

Verschiedene methodische Ansätze zur Detektion von aquatischen Allergenen in Lebensmitteln – Überblick des AQUALLERG-ID Projektes

23.11.2023, Bundesinstitut für Risikobewertung, Diedersdorfer Weg

Matthias Winkel

FG51 Wirkungsbezogene Analytik und Toxicogenomik

Abteilung 5 Lebensmittelsicherheit



AQUALLERG-ID

Projekttitel: Entwicklung und Validierung neuer Methoden für den qualitativen Nachweis und die Quantitative Bestimmung von Fischen, Krebs-und Weichtieren sowie Insekten als potentielle Lebensmittelallergene

Fördermittelgeber: Bundesministerium für Ernährung und Landwirtschaft

Programm: Programm zur Innovationsförderung des Bundesministeriums für Ernährung und Landwirtschaft (BMEL), Förderung von Innovationen zur sicheren, ressourcenschonenden und nachhaltigen Lebensmittelherstellung: „Allergenmanagementsysteme und Untersuchungsmethoden für Allergene und Pseudoallergene“

Laufzeit: 01.04.2019 – 31.03.2022 (kostenneutrale Verlängerung bis 30.09.2022)

Projektpartner:

- Institut für Produktqualität GmbH, Berlin
- IMG M Laboratories GmbH, Planegg

Assoziierter Partner:

- FRoSTA AG, Bremerhaven



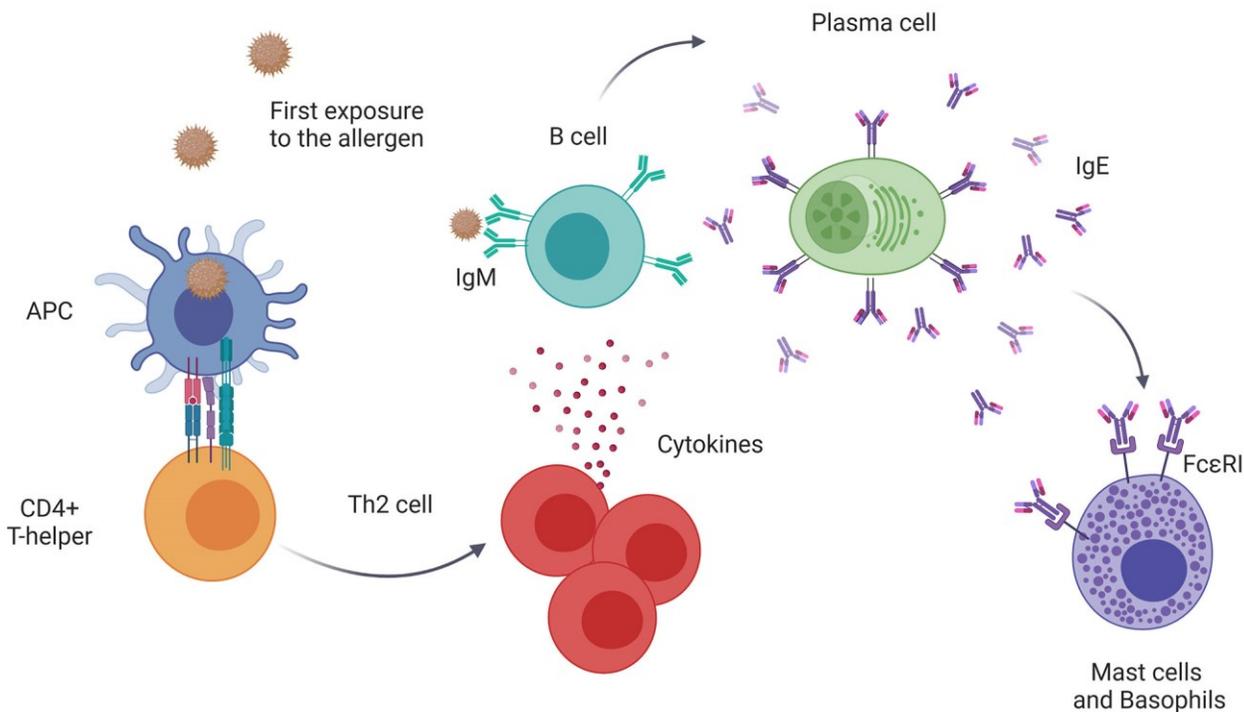
Ziele des AQUALLERG-ID Projektes

Das Projekt verfolgt das übergreifende Ziel, die derzeitigen Lücken hinsichtlich der Analytik extrem artenreicher Allergengruppen zu schließen. Dabei finden auch erstmalig Insekten, welche wie die Krebstiere zu den Gliederfüßern zählen, als neuartige Lebens- und Futtermittel Beachtung. Die Ergebnisverwertung umfasst i) neue routinegeeignete und standardisierbare Verfahren für die Lebensmittelüberwachung, ii) kommerzialisierbare und nutzerfreundliche Assays sowie iii) die Bereitstellung einer innovativen und zukunftsweisenden Serviceanalytik für Allergene.

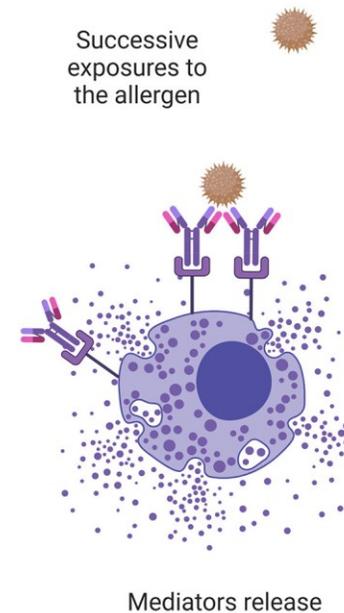
1. Entwicklung und Validierung von Low-Density-PCR-Arrays zum einfachen und effizienten Screening auf Fisch, Krustazeen, Weichtierarten sowie Insekten als neuartige potentielle Allergenquelle in Lebensmitteln. (**BfR**)
2. Entwicklung einer NGS (Next Generation Sequencing)-basierten Methode als neues molekularbiologisches Verfahren zur parallelen Detektion aquatischer allergener Organismen. (**IMG M GmbH**)
3. Entwicklung innovativer immunochemischer Schnelltests und quantitativer ELISA (Enzyme Linked Immunosorbent Assay) zum Nachweis und zur Bestimmung von kennzeichnungspflichtigen allergenen Lebensmitteln aus den artenreichen Gruppen der Fische, Krustazeen, Weichtiere und Insekten. (**ifp GmbH**)

Was passiert bei allergischen Reaktionen auf Lebensmittel?

Sensitization phase



Re-exposure phase



SIGNS AND SYMPTOMS OF ANAPHYLAXIS

Anaphylaxis (an-a-fi-LAK-sis) is a serious allergic reaction that comes on quickly and has the potential to become life-threatening. The most common anaphylactic reactions are to foods, venom, medications, and latex.

