

# „Neue PCR Arrays zum Screening der Allergie- auslösenden Lebensmittel aus Fisch, Krustazeen, Weichtieren“

## Projekt AQUALLERG-ID

23.11.2023, Berlin

**Vincent Blaschke**

Nationales Referenzlabor für Tierisches Protein in Futtermitteln

Abteilung Lebensmittelsicherheit (Fachgruppe 51)

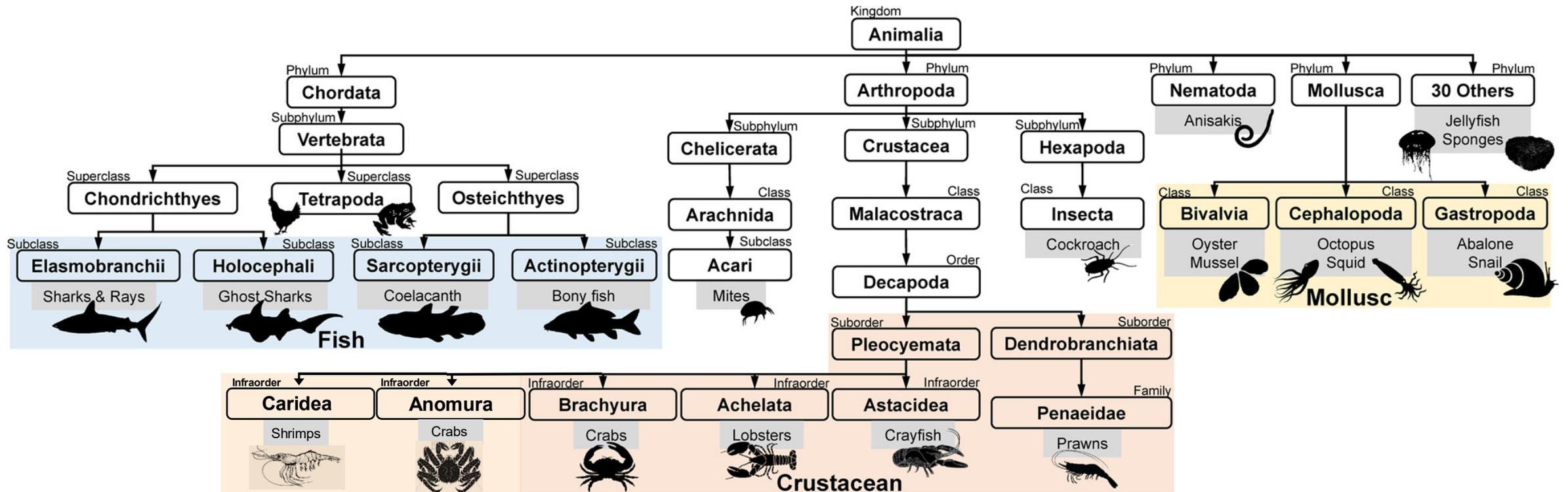
# Projekt AQUALLERG-ID – Überblick der Ziele

## Ziele:

Schließung derzeitiger Lücken in der Analyse artenreichen Allergengruppen

- Entwicklung neuer routinemäßiger und standardisierbarer Methoden für die Lebensmittelüberwachung
- Etablierung kommerzialisierbaren und anwenderfreundlichen Assays
- Bereitstellung innovativer und zukunftsorientierter Dienstleistungsanalysen für Allergene

# Etablierung neuer real-time PCR Systeme (Fische, Krustazeeen, Mollusken)



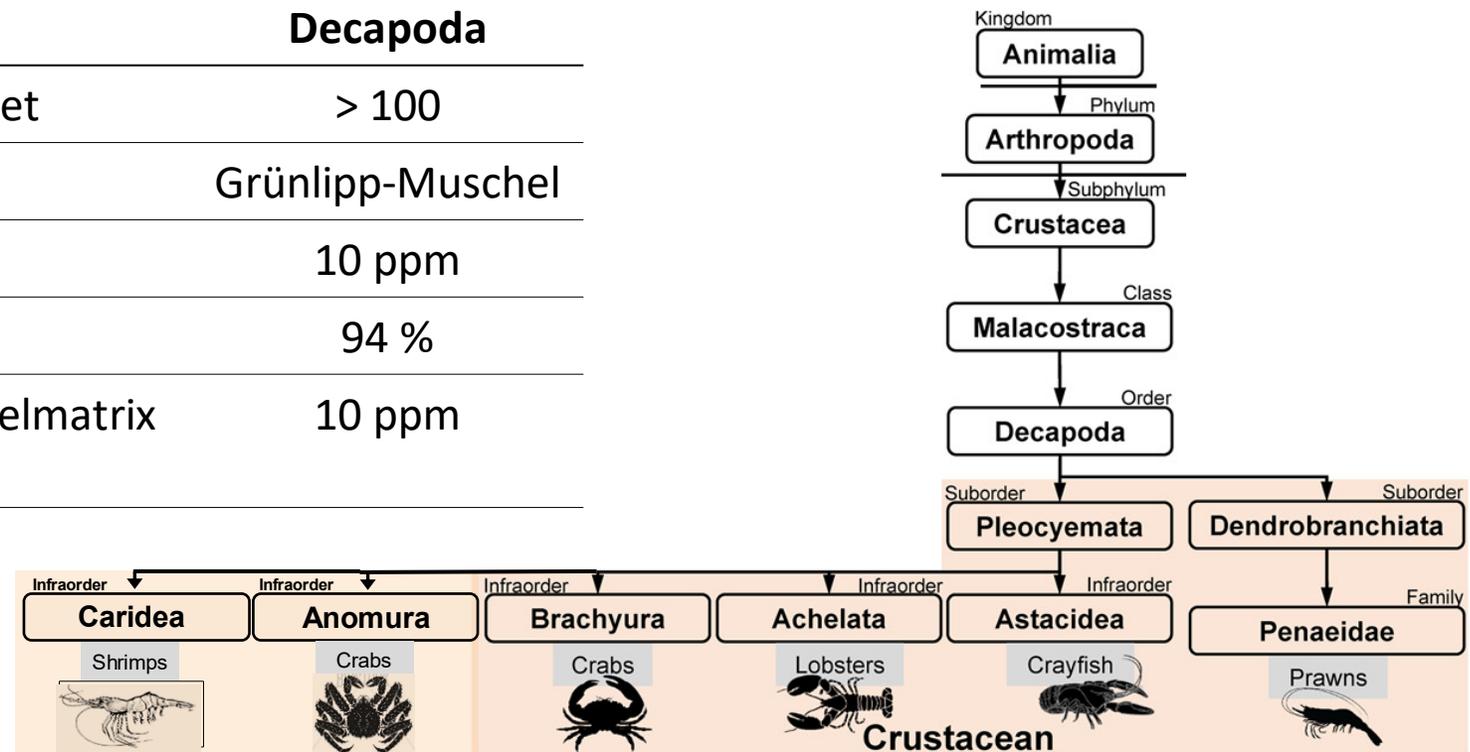
Reference: Modified after Ruethers et al., 2018

