

## Indirekte Bestimmung von Allergenen in Fleischerzeugnissen mittels Polymerase-Kettenreaktion

Indirect determination of allergens in meat products using polymerase chain reaction

S. ANDRÉE und F. SCHWÄGELE

### Zusammenfassung

Nahrungsmittel- oder Lebensmittelallergien sind eine besondere Form der Nahrungsmittelunverträglichkeit. Sie sind gekennzeichnet durch eine spezifische Überreaktion gegen bestimmte Stoffe, die in der Nahrung enthalten sind und mit ihr aufgenommen werden. Allergene können ungewollt und unbeabsichtigt z.B. durch Kreuzkontamination bei der Produktion in Nahrungsmittel allgemein, und so auch in Fleischerzeugnisse gelangen. Diese versteckten Allergene, die oft nur in Spuren vorhanden sind, stellen eine erhebliche Gefährdung der Gesundheit allergischer Personen dar. Um die Sicherheit potentiell gefährdeter Konsumenten zu gewährleisten, ist eine konzertierte Aktion der Lebensmittelproduzenten, der Legislative und der Kontrollbehörden zwingend erforderlich. Eines der dazu notwendigen Werkzeuge ist die Entwicklung verlässlicher Methoden, die in der Lage sind, Allergene bereits in Spuren in verschiedenen Nahrungsmitteln spezifisch nachzuweisen.

Potentiell geeignete Analysemethoden auf DNA (Desoxyribonukleinsäure)-Basis aus der wissenschaftlichen Literatur wurden auf ihre Anwendbarkeit für die Matrix Fleischerzeugnis geprüft und zum indirekten Nachweis der potentiell allergenen Bestandteile Weizen, Gerste, Roggen, Erbse, Soja, Erdnuss und Sellerie mittels Polymerase-Kettenreaktion (PCR) eingesetzt.

### Summary

Food allergies represent an important health problem in industrialized countries. They are characterized by a specific overreaction of the immune system to foreign substances deriving from food. Undeclared allergens, unintentionally introduced in the food chain by cross contamination, pose a major risk to sensitized persons. More often than not the content of these allergenic substances is on the level of only traces. Reliable detection and quantification methods at trace level are necessary for food allergens to improve consumer protection. Methods available so far are based on protein or DNA detection. Within the scope of the current study several literature based methods using DNA as target analyte were reviewed for their applicability to the detection of potentially allergenic substances such as wheat, barley, rye, pea, soy, peanut and celery within processed meat products.

---

**Schlüsselwörter** Allergene – Fleischerzeugnisse – PCR – Elektrophorese

**Key Words** allergens – meat products – PCR – electrophoresis

---

### Allergie

Nahrungsmittel- oder Lebensmittelallergien sind eine besondere Form der Nahrungsmittelunverträglichkeit. Sie sind gekennzeichnet durch eine spezifische Überreaktion gegen bestimmte Stoffe, die in der Nahrung enthalten sind und mit ihr aufgenommen werden. Nahrungsmittelallergien äußern sich in Reaktionen der

Schleimhaut, zum Beispiel in Form von Schleimhautschwellungen im gesamten Mund- und Rachenraum, Juckreiz und Anschwellen der Zunge. Symptome im Magen-Darm-Bereich sind Übelkeit, Erbrechen und Durchfall. Nahrungsmittelallergien können aber auch zu Reaktionen der Atemwege (allergische Rhinitis, allergisches Asthma), der Haut (atopische Dermatitis) sowie zu Gelenkerkrankungen

(Arthritis) führen. Um akute und potentiell lebensbedrohliche allergische Reaktionen zu verhindern, sind Betroffene auf eine erfolgreiche Vermeidung der entsprechenden Allergene angewiesen. In diesem Zusammenhang spielt die Kennzeichnung von allergenen Nahrungsmittelbestandteilen eine entscheidende Rolle.

### Allergenkennzeichnung

Das Problem der Deklaration von potentiell allergenen Zutaten – zumindest der kennzeichnungspflichtigen Hauptallergene – in verpackten Lebensmitteln ist eindeutig geregelt (2007/68/EG und Lebensmittel-Kennzeichnungsverordnung (LMKV) (gem. Verordnung zur Änderung der Lebensmittel-Kennzeichnungsverordnung vom 18. Dezember 2007), Anlage 3).

