



BMBF-Projekt AllerGen

Innovative nukleinsäurebasierte Methoden zur Allergenanalytik
im Gewürzbereich



Hochschule
Albstadt-Sigmaringen
Albstadt-Sigmaringen University



Chemisches und Veterinäruntersuchungsamt Sigmaringen

Hochschule Ostwestfalen-Lippe
University of Applied Sciences

Forschungsprojekt AllerGen

- Potentiell hohe Gefahr von Kreuzkontaminationen in der Gewürzverarbeitung
 - Viele Einzelsubstanzen und Gemische
 - Verwendung fast aller kennzeichnungspflichtigen Allergene
 - Herstellung in den gleichen Anlagen
 - Staubentwicklung



Foto: HS Ostwestfalen-Lippe



Foto: HS Ostwestfalen-Lippe

Forschungsprojekt AllerGen

- Forschungsprojekt AllerGen (seit Sept. 2008)
 - HS Albstadt-Sigmaringen, HS Ostwestfalen-Lippe, CVUA Sigmaringen, S.A.M., Rubinmühle, Schumann & Sohn, Metro Group, CONGEN
 - Projekttitle: Innovative Ansätze zur Analytik und Vermeidung allergener Kreuzkontaminationen in der Gewürzverarbeitung

Sellerie Senf
? ?
Soja ?
Kreuzkontamination?



Foto: Marion Kenk und Silvia Panter, HS Albstadt-Sigmaringen

Stand der Analytik im Gewürzbereich 2008

- Vergleichsmaterial für vergleichende Untersuchungen im Gewürzbereich fehlt
- Wenig Erkenntnisse über die Eignung der Nachweisverfahren (PCR/ELISA) in der Lebensmittelmatrix Gewürz
- Quantitative Nachweisverfahren fehlen
- Analyse authentischer Gewürzproben zur Abschätzung der Kreuzkontaminationsproblematik fehlt



Projekt AllerGen greift die Defizite auf

BMBF-Projekt AllerGen cont.