# Etablierung neuer real-time PCR Systeme (Fische, Krustazeeen, Mollusken)

## Welche Systeme wurden entwickelt?

Duplex-System	Decapoda
Spezies / Produkte getestet	> 100
Kreuzreaktionen	Grünlipp-Muschel
LOD <sub>12</sub>	10 ppm
Effizienz	94 %
Sensitivität in Lebensmittelmatrix	10 ppm

- 96% aller kommerziell relevanten Krustazeeen gehören zu den Decapoda

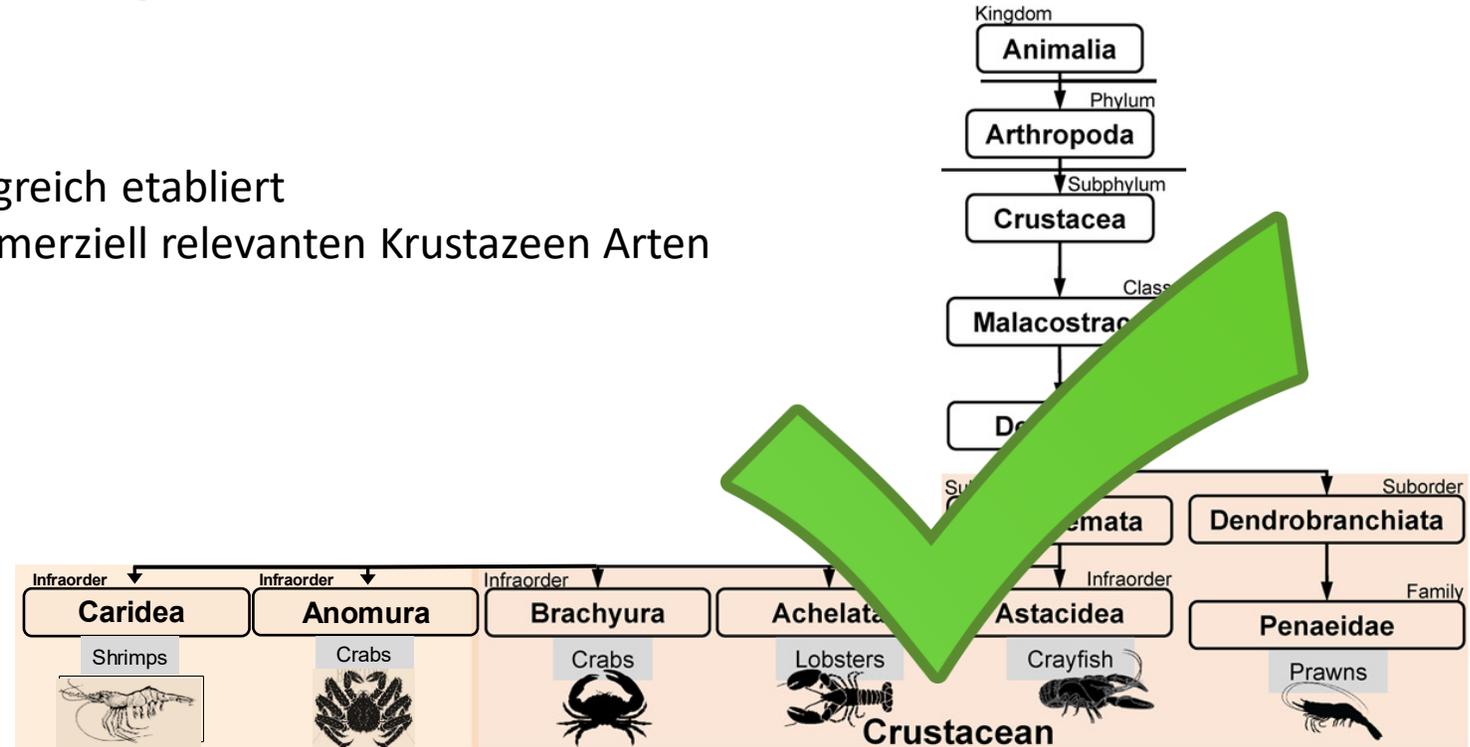


Reference: Modified after Ruethers et al., 2018

# Etablierung neuer real-time PCR Systeme (Fische, Krustazeeen, Mollusken)

## Welche Systeme wurden entwickelt?

- Krustazeeen System erfolgreich etabliert
  - Detektiert alle kommerziell relevanten Krustazeeen Arten

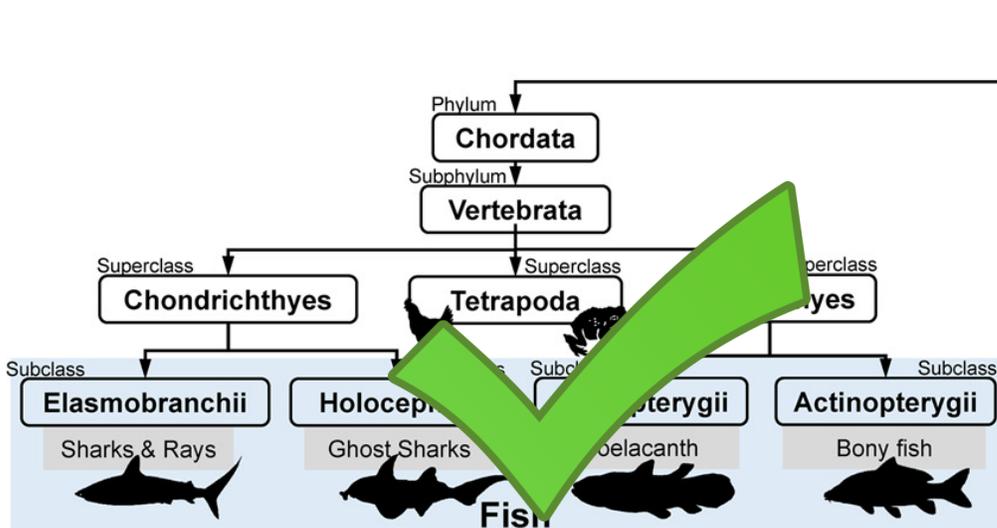


- System ist publiziert:
  - A novel duplex real-time PCR method for the detection of commercially relevant crustaceans in food

Reference: Modified after Ruethers et al., 2018

# Etablierung neuer real-time PCR Systeme (Fische, Krustazeeen, Mollusken)

## Welche Systeme wurden entwickelt?

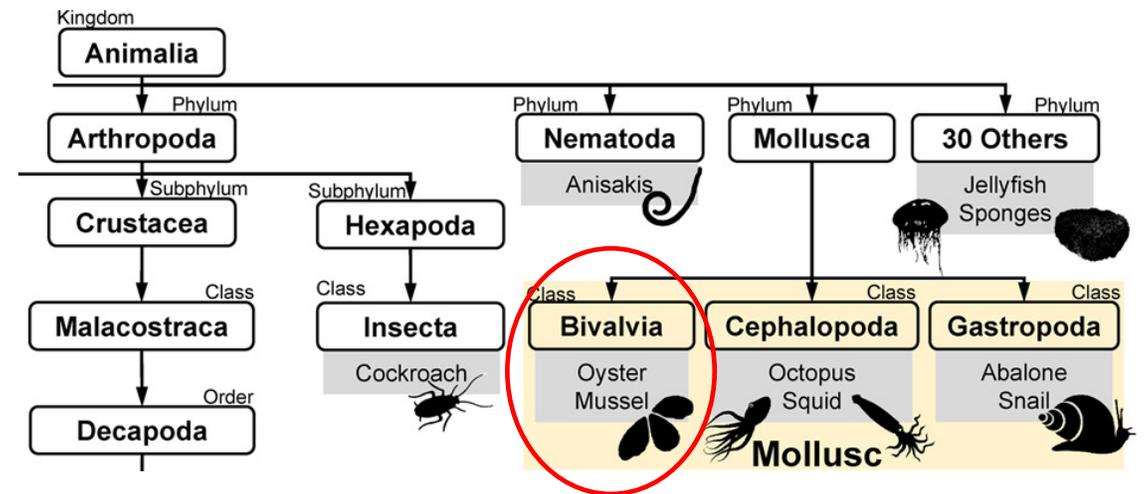


Reference: Modifiziert nach  
Ruethers et al., 2018

- System von Tetzlaff and Mäde, 2017
  - Detektiert alle Fischarten
    - Keine Detektion von Haien, Rochen und Stören
- Vermutlich die nächste Standardmethode für Fisch-Allergen Detektion

