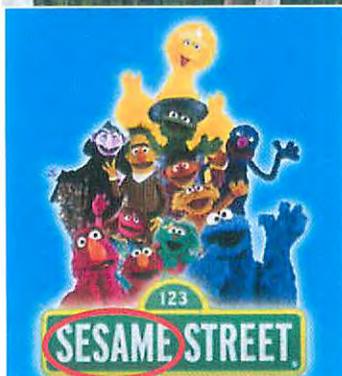
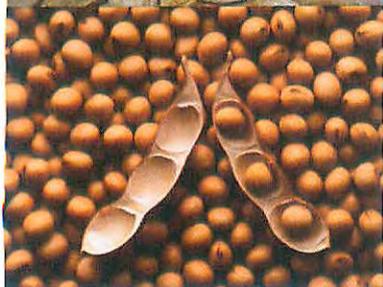
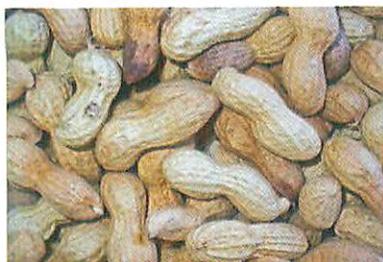




aktuelle Kurzinformationen zu

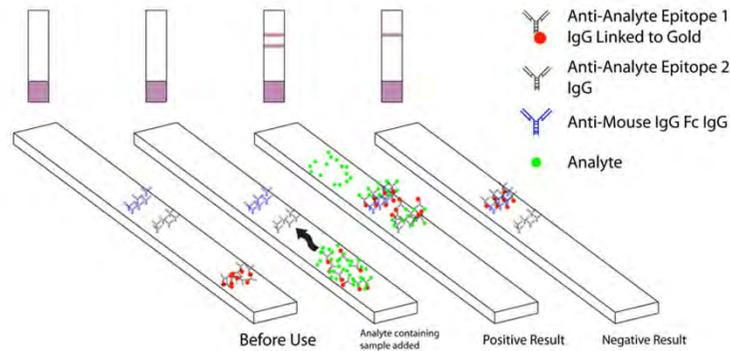
# Allergenen



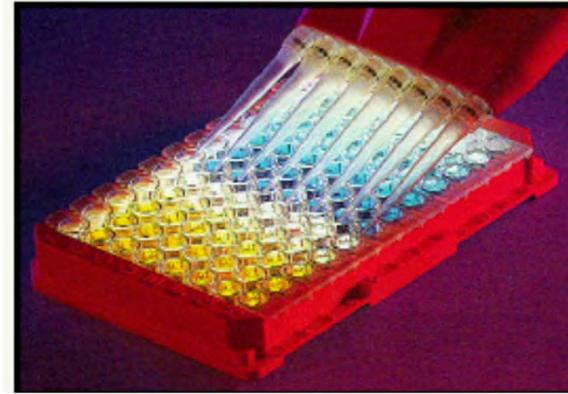
# Nachweisverfahren von Allergenen

## über Protein-Ebene

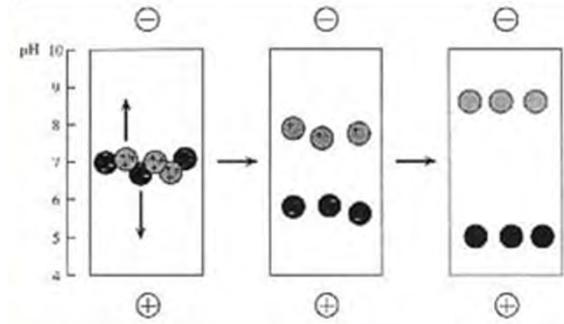
1)



2)