A.
Entwicklung eines Risikomanagement-Konzeptes für Allergene

Partner:
Gewürzhersteller Verbände



Foto: HS Ostwestfalen-Lippe

B.
Gewürzspezifische Überprüfung und Bewertung verfügbarer Allergenanalytik

Partner:
Untersuchungsamt Analytikanbieter

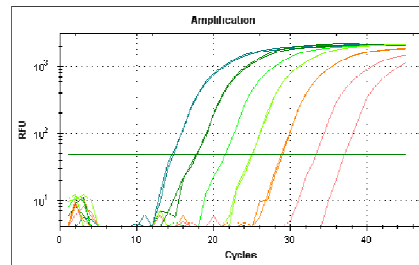


Abbildung: HS Albstadt-Sigmaringen

C.
Methodenentwicklung sensitiver Real-Time PCR mit neuartigen DNA-Targets

Partner:
PCR-Entwickler

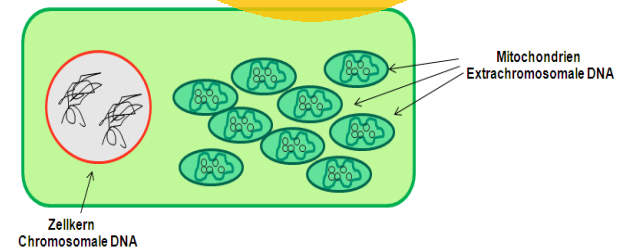
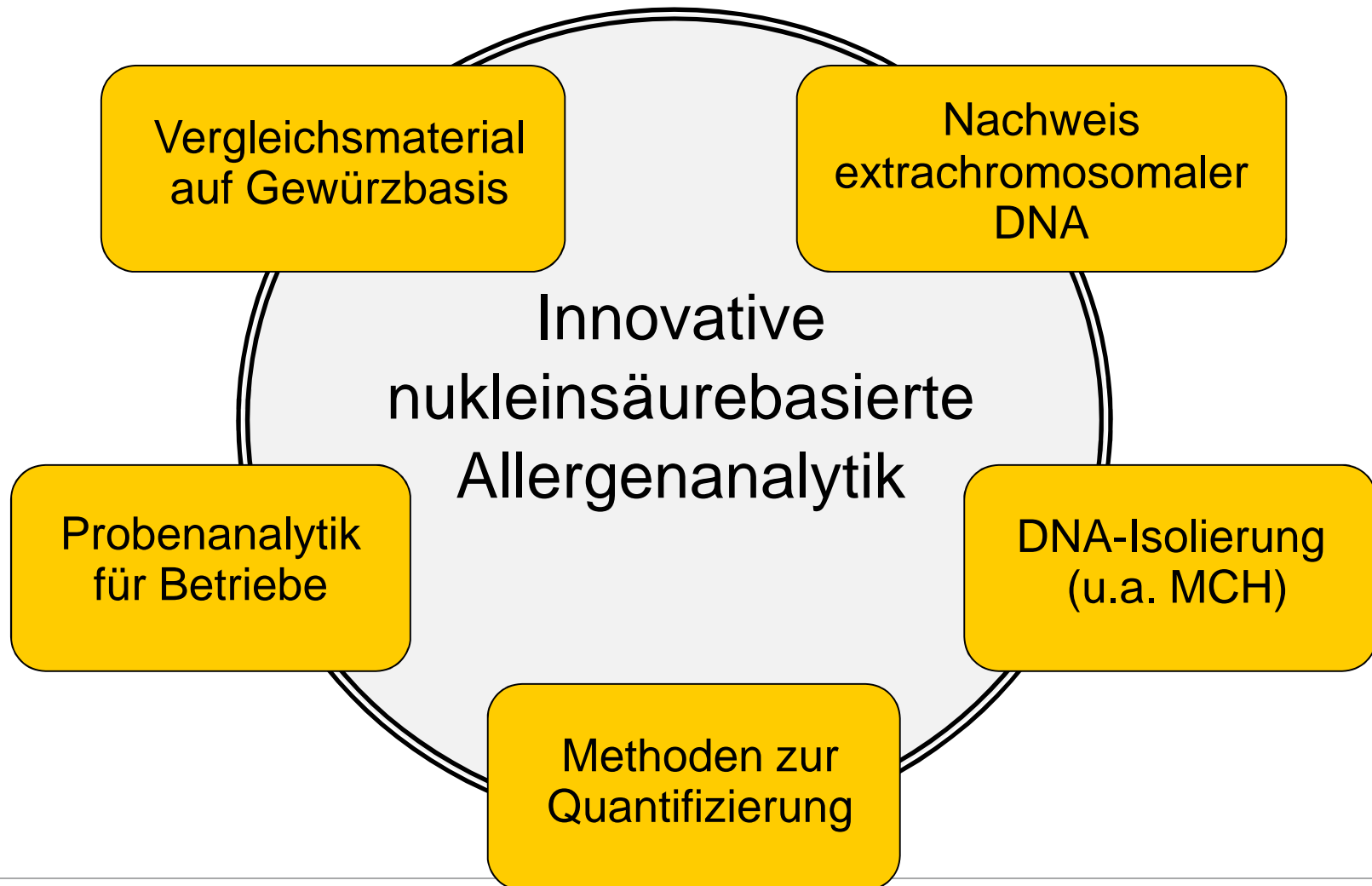




Abbildung: HS Albstadt-Sigmaringen

Teilprojekt Sigmaringen



Vergleichsmaterial auf Gewürzbasis

Allergenanalytik aktuell

- Viele verschiedene Methoden (Isolierung der DNA/Real-time PCR, Isolierung der Proteine/ELISA, usw.)
 - Verschiedene kommerzielle Kits und Anbieter
 - Labore wenden unterschiedlichste Methoden an bei der Analytik von Allergenen in Lebensmitteln
-  Vergleichbarkeit von Analyseergebnissen bei Anwendung unterschiedlicher Analysemethoden?
-  Eignung der angewandten Analysemethoden für die zu untersuchende Lebensmittelmatrix?

