCR

Lediglich die Probe Pferdecabanossi lieferte bei der qualitativen Untersuchung Ergebnisse, die quantifiziert werden konnten. Es wurde, wie erwähnt, ein Kalibrator aus jeweils 50% Schweine- und Pferdefleischaufschluss hergestellt. Wie gewohnt diente das Myostatin-Gen als Referenzsystem zur Quantifizierung. Beide Proben wurden jeweils im Doppelansatz aufgetragen. Bei einer sehr guten Effizienz der Amplifizierung ( $\sim 93 - 98\%$ ) zeigte die quantitative Real-time PCR, dass der Fleischanteil der Pferdecabanossi „nur“ zu  $\sim 38-39\%$  Pferdefleisch bestand. Schweinefleisch macht den restlichen Fleischgehalt aus.

Tabelle 49: Quantitative Real-time PCR der Probe Pferdecabanossi mit Kalibrator 50% Pferd in 50% Schwein

Kalibrator: 50% Pferd in 50% Schwein				
Pferdecabanossi	PfC1		PfC2	
	Ct-Wert	c (%)	Ct-Wert	c (%)
	26,94	38,7	26,89	38,4
	27,00	39,6	26,80	37,6
Mittelwert		39,1		38,0
Standardabweichung		0,65		0,52
Variationskoeffizient (%)		1,7		1,4
Wiederfindung (%)		78,2		76,0

## 6 Diskussion

In der Routineanalytik werden zur Überprüfung der Authentizität tierischer Lebensmittel meist die DNA-basierte Real-time PCR und der Protein-basierte Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA) verwendet. Die Real-time PCR hat, aufgrund der relativ schnellen und einfachen Quantifizierung, in den letzten Jahren enorm an Bedeutung zugenommen. Die Tatsache, dass nach jedem Zyklus die Menge an gebildetem Amplikon gemessen wird, ermöglicht die Quantifizierung der Ausgangs-DNA-Konzentration. Für die einfache Durchführung von ELISA, meist Sandwich-ELISA, gibt es bereits einige Testkits auf dem Markt. Welche Methode letztendlich verwendet wird, hängt grundsätzlich vom Zustand der Probe (erhitzt/unerhitzt), der gewünschten Art von Ergebnis (qualitativ/quantitativ), der vorhandenen Zeit und den aufbringbaren Kosten ab.

Ziel dieser Diplomarbeit war die Validierung einer quantitativen Real-time PCR Methode zur Differenzierung in Tierarten, damit sie in die Routine-Analytik der AGES aufgenommen werden kann. Verwendet wurden verschiedene Konzentrationen unterschiedlicher Tierarten-Kombinationen, welche mithilfe des Referenzgens Myostatin quantifiziert werden konnten.

Die Nachweisgrenze, welche laborintern bereits ermittelt worden war, lag bei 0.1%. Ziel war es, eine effiziente Quantifizierung möglichst unter 1% zu erreichen. Bis auf das System Pferd in Schwein, welches erst bei einer Konzentration von 1.5% Pferd in Schwein adäquat quantifiziert werden konnte, wurde dieses Ziel auch erreicht. Alle anderen Tierarten-Kombinationen konnten bereits bei einer Konzentration von 0.6 – 1% Tier A in Tier B bestimmt werden, wodurch das Validierungsziel bezüglich der Bestimmungsgrenze erreicht wurde.

Einen direkten Vergleich der Methoden ELISA und Real-time PCR führten Perestam et al. (2016) durch. Dabei untersuchten sie die Systeme Rind und Schwein in verschiedenen Tierartenmischungen. Mittels Real-time PCR, mit Taq-Man als Detektionsmethode, erreichten sie eine Nachweisgrenze von 0.5% bei Rind und 0.1% bei Schwein. Im Vergleich zur in dieser Diplomarbeit validierten Methode, wurde lediglich 20 Sekunden bei 95°C vordenaturiert, worauf 35 Zyklen Denaturierung (95°C/1 sec) und Annealing und Elongation (60°C/20 sec) folgten.

Der Sandwich-ELISA hingegen detektierte Rind erst bei 1% und Schwein bei 10%. Unabhängig von den erreichten Nachweisgrenzen, erwies sich ELISA als kostenintensivere, aber weniger zeitaufwendige und einfachere Methode. [PERESTAM et al., 2016]

Die von Amaral et al. (2017) entwickelte und validierte Real-time PCR Methode detektierte Schweinefleisch sogar bei 0.0001% und ermöglichte eine Quantifizierung bei Konzentrationen bis zu 0.1%, also um 1/10 niedriger als die in dieser Diplomarbeit validierte Bestimmungsgrenze für das System Schwein. Dabei erfolgte der Nachweis von Schweinefleisch sowohl mit thermisch behandelten als auch mit thermisch unbehandelten Rindfleischproben, welche mit Schweinefleisch gespikt wurden. Das Temperaturprogramm sah eine 5-minütige initiale Denaturierung bei 95°C vor, worauf 44 Zyklen bei 95°C (15 sec) und 66°C (45 sec) folgten. Im Vergleich zur bei dieser Diplomarbeit verwendeten Detektionsmethode, kam der interkalierende Farbstoff EvaGreen® zum Einsatz. Dieser kann dafür nicht bei Duplex- bzw Multiplex-Assays angewandt werden. [AMARAL et al., 2017]

