

Entwicklung innovativer Schnelltests zum Nachweis von Lebensmittelallergenen in der Produktentwicklung- und Kontrolle mittels PCR

Dr. Jutta Zagon

Verbundprojekt:

„Entwicklung von innovativen Schnelltest- und Screeningverfahren zum Nachweis von Lebensmittelallergenen vor Ort in der Produktentwicklung und –kontrolle“

- **Programm zur Innovationsförderung des BMELV
- FKZ 281-6400508 (BLE)**
- **1. September 2009 – 30. August 2012**
- **Verbundpartner:**

BfR, Berlin (Koordination)

Institut für Produktqualität, Berlin (IfP)

Zentis GmbH & Co KG, Aachen

KENNZEICHNUNGSPFLICHT

EU-weite Kennzeichnungspflicht

für rezepturbedingte Zutaten

(Richtlinie 2000/13/EG und 2007/68/EG)



Kuhmilch

Hühnerei

Fisch

Krebstiere

Weichtiere

Senf, Sellerie

Baumnüsse

Erdnuss, Soja

Glutenhaltige Getreide

Lupine

Sesam

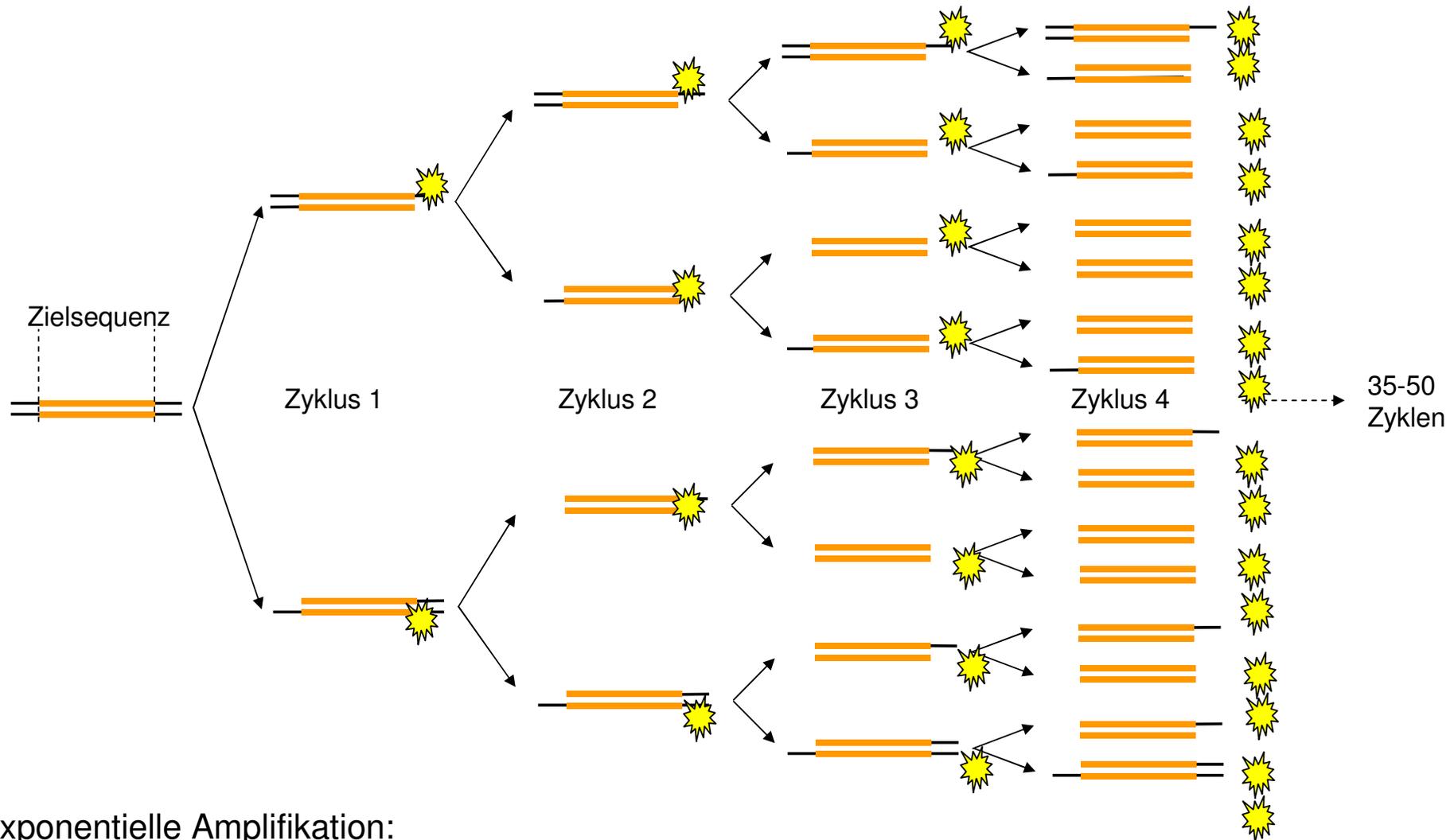
SO₂, Sulfit



ZIELE

- Beschaffung und Herstellung von Referenz- (Plasmide) und Probenmaterial (BfR, IfP, ZENTIS)
- Entwicklung PCR-basierter Schnelltests („Ready-to-use“ Reaction Plate) für alle Allergene (außer: Milch, Ei, Sulfit)
- Entwicklung neuer PCR-Verfahren zur Detektion von Weichtieren, Fisch, Krebstieren (BfR)
- Entwicklung immunologischer Schnelltestverfahren, Schnellnachweis von PCR-Produkten („DIP STICKS“) (IfP)
- Prozessoptimierung, Methodenanwendung in der Praxis (ZENTIS)
- Veröffentlichung (Konferenz, Publikation, validierte Methoden)

Prinzip der Polymerase-Kettenreaktion (PCR)



Exponentielle Amplifikation:

$$2^1 = 2 \text{ Kopien}$$

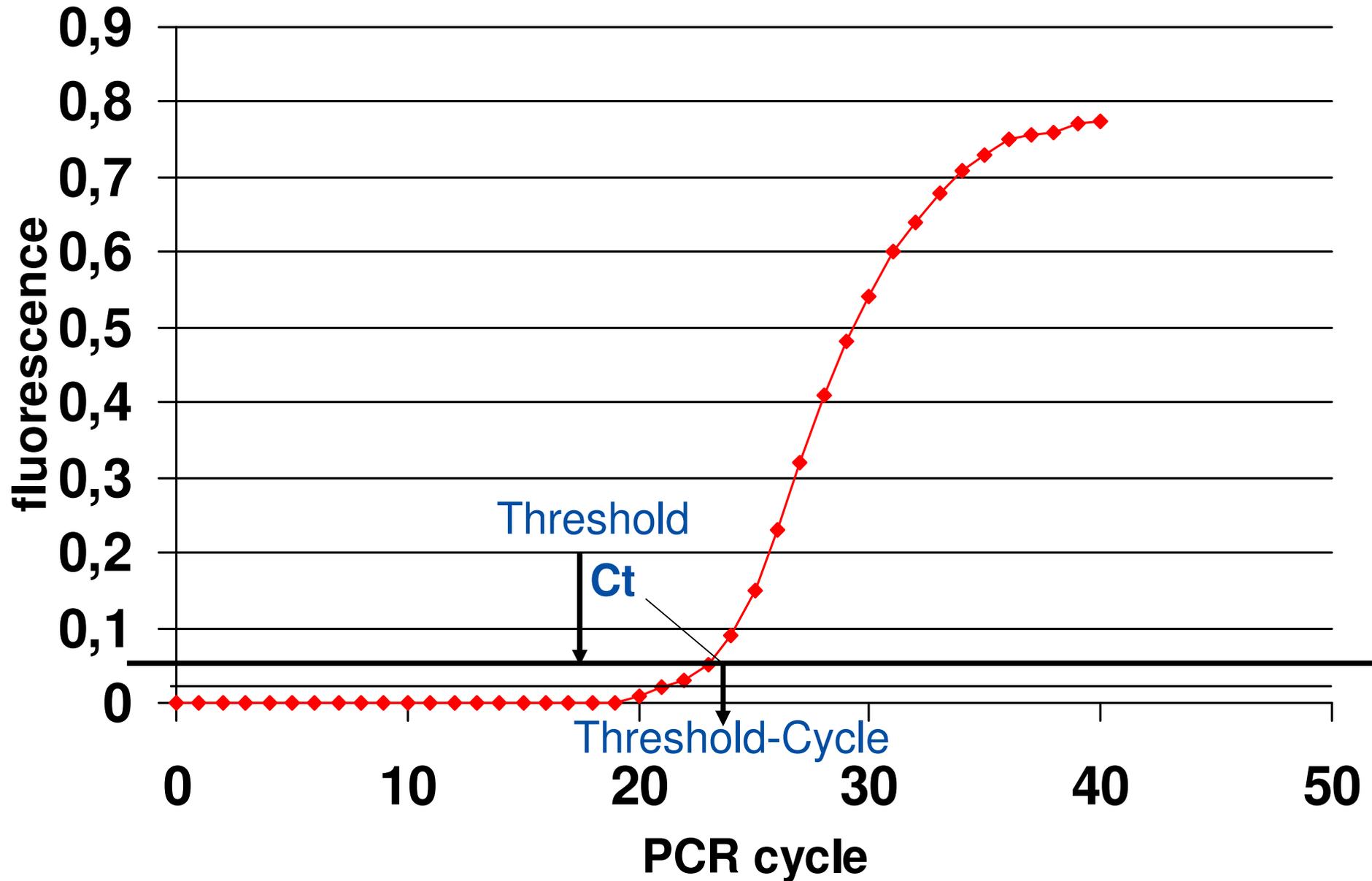
$$2^2 = 4 \text{ Kopien}$$

$$2^3 = 8 \text{ Kopien}$$

$$2^4 = 16 \text{ Kopien}$$

$$2^{35} = 34 \text{ Mrd. Kopien}$$

Fluoreszenzanstieg bei der Real Time PCR



„Ready-to-use“- PCR - Mikrotiter-Platte - Prinzip

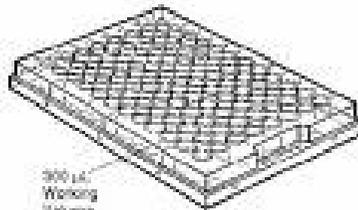
Belegen der Platten:

- Primer
- Sonden
- Kontrollen (NTC; Ampli-K; Pos-K; Extr-K; Inhib-K)

Süßwarenplatte:

PCR-Systeme:

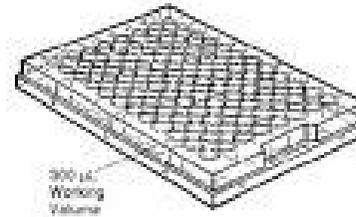
Sesam, Walnuss,
Erdnuss, Haselnuss,
Macadamia, Soja,
Cashew/Pistazie,
Chloroplasten-Sequenz
(Pflanze)



Fleischprodukt-Platte:

PCR-Systeme:

Senf, Sellerie, Cashew/Pistazie,
Getreide (Weizen/Roggen/Dinkel
Hafer/Gerste), Soja,
Myostatin-Sequenz (Tier).