Vergleichsmaterial für die Allergenanalytik

- Vergleichsmaterial notwendig für
 - Überprüfung und Bewertung von Methoden (Real-time PCR/ DNA-Isolierung, ELISA, usw.)
 - Methodenvergleich/-eignung bei unterschiedlichen Lebensmittelmatrices
 - Standardisierung der Allergenanalytik
- Prinzip: Allergenfreie Lebensmittelmatrix mit definierten Konzentrationen an Allergenen dotieren (z.B. 10, 20, 50 mg/kg)
- Aktuell 3 Forschungsprojekte die Vergleichsmaterial herstellen (z.B. Gewürze, Backwaren, Brühwurst, Schokolade, Eiscreme)

Herausforderung



Homogene Verteilung der allergenen Rohstoffe im Modellgewürz

Nachweis geringster Mengen Allergen

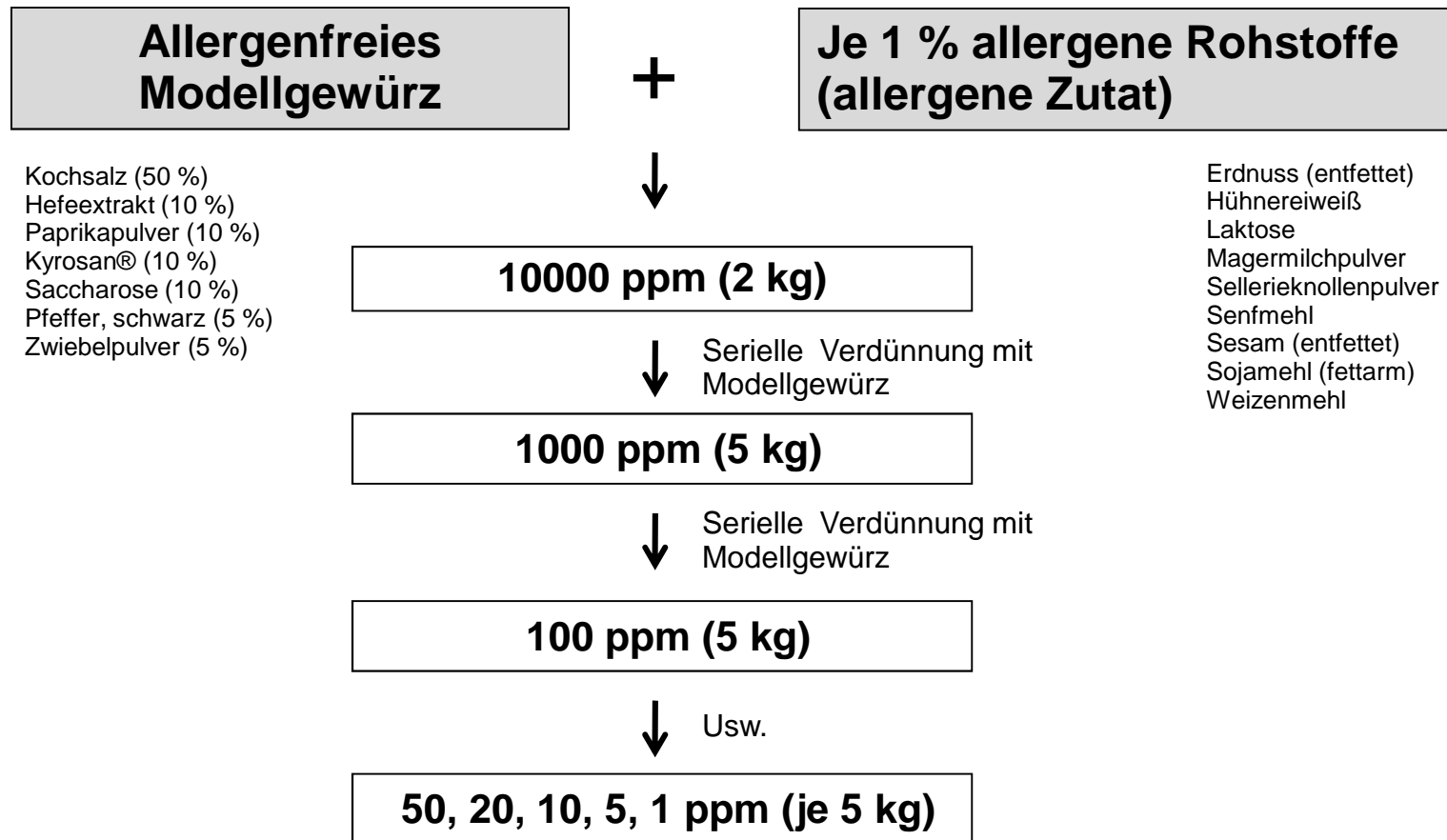
$1 \text{ mg/kg} = 1 \text{ ppm} = 0,0001 \%$