Mandli et al. (2018) entwickelten sowohl einen direkten als auch einen kompetitiven ELISA, um möglichst niedrige Konzentrationen von Schweinefleisch in Rindfleisch nachweisen zu können. Dabei konnte mit der direkten Methode Schwein bis zu einer Konzentration von 0.01% und mit der kompetitiven Methode bis zu 0.1% nachgewiesen werden. Allerdings dauerte der direkte Assay knapp über 14 Stunden während der kompetitive ELISA lediglich eine Laufzeit von 45 Minuten aufwies. Vergleichend mit unserer Methode wurde beim kompetitiven Assay bei einer kürzeren Laufzeit eine gleich gute Nachweisgrenze (0.1%) für Schwein erreicht. [MANDLI et al., 2018]

Bezüglich des Validierungsparameters Robustheit zeigt diese Diplomarbeit, dass es durchaus möglich ist, bei der angewandten Methode, anstelle eines Pipettierschemas von 5 µl DNA und 20 µl Reaktionsmix, ein 4 + 16 Schema zu verwenden. Die quantitative Real-time PCR Methode erwies sich als äußerst robust; lediglich bei der Tierarten-Kombination Schwein in Huhn sorgten die

Systemänderungen Pipettierfehler und Senkung/ Erhöhung der Annealingtemperatur für Abweichungen von  $\geq 1$  Ct-Wert.

Da sich die, in dieser Diplomarbeit validierte Real-time PCR Methode, ausschließlich auf unerhitzte, DNA-Lösungen bezieht, wurden für die Überprüfung der Anwendbarkeit hauptsächlich rohe Würste (Schweinesalami und Pferdecabanossi) verwendet. Zur Analyse der Anwendbarkeit des Systems Pute wurde allerdings eine Brühwurst (Putenextrawurst) herangezogen. Die 3 kommerziell erhältlichen Lebensmittelprodukte wurden vor der quantitativen Analyse einer qualitativen Untersuchung unterzogen, um herauszufinden, ob Fleisch anderer Tierarten ebenfalls vorhanden war und in welchem Verhältnis. Während die Schweinesalami wirklich „nur“ Schweinefleisch enthielt, konnten bei der Putenextrawurst zusätzlich Hühnerfleisch (an der Nachweisgrenze) und bei der Pferdecabanossi Schweinefleisch qualitativ nachgewiesen werden.

Mit dieser Diplomarbeit konnte die quantitative Real-time PCR Methode für die Identifizierung der Tiere Schwein, Pferd und Pute in rohen Fleischmischungen mit anderen Tierarten soweit validiert werden, um die Aufnahme in die Routine-Analytik zu ermöglichen. Optimierungsbedarf gäbe es beim System Pferd bei der Anwesenheit in Schweinefleisch bezüglich der Bestimmungsgrenze.

## 7 Literaturverzeichnis

- ALIKORD M., MOMTAZ H., KERAMAT J., KADIVAR M., HOMAYOUNI A. Species identification and animal authentication in meat products: a review. *Journal of Food Measurement and Characterization*. 12: 145-155.
- AMARAL J.S., SANTOS G., OLIVEIRA M.B.P.P., MAFRA I. Quantitative detection of pork meat by EvaGreen real-time PCR to assess the authenticity of processed meat products. *Food Control*. 2017; 72: 53-61.
- BALLIN NZ. Authentication of meat and meat products. *Meat Science*. 2010; 86: 577–587.
- BELITZ H-D., GROSCH W., SCHIEBERLE P. *Lehrbuch der Lebensmittelchemie*. Springer Verlag. 6. Auflage. Heidelberg. Deutschland. 2008.
- BERTOLONI F., GHIONDA M.C., D'ALESSANDRO E., GERACI C., CHIOFALO V., FONTANESI L. A Next Generation Semiconductor Based Sequencing Approach for the Identification of Meat Species in DNA Mixtures. *PLoS ONE* 10(4): e0121701.
- BUSCH U. *Molekularbiologische Methoden in der Lebensmittelanalytik*. Springer Verlag. 1. Auflage. Berlin. Deutschland. 2010.
- COLEMAN W.B., TSONGALIS G.J. *Diagnostic Molecular Pathology: A Guide to Applied Molecular Testing*. Academic Press. United States. 2016.
- DORAK M.T. *Real-time PCR*. Taylor & Francis Group. United Kingdom. 2007.
- DOWNEY G. *Advances in Food Authenticity Testing*. Woodhead Publishing. 1. Auflage. United States. 2016.
- European Network of GMO Laboratories. Definition of Minimum Performance Requirements for Analytical Methods of GMO Testing. Internet: <http://gmocrl.jrc.ec.europa.eu/guidancedocs.htm> (Zugriff: 22.12.2017)
- GERBER A., ZITNIK S. Gefahr einer Trichinellose durch falsch deklariertes Pferdefleisch. *Zbl Arbeitsmed*. 2013; 63: 116–117.
- GIOVANNACCI I., GUIZARD C., CARLIER M., DUVAL V., MARTIN J.L. DEMEULEMESTER C. Species identification of meat products by ELISA. *Int. J. Food Sci. Technol*. 2004; 39: 863–867.
- HELLBERG R.S., HERNANDEZ B.C., HERNANDEZ E.L. Identification of meat and poultry species in food products using DNA barcoding. *Food Control* 2017; 80: 23-28.
- KLEIN H.G., CULLEN P.M., THIEMANN F. *Molekulare Diagnostik*. Wiley-VCH. 2. Auflage. Weinheim. Deutschland. 2014.