Notwendig nur noch Zugabe von:
DNA-Polymerase/Puffer + DNA aus dem Lebensmittel

Real-time PCR / Einheitliches Zeit-/Temperaturprogramm

„Ready-to-use“ PCR-Mikrotiterplatte für Süswaren

-Beispiel für Plattendesign-

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	
AC/Pflanze	EC	PC	NTC	Probe 1.1	Probe 1.2	Probe 1.3	Probe 2.1	Probe 2.2	Probe 2.3	Probe 3.1	Probe 3.2	Probe 3.3	A
Macadamia	EC	PC	NTC	Probe 1.1	Probe 1.2	Probe 1.3	Probe 2.1	Probe 2.2	Probe 2.3	Probe 3.1	Probe 3.2	Probe 3.3	B
Erdnuss	EC	PC	NTC	Probe 1.1	Probe 1.2	Probe 1.3	Probe 2.1	Probe 2.2	Probe 2.3	Probe 3.1	Probe 3.2	Probe 3.3	C
Haselnuss	EC	PC	NTC	Probe 1.1	Probe 1.2	Probe 1.3	Probe 2.1	Probe 2.2	Probe 2.3	Probe 3.1	Probe 3.2	Probe 3.3	D
Soja	EC	PC	NTC	Probe 1.1	Probe 1.2	Probe 1.3	Probe 2.1	Probe 2.2	Probe 2.3	Probe 3.1	Probe 3.2	Probe 3.3	E
Walnuss	EC	PC	NTC	Probe 1.1	Probe 1.2	Probe 1.3	Probe 2.1	Probe 2.2	Probe 2.3	Probe 3.1	Probe 3.2	Probe 3.3	F
Cashew/ Pistazie	EC	PC	NTC	Probe 1.1	Probe 1.2	Probe 1.3	Probe 2.1	Probe 2.2	Probe 2.3	Probe 3.1	Probe 3.2	Probe 3.3	G
Sesam	EC	PC	NTC	Probe 1.1	Probe 1.2	Probe 1.3	Probe 2.1	Probe 2.2	Probe 2.3	Probe 3.1	Probe 3.2	Probe 3.3	H
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	

EC: extraction control; **PC:** positive control; **NTC:** no template control; **AC:** amplification control

„Ready-to-use“ PCR-Mikrotiterplatte

-Getestete Systeme-

PCR-System	Quelle:
Cashew/Pistazie	Brzesinski et al., 2006
Erdnuss I	BfR, 2008
Erdnuss II	Hird et al., 2003
Gerste	Zeltner et al., 2009
Hafer	Zeltner et al., 2009
Haselnuss	Schöringhumer et al., 2009
Lupine	Demmel et al., 2008
Macadamia	Brezna et al., 2006
Mandel I	Leidinger, 2009
Mandel II	Köppel, 2009
Mandel III	Röder et al., 2010, in press
Sellerie	Hupfer et al., 2006 (§-64 LFGB: L-08.00-56:2008-12)
Senf, weiß	Fuchs et al., 2010
Sesam I	Brzezinski, 2007
Sesam II	Schöringhumer et al., 2009
Soja	ISO/FDIS 21570:2005
Weizen/Roggen/Dinkel	Zeltner et al., 2009

Anpassung aller PCR Systeme auf ein universelles Zeit-Temperaturprogramm (einheitliche Annealingtemperatur: 60 °C)

Optimierung der Primerkonzentration

Effizienzbestimmung

Messwerte für 5 Log-(Verdünnungs-)Stufen
(akzeptabel: Effizienz = 89-110 %)

Sensitivität - Limit of detection (LOD)

Messwerte (Ct) für 50, 10, 5 und 2,5 Genomkopien-> 10 Replikate;
(akzeptabel: LOD \leq 10 gc)