250 mg Probeneinwaage für DNA-Isolierung

1/10 DNA-Extrakt für Real-time PCR

Foto: Marion Kenk und Silvia Panter, HS Albstadt-Sigmaringen

Herstellung Vergleichsmaterial - Plan



Herstellung Vergleichsmaterial - Mischen

- Methodenentwicklung notwendig zur Herstellung einer homogenen Mischung
- Erfolg abhängig von
 - physikalischen Eigenschaften der zu mischenden Stoffe (z.B. Partikelgröße und -form, Agglomerationsneigung, Dichteunterschiede, Fließeigenschaften, Konsistenz/Fettgehalt)
 - Mischprinzip und der Wirksamkeit der verwendeten Maschine



Doppelkonusmischer



Rhönradmischer

Überprüfung Vergleichsmaterial

- Überprüfung der Homogenität des Materials
- Analyse jeder Konzentrationsstufe (Thompson et al. 2006)
 - Aufteilung des Probenmaterials in 10 Portionen
 - Aus jeder Portion werden je zwei Proben aufgearbeitet
 - Einzelbestimmung der isolierten Proben in PCR/ELISA für ausgewählte Allergene
 - Statistische Bewertung der Homogenität

Pure Appl. Chem., Vol. 78, No. 1, pp. 145–196, 2006.
doi:10.1351/pac200678010145
© 2006 IUPAC

INTERNATIONAL UNION OF PURE AND APPLIED CHEMISTRY

ANALYTICAL CHEMISTRY DIVISION*

INTERDIVISIONAL WORKING PARTY FOR HARMONIZATION OF
QUALITY ASSURANCE SCHEMES

**THE INTERNATIONAL HARMONIZED PROTOCOL
FOR THE PROFICIENCY TESTING OF ANALYTICAL
CHEMISTRY LABORATORIES**

(IUPAC Technical Report)

Prepared for publication by
MICHAEL THOMPSON¹, STEPHEN L. R. ELLISON^{2,*}, AND ROGER WOOD³

Herstellung Modellgewürz

- Herstellung eines allergenfreien Modellgewürzes in einem gewürzverarbeitenden Betrieb
- Analytik: Modellgewürz wies eine Kreuzkontamination mit Senf auf und konnte nicht verwendet werden
- ↪ Relevanz und Notwendigkeit des Forschungsprojekts ersichtlich
- Herstellung eines zweiten Modellgewürzes (HS OWL)
- ↪ Analytik: Zweites Modellgewürz wird verwendet für die Herstellung des Vergleichsmaterials

Vorversuch (Labormaßstab)

- Allergenfreies Modellgewürz dotiert mit den Allergenen Sojamehl, Sellerieknollenpulver und Senfmehl



Foto: HS Albstadt-Sigmaringen


200 50 20 10 5 1 ppm

- Überprüfung von zwei DNA-Isolierungsmethoden und unterschiedlichen Real-time PCR-Verfahren

Vorversuch (Labormaßstab)

- Vergleich zweier Isolierungsmethoden (A/B) mit anschließender Sellerie Real-time PCR

