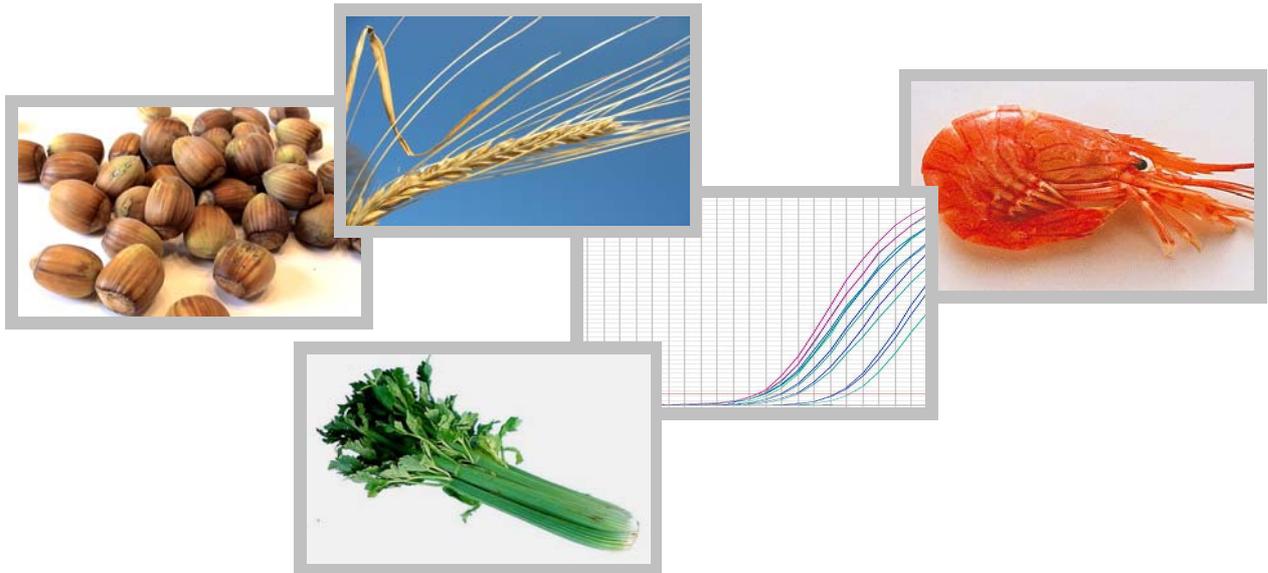


Nachweis allergener Zutaten in Lebensmitteln

Christine Hupfer, Ulrich Busch

Bayerisches Landesamt für Gesundheit und Lebensmittelsicherheit (LGL),
85764 Oberschleißheim



Einführung

Aktuell sind in der Bevölkerung ca. 1-3 % der Erwachsenen und bis zu 6 % der Kinder und Jugendlichen von echten, immunvermittelten Lebensmittelallergien betroffen, mit steigender Tendenz [1]. Für diese Verbraucher kann der Verzehr bereits sehr geringer Mengen an Allergie-auslösenden Zutaten in Lebensmittelprodukten eine unmittelbare Gesundheitsgefährdung darstellen. So kam es in der Vergangenheit immer wieder zu schweren, teils lebensbedrohlichen allergischen Reaktionen, infolge des unbemerkten Verzehrs nicht deklariertes, so genannter "versteckter" Allergene, obwohl sich viele der Allergiker ihrer Empfindlichkeit bewusst waren. So sterben allein in den USA jährlich ca. 120 Menschen an den Folgen von Lebensmittelallergien [2].