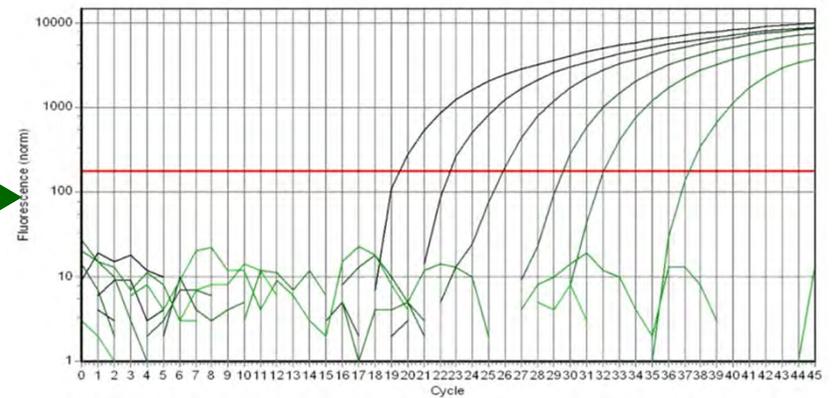
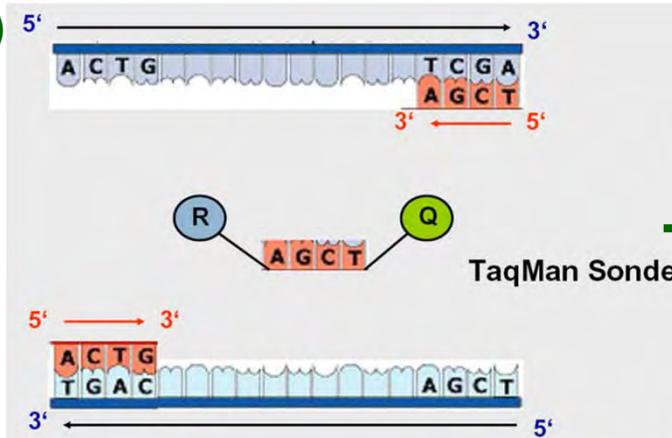


3)



## über DNA-Ebene

4)



# Kennzeichnungspflicht

- ◆ **Schalenfrüchte** (Mandel, Hasel-, Wal-, Cashew, Macadamia-, Pecan-, Queensland-, Paranuss, Pistazie)
- ◆ **Krebstiere**
- ◆ **Eier**
- ◆ **Fisch**
- ◆ **Erdnuss**
- ◆ **Soja**
- ◆ **Milch** (einschließlich Laktose)
- ◆ **Sellerie**
- ◆ **Sesam**
- ◆ **Senf**
- ◆ **Lupine\***
- ◆ **Weichtiere (Mollusken)\***
- ◆ **Glutenhaltiges Getreide** (Weizen, Gerste, Roggen, Hafer, Dinkel, Kamut)
  - ✓ „sehr geringer Glutengehalt“ < 100 mg/kg
  - ✓ „glutenfrei“ < 20 mg/kg
- ◆ **Pseudoallergen Sulfid < 10 mg/kg**



# Problem: Kennzeichnungsgrenzwert für Allergene

- ◆ bisher noch nicht festgelegt!
  
- ◆ **Problematik** - Erfüllung folgender Ziele:
  - ✓ Schutz der Allergiker
  - ✓ Realisierbarkeit von der Analytik
    - ⇒ erreichbare Nachweisgrenzen
    - ⇒ Screening auf nur ein allergenes Protein
    - ⇒ lebensmitteltechnologische Prozesse
    - ⇒ Matrices
  - ✓ Umsetzbarkeit für die Lebensmittelhersteller



# Vorbilder für Kennzeichnungsgrenzwerte

- ◆ „Vorbild“ - Australien & Neuseeland: **VITAL**-Konzept
  - ✓ „**Voluntary Incidental Trace Allergen Labelling**“
  - ✓ Deklaration von unbeabsichtigter Spuren von Allergenen
  - ✓ auf freiwilligen Basis seit 2007
  - ✓ Prozessmonitoring
  - ✓ ohne Sellerie, Lupine, Weichtiere, Senf, SO<sub>2</sub>
  - ✓ Dreistufige Bewertung:
    - ⇒ **Level 1: keine Kennzeichnung**
    - ⇒ **Level 2: „enthält Spuren von ...“ („May be present: ...“)**
    - ⇒ **Level 3: Kennzeichnung in der Zutatenliste („Contains ...“)**
  