- KROMIDAS S. Handbuch Validierung in der Analytik. Wiley-VCH. 2. Auflage. Weinheim. Deutschland. 2011.
- LIU L., CHEN F.C., DORSEY J.L. HSIEH YHP. Sensitive monoclonal antibody-based sandwich ELISA for the detection of porcine skeletal muscle in meat and feed products. *J. Food Sci.* 2006; 71(1): 1–6.
- MANDLI J., EL FATIMI I., SEDDAOUI N., AMINE A. Enzyme immunoassay (ELISA/immunosensor) for a sensitive detection of pork adulteration in meat. *Food Chem.* 2018; 255: 380-389.
- MATISSEK R., STEINER G., FISCHER M., *Lebensmittelanalytik*. Springer Verlag. 6. Auflage. Berlin. Deutschland. 2018.
- MONTOWSKA M., POSPIECH E. Species Identification of meat by electrophoretic methods. *Acta Sci. Pol. Technol. Aliment.* 2007; 6(1): 5-16.
- MÜLHARDT C., *Der Experimentator Molekularbiologie/ Genomics*. Springer Verlag. 7. Auflage. Berlin. Deutschland. 2013.
- O`MAHONY PJ. Finding horse meat in beef products - a global problem. *QJM.* 2013; 106: 595–597.
- Österreichisches Lebensmittelbuch (ÖLMB). Internet:  
<http://www.lebensmittelbuch.at/a-1-judikatur-bei-waren-nach-dem-lebensmittelsicherheits-und-verbraucherschutzgesetz-lmsvg/lebensmittel> (Zugriff: 20.12.2017)
- PERESTAM AT., FUJISAKI K.K., NAVA O., HELLBERG R.S. Comparison of Real-time PCR and ELISA-based methods for the detection of beef and pork in processed meat products. *Food Control.* 2016; 71: 346-352.
- SANGER F., NICKLEN S., COULSON A.R. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci.* 1977; 74(12): 5463–5467.
- SCHMIDT O. *Genetik und Molekularbiologie*. Springer Verlag. 1. Auflage. Berlin. Deutschland. 2017.
- SOARES S., AMARAL J.S., OLIVEIRA M.B.P.P., MAFRA I. A SYBR Green real-time PCR assay to detect and quantify pork meat in processed poultry meat products. *Meat Science.* 2013; 94: 115–120.
- THERMO FISHER SCIENTIFIC. *Real-time PCR Handbook*. 2014.
- THIEMANN F., CULLEN P.M., KLEIN H-G. *Molekulare Diagnostik: Grundlagen der Molekularbiologie, Genetik und Analytik*. Wiley-VCH. 2. Auflage. Weinheim. Deutschland. 2014

TILLMAR A.O., DELL`AMICO B., WELANDER J., HOLMLUND G. A Universal Method for Species Identification of Mammals Utilizing Next Generation Sequencing for the Analysis of DNA Mixtures. PLoS ONE 8(12): e83761.

## 8 Appendix

### 8.1 Validierungsplan: Real-time PCR Methode zur Quantifizierung von Schwein



#### FORMULAR

#### Validierungsplan und -bewertung von chemisch-physikalischen Prüfverfahren

<b>Prüfvorschrift-Nr.:</b>		<b>Organisationseinheit:</b>	Institut für Lebensmittelsicherheit, Abteilung Molekular- und Mikrobiologie	
<b>Titel der Methode:</b>	Validierung eines <i>Duplex Real-time</i> PCR-Nachweisverfahrens für Schwein			
<b>Matrix:</b>	Wässrige DNA-Lösungen aus <i>Rind</i> oder <i>Huhn</i> oder <i>Pute</i>	<b>Messgerätetyp:</b>	<i>Real-time</i> PCR-Thermocycler	
<b>Untersuchungsziel:</b>	Validierung eines <i>Duplex Real-time</i> PCR-Nachweisverfahrens für Schwein			
<b>Verfahrenstyp:</b>	<input type="checkbox"/> Spurenanalytik quant. <input type="checkbox"/> Konventionsverfahren	<input type="checkbox"/> Spurenanalytik qual./neg. <input type="checkbox"/> physikalische Messungen	<input checked="" type="checkbox"/> Inhaltsstoffanalytik <input type="checkbox"/> Screening-Verfahren	<input type="checkbox"/> Gravimetrie/Volumetrie
<b>Normverfahren:</b>	<input type="checkbox"/> vollständig übernommen	<input type="checkbox"/> verändert übernommen	<input type="checkbox"/> nicht übernommen	<input checked="" type="checkbox"/> keine Norm vorhanden
<b>Externe Vorgaben zur Validierung:</b>	<input type="checkbox"/> gesetzlich (national/EU) <input type="checkbox"/> anerkannter Leitfaden			
<b>Validierungsstatus:</b>	<input checked="" type="checkbox"/> Erstvalidierung <input type="checkbox"/> Verifizierung (z.B. bei Normmethoden)	<input type="checkbox"/> Revalidierung	Begründung:	