Vor diesem Hintergrund hat der Gesetzgeber mit erweiterten Kennzeichnungsvorschriften zur besseren Information aller Verbraucher und zum Schutz der

betroffenen Allergiker reagiert. Mit der Umsetzung der EU-Richtlinie 2013/89/EG [3] in die Lebensmittelkennzeichnungsverordnung (LMKV) muss seit dem 25.11.2005 eine umfangreiche Liste an potentiell allergenen Lebensmitteln und daraus hergestellten Produkten bei Verwendung als Zutat in jedem Falle im Zutatenverzeichnis gekennzeichnet werden (z.B. Nüsse, Getreide, Fisch, Sellerie, Ei, Milch) [4].

So ergibt sich in zweierlei Hinsicht die Notwendigkeit, allergene Bestandteile in Lebensmitteln nachweisen zu können: Zum einen stellen versteckte Allergene an sich eine Gefahr für den allergischen Konsumenten dar und ihre Nachweisbarkeit ist Voraussetzung um den Verbraucher davor warnen und schützen zu können, zum anderen erfordert allein die Aufgabe der Lebensmittelüberwachungsbehörden die Einhaltung gesetzlicher Vorschriften zu kontrollieren, dass geeignete analytische Methoden zur Verfügung stehen.

Nachweismethoden in der Allergenanalytik

Nachweismethoden für allergene Zutaten müssen hoch spezifisch sein, da unter Umständen zwischen phylogenetisch engen Verwandten differenziert werden muss. Z. B. umfasst die Familie der Apiaceen sowohl die allergene Spezies Sellerie als auch nicht allergene Spezies wie Petersilie oder Kümmel. Ebenfalls eng verwandt sind die beiden kennzeichnungspflichtigen Schalenfrüchte Walnuss und Pekannuss, die es analytisch zu unterscheiden gilt.

Die Nachweisgrenzen sollten in einem Bereich liegen, der bei empfindlichen Allergikern gerade noch eine Reaktion auslösen kann, was in etwa dem niedrigen ppm-Bereich entspricht. So waren in sog. DBPCFC (double-blind placebo-controlled food challenge) Studien, dem Goldstandard zur Beurteilung Allergie-auslösender Dosen, Mengen von nur 0,1 mg Erdnuss ausreichend um subjektive allergische Symptome hervorzurufen [5].

Bei der Entwicklung von Nachweismethoden ist weiterhin zu berücksichtigen, dass eine Anwendung für viele unterschiedliche Lebensmittelmatrices sowie für verarbeitete Lebensmittel gegeben sein muss und darüber hinaus die

Untersuchungsmethoden für die Routineanalytik geeignet und möglichst automatisierbar sind.

Aus diesen Gründen haben sich in der Allergenanalytik im wesentlichen zwei Technologien durchgesetzt: der molekularbiologische Nachweis speziesspezifischer DNA-Sequenzen mittels PCR und der immunchemische Nachweis der allergenen Proteine bzw. geeigneter Markerproteine mit Hilfe spezifischer Antikörper.

Aufgrund der einfachen Handhabung und der guten Automatisierbarkeit haben sich bei den immunchemischen Nachweismethoden die Festphasen-Enzymimmuno-Assays (ELISA)- als wichtigstes Routine-Verfahren etabliert.

Dabei ist das häufigste Format für den Nachweis größerer Peptide und Proteine mit mindestens zwei Epitopen der sog. "Sandwich-ELISA", bei dem sich ein erster Antikörper auf der Festphase fixiert befindet, der das gesuchte Protein bindet. Mit Hilfe eines zweiten, enzym-markierten Antikörpers werden die gebundenen Proteine anschließend detektiert und ggf. quantifiziert. Kleinere Analyte mit nur noch einem Epitop, wie z.B. partiell hydrolysierte Proteine aus hypoallergener Babynahrung können dagegen noch mit sog. "kompetitiven" ELISA-Verfahren detektiert werden. Hierbei konkurrieren die fixierten Antigene und die entsprechenden Antigenen aus der Probe um die enzym-markierten Antikörper. Die von den überschüssigen fixierten Antigenen gebundenen Antikörper werden mittel enzym-katalysierter Farbreaktion bestimmt. Ihre Menge ist umgekehrt mit dem Antigengehalt der Probe korreliert.