- ◆ „Vorbild“ - Schweiz:  
seit 1999 verpflichtender Grenzwert für:  
„kann enthalten“: 1 g/kg (1000 ppm)



# European Voluntary Incidental Trace Allergen Labelling (EU-VITAL)

- ◆ Vereinheitlichung der Deklaration von LB-Allergenen
- ◆ Einführung von Grenzwerten „action level“
- ◆ alle Allergene gemäß der europäischen Richtlinien
- ◆ **EU-VITAL:**  
mg allergene Bestandteile/kg Lebensmittel [ppm]
- ◆ Dreistufige Bewertung:
  - ⇒ Level 1: keine Kennzeichnung
  - ⇒ Level 2: „enthält Spuren von ...“ („May be present: ...“)
  - ⇒ **Level 3: Kennzeichnung in der Zutatenliste**  
(„Contains ...“)



# ACTION LEVEL für Allergene gemäß EU-Richtlinie 2007/68/EG

Allergen	Action Level 1	Action Level 2	Action Level 3
Milch	< 50	50 – 500	> 500
Ei	< 20	20 – 200	> 200
Soja	< 25	25 – 250	> 250
Fisch	< 100	100 – 1.000	> 1.000
Erdnuss	< 8	8 – 80	> 80
Schalenfrüchte	< 10	10 – 100	> 100
Sesam	< 10	10 – 100	> 100
Krustentiere	< 10	10 – 100	> 100
Gluten	< 20	20 – 100	> 100
Sellerie	< 20	20 – 200	> 200
Lupine	< 20	20 – 200	> 200
Mollusken	< 20	20 – 200	> 200
Senf	< 20	20 – 200	> 200
SO <sub>2</sub>	< 10	10 – 100	> 100