Validierungs-kriterien	Zu ermittelnde Verfahrenskennndaten <sup>1</sup>	Ermittelte Verfahrenskennndaten <sup>2</sup>	Mindestvoraussetzungen <sup>1</sup>	Ziel erfüllt <sup>2</sup>
<b>Kalibrierung</b>	<p>Kalibrierung mit matrixbezogenem Kalibrator 20% Schwein + 80% Rind oder Huhn oder Pute</p> <p>Es werden Mischungen von Fleisch-Lysaten hergestellt (1g auf 10ml CTAB-Puffer)</p>	<p><b><u>Schweine-PCR</u></b> Kalibrierbereich: 4 µg/ml – 0,0156 µg/ml R<sup>2</sup> = 0,9984 k = -3,3977</p> <p><b><u>Referenz-PCR</u></b> Kalibrierbereich: 20 µg/ml – 0,078 µg/ml R<sup>2</sup> = 0,9996 k = -3,4444</p>	<p>R<sup>2</sup> ≥ 0,98 -3,6 &lt; k &lt; -3,1</p>	<p><input type="checkbox"/> ja <input type="checkbox"/> nein</p>

<b>Wiederfindung</b>	<p>Wiederfindung des Fleischanteils in Modell-Fleischgemischen bei folgenden Konzentrationen mit jeweils 12 Wiederholungen: 1%, 2%, 5%, 10%, 30%</p>	<p><b><u>S in Huhn</u></b>  <u>1%:</u> 92,9  <u>2%:</u> 93,9  <u>5%:</u> 95,6  <u>10%:</u> 94,4  <u>30%:</u> 110,4</p> <p><b><u>S in Pute</u></b>  <u>1%:</u> 110,7  <u>2%:</u> 116,2  <u>5%:</u> 108,2  <u>10%:</u> 120,9  <u>30%:</u> 107,1</p> <p><b><u>S in Rind</u></b>  <u>1%:</u> 76,5  <u>2%:</u> 90,2  <u>5%:</u> 105,8  <u>10%:</u> 115,4  <u>30%:</u> 108,1</p>	70-130% ±30%	<input type="checkbox"/> ja <input type="checkbox"/> nein
----------------------	--	--	-----------------	---

<b>Präzision</b>	VK bei den Wiederfindungsversuchen bei folgenden Konzentrationen mit jeweils 12 Wiederholungen: 1%, 2%, 5%, 10%, 30%	<u><b>S in Huhn</b></u> <u>1%: 22,1</u> <u>2%: 28,8</u> <u>5%: 12,3</u> <u>10%: 13,7</u> <u>30%: 19,0</u>  <u><b>S in Pute</b></u> <u>1%: 16,1</u> <u>2%: 12,0</u> <u>5%: 25,3</u> <u>10%: 19,2</u> <u>30%: 7,3</u>  <u><b>S in Rind</b></u> <u>1%: 17,7</u> <u>2%: 14,2</u> <u>5%: 22,5</u> <u>10%: 5,9</u> <u>30%: 17,6</u>	≤ 30%	<input type="checkbox"/> ja <input type="checkbox"/> nein
<b>Richtigkeit</b> (siehe Wiederfindung)			±..%	<input type="checkbox"/> ja <input type="checkbox"/> nein
<b>Spezifität</b>	Siehe Köppel et al., 2011		keine	<input type="checkbox"/> ja <input type="checkbox"/> nein

<b>Nachweisgrenze</b>	Wurde bereits bei der Validierung des jeweiligen Nachweisverfahrens ermittelt.		$\leq 0,1\%$	<input type="checkbox"/> ja <input type="checkbox"/> nein
<b>Bestimmungsgrenze</b>	Jene niedrigste Konzentration an Analyt, die unter Wiederholbedingungen (10 Wiederholungen) mit einem Mindestmaß an Präzision bestimmt werden kann. -> VK $\leq 25\%$ Unter Idealbedingungen (kühl, fettfrei).	<b><u>S in Huhn:</u></b> 1% <b><u>S in Pute:</u></b> 0,6% <b><u>S in Rind:</u></b> 1%	$\leq 1\%$	<input type="checkbox"/> ja <input type="checkbox"/> nein
<b>Anwendbarkeit</b>	Das Verfahren muss auf alle unerhitzten, wässrigen DNA-Lösungen, die frei von PCR-Inhibitoren sind, anwendbar sein. Verwendung von Modellwürsten und kommerziell erhältlichen Lebensmittelprodukten (Schweinesalami).	Die Anwendbarkeit ist gegeben. Ein erhöhter Geflügelanteil setzt aber die Wiederfindung herab.		<input type="checkbox"/> ja <input type="checkbox"/> nein