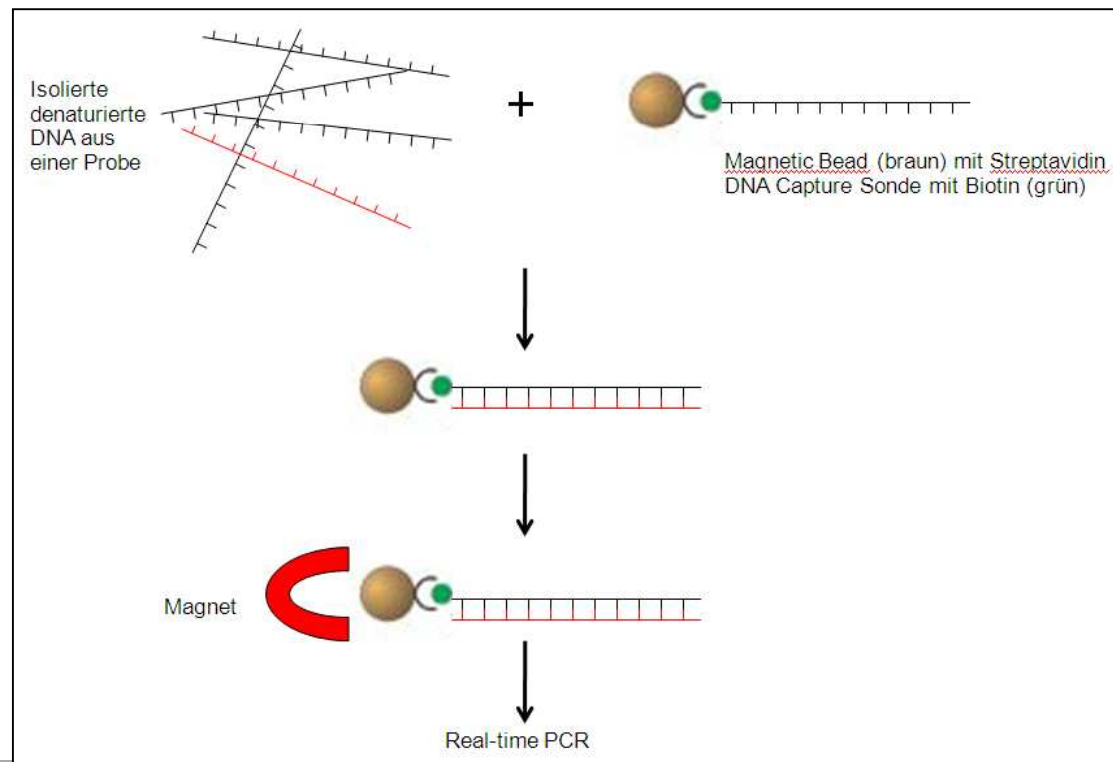
Proben	Isolierung A	CT-Wert (Isol. A)	Isolierung B	CT-Wert (Isol. B)
Blank	0/3		0/3	
1 ppm	0/3		1/3	34,4
5 ppm	0/3		2/3	34,3/34,8
10 ppm	0/3		3/3	32,1/32,0/32,5
20 ppm	0/3		3/3	33,2/31,9/32,7
50 ppm	2/3	35,4/34,0	3/3	31,8/31,5/30,2
200 ppm	3/3	33,7/33,3/33,6	3/3	29,4/29,6/29,1
Extraktionsk.	0/1		0/1	

- DNA-Isolierungsmethode entscheidend für sensitive Analytik im Modellgewürz (mit Isol. B 20-fach sensitiver)
- 
 Vergleichsmaterial unabdingbar für die Überprüfung der Eignung von Methoden

Magnetic Capture Hybridisierung

Magnetic Capture Hybridisierung (MCH)

- MCH: Sequenzspezifische Isolierung des Zielanalyten mittels Magnetpartikeln und Fängersonden



Theorie Magnetic Capture Hybridisierung

- Isolierung der gesamten spezifischen Ziel-DNA
- Theoretisch: Eliminierung von möglichen PCR-Inhibitoren, Hintergrund-DNA und Begleitstoffen (Fett, Proteine, Polysaccharide, etc.)