Anaphylaxis signs and symptoms that may occur alone (*) or in any combination after exposure to an allergen include:

MOUTH:

itching, tingling, swelling of the lips/tongue/palate (roof of the mouth)

THROAT:

hoarseness, tightening of throat, difficulty swallowing, hacking cough, stridor (a loud, high-pitched sound when breathing in)

LUNGS:

shortness of breath, wheezing, coughing, chest pain, tightness

GUT:

abdominal pain, nausea, vomiting, diarrhea

*** IMMEDIATE & POTENTIAL LIFE-THREATENING SYMPTOMS**

CNS/BRAIN:

anxiety, panic, sense of doom

EYES/NOSE:

runny nose, stuffy nose, sneezing, watery eyes, itchy eyes, swollen eyes

SKIN:

hives or other rash, redness/flushing, itching, swelling

* CIRCULATION/HEART:

chest pain, low blood pressure, weak pulse, shock, pale blue color, dizziness or fainting, lethargy (lack of energy)

Consult with a board-certified allergist for an accurate diagnosis and management plan.

Although the majority of individuals experiencing anaphylaxis have skin symptoms, some of the most severe cases have no rash, hives, swelling

EPINEPHRINE is the first-line of treatment for anaphylaxis

Antihistamines, inhalers, & other treatments should only be used as secondary treatment

ALWAYS CARRY TWO (2) epinephrine auto-injectors at all times

When you, or someone you know, begin to experience symptoms, **CALL 9-1-1 IMMEDIATELY!**

FAACT
Food Allergy & Anaphylaxis Connection Team
AWARENESS • ADVOCACY • EDUCATION
www.FoodAllergyAwareness.org
(513) 342-1293
Fax (513) 342-1239
P.O. Box 511
West Chester, OH 45071
info@FoodAllergyAwareness.org

The Voice of Food Allergy Awareness

Allergene Arten in Lebensmitteln

Die großen 8 (‘The BIG 8‘)