Einheit in mg/kg [ppm] des allergenen Bestandteils



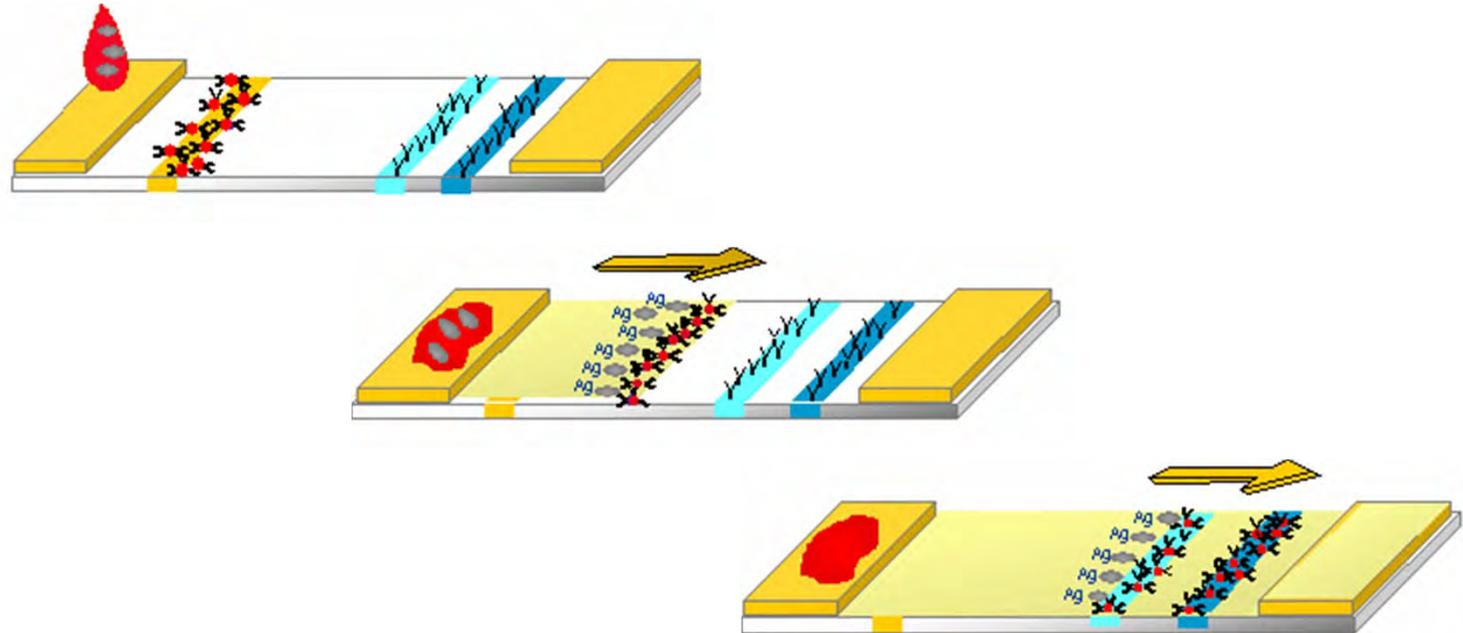
# IKB - Lateral Flow Tests

- ◆ von Rückständen in LB-Produktionsanlagen
- ◆ LOD:
  - ✓ 1 ppm (1 mg/kg): Kokus-, Para-, Macadonianuss, Mandel, Senf, Ei, Sesame, Cashew, Pistazien, Milch, Soja
  - ✓ 5 ppm (5 mg/kg): Hasel- & Erdnuss
  - ✓ 10 ppm (10 mg/kg): Walnuss & Krustentiere
  - ✓ 2,5 ppm (2,5 mg/kg): Gliadin (ca. 5 ppm Gluten)