Abbildung 1: Sandwich-ELISA, a) spezifische Bindung des Analyten (Antigen) an die ELISA-Platte, b) Bindung des enzymmarkierten Antikörpers und Detektion durch Farbreaktion

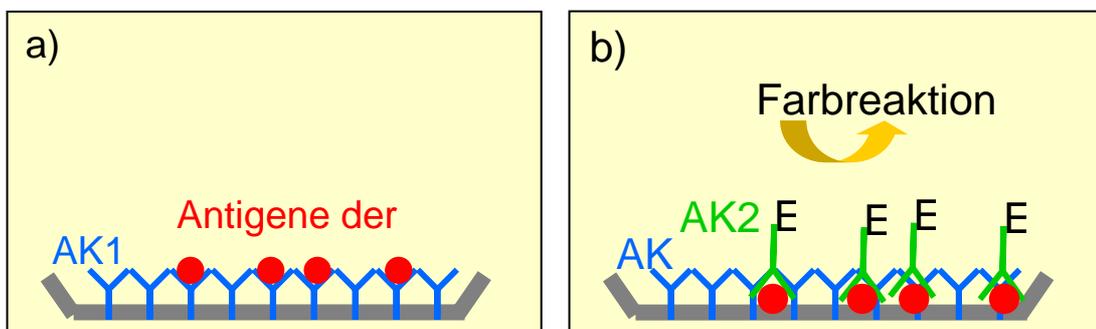
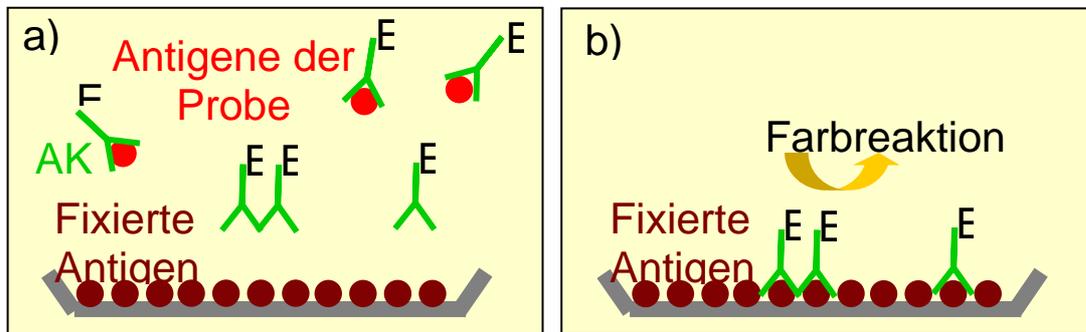
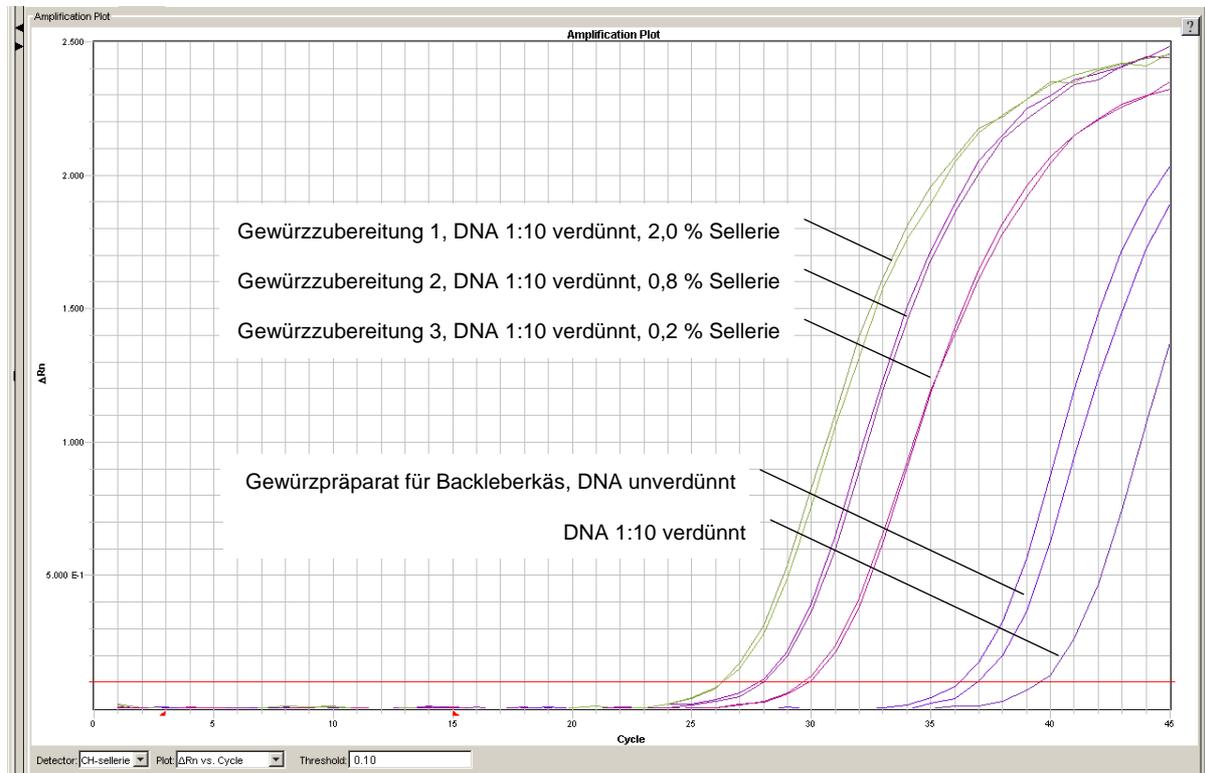