Erdnuss



Milch



Ei



Baumnüsse



Weizen



Soja



Schalentiere



Fisch



Andere gelistete Allergene in der EU

Senf



Sellerie



Sesam



Mollusken



Lupine



Sulfite

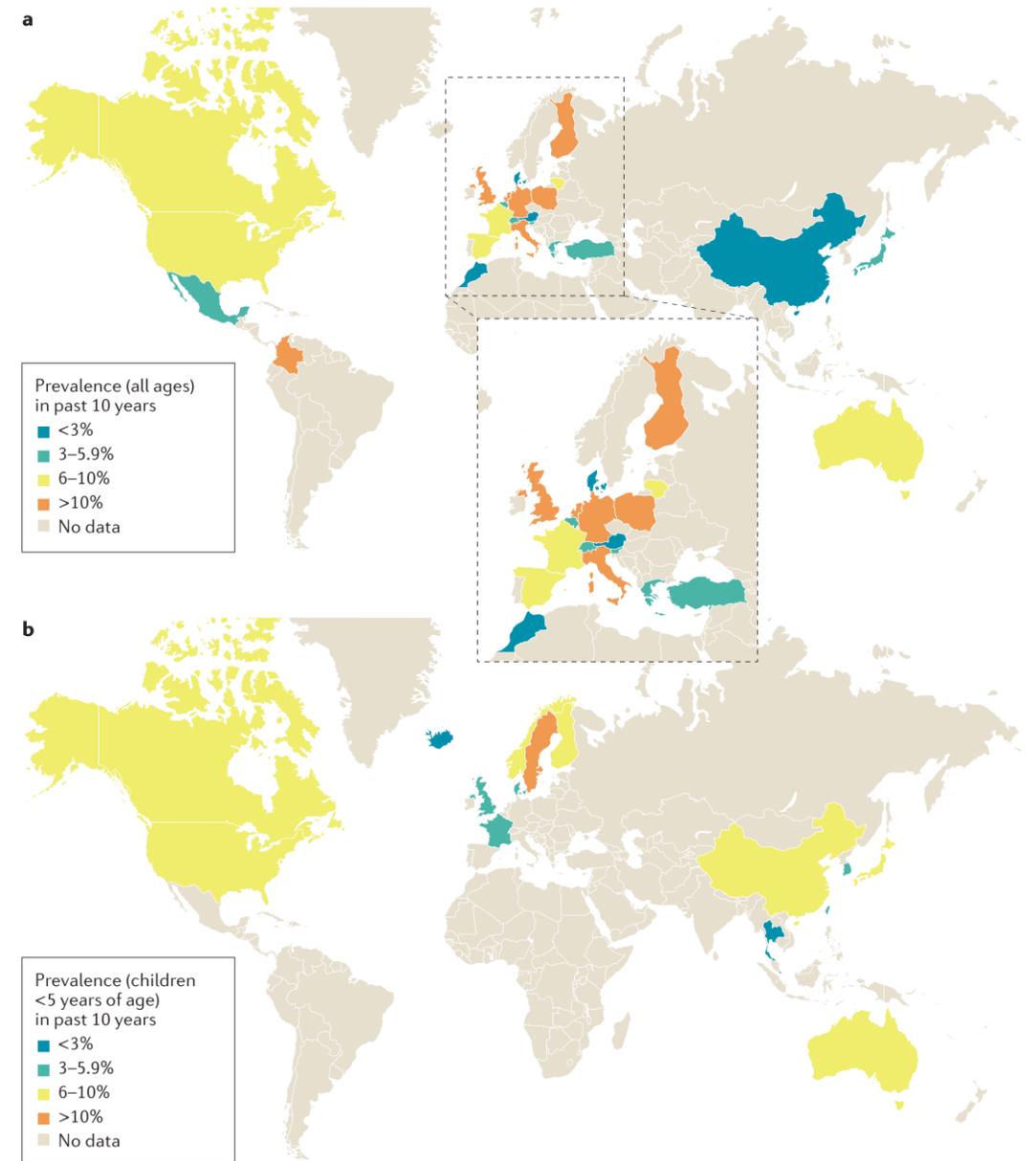


Häufigkeit von Lebensmittelallergien weltweit

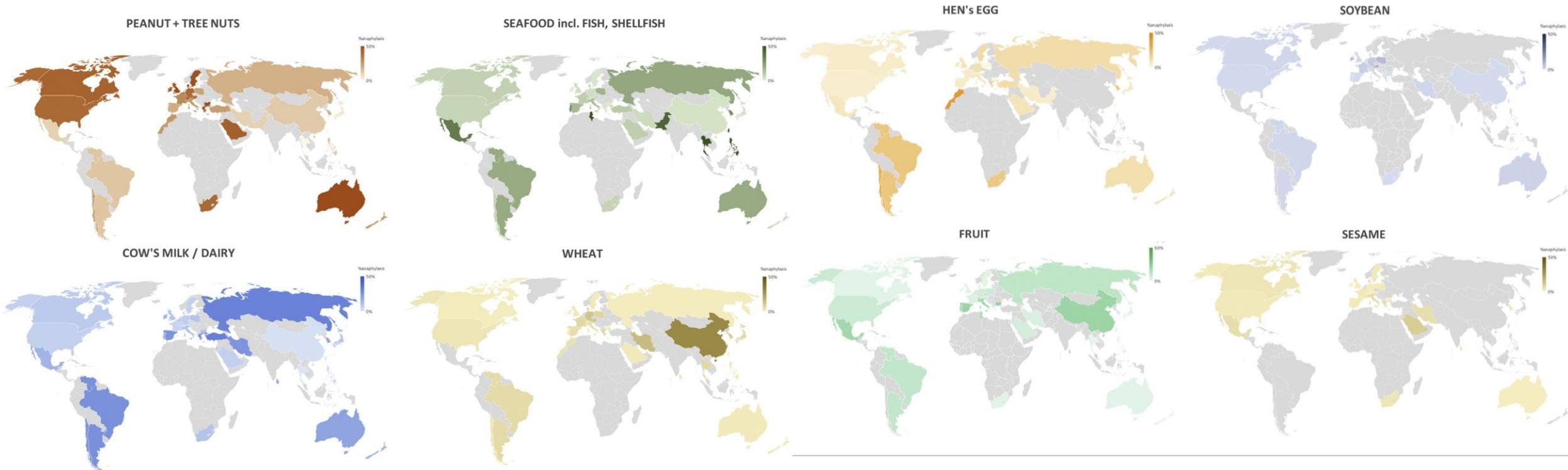
- Fehlende Daten in vielen Ländern
- Globale und regionale Unterschiede
- Kontrollierte orale Provokationsteste sind immer noch rar, die meisten Schätzungen basieren auf dem Anstieg der Anaphylaxie
- Nach wie vor beste Praxis, Lebensmittel mit allergischen Arten zu meiden

Fragen:

- Referenzdosen?
- Richtige Kennzeichnung?
- Wie geht man mit Kontaminationen um?

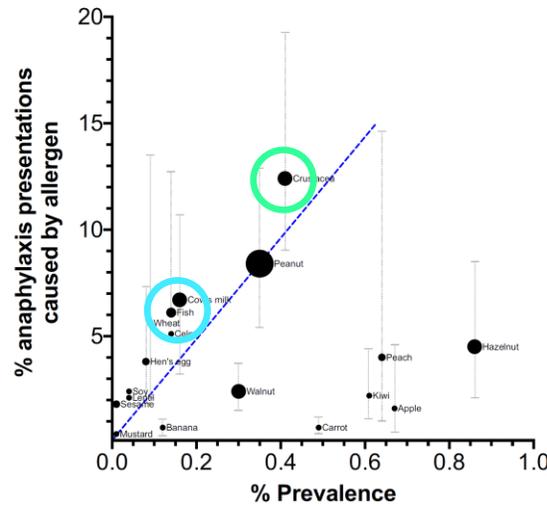


Gemeldete Anaphylaxien nach Allergenen und Ländern

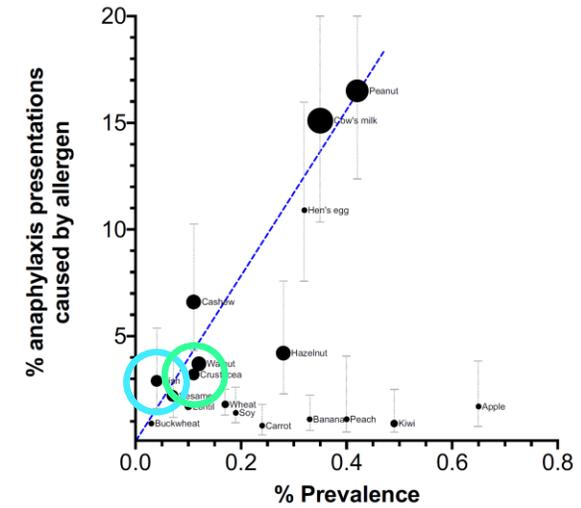


Häufigkeit von Anaphylaxien durch Allergene

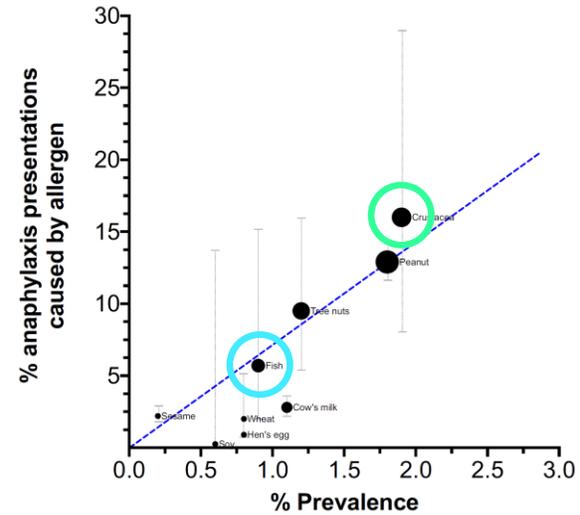
EUROPE: adults



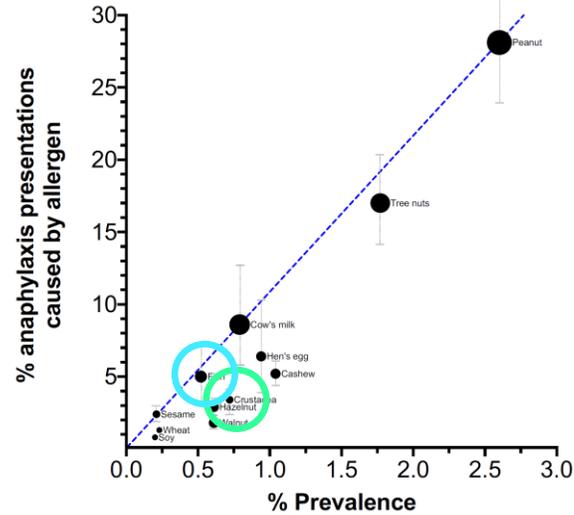
EUROPE: children



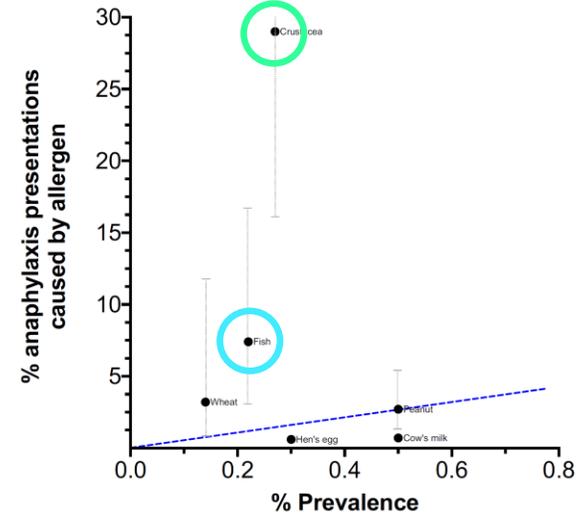
NASWP: adults



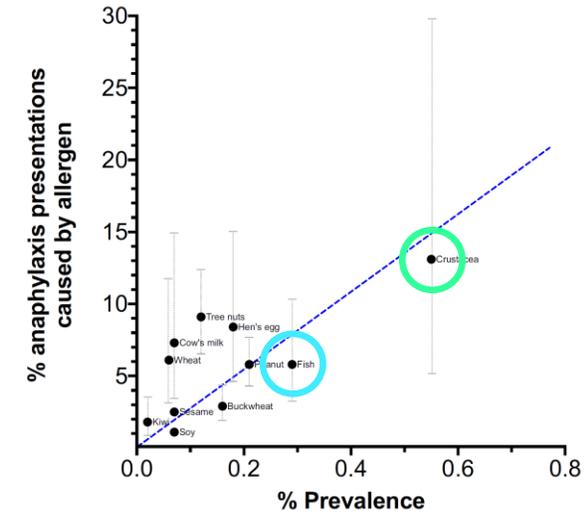
NASWP: children



ASIA: adults



ASIA: children





Aquatische Arten die Allergien auslösen (Fische, Krebs- und Weichtiere)