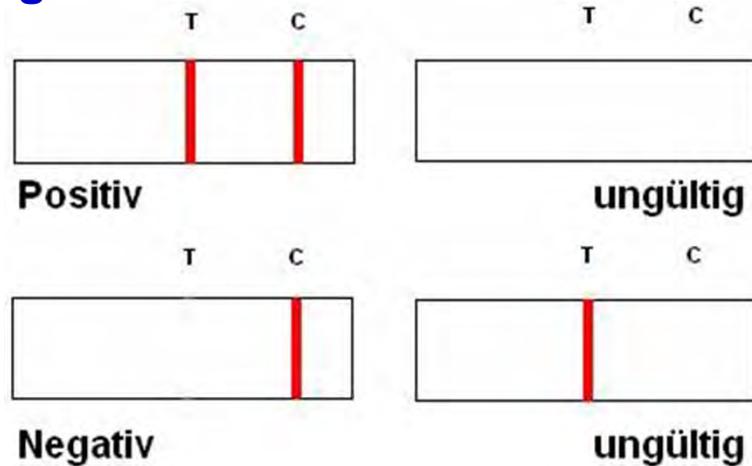


# Lateral Flow Test - qualitativer Nachweis

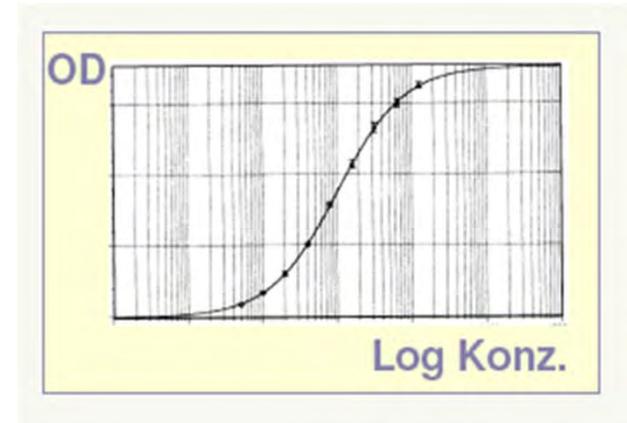
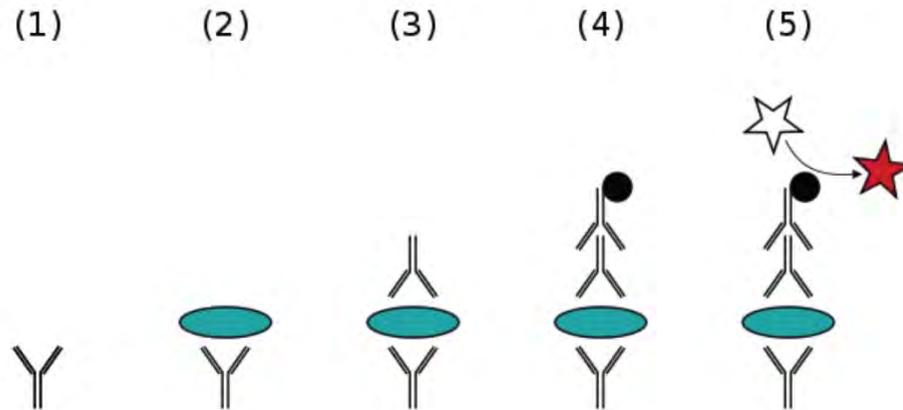
## Ablauf



## Auswertung



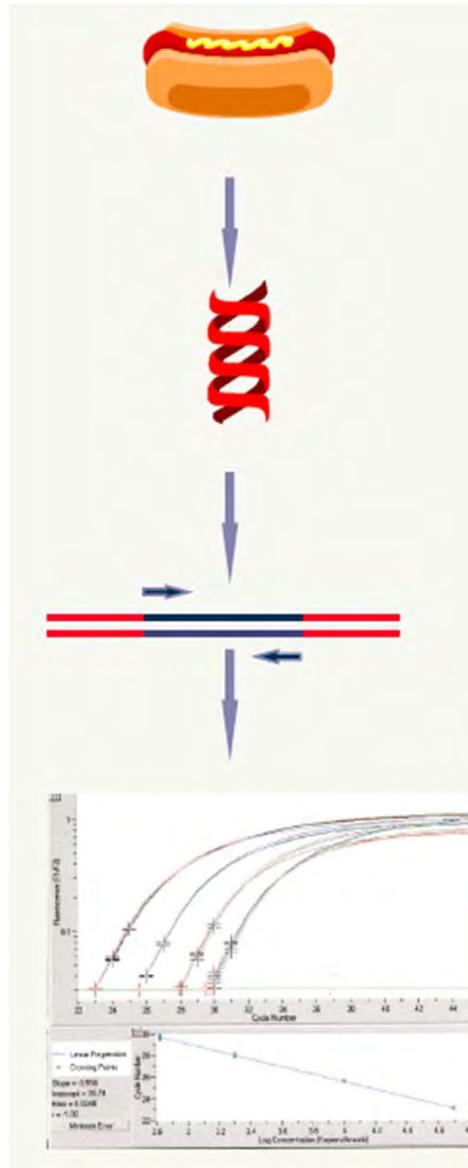
# Immunologischer Nachweis: Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA)



- ◆ Proteinnachweis
- ◆ Sandwich & kompetitiver ELISA
- ◆ quantitativ
- ◆ Nachweisgrenze Matrix-abhängig
- ◆ LOQ : 1 - 10 mg/kg allergenes Lebensmittel (bzw. 0,1 – 1 mg/kg potentiell allergenes Protein)
- ◆ schnell
- ◆ standardisierbar & routinegeeignet