<b>Robustheit</b>	<p>Um die Robustheit der Methode zu evaluieren, werden die Annealingtemperaturen und die Menge an Reaktionsmix verändert. Außerdem wird der PCR-Lauf bei 60°C zusätzlich an einem anderen Gerät durchgeführt.</p> <p><u>Thermocycler</u> 59, 60, 61°C 4+16, 4+17, 3+16</p> <p><u>Rotor-Gene Q Cyler</u> 60°C 4+16, 4+17, 3+16</p>	<p><b><u>S in Huhn:</u></b> Abweichung nicht erfüllt bei:</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- Pipettierfehler 60°C</li> <li>- Pipettierfehler und Senkung der Annealingtemperatur 59°C</li> <li>- Pipettierfehler und Erhöhung der Annealingtemperatur 61°C</li> </ul> <p>Abweichung von <math>\leq 1</math> Ct-Wert erfüllt bei Pipettierfehler und Rotor-Gene Q Cyler</p> <p><b><u>S in Pute:</u></b> Abweichung bei allen Systemänderungen erfüllt.</p> <p><b><u>S in Rind:</u></b> Abweichung bei allen Systemänderungen erfüllt.</p>	Abweichungen von $\leq 1$ Ct-Wert	<input type="checkbox"/> ja <input type="checkbox"/> nein
<b>Messunsicherheit</b>	Aus Präzisionsdaten ermittelt (aufgerundeter maximaler VK).	Der höchste VK liegt bei 29%. (2% Schwein in 98% Huhn)	Max. 30%	<input type="checkbox"/> ja <input type="checkbox"/> nein
<p><sup>1</sup> auszufüllen bei Erstellung des Validierungsplans  <sup>2</sup> auszufüllen bei Erstellung der Validierungsbewertung</p>				
<b>Abschlussbewertung</b>	<input type="checkbox"/> Methode ist geeignet <input type="checkbox"/> Methode ist nicht geeignet (siehe Kommentar) <input type="checkbox"/> Methode ist unter folgenden Bedingungen geeignet (siehe Kommentar) <b>Kommentar:</b>			

<b>Erstellung Validierungsplan (durchführende/r Fach-expertIn)</b>		<b>Erstellung Validierungsbewertung (durchführende/r FachexpertIn)</b>	
<b>Freigabe Validierungsplan (OE-Leitung)</b>		<b>Freigabe Validierungsbewertung (OE-Leitung)</b>	
	Name / Datum / Unterschrift (Paraphe)		Name / Datum / Unterschrift (Paraphe)

## 8.2 Validierungsplan: Real-time PCR Methode zur Quantifizierung von Pferd



### FORMULAR

#### Validierungsplan und -bewertung von chemisch-physikalischen Prüfverfahren

<b>Prüfvorschrift-Nr.:</b>		<b>Organisationseinheit:</b>	Institut für Lebensmittelsicherheit, Abteilung Molekular- und Mikrobiologie	
<b>Titel der Methode:</b>	Validierung eines <i>Duplex Real-time</i> PCR-Nachweisverfahrens für Pferd			
<b>Matrix:</b>	Wässrige DNA-Lösungen aus <i>Schwein</i> oder <i>Huhn</i> oder <i>Rind</i>	<b>Messgerätetyp:</b>	<i>Real-time</i> PCR-Thermocycler	
<b>Untersuchungsziel:</b>	Validierung eines <i>Duplex Real-time</i> PCR-Nachweisverfahrens für Pferd			
<b>Verfahrenstyp:</b>	<input type="checkbox"/> Spurenanalytik quant. <input type="checkbox"/> Konventionsverfahren	<input type="checkbox"/> Spurenanalytik qual./neg. <input type="checkbox"/> physikalische Messungen	<input checked="" type="checkbox"/> Inhaltsstoffanalytik <input type="checkbox"/> Screening-Verfahren	<input type="checkbox"/> Gravimetrie/Volumetrie
<b>Normverfahren:</b>	<input type="checkbox"/> vollständig übernommen	<input type="checkbox"/> verändert übernommen	<input type="checkbox"/> nicht übernommen	<input checked="" type="checkbox"/> keine Norm vorhanden
<b>Externe Vorgaben zur Validierung:</b>	<input type="checkbox"/> gesetzlich (national/EU) <input type="checkbox"/> anerkannter Leitfaden			
<b>Validierungsstatus:</b>	<input checked="" type="checkbox"/> Erstvalidierung <input type="checkbox"/> Verifizierung (z.B. bei Normmethoden)	<input type="checkbox"/> Revalidierung	Begründung:	