© BfR

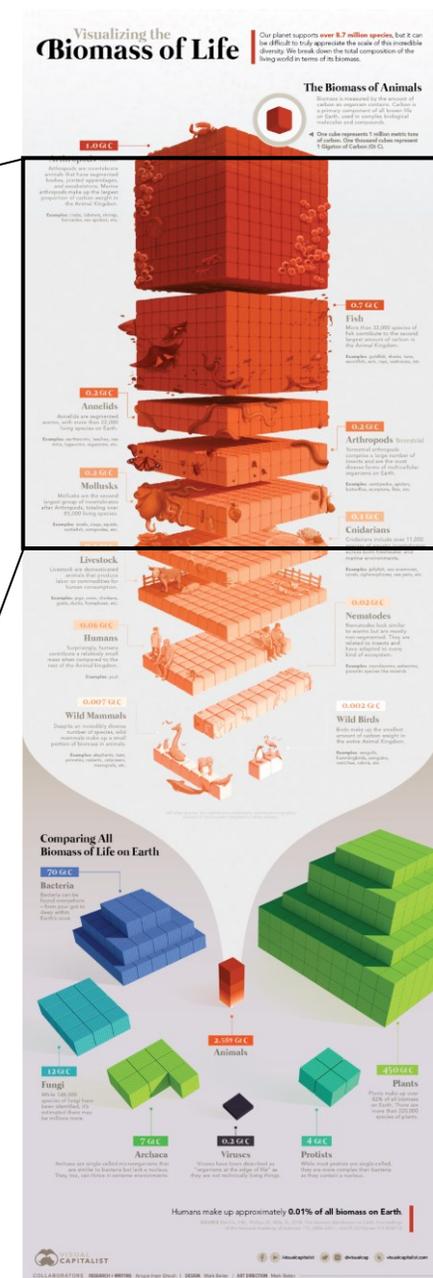
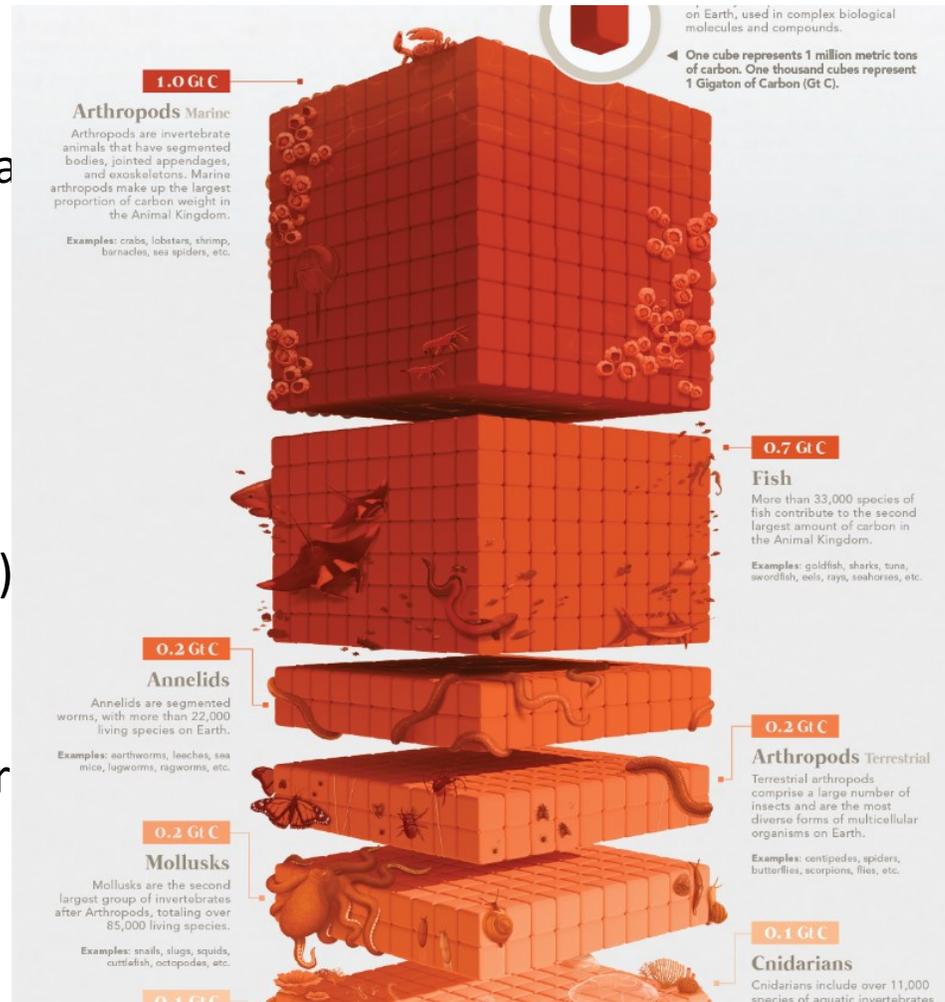
Biomasse und Diversität aquatischer Arten

Marine (Arthropoda): circa

Fische: circa 33.000 Arten

Terrestrische (Arthropoda)

Mollusken: circa 85.000 Ar



© Name Fotograf / Bildagentur

© Visual Capitalist

Methoden zum Nachweis von Krebstieren

Rese

Detection of Shrimp-Derived C Fluore



JIJUAN CAO,^{1,*} I

JOURNAL OF
AGRICULTURAL AND
FOOD CHEMISTRY

JOURNAL OF
AGRICULTURAL AND
FOOD CHEMISTRY



Food Control 79 (2017) 27–34

Contents lists available at ScienceDirect

Food Control

journal homepage: www.elsevier.com/locate/foodcont



Fast Real-Time PCR for t

Beatriz Herrero, Juan M. Vieites, ar

Area of Molecular Biology and Biotechnolog

Supporting Information

ABSTRACT: Crustaceans are one of the r
problem, and they have become very im
regarding these allergens to warn consume
allows the detection of crustaceans in all ki
temperature and pressure during the ma
specificity and reduces the analysis time o

A novel screening approach based on six real-time PCR systems for the detection of crustacean species in food

Jutta Zagon ^{a,*}, Jessica Schmidt ^a, Allegra Suzanna Schmidt ^b, Hermann Broll ^a,
Alfonso Lampen ^a, Tassilo Seidler ^b, Albert Braeuning ^a

^a Department of Food Safety, Federal Institute for Risk Assessment (BfR), P.O. Box 33 00 13, D-14191, Berlin, Germany

^b Fachbereich IV, Food Science & Technology, Beuth University of Applied Science, Luxemburger Str. 10, D-13353, Berlin, Germany



ARTICLE INFO

Article history:
Received 6 January 2017
Received in revised form
14 March 2017

ABSTRACT

Analysis of crustacean species plays a role in authenticity issues as well as allergen detection. A real-time PCR-based screening assay was developed for the detection of crustaceans in food. In order to cover most relevant species in one analytical step, PCR systems were newly developed for the detection of shrimps (Penaeidae), lobster (*Homarus* sp.), Common shrimp (*Crangon crangon*), river prawns (*Macrobrachium* sp.)