Abbildung 2: Kompetitiver ELISA, a) Zugabe der mit spezifischen Antikörpern inkubierten Probe, b) Detektion der gebundenen, überschüssigen Antikörper nach dem Waschen



Als alternative Technologie zum Nachweis von Proteinen bietet sich der molekularbiologische Nachweis von DNA-Sequenzen an, die für die jeweilige allergene Zutat charakteristisch sind. Nach der Isolation der Gesamt-DNA aus dem Lebensmittel wird die Zielsequenz mit Hilfe der Polymerasekettenreaktion (PCR) so stark vervielfältigt, dass sie letztlich auf einem Agarosegel visualisiert werden kann. Anschließend muss die Identität der gesuchten Sequenz durch eine zweite Methode verifiziert werden. Hierfür können Restriktionsverdau, Sondenhybridisierung, PCR-ELISA oder direkte Sequenzierung des Amplifikats eingesetzt werden. Einfacher, schneller und sicherer als durch die konventionelle PCR wird der Nachweis durch den Einsatz von Real-time PCR-Verfahren. Hier finden Amplifizierung, Detektion und Verifizierung in einem Schritt und im selben Reaktionsgefäß stattfinden. Neben der stark verringerten Kontaminationsgefahr ist auch die gute Automatisierbarkeit des Verfahrens von Vorteil.

Abbildung 3: Real-time PCR-Verfahren zum Nachweis von Sellerie in drei Gewürzzubereitungen mit bekanntem Selleriegehalt und in einer unbekanntem Probe