Hochreine DNA für sensitive Analytik

- MCH bisher noch nicht in der Allergenanalytik für Lebensmittel eingesetzt

Magnetic Capture Hybridisierung

- MCH-System für Haselnuss etabliert

1000 ppm Haselnuss in Lebensmittelmatrix (1 x isoliert, 4-fach gemessen)			
Isolierungsart	Positive Real-time PCR Ergebnisse	CT-Werte	Mittelwert der CT- Werte
CTAB-Isolierung mit QIAquick-Aufreinigung	4/4	22,68/23,51	23,09
		23,59/22,60	
CTAB-Isolierung mit anschließender MCH	4/4	23,76/23,88	23,92
		24,34/23,71	

- Sequenzspezifische Isolierung funktioniert prinzipiell
- MCH vergleichbar mit klassischer Isolierungsmethode
- Weitere Optimierung des Systems (Salzkonzentration, Inkubationszeit, usw.)

DNA-Isolierung

- DNA-Isolierung enorm wichtig für die anschließende Analytik mittels Real-time PCR
- Ein Schwerpunkt des 3. Projektjahres liegt in der weiteren Optimierung von DNA-Isolierungsverfahren
- Methodenentwicklung/ -optimierung der DNA-Isolierung
 - Sensitive Allergenanalytik
 - Großes Spektrum an Lebensmittelmatriices abdecken
- Eignung der Verfahren für verschiedenste Produktgruppen anhand von Vergleichsmaterialien überprüfen

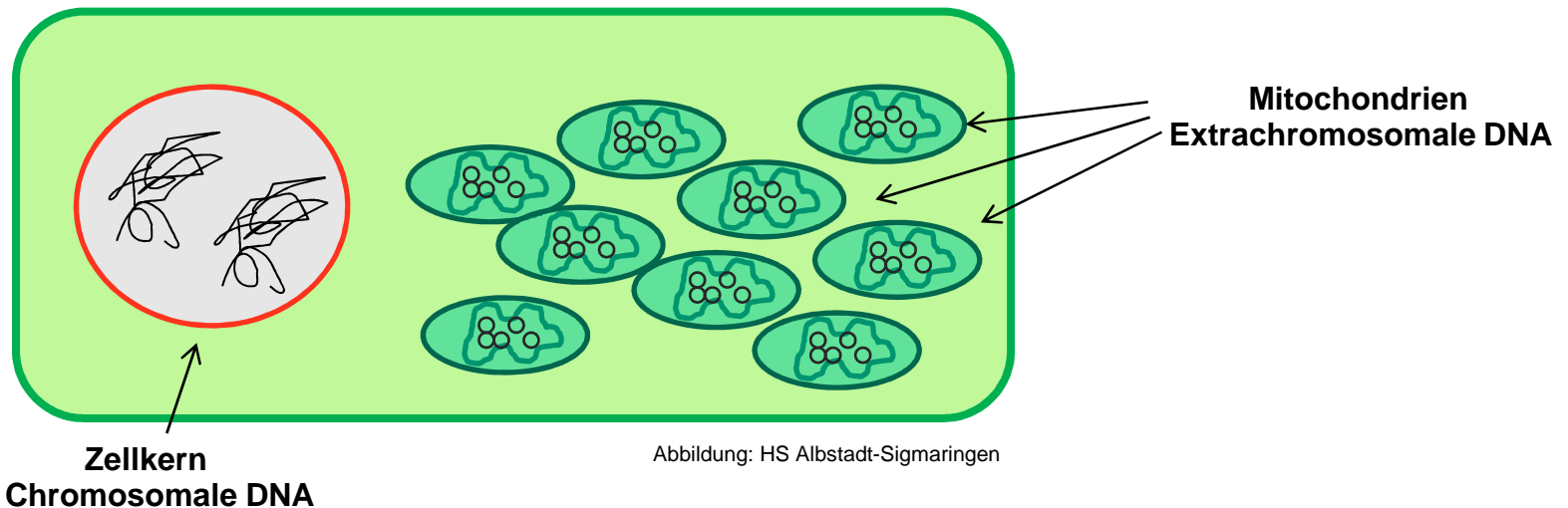
Nachweis von Soja anhand mitochondrialer DNA

Mitochondrialer Sojanachweis

- Mitochondriale DNA liegt in Zellen in höherer Kopienzahl vor als genomische DNA