# Etablierung neuer real-time PCR Systeme (Fische, Krustazeeen, Mollusken)

## Welche Systeme wurden entwickelt?



Reference: Modified after Ruethers et al., 2018

# Kommerziell wichtige Bivalvia Ordnungen

Venerida (Venusmuscheln)



Ostreida (Austern)



Pectinida (Jakobsmuscheln)



Mytilida (Miesmuscheln)



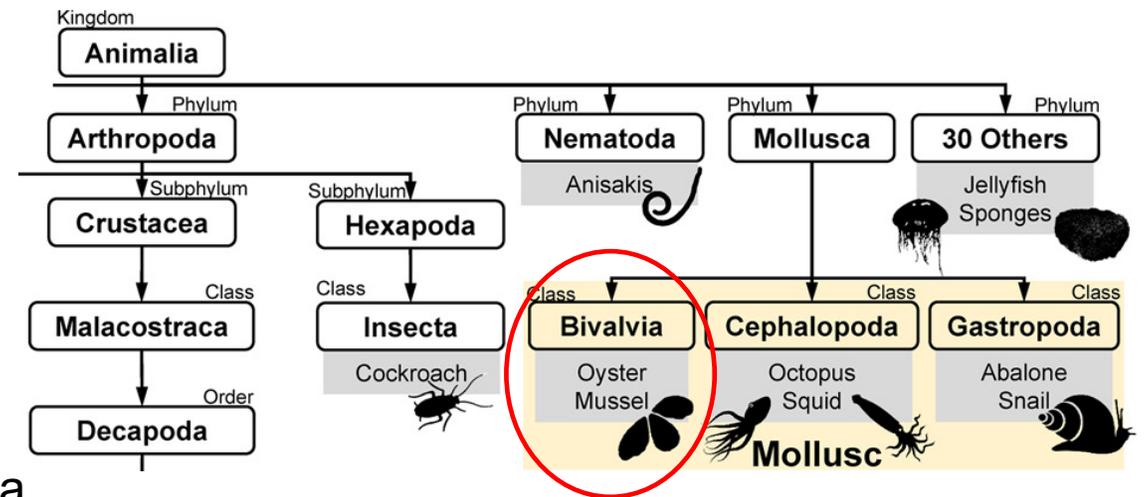
Cardiida (Herzmuscheln)



# Etablierung neuer real-time PCR Systeme (Fische, Krustazeeen, Mollusken)

## Welche Systeme wurden entwickelt?

- Bivalvia:
  - Schwierigkeiten bei der Entwicklung von Systemen für Bivalvia
  - Hohes Zeit-Investment
- Nur zwei Systeme konnten etabliert werden
  - Für die Ordnungen der Pectinida und Mytilida
- Wichtige Ordnungen der Venerida, Ostreida und Cardiida fehlen



Reference: Modified after Ruethers et al., 2018

# Kommerziell wichtige Bivalvia Ordnungen

Venerida (venus clams)



Ostreida (oysters)



Pectinida (scallops)



Mytilida (mussels)



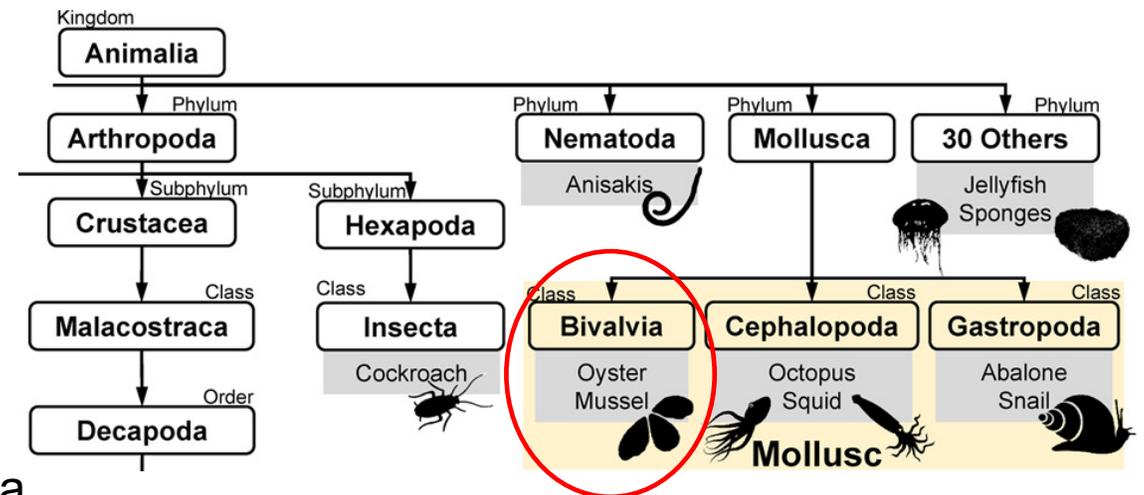
Cardiida (cockle shells)



# Etablierung neuer real-time PCR Systeme (Fische, Krustazeeen, Mollusken)

## Welche Systeme wurden entwickelt?

- Bivalvia:
  - Schwierigkeiten bei der Entwicklung von Systemen für Bivalvia
  - Hohes Zeit-Investment
- Nur zwei Systeme konnten etabliert werden
  - Für die Ordnungen der Pectinida und Mytilida
- Wichtige Ordnungen der Venerida, Ostreida und Cardiida fehlen
- Große genetische Unterschied innerhalb der Familien (Venerida)