Welche der beiden Technologien jeweils besser geeignet ist, muss im Einzelfall entschieden werden. Im Hinblick auf die Sensitivität sind beide weitgehend vergleichbar, wobei je nach Lebensmittelmatrix in einigen Fällen ELISA-Methoden in anderen PCR-Verfahren als sensitiver beschrieben werden [6]. Dagegen ist es oftmals leichter hoch spezifische PCR-Nachweismethoden auf der Basis geeigneter DNA-Sequenzabschnitte zu entwickeln, als entsprechende spezifische Antikörper zur Differenzierung nahe verwandter Spezies durch einen immunchemischen Nachweis zu generieren. Vergleicht man die Anwendbarkeit der Technologien bei verarbeiteten Lebensmitteln, so ist die Stabilität des jeweiligen Analyten unter den Verarbeitungsbedingungen entscheidend. Während in erhitzten Lebensmitteln die gesuchten Zielproteine unter Umständen bereits zerstört sein können, ist die DNA als Target auch bei höheren Temperaturen längere Zeit stabil [7] und somit die PCR die geeignetere Methode. Umgekehrt werden Nukleinsäuren in Lebensmitteln mit niedrigem pH-Wert, z.B. eingelegtem Gemüse, schneller degradiert als manche Proteine und es empfiehlt sich die Anwendung eines ELISA-Verfahrens.

Dies gilt ebenso speziell für den Nachweis von Kuhmilch oder Hühnerei. Da die DNA dieser Spezies auch im jeweiligen Fleisch vorkommt, kann mittels PCR die allergene Zutat nicht eindeutig identifiziert werden. Daher ist in diesen Fällen der proteinchemische Nachweis die Methode der Wahl.

Vom Arbeitsaufwand her gesehen bieten ELISA-Methoden einerseits eine relativ einfache Technik mit geringem apparativen Aufwand, andererseits sind die Arbeiten im Vorfeld der Analysen oft umfangreicher, da zur Extraktion verschiedener allergener Proteine die Extraktionsverfahren einzeln optimiert werden müssen. Im PCR-Bereich dagegen kann die einmal aus einem Lebensmittel isolierte genomische DNA als Analyt für die unterschiedlichsten Nachweissystem genutzt werden. Nachteilig wiederum sind insbesondere bei Real-time PCR die hohen Kosten für die erforderlichen Analysengeräte.

Eine umfangreiche Zusammenstellung publizierter und kommerziell erhältlicher Allergen-Nachweismethoden ist in Review-Form [8] bzw. als Internetseite [9] zu finden.

Überwachung der Allergenkennzeichnung am Beispiel von Sellerie

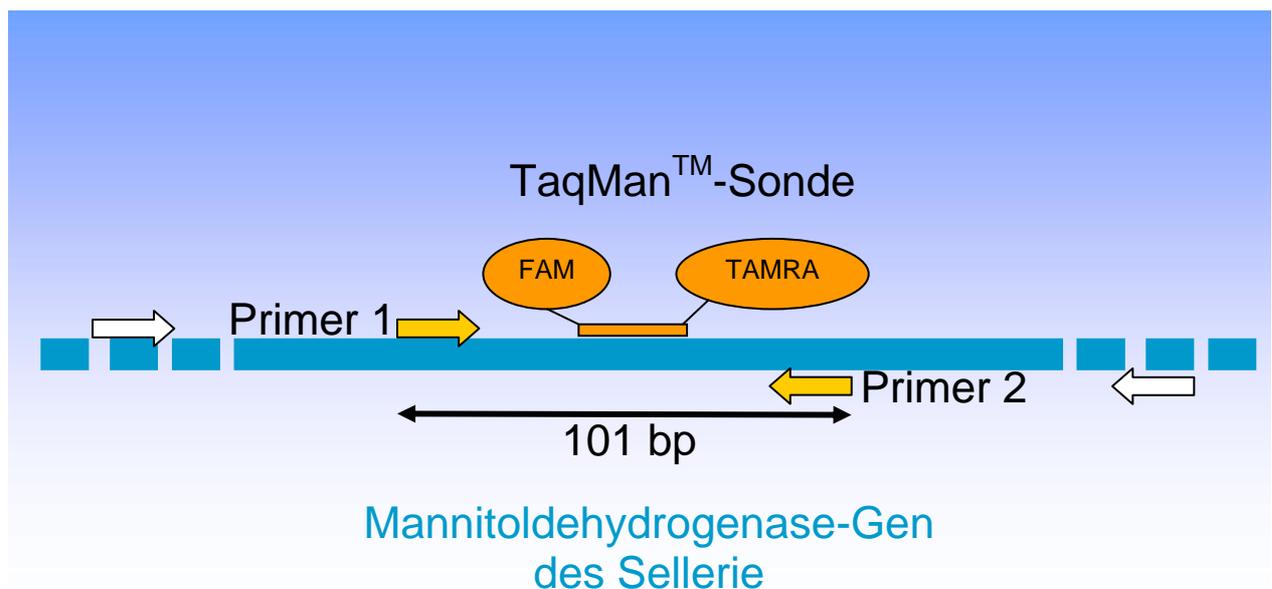
Sellerie ist als eine der häufigsten Allergie auslösenden Zutaten im Erwachsenenalter bekannt [10]. Da er zudem in großem Umfang in der Lebensmittelindustrie eingesetzt wird, ist die korrekte Information der betroffenen Verbraucher über seine Verwendung sowie die Kontrolle der entsprechenden Kennzeichnungsvorschriften von großer Bedeutung.