Abstract

FDA has received consumer complaints about food products, most notably sardines, containing krill as an undeclared crustacean shellfish allergen. The Food Allergen Labeling and Consumer Protection Act (FALCPA) requires that food products containing crustacean shellfish be labeled with the type of crustacean. Available antibody-based allergen detection assays, which detect proteins, do not distinguish crustacean type. Real-time PCR assays, which detect DNA, can differentiate type

Two Quant Shrimp an Anne C. Eischei

Division of Bioanaly
Administration, 510

Supporting Inf

ABSTRACT: For
complex food mat
developed to detect penaeid shrimp and blue crab, crusta
crab meat spiked into several types of foods, including ca
Foods were spiked with either shrimp or crab at levels ran
cooked by a variety of methods. Real-time PCR data were
respect to linear range and reaction efficiency. Results in
reaction efficiencies were achieved across a linear range o

Methoden zum Nachweis von Fischen

FOOD COMPOSITION AND ADDITIVES

Detection of Fish in Food, by R

MIN SUN, CHENGZHU
Shandong Entry-Exit Inspection and Quarantine
People's Republic of China

Fish, as one of the most important food sources, has received increasing attention from the food industry and legislative authorities. This study developed a real-time polymerase chain reaction (PCR) system on TaqMan-MGB probes for the detection of fish allergen gene. The results showed that the system could detect 5 ng purified fish

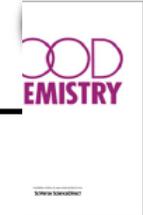
Eur Food Res Technol (2017) 243:849–857
DOI 10.1007/s00217-016-2799-5

ORIGINAL PAPER

Development of a real-time PCR system for the detection of the potential allergen fish in food

Carina Tetzlaff¹ · Dietrich Mäde¹

Received: 30 May 2016 / Revised: 23 August 2016 / Accepted: 1 October 2016 / Published online: 13 October 2016
© The Author(s) 2016. This article is published with open access at Springerlink.com

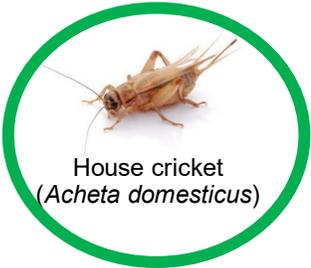


A,³

most impor-
reactions in
he objective
r the detec-
cessive treat-
ducts likely

apan

Methoden zum Nachweis von Insekten



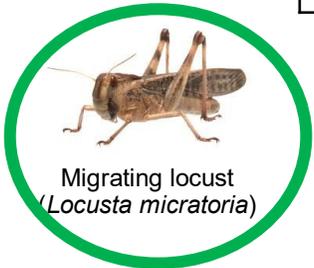
House cricket
(*Acheta domesticus*)



Banded cricket
(*Grylodes sigillatus*)



Field cricket
(*Gryllus assimilis*)



Migrating locust
(*Locusta migratoria*)



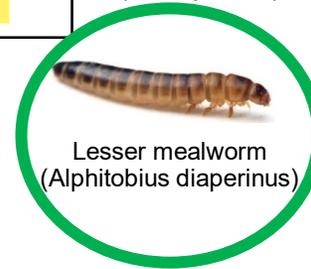
Desert locust
(*Schistocerca gregaria*)



Honey bee larvae
(*Apis mellifera*)



Yellow mealworm
(*Tenebrio molitor*)



Lesser mealworm
(*Alphitobius diaperinus*)



Black soldier fly
(*Hermetia illucens*)



Common housefly
(*Musca domestica*)



Silk worm pupae
(*Bombyx mori*)

Order	Suborder	Family	Species	Pet feed EU	Feed EU	Food EU Application
Orthoptera	Ensifera	Gryllidae	<i>Acheta domesticus</i>	✓	✓	✓
			<i>Gryllus assimilis</i>	✓	✓	≠
			<i>Grylodes sigillatus</i>	✓	✓	≠
	Caelifera	Acrididae	<i>Locusta migratoria</i>	✓	≠	✓
	Caelifera	Acrididae	<i>Schistocerca gregaria</i>	✓	≠	✓
Hymenoptera	Apiformes	Apidae	<i>Apis mellifera</i>	✓	≠	✓
Coleoptera	Polyphaga	Tenebrionidae	<i>Alphitobius diaperinus</i>	✓	✓	✓
			<i>Tenebrio molitor</i>	✓	✓	✓
Lepidoptera	Lepidoptera	Bombycidae	<i>Bombyx mori</i>	✓	✓	≠
		Pyalidae	<i>Galleria mellonella</i>	✓	≠	≠
Diptera	Brachycera	Muscidae	<i>Musca domestica</i>	✓	✓	≠
		Stratiomyidae	<i>Hermetia illucens</i>	✓	✓	✓