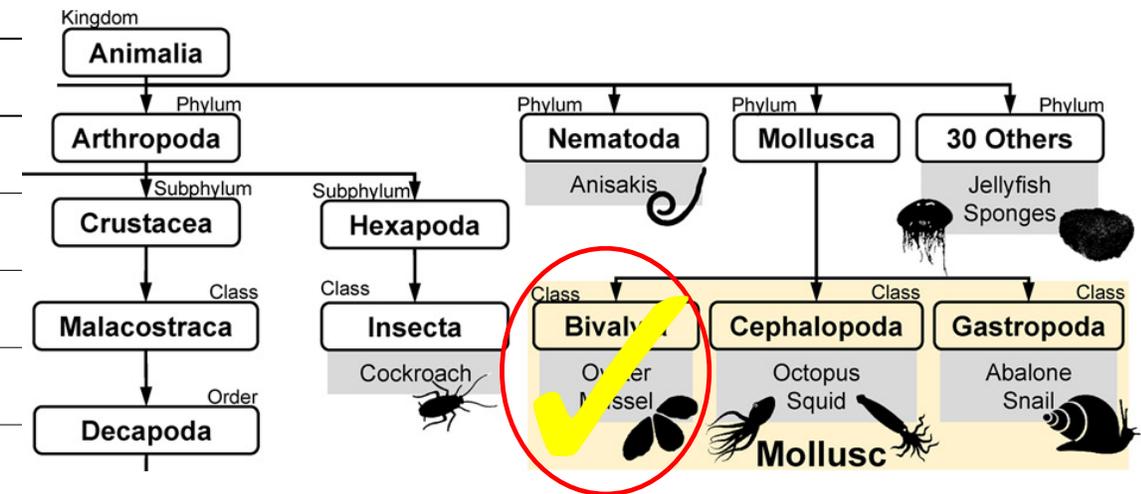


Reference: Modified after Ruethers et al., 2018

# Etablierung neuer real-time PCR Systeme (Fische, Krustazeeen, Mollusken)

## Welche Systeme wurden entwickelt?

Duplex-System	Pectinida	Mytilida
Spezies / Produkte getestet		> 60
Kreuzreaktionen	Keine	Tiefseescallop
LOD <sub>12</sub>	1 ppm	10 pm
Effizienz	95 – 98 %	93 - 101 %
Sensitivität in Lebensmittelmatrix		10 ppm



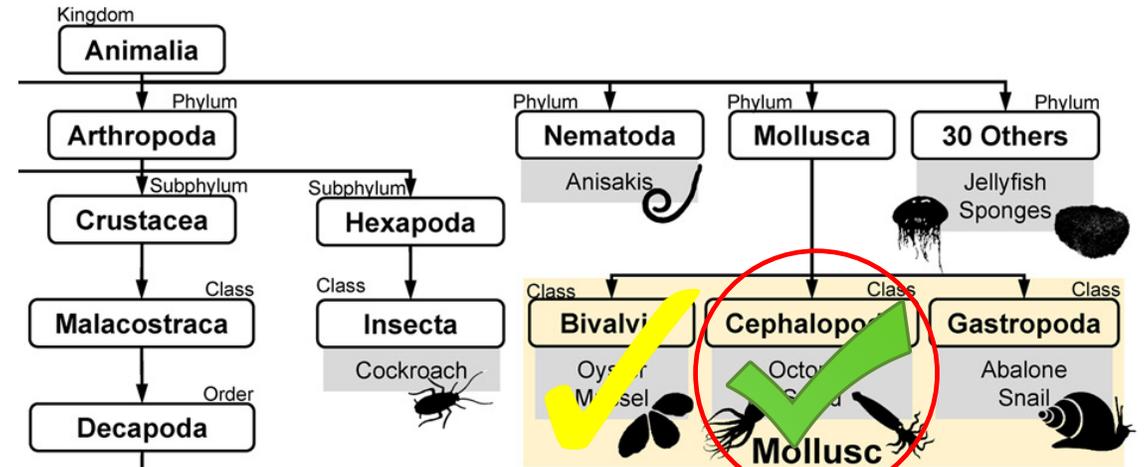
Reference: Modified after Ruethers et al., 2018

- Beide Bivalvia Systeme werden zusammen publiziert
- Letzte Publikation aus diesem Projekt

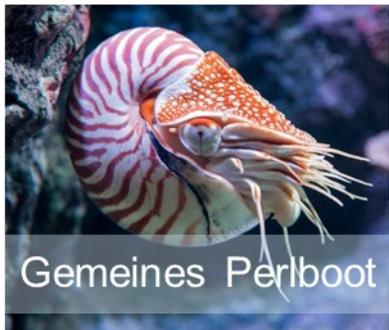
# Etablierung neuer real-time PCR Systeme (Fische, Krustazeeen, Mollusken)

## Welche Systeme wurden entwickelt?

- Cephalopoda:
  - System für alle kommerziell relevanten Arten konnte validiert und etabliert

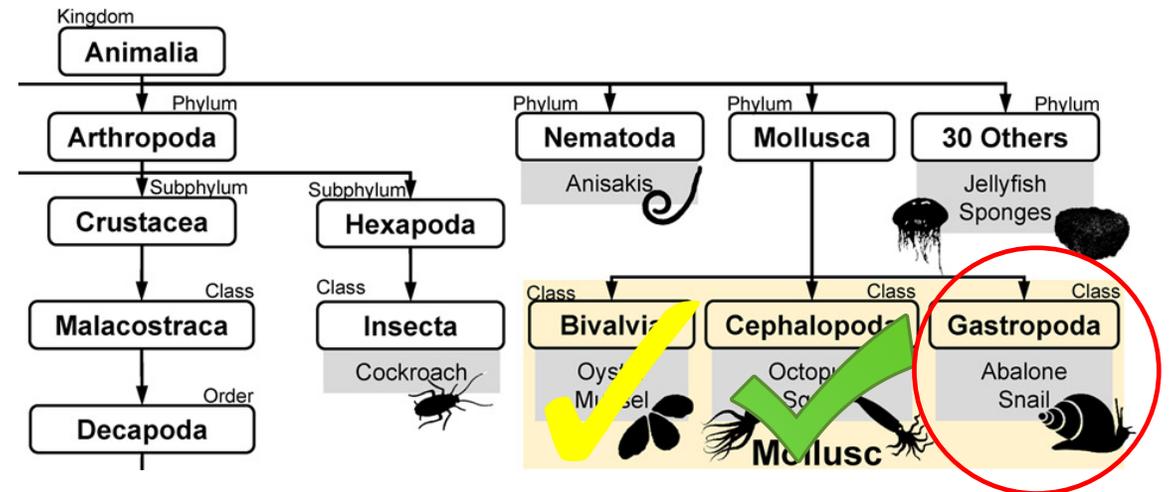


Reference: Modified after Ruethers et al., 2018



# Etablierung neuer real-time PCR Systeme (Fische, Krustazeeen, Mollusken)

## Welche Systeme wurden entwickelt?



Reference: Modified after  
Ruethers et al., 2018

# Kommerziell wichtige Gastropoda - Familien

Helicidae (Weinbergschnecken)



Haliotidae (Seeohren)



Littorinidae (Strandschnecken)



Buccinidae (Hornschncken)



Muricidae (Stachelschnecken)