Theoretisch sollte sich eine Steigerung der Sensitivität ergeben



- Etablierung eines sondenbasierten Real-time PCR Systems zum Nachweis von Soja anhand mitochondrialer DNA

Mitochondrialer Sojanachweis

Eingesetzte Soja-DNA-Menge	Mittelwert der CT-Werte und Stabw	Abweichung der CT-Werte in 3 PCR's
Mitochondriales Nachweissystem		
25000 pg	17,91±0,34	0,15
2500 pg	21,17±0,11	0,13
250 pg	24,56±0,34	0,09
25 pg	27,85±0,37	0,13
2,5 pg	31,32±0,43	0,38
0,25 pg	34,62±0,47	0,55
Nukleäres Nachweissystem		
25000 pg	25,69±0,42	0,58
2500 pg	28,69±0,29	0,11
250 pg	32,11±0,12	0,11
25 pg	35,50±0,45	0,63

ca. 100-fach



- Serielle Verdünnung von Gesamt-Soja-DNA
- Doppelbestimmung in 3 unabhängigen Real-time PCR Läufen (n= 6)
- Aufgeführt sind die Konzentrationen bei denen alle Reaktionen positiv waren

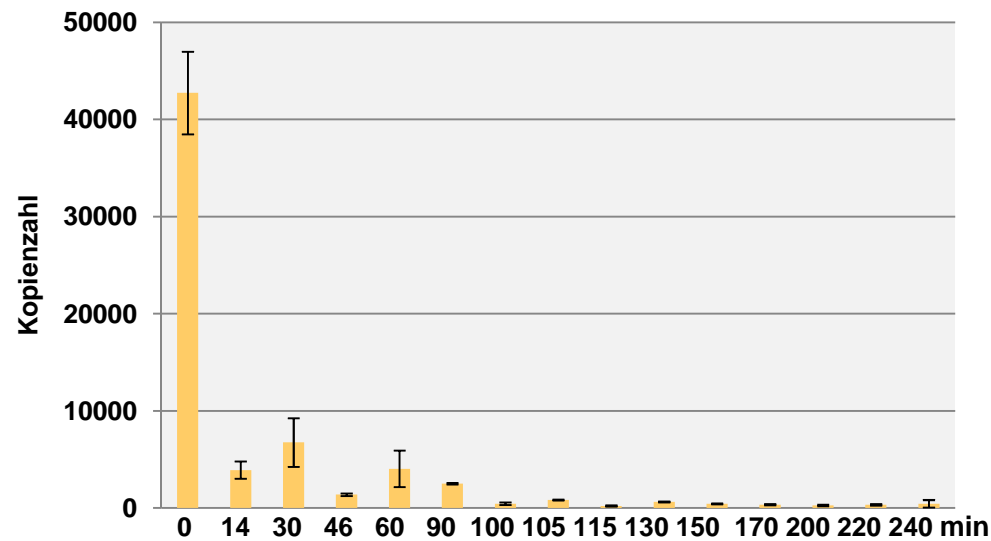
Steigerung der Sensitivität konnte bestätigt werden

Mitochondrialer Sojanachweis

- Sensitivitätssteigerung um das ca. 100-fache im Vergleich zu einem kommerziellen Sojanachweis-system erreicht
 - Spurenbereich kann zuverlässig erfasst werden
 - Höhere Messgenauigkeit im Spurenbereich
 - Sehr gut einsetzbar zum Nachweis von Kreuzkontaminationen
- Nachweissystem ermöglicht z.B. in Betrieben Kreuz-kontaminationen nachzuweisen und entsprechende Maßnahmen einzuleiten
- Betriebsversuch: Ist das durchgeführte Reinigungs-protokoll ausreichend bei einem Produktwechsel?

Praxisanwendung

- Produkt mit 1/3 Sojaanteil läuft über eine Anlage
- Reinigung: 240 min konstanter Spülvorgang mit sojafreiem Produkt
- Fragestellung: Ist der Reinigungsschritt ausreichend?