Spezifität

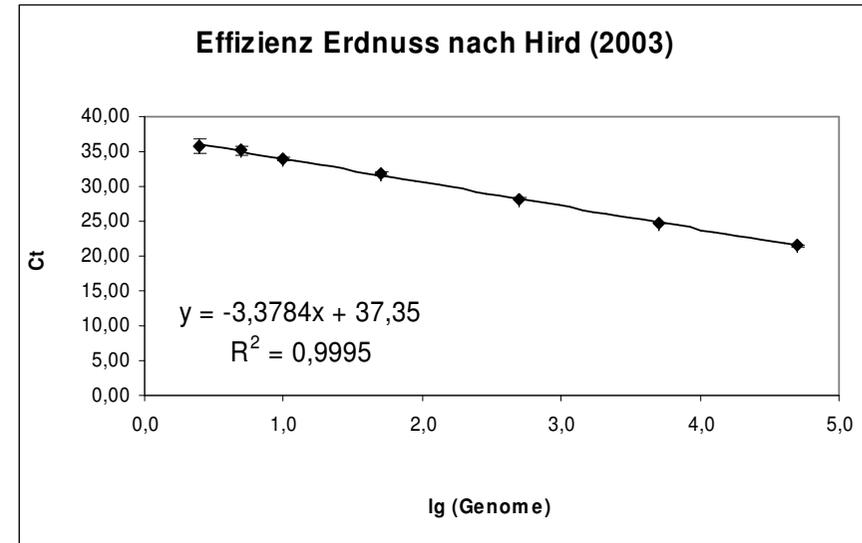
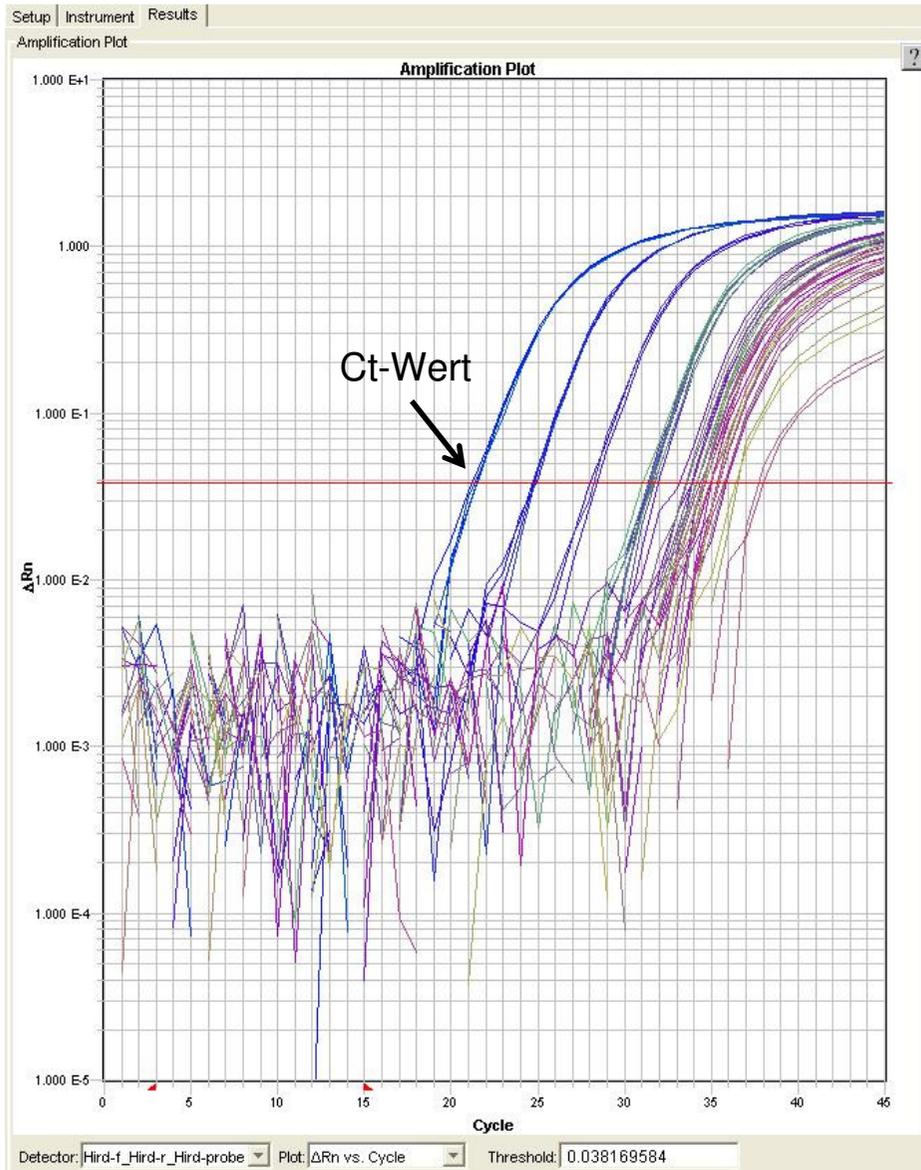
sinnvolle Auswahl (~ 30 verschiedene Spezies); einheitlich 25000 Genomkopien / PCR

Wiederholbarkeit (Intra-/Interassay-Präzision)

DNA-Extraktion: je 4 Extraktionen an zwei verschiedenen Tagen
PCR von 8 Proben an zwei unterschiedlichen Tagen
(akzeptabel: Interassay-Präzision -> VK% < 15%)