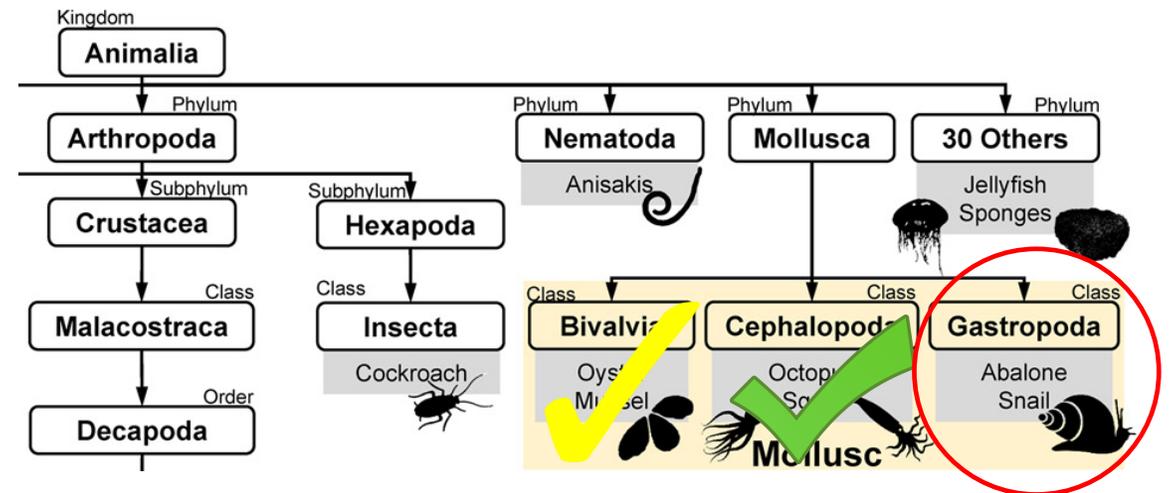
Achatinidae (Achatschnecken)



# Etablierung neuer real-time PCR Systeme (Fische, Krustazeeen, Mollusken)

## Welche Systeme wurden entwickelt?

- Gastropoda:
  - System für Buccinidae, Muricidae und Helicidae validiert und etabliert



Reference: Modified after Ruethers et al., 2018

# Kommerziell wichtige Gastropoda - Familien

Helicidae (Weinbergsschnecken)



Buccinidae (Hornschnecken)



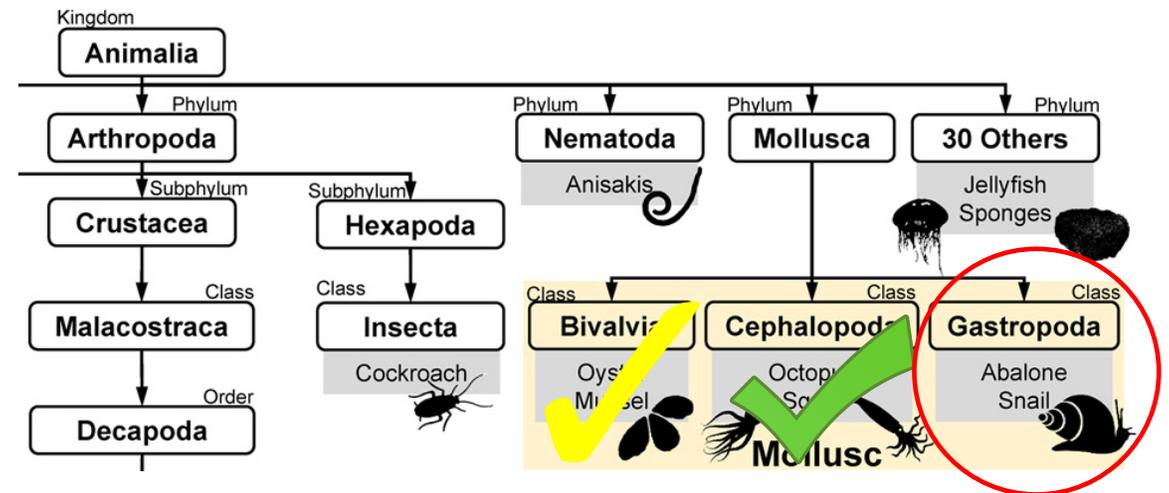
Muricidae (Stachelschnecken)



# Etablierung neuer real-time PCR Systeme (Fische, Krustazeeen, Mollusken)

## Welche Systeme wurden entwickelt?

- Gastropoda:
  - System für Buccinidae, Muricidae und Helicidae validiert und etabliert
- Wichtige Arten fehlen
  - Seeohren, Strand- und Achatschnecken



Reference: Modified after  
Ruethers et al., 2018

# Kommerziell wichtige Gastropoda - Familien

Haliotidae (Seeohren)



Littorinidae (Strandschnecken)



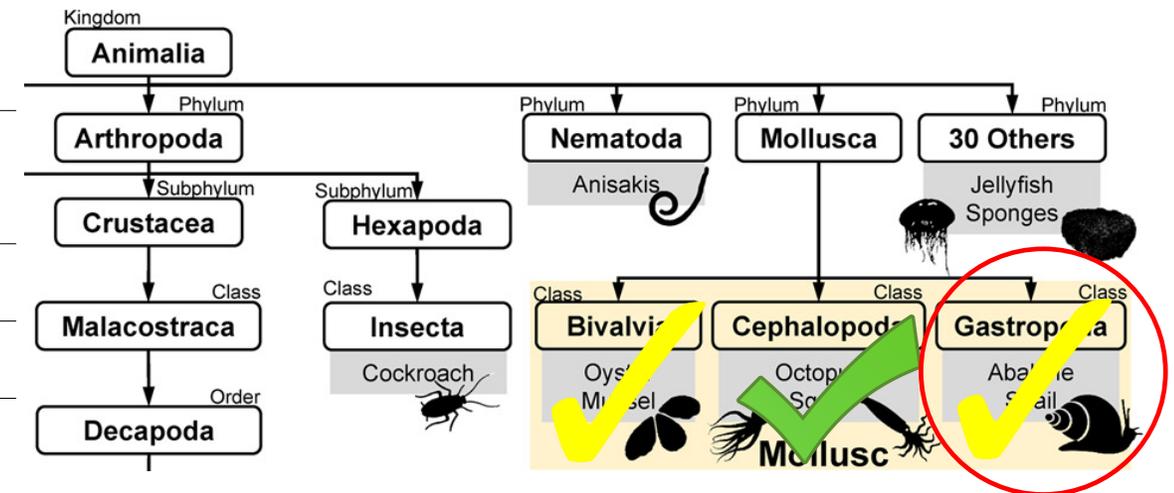
Achatinidae (Achatschencken)



# Etablierung neuer real-time PCR Systeme (Fische, Krustazeeen, Mollusken)

## Welche Systeme wurden entwickelt?

System	Cephalopoda	Gastropoda
Spezies/ Produkte getestet		> 100
Kreuzreaktionen	Japanische Kammuschel	Große Achatschnecke
LOD <sub>12</sub>		10 ppm
Effizienz	≈ 93 %	≈ 95 %
Sensitivität in Lebensmittelmatrix		10 ppm