Validierungs-kriterien	Zu ermittelnde Verfahrenskenndaten <sup>1</sup>	Ermittelte Verfahrenskenndaten <sup>2</sup>	Mindestvoraussetzungen <sup>1</sup>	Ziel erfüllt <sup>2</sup>
<b>Kalibrierung</b>	<p>Kalibrierung mit matrixbezogenem Kalibrator 20% Pferd + 80% Schwein oder Huhn oder Rind</p> <p>Es werden Mischungen von Fleisch-Lysaten hergestellt (1g auf 10ml CTAB-Puffer)</p>	<p><b><u>Pferde-PCR</u></b> Kalibrierbereich: 4 µg/ml – 0,0156 µg/ml R<sup>2</sup> = 0,9987 k = -3,4074</p> <p><b><u>Referenz-PCR</u></b> Kalibrierbereich: 20 µg/ml – 0,078 µg/ml R<sup>2</sup> = 0,9992 k = -3,4612</p>	<p>R<sup>2</sup> ≥ 0,98 -3,6 &lt; k &lt; -3,1</p>	<p><input type="checkbox"/> ja <input type="checkbox"/> nein</p>

<b>Wiederfindung</b>	Wiederfindung des Fleischanteils in Modell-Fleischgemischen bei folgenden Konzentrationen mit jeweils 12 Wiederholungen: 1%, 2%, 5%, 10%, 30%	<p><b><u>Pf in Huhn</u></b>  <u>1%:</u> 87,9  <u>2%:</u> 85,3  <u>5%:</u> 69,5  <u>10%:</u> 89,9  <u>30%:</u> 98,1</p> <p><b><u>Pf in Rind</u></b>  <u>1%:</u> 126,4  <u>2%:</u> 114,7  <u>5%:</u> 108,3  <u>10%:</u> 117,0  <u>30%:</u> 118,1</p> <p><b><u>Pf in Schwein</u></b>  <u>1%:</u> 74,5  <u>2%:</u> 75,8  <u>5%:</u> 80,5  <u>10%:</u> 117,8  <u>30%:</u> 109,5</p>	70-130% ±30%	<input type="checkbox"/> ja <input type="checkbox"/> nein
----------------------	--	--	-----------------	---

<b>Präzision</b>	VK bei den Wiederfindungsversuchen bei folgenden Konzentrationen mit jeweils 12 Wiederholungen: 1%, 2%, 5%, 10%, 30%	<b><u>Pf in Huhn</u></b> <u>1%:</u> 19,7 <u>2%:</u> 17,0 <u>5%:</u> 12,2 <u>10%:</u> 16,2 <u>30%:</u> 24,5  <b><u>Pf in Rind</u></b> <u>1%:</u> 16,0 <u>2%:</u> 14,0 <u>5%:</u> 26,8 <u>10%:</u> 7,2 <u>30%:</u> 22,7  <b><u>Pf in Schwein</u></b> <u>1%:</u> 27,8 <u>2%:</u> 19,0 <u>5%:</u> 8,4 <u>10%:</u> 7,8 <u>30%:</u> 6,8	≤ 30%	<input type="checkbox"/> ja <input type="checkbox"/> nein
<b>Richtigkeit</b> (siehe Wiederfindung)			±..%	<input type="checkbox"/> ja <input type="checkbox"/> nein
<b>Spezifität</b>	Siehe jeweilige Singleplex-PCR		keine	<input type="checkbox"/> ja <input type="checkbox"/> nein

<b>Nachweisgrenze</b>	Wurde bereits bei der Validierung des jeweiligen Nachweisverfahrens ermittelt.		$\leq 0,1\%$	<input type="checkbox"/> ja <input type="checkbox"/> nein
<b>Bestimmungsgrenze</b>	Jene niedrigste Konzentration an Analyt, die unter Wiederholbedingungen (10 Wiederholungen) mit einem Mindestmaß an Präzision bestimmt werden kann. -> VK $\leq 25\%$ Unter Idealbedingungen (kühl, fettfrei).	<b><u>Pf in Huhn:</u></b> 0,6% <b><u>Pf in Rind:</u></b> 1% <b><u>Pf in Schwein:</u></b> 1,5%	$\leq 1\%$	<input type="checkbox"/> ja <input type="checkbox"/> nein
<b>Anwendbarkeit</b>	Das Verfahren muss auf alle unerhitzten, wässrigen DNA-Lösungen, die frei von PCR-Inhibitoren sind, anwendbar sein. Verwendung von Modellwürsten und kommerziell erhältlichen Lebensmittelprodukten (Pferdecabanossi).	Die Anwendbarkeit ist gegeben.		<input type="checkbox"/> ja <input type="checkbox"/> nein