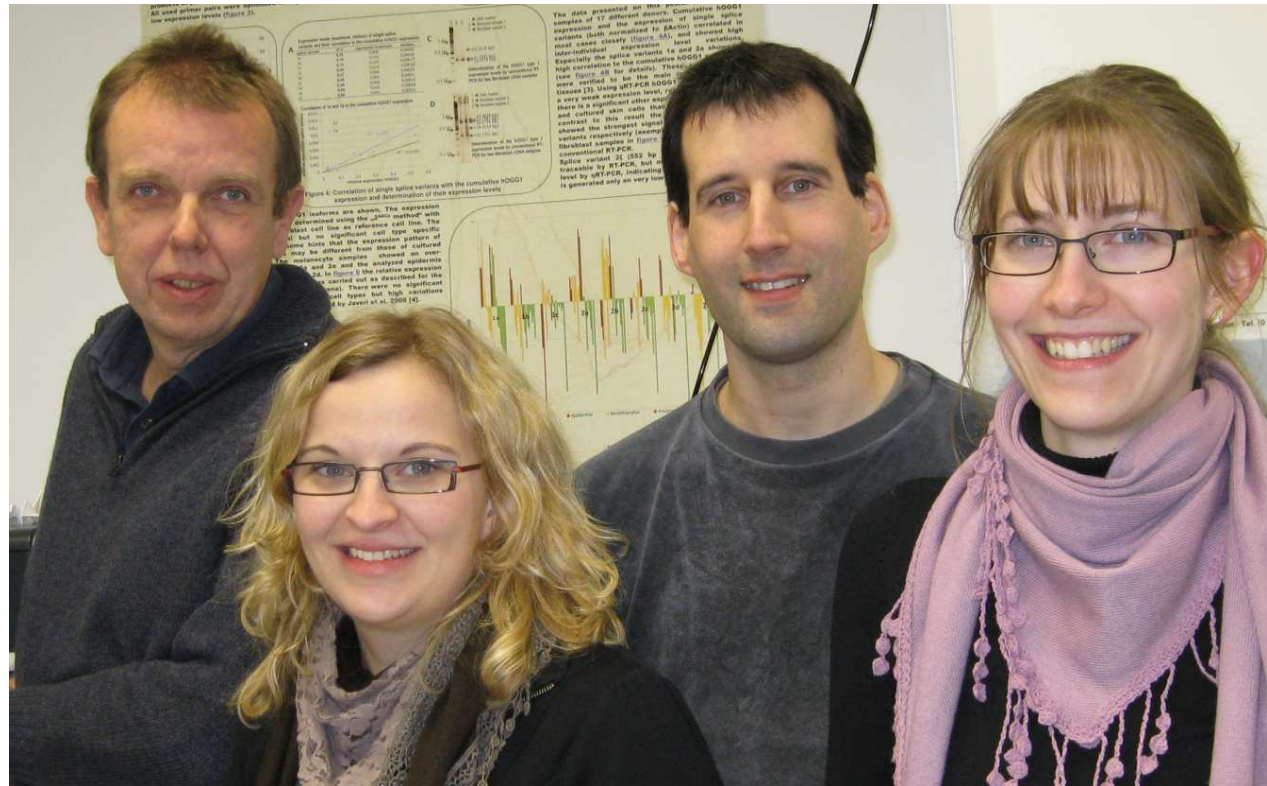


Nach ca. 90 min reguliert sich das Sojasignal auf ein Hintergrundrauschen

Ausblick

- Optimierung der DNA-Isolierung
- Quantifizierungsstrategien
- Probenanalytik für Betriebe zur Aufdeckung von Kreuzkontaminationen

Team AllerGen Sigmaringen



Prof. Dr. Jörg Bergemann M. Sc. Silvia Panter B. Sc. Tobias Bauer B. Sc. Marion Kenk

Es fehlen: Dr. Sven Hellwig (HS Sig), Oberchemierätin Elisabeth Burgmaier-Thielert (CVUA Sig) und Dr. Gabriele Engler-Blum (CVUA Sig)

Vielen Dank für Ihre Aufmerksamkeit!



Hochschule Ostwestfalen-Lippe
University of Applied Sciences



Chemisches und Veterinäruntersuchungsamt Sigmaringen