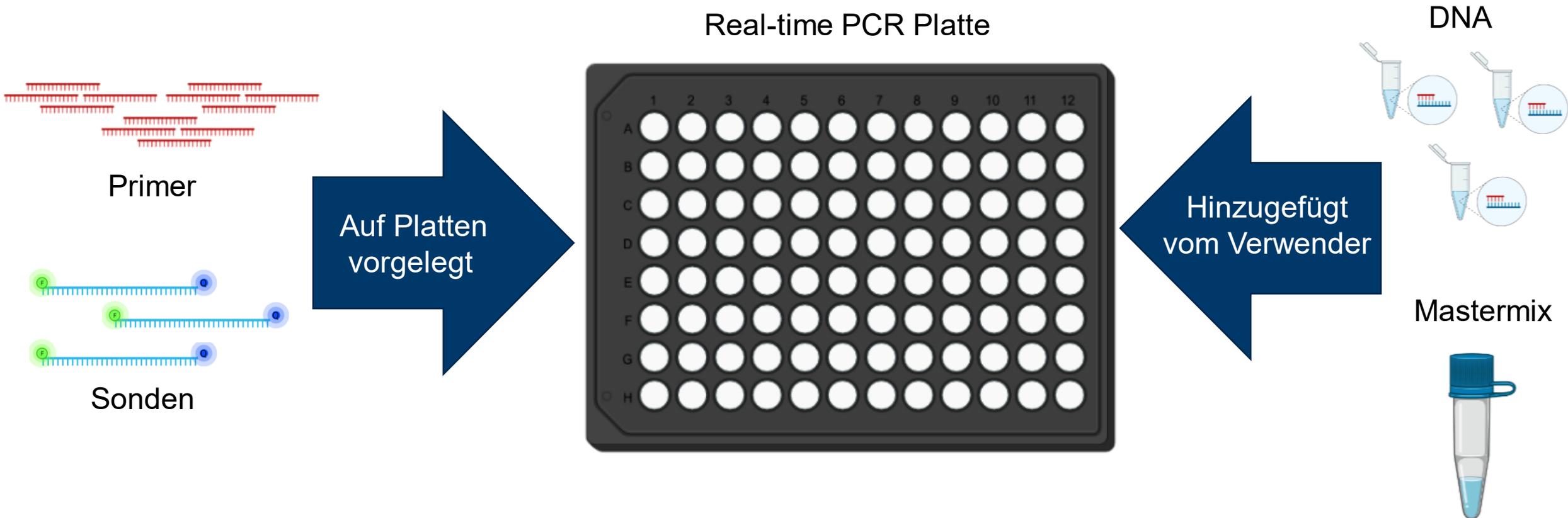


Reference: Modified after Ruethers et al., 2018

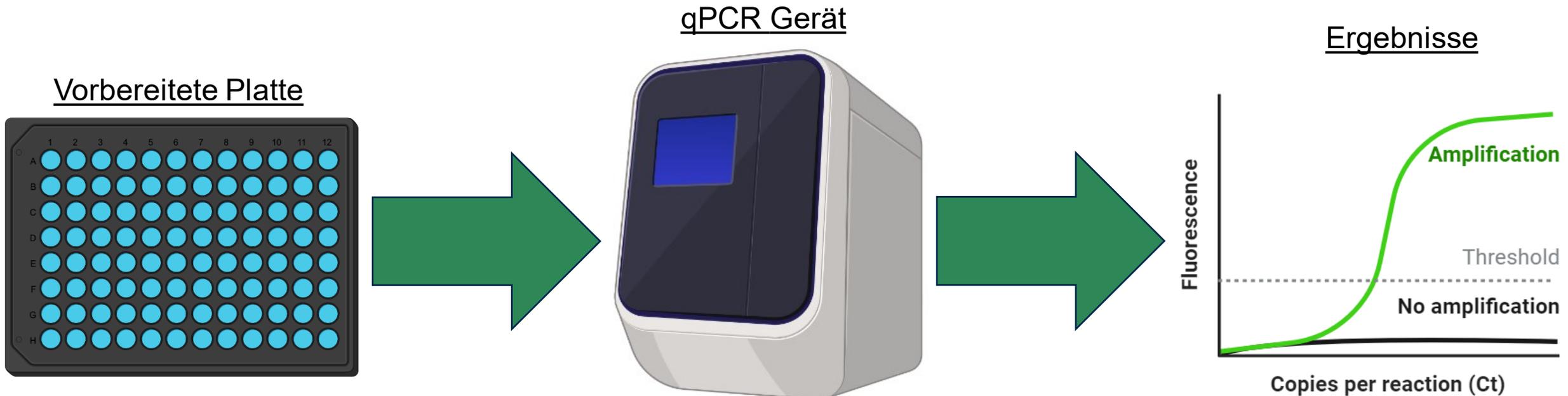
- Cephalopoda and Gastropoda Systeme wurden zusammen publiziert
- Filling Analytical Gaps in Allergen Detection – Real-Time PCR for the Detection of Commercially Relevant Cephalopods and Gastropods in Food

# Entwicklung einer Ready-to-use PCR Platte zur gleichzeitigen Detektion allergener aquatischer Organismen

## Überblick und Workflow



# Entwicklung einer Ready-to-use PCR Platte zur gleichzeitigen Detektion allergener aquatischer Organismen



## • Vorteile:

- Geringer Materialverbrauch
- Keine Lagerung einzelner Primer/ Sonden

- Einfache und schnelle Ergebnisse
- High-Throughput

# Entwicklung einer Ready-to-use PCR Platte zur gleichzeitigen Detektion allergener aquatischer Organismen

	Sample 1		Sample 2		Sample 3		Sample 4		Sample 5		Sample 6	
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	Decapoda	Pectinida										
B	Decapoda	Pectinida										
C	Cephalopoda	Mytilida										
D	Cephalopoda	Mytilida										
E	Teleostei	Gastropoda										
F	Teleostei	Gastropoda										
G	ntc	ntc										
H	pc 1	pc 1	pc 2	pc 2	pc 3	pc 3	pc 4	pc 4	pc 5	pc 5	pc 6	pc 6

	Decapoda
	Cephalopoda
	Teleostei
	Pectinida
	Mytilida
	Gastropoda
ntc	Non template control
pc	Positive control



- 6 different systems
- 6 different samples



- 6 samples with 6 different systems

# Entwicklung einer Ready-to-use PCR Platte zur gleichzeitigen Detektion allergener aquatischer Organismen

## Platten Layout - Entwicklung

- Zwei Platten Layouts wurden entwickelt
  - 1. Aquatische Organismen:
    - Systeme: Krustazeen, Cephalopoda, Pectinida, Mytilida, Gastropoda, Teleostei
  - 2. Insekten:
    - Systeme: Coleoptera, *Alphitobius diaperinus*, *Tenebrio molitor*, *Musca domestica*, *Hermetia illucens* und *Acheta domestica*

# Zusammenfassung & Ausblick – AQUALLERG-ID Projekt

- Entwicklung mehrerer hochspezifischen, empfindlichen und robusten Systeme

- Krustazeen
- Bivalvia (Mytilida, Pectinida)
- Cephalopoda
- Gastropoda (Helicidae, Muricidae, Buccinidae)