<b>Robustheit</b>	Um die Robustheit der Methode zu evaluieren, werden die Annealingtemperaturen und die Menge an Reaktionsmix verändert. Außerdem wird der PCR-Lauf bei 60°C zusätzlich an einem anderen Gerät durchgeführt. <u>Thermocycler</u> 59, 60, 61°C 4+16, 4+17, 3+16 <u>Rotorgene</u> 60°C 4+16, 4+17, 3+16	<b>Pf in Huhn:</b> Abweichung bei allen Systemänderungen erfüllt.  <b>Pf in Rind:</b> Abweichung bei allen Systemänderungen erfüllt.  <b>Pf in Schwein:</b> Abweichung bei allen Systemänderungen erfüllt.	Abweichungen von $\leq 1$ Ct-Wert	<input type="checkbox"/> ja <input type="checkbox"/> nein
<b>Messunsicherheit</b>	Aus Präzisionsdaten ermittelt (aufgerundeter maximaler VK).	Der höchste VK liegt bei 28%. (1% Pferd in 99% Schwein)	Max. 30%	<input type="checkbox"/> ja <input type="checkbox"/> nein
<sup>1</sup> auszufüllen bei Erstellung des Validierungsplans <sup>2</sup> auszufüllen bei Erstellung der Validierungsbewertung				
<b>Abschlussbewertung</b>	<input type="checkbox"/> Methode ist geeignet <input type="checkbox"/> Methode ist nicht geeignet (siehe Kommentar) <input type="checkbox"/> Methode ist unter folgenden Bedingungen geeignet (siehe Kommentar) <b>Kommentar:</b>			
<b>Erstellung Validierungsplan (durchführende/r Fach-expertIn)</b>		<b>Erstellung Validierungsbewertung (durchführende/r FachexpertIn)</b>		

<b>Freigabe Validierungsplan (OE-Leitung)</b>		<b>Freigabe Validierungsbewertung (OE-Leitung)</b>	
	Name / Datum / Unterschrift (Paraphe)		Name / Datum / Unterschrift (Paraphe)

### 8.3 Validierungsplan: Real-time PCR Methode zur Quantifizierung von Pute



#### FORMULAR

#### Validierungsplan und -bewertung von chemisch-physikalischen Prüfverfahren

<b>Prüfvorschrift-Nr.:</b>		<b>Organisationseinheit:</b>	Institut für Lebensmittelsicherheit, Abteilung Molekular- und Mikrobiologie	
<b>Titel der Methode:</b>	Validierung eines <i>Duplex Real-time</i> PCR-Nachweisverfahrens für Pute			
<b>Matrix:</b>	Wässrige DNA-Lösungen aus <i>Schwein</i> oder <i>Huhn</i> oder <i>Rind</i>	<b>Messgerätetyp:</b>	<i>Real-time</i> PCR-Thermocycler	
<b>Untersuchungsziel:</b>	Validierung eines <i>Duplex Real-time</i> PCR-Nachweisverfahrens für Pute			
<b>Verfahrenstyp:</b>	<input type="checkbox"/> Spurenanalytik quant. <input type="checkbox"/> Konventionsverfahren	<input type="checkbox"/> Spurenanalytik qual./neg. <input type="checkbox"/> physikalische Messungen	<input checked="" type="checkbox"/> Inhaltsstoffanalytik <input type="checkbox"/> Screening-Verfahren	<input type="checkbox"/> Gravimetrie/Volumetrie
<b>Normverfahren:</b>	<input type="checkbox"/> vollständig übernommen	<input type="checkbox"/> verändert übernommen	<input type="checkbox"/> nicht übernommen	<input checked="" type="checkbox"/> keine Norm vorhanden
<b>Externe Vorgaben zur Validierung:</b>	<input type="checkbox"/> gesetzlich (national/EU) <input type="checkbox"/> anerkannter Leitfaden			
<b>Validierungsstatus:</b>	<input checked="" type="checkbox"/> Erstvalidierung <input type="checkbox"/> Verifizierung (z.B. bei Normmethoden)	<input type="checkbox"/> Revalidierung	Begründung:	

Validierungs-kriterien	Zu ermittelnde Verfahrenskenndaten <sup>1</sup>	Ermittelte Verfahrenskenndaten <sup>2</sup>	Mindestvoraussetzungen <sup>1</sup>	Ziel erfüllt <sup>2</sup>
<b>Kalibrierung</b>	<p>Kalibrierung mit matrixbezogenem Kalibrator 20% Pute + 80% Schwein oder Huhn oder Rind</p> <p>Es werden Mischungen von Fleisch-Lysaten hergestellt (1g auf 10ml CTAB-Puffer)</p>	<p><b><u>Puten-PCR</u></b> Kalibrierbereich: 4 µg/ml – 0,0156 µg/ml R<sup>2</sup> = 0,9967 k = -3,3518</p> <p><b><u>Referenz-PCR</u></b> Kalibrierbereich: 20 µg/ml – 0,078 µg/ml R<sup>2</sup> = 0,9997 k = -3,4330</p>	<p>R<sup>2</sup> ≥ 0,98 -3,6 &lt; k &lt; -3,1</p>	<p><input type="checkbox"/> ja <input type="checkbox"/> nein</p>