Validierung aller PCR-Systeme: Beispiel Erdnuss-PCR nach Hird, 2003

Effizienz und Limit of Detection



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

Validierung: E = 97,70 %

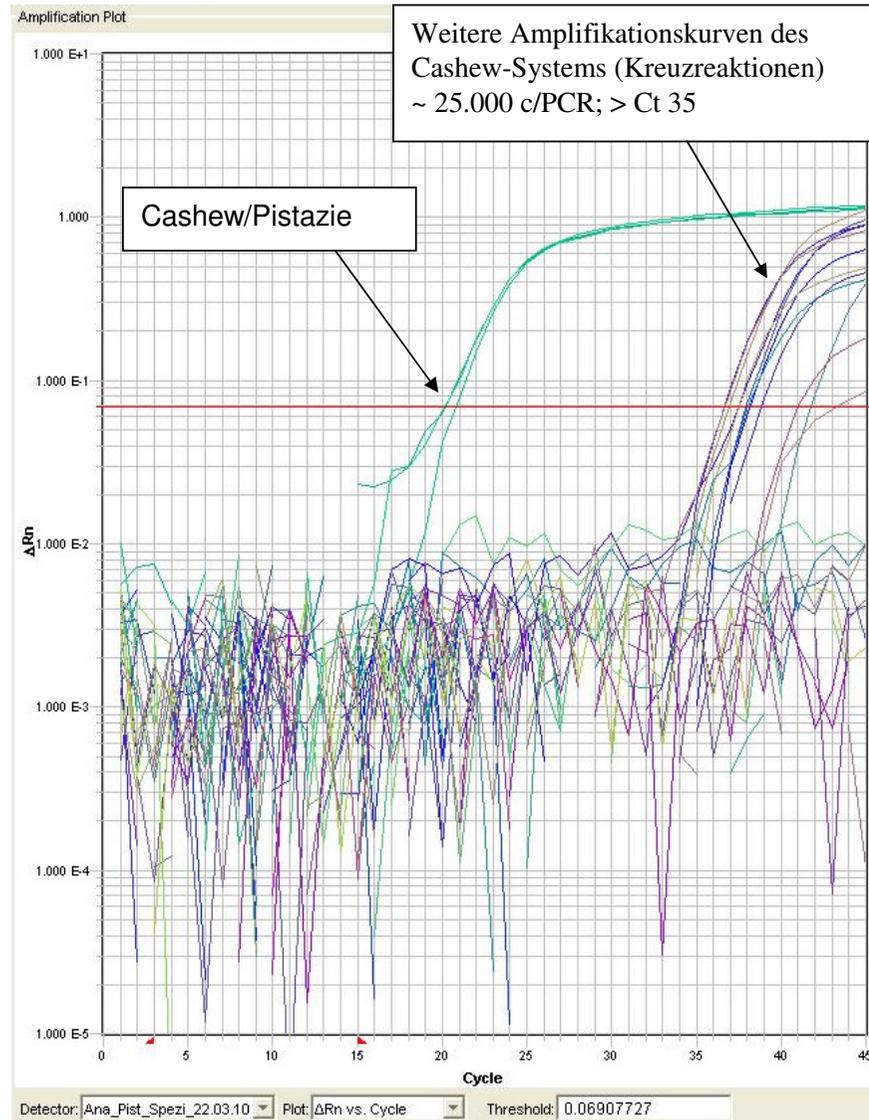
akzeptabel: $R^2 > 0,995$; Steigung: -3,1 bis -3,6, bzw. E: 89-110%

für Genomkopien 50, 10, 5 und 2,5 -> 10 Replikate
→ wenn noch alle 10 Replikate positiv = LOD

Validierung: LOD = 2,5 Genome (= 7,82 pg)

akzeptabel: LOD ≤ 10 Genomkopien

Validierung der Spezies-Spezifität



Bsp. Cashew-PCR Brzezinski et al. 2006:

Schwache
Kreuzreaktionen mit:
Soja, Senf, Weizen,
Hafer, Dinkel
(100 % Material,
25.000 c)