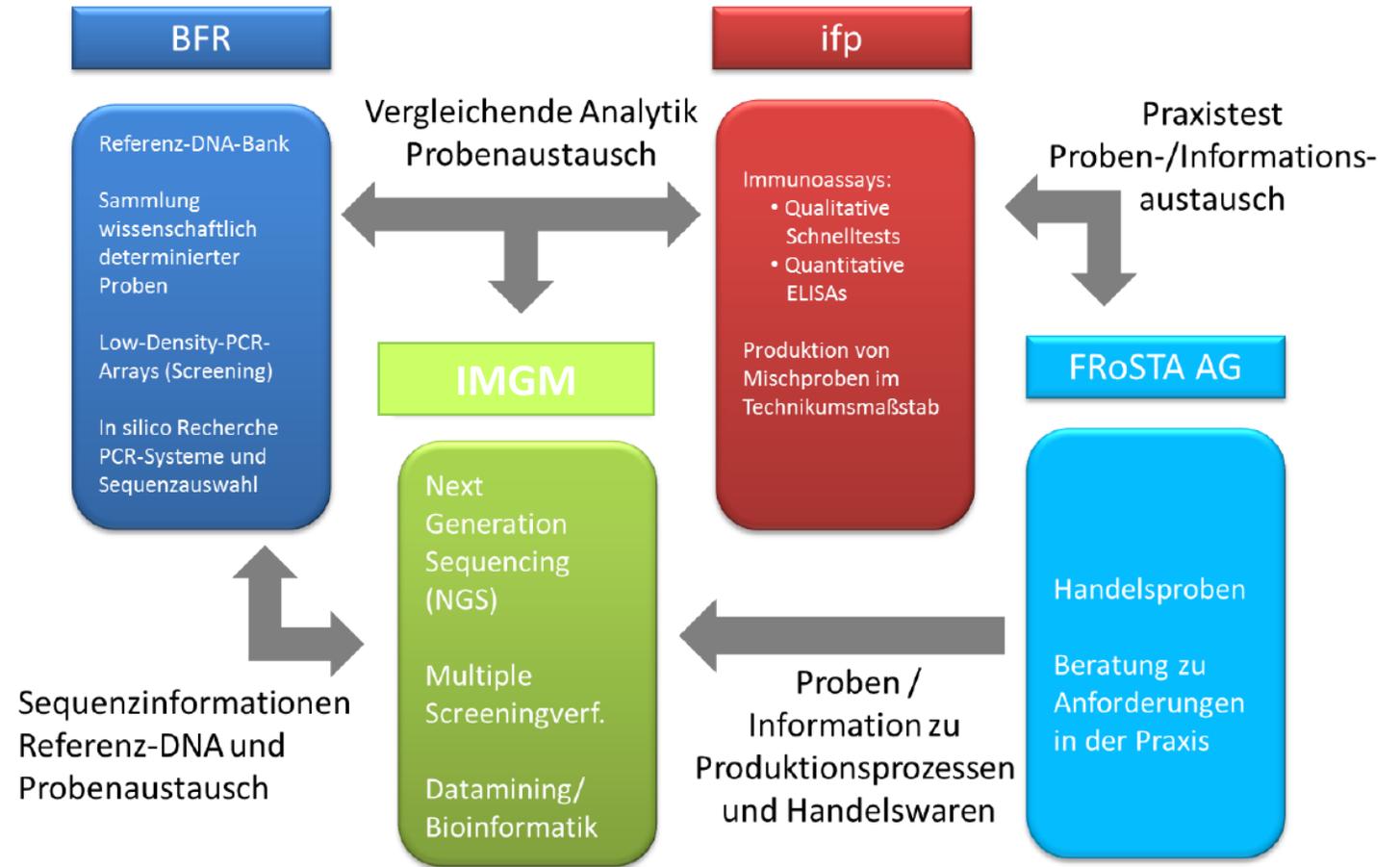
AQUALLERG-ID Projektbeschreibung



© BfR

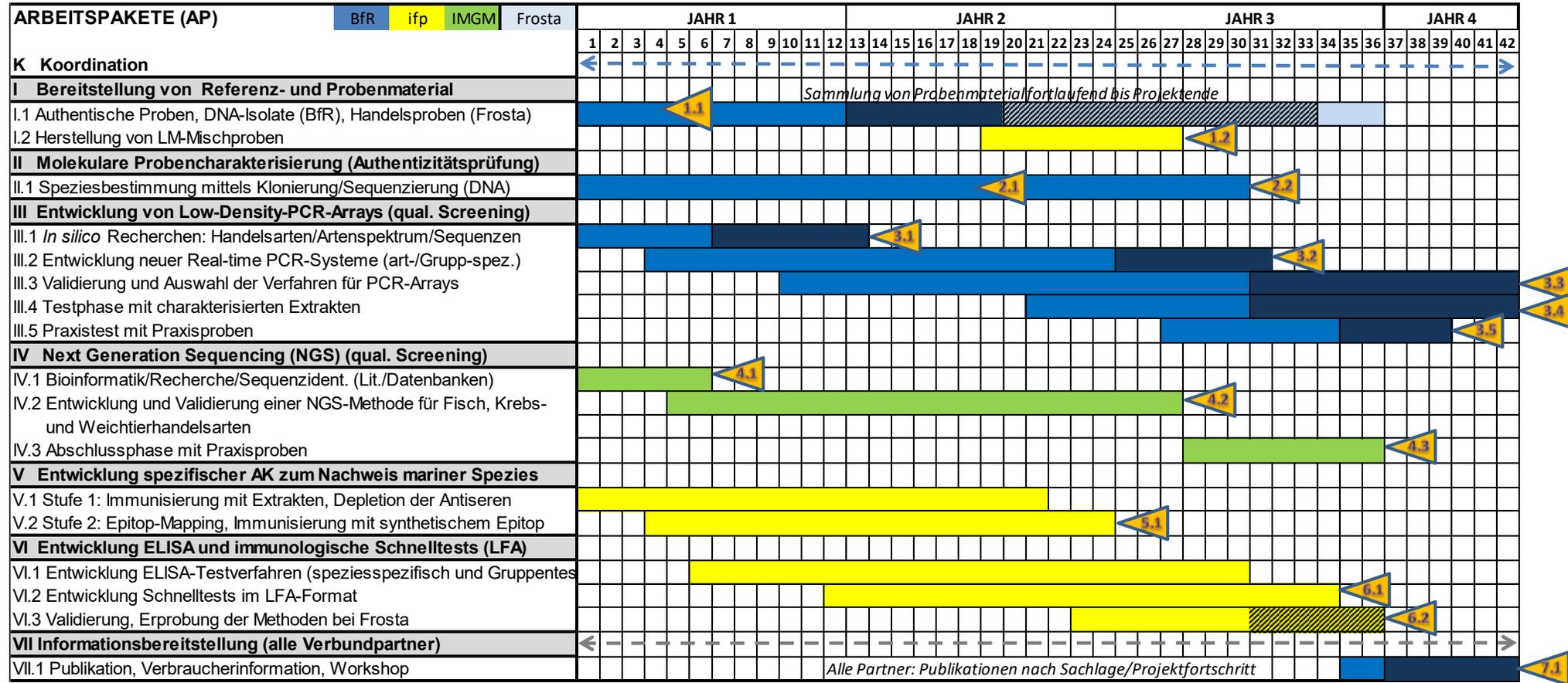
Projekt „AQUALLERG-ID“ Übersicht

Das Verbundprojekt (BfR, ifp und IMGGM) verfolgte das Ziel, neue analytische Methoden zum Nachweis von aquatischen Organismen (Fische, Krebs- und Weichtiere) sowie Insekten als potentielle Lebensmittelallergene zu entwickeln. Dabei sollten analytische Lücken durch neue immunochemische Schnelltest, quantitative ELISA, real-time PCR-Arrays und Next-Generation Sequenzierungsmethoden geschlossen werden.