Abbildung 4: Sellerieprodukte (Trockensuppen) und Sellerieblätter



Bis vor kurzem waren weder geeignete publizierte noch kommerziell erhältliche Nachweis-Systeme für Sellerie verfügbar. Daher wurde am Bayerischen Landesamt für Gesundheit und Lebensmittelsicherheit (LGL) ein spezifischer Real-time PCR-Nachweis entwickelt und umfangreich validiert [11]. Das System basiert auf der Detektion eines spezifischen DNA-Sequenzabschnittes aus dem Gen der Mannitoldehydrogenase des Sellerie. Um falsch positive Signale durch andere evtl. im Lebensmittel enthaltene Bestandteile auszuschließen, wurde die Spezifität für Sellerie gegenüber mehr als 50 tierischer und pflanzlicher Organismen überprüft. Darüber hinaus wurde die Nachweisgrenze anhand von Brühwürsten, die mit bekannten Gehalten an Selleriesaat dotiert waren, bestimmt. Je nach DNA-Extraktionsmethode waren 5-10 ppm noch sicher nachweisbar.

Abbildung 5: Real-time PCR-System zum spezifischen Nachweis von DNA aus Sellerie



Die Methode wurde anschließend im Rahmen eines Schwerpunktprogramms zur Überwachung der korrekten Kennzeichnung von potentiell allergenem Sellerie in 45 Lebensmittelerzeugnissen aus den Bereichen Gewürzmischungen/-präparate, Trockensuppen/-soßen und Suppenpasten eingesetzt.

In elf der insgesamt 13 Produkte, die laut Zutatenverzeichnis Sellerie(-bestandteile) enthielten, konnte die Anwesenheit von Sellerie analytisch bestätigt werden. Die zwei

verbleibenden Produkte, in denen der Nachweis negativ verlief, führten Sellerie als Bestandteil von Gewürzextrakten auf. Dabei sind infolge der starken Verarbeitung (Abtrennung von DNA im Zuge der Extraktion von Aromastoffen mit Lösungsmitteln) kaum noch DNA-Reste zu erwarten. Darüber hinaus besteht, im Falle von Sellerie-Oleoresinen (ein Gewürzextrakt), auf Grund einer Ausnahmeregelung der LMKV auch keine Kennzeichnungspflicht [4, 12].