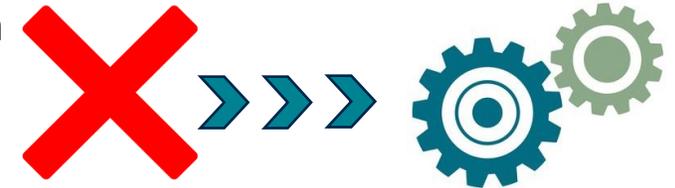


- Dritte Publikation aus diesem Projekt wird geschrieben

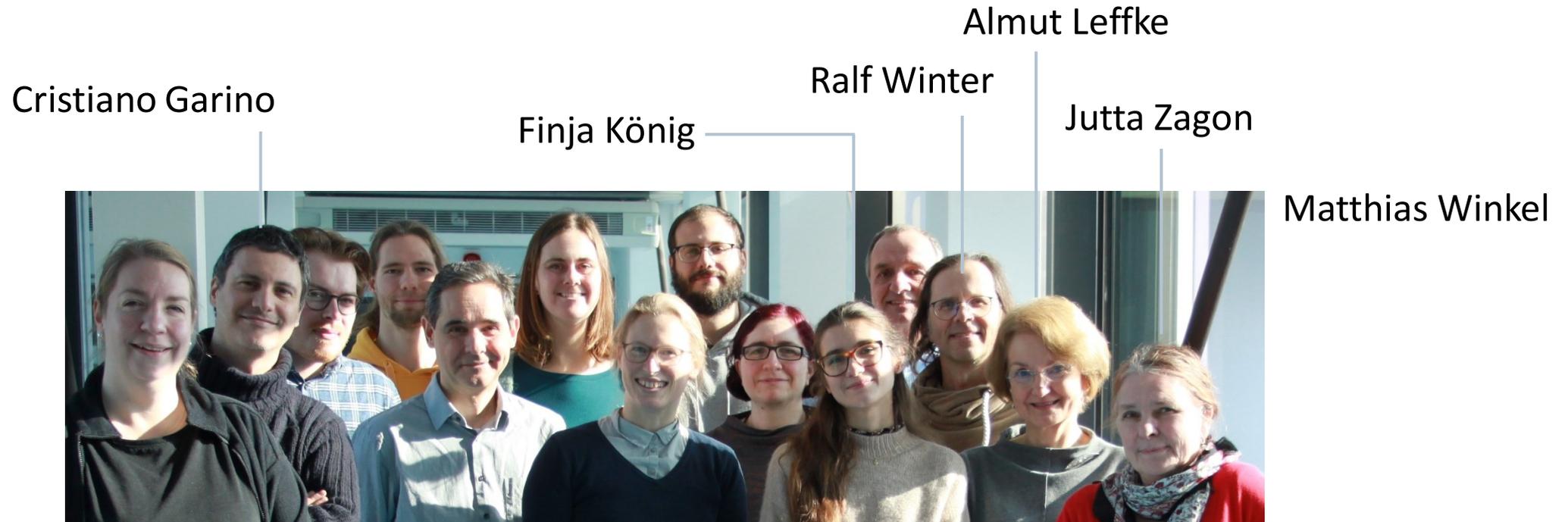


- Einige Ordnungen der Bivalvia und Gastropoda konnten nicht detektiert werden

- Fokus auf Methoden Entwicklung für diese Ordnungen und Familien



# Ein großes Dankeschön an ...



## Nationales Referenzlabor für Tierisches Protein in Futtermitteln Referenzlabor für GVO-Analyse

### Students

Thao Uyen Tran | Mohammed Naneh  
Majed Dandal | Alea Berten  
Vanessa Hölling

Vincent Blaschke

T +49 30 18412-25111

Vincent.blaschke@bfr.bund.e

Bundesinstitut für Risikobewertung

bfr.bund.de

**BfR** | Risiken erkennen –  
Gesundheit schützen

Verbraucherschutz zum Mitnehmen

**BfR2GO – das Wissenschaftsmagazin des BfR**

[bfr.bund.de/de/wissenschaftsmagazin\\_bfr2go.html](https://bfr.bund.de/de/wissenschaftsmagazin_bfr2go.html)

Folgen Sie uns

 @bfrde | @bfren | @Bf3R\_centre

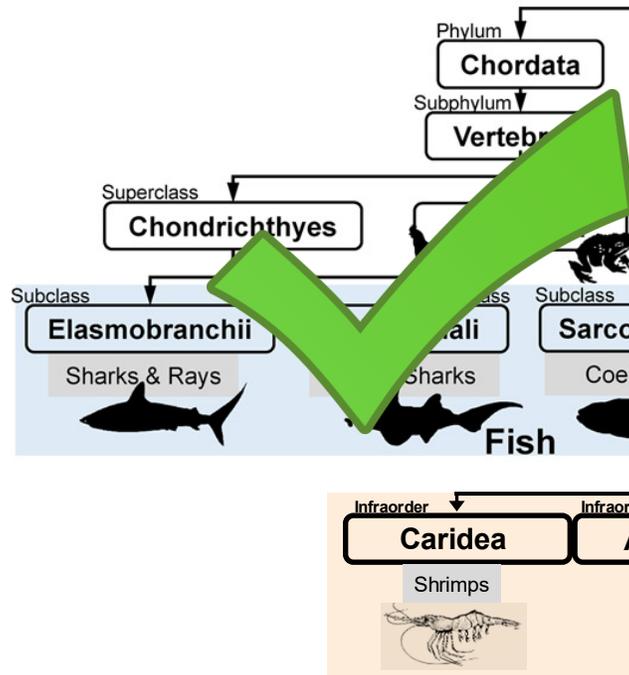
 @bfrde

 youtube.com/@bfr\_bund

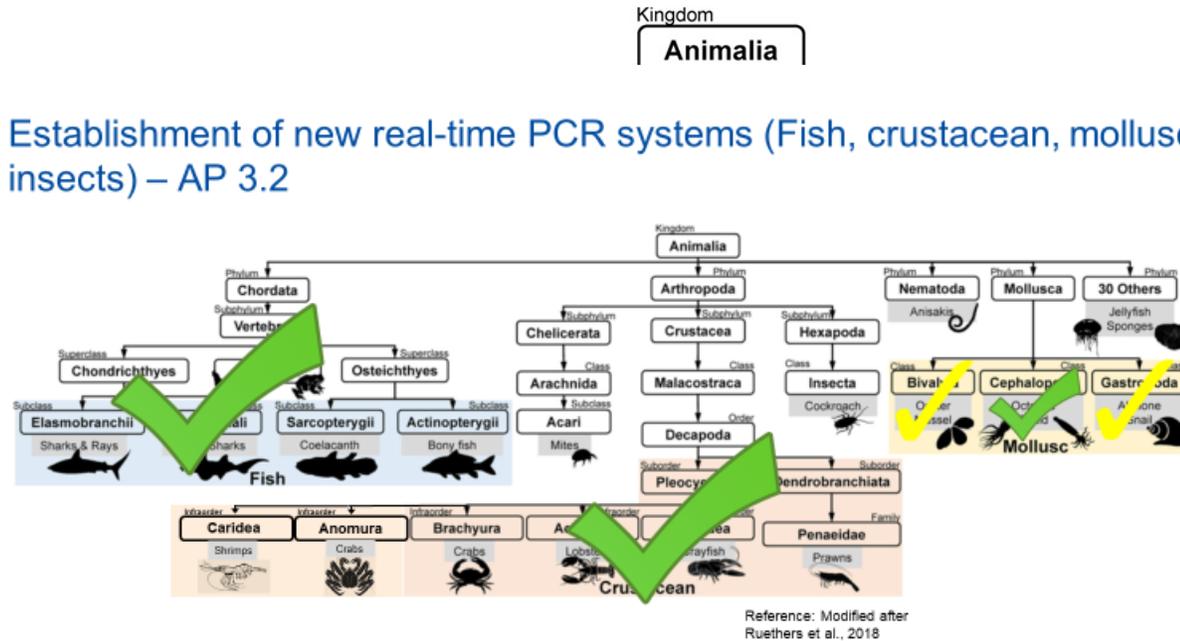
 social.bund.de/@bfr

 linkedin.com/company/bundesinstitut-f-r-risikobewertung

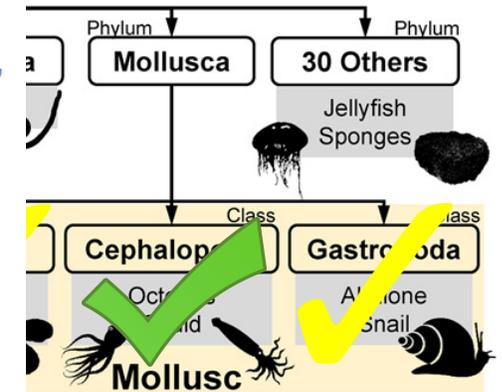
# Establishment of new real-time PCR systems (Fish, crustacean, molluscs, insects) – AP 3.2