Fließdiagramm der Verknüpfung der einzelnen Partner des Verbundprojektes

Projekt Zeitplan und Arbeitspakete



Legende und Abkürzungen:

- ifp Balkenfarbe = Hauptanteil des Verbundpartners am Arbeitspaket; blau schraffiert = Kooperation/Frosta
-  Meilenstein (s. ANLAGE 1-2)
- AK: Antikörper
- LFA: Lateral Flow Assay (immunolog. Streifentest)
- LM: Lebensmittel

WP1 Bereitstellung von Referenz und Probenmaterial (BfR, FRoSTA, ifp)

- Beschaffung von Referenzsubstanzen (authentische Proben) und Probenmaterialien (Rohware, prozessierte Lebensmittel)
- Herstellung von Lebensmittelmischproben im Technikumsmaßstab und Weitergabe an Projektpartner
- Proben aus der Praxis (FRoSTA AG)
- verfügbare eigene Proben; determinierte Fisch- und Krebsproben anderer wissenschaftlicher Institutionen (Max-Rubner-Institut, MRI, entomologische und genetische Forschungsinstitute; Partner aus anderen Projekten Handelsproben der FRoSTA AG; eigene gezogene Proben aus dem Einzelhandel und Insektenfarmen)

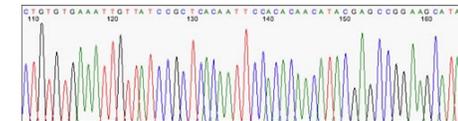
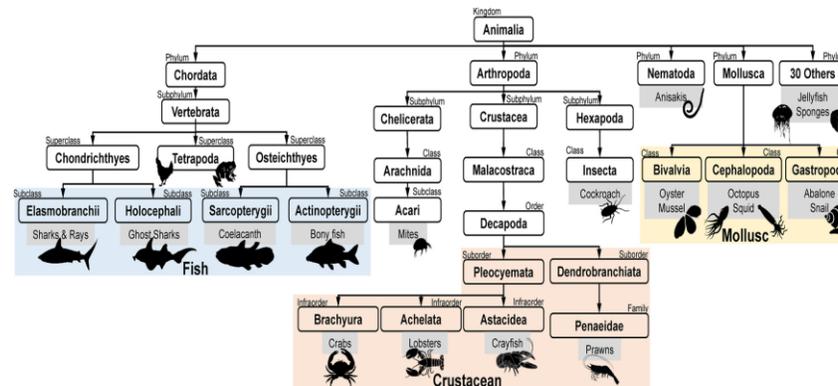
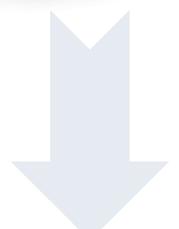
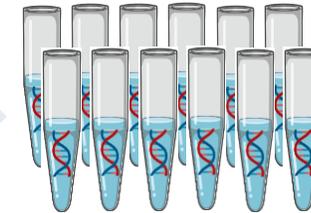


<https://www.zeit.de/news/2023-02/15/frosta-praesentiert-geschaeftszahlen-2022>



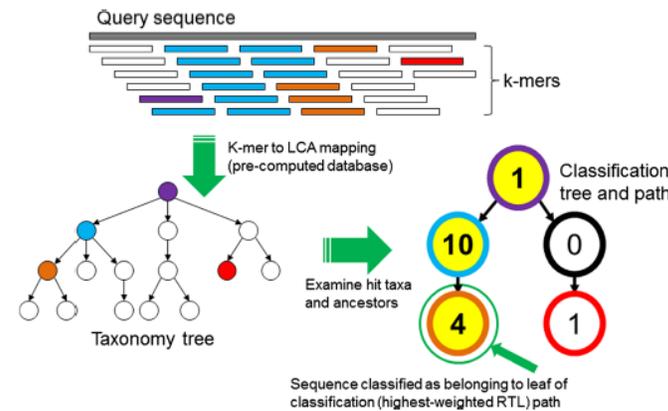
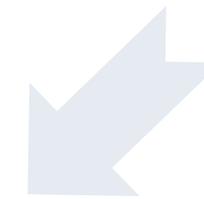
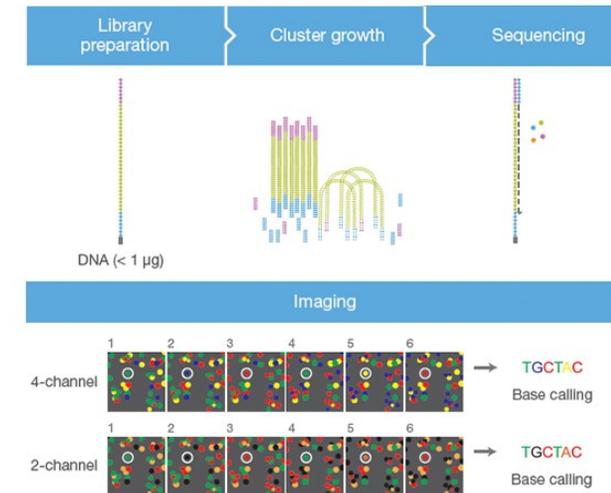
WP2 Molekulare Probencharakterisierung (BfR)

- umfassende Charakterisierung von Proben zur Speziesidentifikation zur Methodenentwicklung
- DNA-Isolierung und Weitergabe an Projektpartner
- Langzeit-Lagerung von DNA
- Zur Authentifizierung der Proben wird die Barcoderegion (COI-Oxidase-Gen) mittels PCR amplifiziert, kloniert und sequenziert und anschließend über NCBI- oder BOLD-Datenbank bestimmt



WP4 Next-Generation Sequencing (NGS) (IMGM)

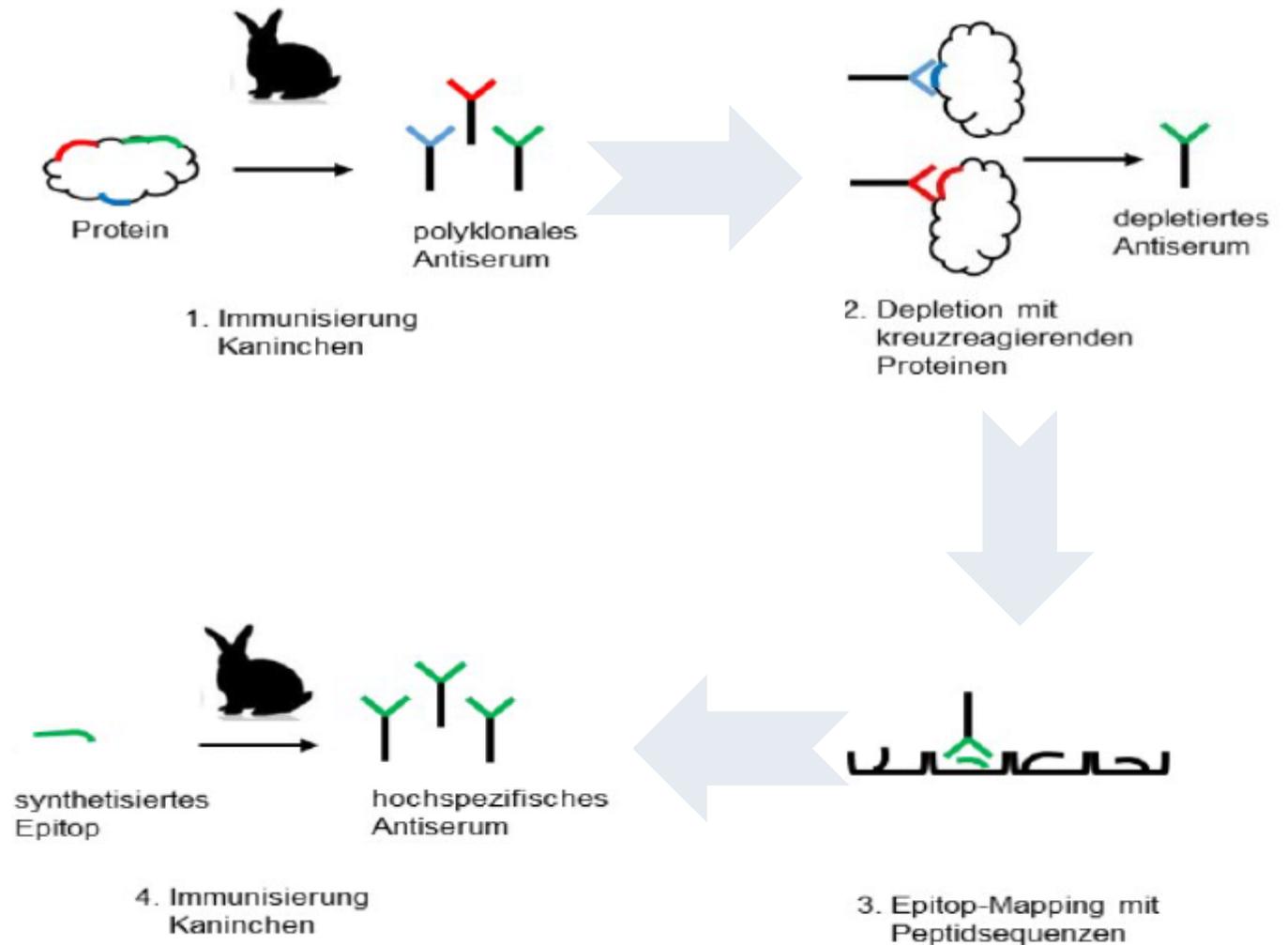
- gleichzeitig Analyse von DNA-Strängen
- zielgerichtete Analyse
- NGS-Methode zur Identifizierung von Fisch-, Mollusken- und Krustazientaxa verschiedener phylogenetischer Ebene (z.B. Art, Familie, Ordnung)
- Validierung und Optimierung authentischer DNA-Isolate sowie DNA-Mischungen
- Ermittlung der Sensitivität an realen Matrices .