**Starke
Kreuzreaktion mit
Pistazie
(*Anacardiaceae*)**

Validierung belegter Platten

Richtigkeit:

Vergleich der Ergebnisse mit einer unabhängigen Methode (ELISA)
Vergleich der Ergebnisse mit Soll-Werten in gespikten Proben

Selektivität:

Ergebnisse mit gespikten Proben, die mehrere Analyten enthalten

Vergleichspräzision (Reproduzierbarkeit):

Mehrere Labors, mehrere Prüfer, mehrere Geräte (Ringversuch)

„Ready-to-use“ PCR-Mikrotiterplatte für Süswaren

- I. Ergebnisse mit dotierter dunkler Schokolade (60 % Kakao)

Probe	Dotierungen			Ergebnisse mit der „ready-to-use“ Platte		
	Soja [ppm]	Erdnuss [ppm]	Sesam [ppm]	Soja	Erdnuss	Sesam
E 322 a	0	0	0	+	-	-
E 322 b	0	10	10	+	+	+
E 322 c	0	50	50	+	+	+
E 322 d	0	100	100	+	+	+
E 442 a	0	0	0	-	-	-
E 442 b	20	10	10	+	+	+
E 442 c	50	50	50	+	+	+
E 442 d	100	100	100	+	+	+

E 322 = Emulgator Sojalecitin ~ 0,4 %

E 442 = Emulgator Ammoniumphosphatid ~ 0,4 %

„Ready-to-use“ PCR-Mikrotiterplatte für Süßwaren

- II. Ergebnisse mit Handelsproben -

Probe	Herstellerangaben		Ergebnisse mit der „ready-to-use“ Platte
	Zutat	„kann enthalten“	
Müsliriegel	Haselnuss (10 %)	Erdnuss	Haselnuss
Cornflakes	Hasel- und Walnuss	Erdnuss, andere Nüsse	Haselnuss, Walnuss
Cashewschokolade	Cashew (20 %), Sojalezithin	andere Nüsse	Soja, Cashew, Haselnuss
Knäckebrötchen	-	Sesam	Sesam
Rührkuchen	Haselnuss (4,8 %)	Walnuss	Haselnuss
Schokolade	Haselnuss, Sojalezithin	andere Nüsse	Haselnuss, Soja
Macadamianüsse	Macadamia	Schalenfrüchte, Erdnuss	Macadamia

Weitere Schritte ...

OPTIMIERUNG UND VALIDIERUNG DER BELEGUNG:

Schutz der Primer- und Sonden vor Degradation und Aktivitätsverlust (Gelatine, PEG, Trehalose); Lagerungsstabilität bei Raumtemperatur; Transparente Methode

HERSTELLUNG VON PLASMIDEN MIT ALLERGEN-SPEZIFISCHEN DNA-SEQUENZEN:

Standardisiertes Vergleichsmaterial (Positivkontrolle); Standards für die Quantifizierung

ENTWICKLUNG EINER INTERNEN INHIBITIONSKONTROLLE

Zur Bestimmung des Einflusses der Lebensmittelmatrix auf das Ergebnis

BEDEUTUNG SCHWACHER KREUZREAKTIONEN MIT 100%-MATERIAL

Bestimmung der Schwellenkonzentration im Lebensmittel für einen positiven Nachweis

RELATION PCR – PROTEIN

Vergleich Genomkopien – ppm allergene Zutat

PCR-Nachweisverfahren für Mollusken, Krebstiere, Fische

DANK AN

DIE FLEISSIGEN HELFER:

Cordula Harting

Mandy Stetina

Fanny Kamprad

Yvonne Kumbier

Sylvia Kurth

Eva Gasteyer

Hanna Neymeyer

Roman Popp

WISSENSCHAFLICHE BEGLEITUNG:

Hermann Broll

Anke Ehlers

KOORDINATION:

Prof. Dr. Dr. Alfonso Lampen



PROJEKTBEGLEITUNG (BLE):

Simone Liss

**... und für Ihre
Aufmerksamkeit!**



Durchschnittliche Pflanzen-Genomgrößen (n) in MBp