Establishment of new real-time PCR systems (Fish, crustacean, molluscs, insects) – AP 3.2

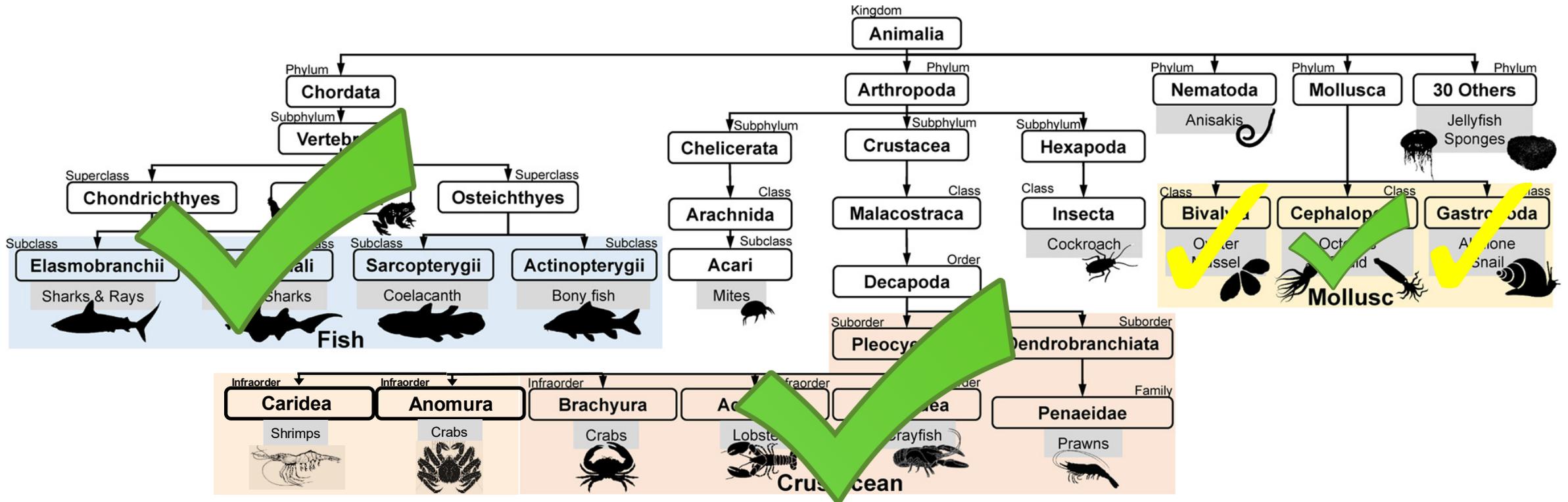


Reference: Modified after Ruethers et al., 2018



Reference: Modified after Ruethers et al., 2018

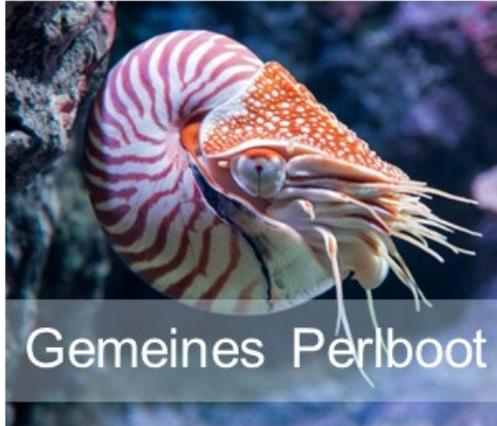
# Establishment of new real-time PCR systems (Fish, crustacean, molluscs, insects) – AP 3.2



Reference: Modified after Ruethers et al., 2018

# Etablierung neuer real-time PCR Systeme (Fische, Krustazeeen, Mollusken)

## Welche Systeme wurden entwickelt?



### Duplex-System

### Decapoda

Spezies / Produkte getestet

> 100

Kreuzreaktionen

Grünlipp-Muschel

LOD<sub>12</sub>

1 pg

Effizienz

94 %

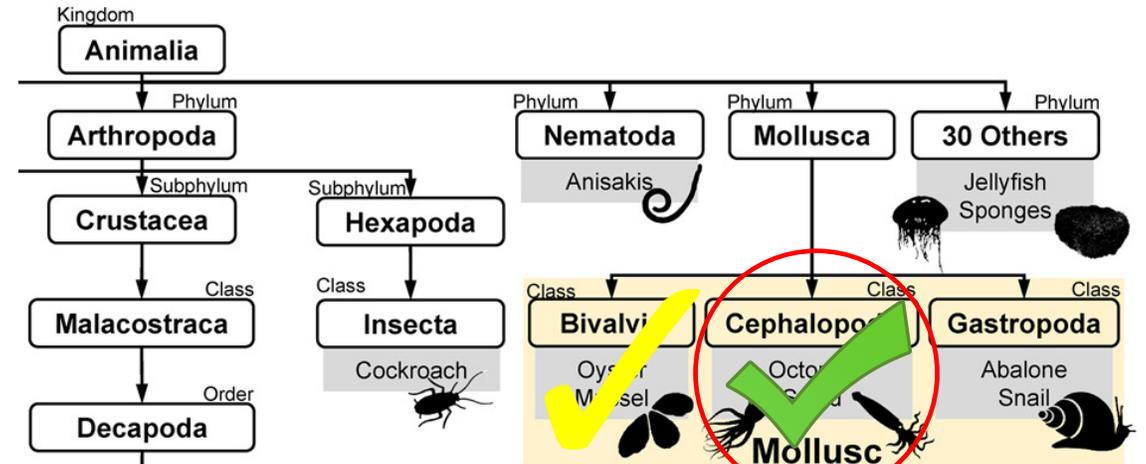
Sensitivität

10 ppm

# Etablierung neuer real-time PCR Systeme (Fische, Krustazeeen, Mollusken)

## Welche Systeme wurden entwickelt?

Duplex-System	Cephalopoda
Spezies / Produkte getestet	> 100
Kreuzreaktionen	Japanische Kammuschel
LOD <sub>12</sub>	10 ppm
Effizienz	93 %
Sensitivität	10 ppm



Reference: Modified after Ruethers et al., 2018

- System ist publiziert:
  - Filling Analytical Gaps in Allergen Detection – Real-Time PCR for the Detection of Commercially Relevant Cephalopods and Gastropods in Food