© 2014 Wood and Salzberg

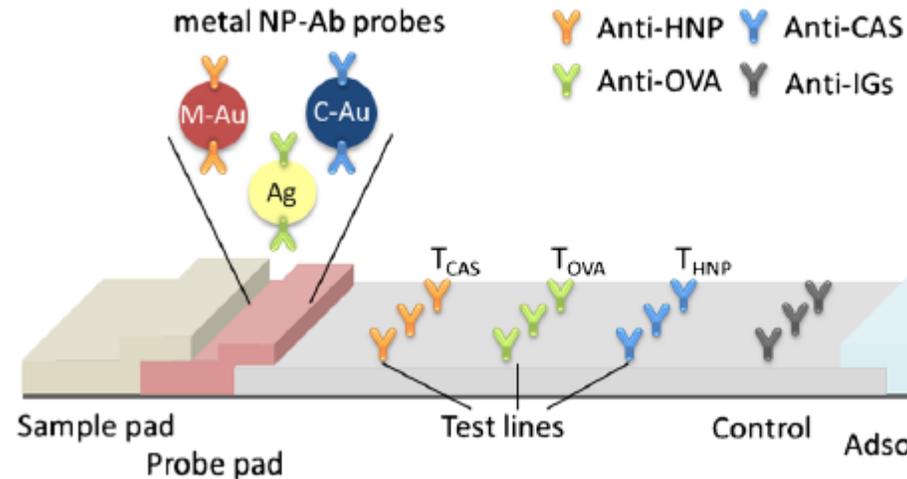
WP5 Entwicklung spezifischer Antikörper zum Nachweis allergener Proteine (ifp)

- neuartiger zweistufiger Prozess zur Herstellung von hochspezifischen Antikörper gegen die aquatischen Hauptallergene
- Extraktion der Hauptallergene aus relevanten Spezies zur Immunisierung von Kaninchen
- erhaltene Antiseren werden depletiert
- Epitop-Mapping mittels überlappender Peptide zur gezielten Peptidimmunisierung



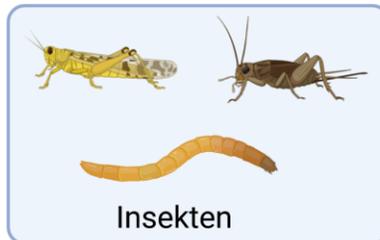
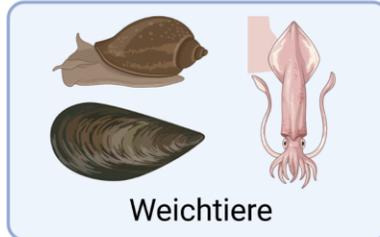
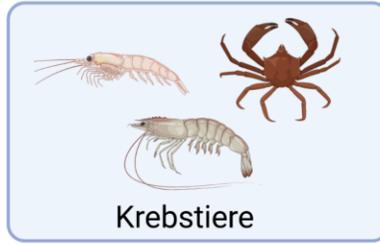
WP6 Entwicklung ELISA und immunologische Schnelltests (ifp)

- Entwicklung von ELISA-Testverfahren
- Variation der Assayparameter zur Ermittlung von optimalen Bedingungen
- Validierung (Intra-/Interassayvarianz, Linearität, Nachweisgrenze, Spezifität, Selektivität)
- Mischung der Antikörper für hohe Artenabdeckung
- Übertragung auf das Schnelltest (LFA)-Format
- Kontrolle der Produktionsbänder und Proben von FRoSTA

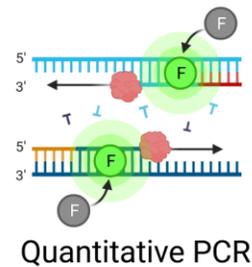
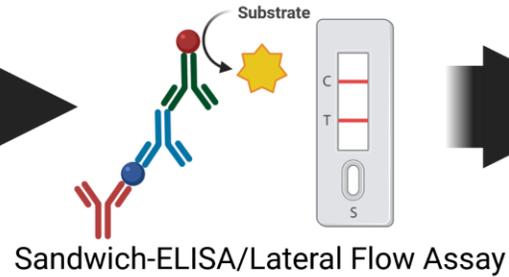
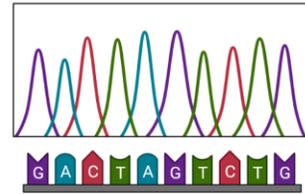


Erfolge des Projektes

Proben aus Tiergruppen



Methodenentwicklung



Ergebnisse



Danke

Martin Röder

Andrea Klink

Hanna König

ifp



Simon Gallenberger

Michael Bonin

Martin Seifert

Cornelia Hock

Dominik Buschmann

IMG M



Annelie Duerr

FRoSTA AG



Ralf Winter

Finja König

Anna-Lena Splinter

Uyen Thao Tran

Majeed Dandal

Mohammad Naneh

Alea Berten

Vanessa Hölling

Bundesinstitut für Risikobewertung



Matthias Winkel

T +49 30 18412-25110

Matthias.winkel@bfr.bund.de

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

Folgen Sie uns

 @bfrde | @bfren | @Bf3R_centre

 @bfrde

 youtube.com/@bfr_bund

 social.bund.de/@bfr

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