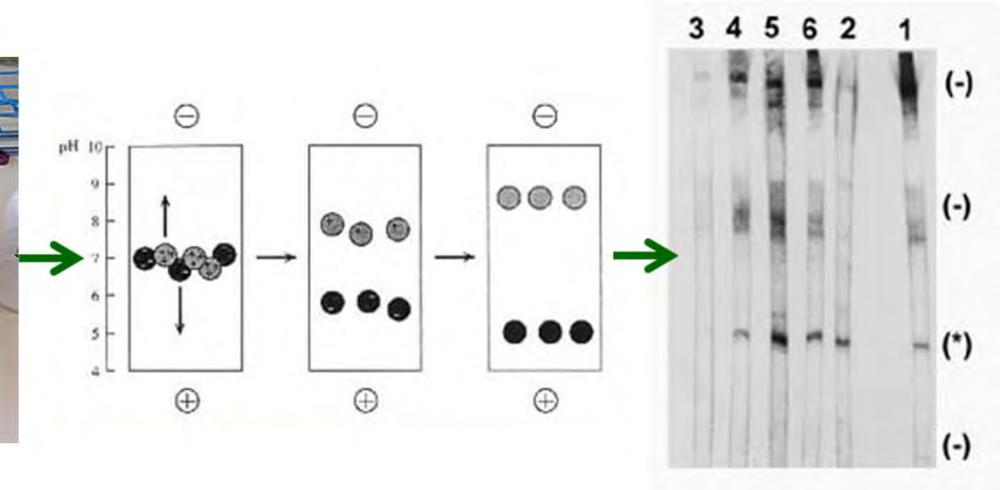
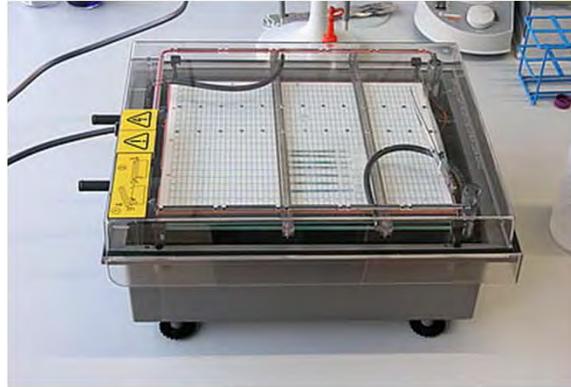


# Allergennachweis mit Real-time PCR



- ◆ Nachweis der Spezies des allergenen Lebensmittels
- ◆ Extraktion der DNA
- ◆ Vervielfältigung eines spezifischen DNA-Abschnittes
  - ✓ Unspezifische Sonden
  - ✓ Spezifische Sonden (TaqMan, ...)
- ◆ Routinegeeignet
- ◆ Zeitraum 3 bis 6 h
- ◆ Nachweisgrenze Matrix-abhängig
- ◆ ca. 10 – 100 mg/kg allergenes Lebensmittel

# Isoelektrische Fokussierung – IFP



- ◆ elektrophoretische Auftrennung von Proteinen
- ◆ Nachweisgrenzen
  - ✓ ca. 0.1% (1000 ppm) Haselnussanteil
  - ✓ ca. 0.06 % (600 ppm) Erdnussprotein
  - ✓ ca. 0.5% (5000 ppm) Aprikosenkernen im Marzipan
  - ✓ ca. 1 % (10.000 ppm) Rind

**IKB**

vorhanden:



Allergenes LB	Lateral Flow Test	ELISA	PCR
Erdnuss	x	x	x
Haselnuss	x	x	x
Mandel	x	x	x
Walnuss	x	x	X
Macadamia	x	-	x
Paranuss / Pistazie / Cashew	x	-	x
Gluten	x	x	-
Milch	x	x	x
Ei	x	x	x
Weizen	-	-	x
Soja	x	x	x
Senf	x	x	x
Krebstiere	x	Spurennachweis	x
Sellerie	-	x	x
Sesam	x	x	x
Lupine	-	-	x

# Screening nach Allergenen mittels Multiplex-Real-time PCR



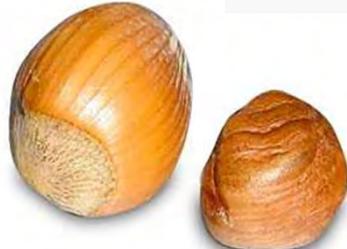
Erdnuss



Ei (Huhn)