<b>Wiederfindung</b>	Wiederfindung des Fleischanteils in Modell-Fleischgemischen bei folgenden Konzentrationen mit jeweils 12 Wiederholungen: 1%, 2%, 5%, 10%, 30%	<p><b><u>P in Huhn</u></b>  <u>1%:</u> 114,4  <u>2%:</u> 119,9  <u>5%:</u> 108,6  <u>10%:</u> 103,5  <u>30%:</u> 101,0</p> <p><b><u>P in Rind</u></b>  <u>1%:</u> 136,1  <u>2%:</u> 110,7  <u>5%:</u> 121,7  <u>10%:</u> 106,1  <u>30%:</u> 100,6</p> <p><b><u>P in Schwein</u></b>  <u>1%:</u> 114,7  <u>2%:</u> 102,3  <u>5%:</u> 103,3  <u>10%:</u> 107,2  <u>30%:</u> 90,5</p>	70-130% ±30%	<input type="checkbox"/> ja <input type="checkbox"/> nein
----------------------	--	--	-----------------	---

<b>Präzision</b>	VK bei den Wiederfindungsversuchen bei folgenden Konzentrationen mit jeweils 12 Wiederholungen: 1%, 2%, 5%, 10%, 30%	<b><u>P in Huhn</u></b> <u>1%: 24,4</u> <u>2%: 10,1</u> <u>5%: 12,3</u> <u>10%: 6,4</u> <u>30%: 9,1</u>  <b><u>P in Rind</u></b> <u>1%: 14,3</u> <u>2%: 9,9</u> <u>5%: 24,7</u> <u>10%: 18,9</u> <u>30%: 5,6</u>  <b><u>P in Schwein</u></b> <u>1%: 7,8</u> <u>2%: 17,1</u> <u>5%: 9,7</u> <u>10%: 7,2</u> <u>30%: 4,9</u>	≤ 30%	<input type="checkbox"/> ja <input type="checkbox"/> nein
<b>Richtigkeit</b> (siehe Wiederfindung)			±..%	<input type="checkbox"/> ja <input type="checkbox"/> nein
<b>Spezifität</b>	Siehe jeweilige Singleplex-PCR		keine	<input type="checkbox"/> ja <input type="checkbox"/> nein

<b>Nachweisgrenze</b>	Wurde bereits bei der Validierung des jeweiligen Nachweisverfahrens ermittelt.		≤ 0,1%	<input type="checkbox"/> ja <input type="checkbox"/> nein
<b>Bestimmungsgrenze</b>	Jene niedrigste Konzentration an Analyt, die unter Wiederholbedingungen (10 Wiederholungen) mit einem Mindestmaß an Präzision bestimmt werden kann. -> VK ≤ 25% Unter Idealbedingungen (kühl, fettfrei).	<b><u>P in Huhn:</u></b> 0,6% <b><u>P in Rind:</u></b> 1% <b><u>P in Schwein:</u></b> 0,6%	≤ 1%	<input type="checkbox"/> ja <input type="checkbox"/> nein
<b>Anwendbarkeit</b>	Das Verfahren muss auf alle unerhitzten, wässrigen DNA-Lösungen, die frei von PCR-Inhibitoren sind, anwendbar sein. Verwendung von Modellwürsten und kommerziell erhältlichen Lebensmittelprodukten (Putenextrawurst).	Die Anwendbarkeit ist grundsätzlich gegeben. Um genauere Ergebnisse zu erzielen, müsste ein angepasster Kalibrator verwendet werden.		<input type="checkbox"/> ja <input type="checkbox"/> nein
<b>Robustheit</b>	Um die Robustheit der Methode zu evaluieren, werden die Annealingtemperaturen und die Menge an Reaktionsmix verändert. Außerdem wird der PCR-Lauf bei 60°C zusätzlich an einem anderen Gerät durchgeführt. <u>Thermocycler</u> 59, 60, 61°C 4+16, 4+17, 3+16 <u>Rotorgene</u> 60°C 4+16, 4+17, 3+16	<b><u>P in Huhn:</u></b> Abweichung bei allen Systemänderungen erfüllt.	9 Abweichungen von ≤ 1 Ct-Wert	<input type="checkbox"/> ja <input type="checkbox"/> nein

<b>Messunsicherheit</b>	Aus Präzisionsdaten ermittelt (aufgerundeter maximaler VK).	Der höchstse VK liegt bei 25%. (5% Pute in 95% Rind)	Max. 30%	<input type="checkbox"/> ja <input type="checkbox"/> nein
<sup>1</sup> auszufüllen bei Erstellung des Validierungsplans <sup>2</sup> auszufüllen bei Erstellung der Validierungsbewertung				
<b>Abschlussbewertung</b>	<input type="checkbox"/> Methode ist geeignet <input type="checkbox"/> Methode ist nicht geeignet (siehe Kommentar) <input type="checkbox"/> Methode ist unter folgenden Bedingungen geeignet (siehe Kommentar) <b>Kommentar:</b>			
<b>Erstellung Validierungsplan (durchführende/r Fach-expertIn)</b>		<b>Erstellung Validierungsbewertung (durchführende/r FachexpertIn)</b>		
<b>Freigabe Validierungsplan (OE-Leitung)</b>		<b>Freigabe Validierungsbewertung (OE-Leitung)</b>		
	Name / Datum / Unterschrift (Paraphe)		Name / Datum / Unterschrift (Paraphe)	