Unter den 28 Produkten ohne Hinweis auf Sellerie im Zutatenverzeichnis waren zwölf, in denen keine Sellerie-DNA detektiert werden konnte. In neun Proben war der Nachweis dagegen positiv, bei den verbleibenden sieben Produkten waren die Ergebnisse der Mehrfachbestimmung uneinheitlich, was auf die Anwesenheit von Selleriemengen an der Nachweisgrenze hinweist. Auch in den vier Handelsprodukten, die mit einem Hinweis auf mögliche Spuren von Sellerie versehen waren, konnte dieser Bestandteil analytisch bestätigt werden.

Ein positiver Nachweis von Sellerie in nicht gekennzeichneten Produkten bedeutet allerdings nicht zwangsläufig, dass diese falsch deklariert sind. Die Frage nach der Herkunft dieser Sellerie-Anteile bzw. ihre Einordnung als Zutat oder zufällige Kontamination kann mit den verfügbaren analytischen Methoden nicht geklärt werden. Sie ist aber entscheidend für das Auslösen der Kennzeichnungspflicht.

Dies kann nur durch weitere Nachproben und ggf. Betriebskontrollen durch die zuständige Lebensmittelüberwachungsbehörden vor Ort erfolgen, in denen sichergestellt wird, dass der Hersteller seiner Sorgfaltspflicht Genüge geleistet hat und alle zumutbaren Maßnahmen zur Vermeidung oder Minimierung von Kontaminationen getroffen hat.

Referenzen

- [1] Scientific Panel on Dietetic Products; Nutrition and Allergies (2004) The EFSA Journal 32: 1-197,
http://www.efsa.europa.eu/science/nda/nda_opinions/341_en.html
- [2] Burks W., Bannon G., Sicherer S. et al., Peanut-induced anaphylactic reactions. *Int Arch Allergy Immunol*, 1999, 119: 165-172

- [3] EU-Richtlinie 2003/89/EG vom 10. November 2003 zur Änderung der Richtlinie 2000/13/EG hinsichtlich der Angabe der in Lebensmitteln enthaltenen Zutaten. ABl. L 308: 15 vom 25.11.2003
- [4] Verordnung über die Kennzeichnung von Lebensmitteln vom 15.12.1999, BGBl I. 2464, zuletzt geändert am 23.09.2005, BGBl I, 2896
- [5] Hourihane J. O'B., Kilburn S. A., Nordlee J. A., Hefle S. L., Taylor S. L., Warner J. O., An evaluation of the sensitivity of subjects with peanut allergy to very low doses of peanut protein: a randomized, double-blind, placebo-controlled food challenge study. *J. Allergy Clin. Immunol.*, 1997, 100: 596-600.
- [6] Stellungnahme der Lebensmittelchemischen Gesellschaft: Nachweisverfahren für Nahrungsmittelallergene, *Lebensmittelchemie*, 2004, 58: 116
- [7] Hupfer C., Hotzel H., Sachse J., Engel K.-H., Detection of the genetic modification in heat-treated products of Bt maize by polymerase chain reaction, *Z. Lebensm. Unters. Forsch. A*, 1998, 206: 203-207
- [8] Poms R. E., Klein C. L., Anklam E., Methods for allergen analysis in food: a review, *Food Add Contam*, 2003, 21 (1): 1-31
- [9] www.gdch.de/strukturen/lm/ag/bioanal/anbieter_neu.pdf
- [10] Etesamifar, M., Wüthrich, B., IgE-vermittelte Nahrungsmittelallergien bei 383 Patienten unter Berücksichtigung des oralen Allergie-Syndroms, *Allergology*, 1998, 21: 451-457
- [11] Hupfer C., Waiblinger H.-U., Busch U., Development and Validation of a Real-time PCR Detection Method for Celery in Food, *Eur Food Res Technol* (im Druck)
- [12] EU-Richtlinie 2005/26/EG vom 21. März 2005 zur Erstellung eines Verzeichnisses von Lebensmittelzutaten oder Stoffen, die vorläufig aus Anhang IIIa der Richtlinie 2000/13/EG ausgeschlossen werden. ABl. EU vom 22.03.2005 Nr. L 75/33