Cashew



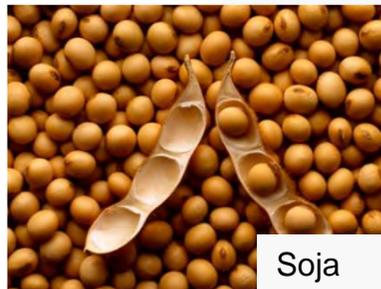
Haselnuss



Mandel



Walnuss



Soja



Milch (Kuh)



Senf



Sellerie



Pistazien

## PCR-Sondensystem : TaqMan Sonde



R = Reporter

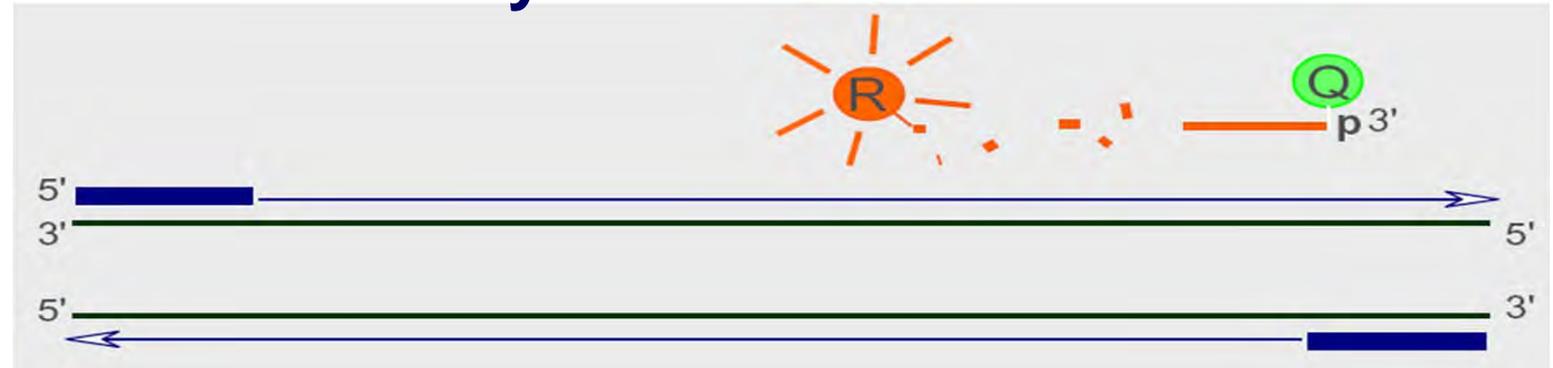
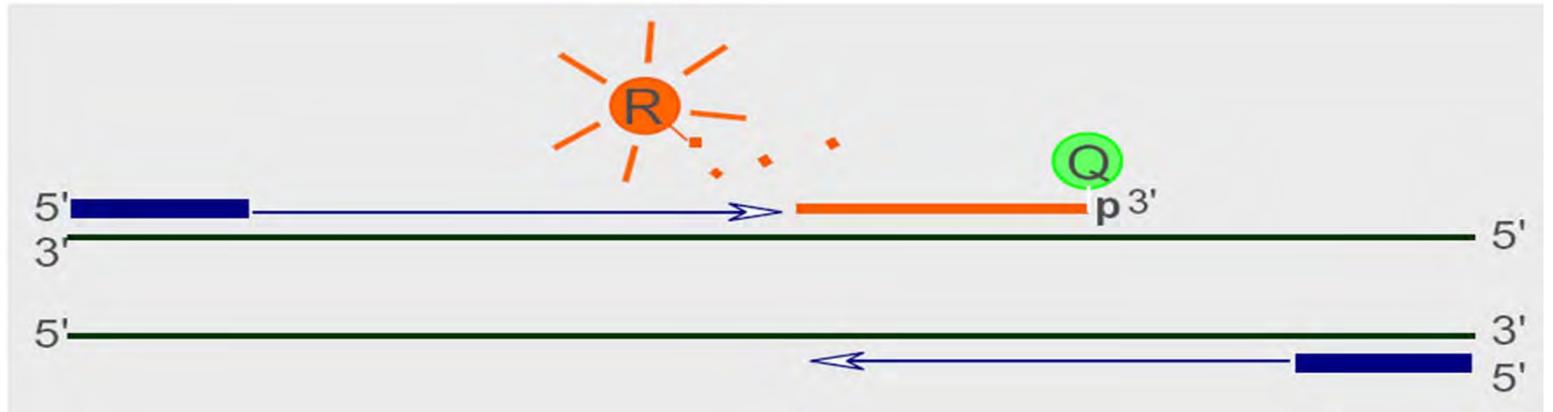
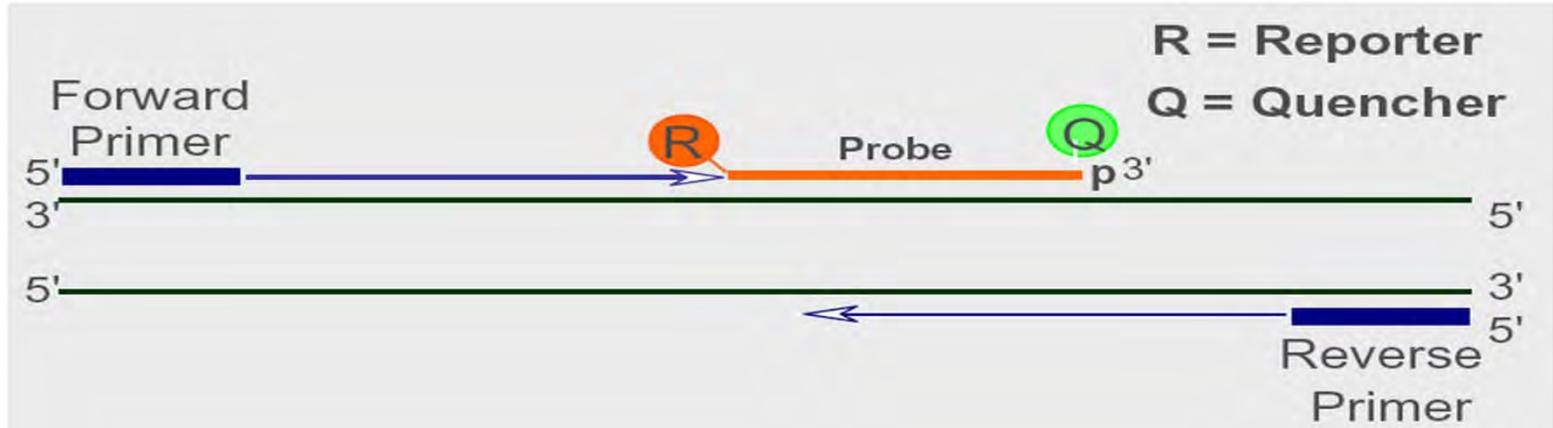
Q = Quencher

Wegen der räumlichen Nähe zum Quencher wird die Fluoreszenz unterdrückt (gequencht).





# 1. Annealingphase





## Vergleich PCR / ELISA

- ◆ unterschiedliche Analyten
- ◆ Abbau von DNA & Protein während Produktion (Hitze, Säure) & Lagerung
- ◆ Komponenten mit verschiedenen DNA-Gehalten
  - ✓ teilweise niedrigere DNA-Ausbeuten (Ei & Milch)
- ◆ ELISA & PCR qualitative Übereinstimmung
- ◆ niedrige Korrelation bei quantitativen Ergebnissen
- ◆ keine signifikanten Unterschiede beim Vergleich Single-PCR & Multiplex-PCR



## Fazit: Multiplex PCRs

- ◆ hervorragende Screening-Methode
- ◆ nur ein PCR-Lauf zum Nachweis von Erdnuss, Soja, Sellerie, Sesam, Milch, Ei, Haselnuss & Mandel
- ◆ System II: Senf, Pistazien, Walnuss & Cashew
- ◆ Empfehlenswert Kombination PCR & ELISA