In diesem Sinne kennzeichnungspflichtige Zutaten sind (gekürzt):

- Glutenthaltiges Getreide (Weizen, Roggen, Gerste, Hafer, Dinkel, Kamut oder deren Hybridstämme) und daraus gewonnene Erzeugnisse
- Krebstiere und Krebserzeugnisse
- Eier und -erzeugnisse
- Fisch und -erzeugnisse
- Erdnüsse und Erdnusserzeugnisse
- Sojabohnen und daraus gewonnene Erzeugnisse
- Milch und -erzeugnisse (einschließlich Laktose)
- Schalenfrüchte, d. h. Mandeln, Pistazien, Hasel-, Wal-, Kaschu-, Pekan-, Para- bzw. Makadamia- und Queenslandnüsse und daraus gewonnene Erzeugnisse
- Sellerie und -erzeugnisse
- Senf und -erzeugnisse
- Sesamsamen und -erzeugnisse
- Schwefeldioxid und Sulfite (Konzentration mehr als 10 mg/kg oder 10mg/l) ausgedrückt als SO<sub>2</sub>
- Lupinen und daraus gewonnene Erzeugnisse
- Weichtiere und daraus gewonnene Erzeugnisse

Ausgenommen von der Kennzeichnungspflicht sind eine Reihe von Erzeugnissen aus den o.g. Zutaten, wie z.B. Glucose-sirupe, Fischgelatine, Lactit usw. für die wissenschaftlich nachgewiesen wurde, dass sie unter bestimmten Umständen wahrscheinlich keine unerwünschten Reaktionen hervorrufen.

Weniger eindeutig und durchaus komplizierter stellt sich die Situation bei potentiell allergenen Stoffen dar, die zufällig und unbeabsichtigt in ein Lebensmittel gelangen. Dies kann auf unterschiedlichen Wegen erfolgen: bereits beim Anbau auf dem Acker, bei Ernte, Transport und Lagerung, auf technischen Anlagen – besonders bei Produktwechsel in Förder- und Mischeinrichtungen, durch Stäube oder durch die Verwendung nicht sortenreinen Reworks. Diese „Verunreinigungen“ stellen im Sinne der o.g. Verordnungen keine Zutaten dar. Es besteht in diesem Fall keine Deklarationspflicht. Wohl aber greifen hier die produkthaftungsrechtlichen Instruktionspflichten. Im Ergebnis steht zumeist ein Hinweis im Anschluss an die Zutatenliste: Kann Spuren von „xy“ enthalten. Ein solcher Hinweis ist freiwillig und kann in der Wortwahl sehr unterschiedlich ausfallen. Immer mehr Lebensmittel werden so gekennzeichnet, auch wenn sie keine potentiell allergenen Bestandteile enthalten. Dies schränkt die Lebensmittelauswahl für Allergiker unnötig ein.

Zur Frage der Kennzeichnung auch von Spuren allergener Bestandteile gibt es international verschiedene Ansätze wie das Australische „VITAL-Konzept“. In der Schweiz existiert seit 1999 ein Grenzwert von 1 g allergener Zutat pro Kilogramm bzw. Liter (also 0,1 %) wobei hier zusätzlich auf die Möglichkeit einer Belastung mit geringeren Mengen hingewiesen werden darf. In Deutschland oder auch EU-weit gibt es bisher keine verbindliche Regelung zu diesem Thema. In diesem Zusammenhang spielen auch Erkenntnisse über Dosis-Wirkungs-Beziehungen von Allergenen und eine mögliche Festlegung von Schwellenwerten für Allergene in Lebensmitteln eine wichtige Rolle (Stellungnahme Nr. 002/2010 des BfR, 2009).

## Allergenanalytik

Mit Blick auf den Stand der Zuverlässigkeit der Allergenanalytik bei Lebensmitteln besteht noch deutlicher Forschungsbedarf. Besonderer Wert wäre hier auf die Validierung der existierenden Methoden zu legen, vorzugsweise in Laborvergleichsuntersuchungen, für das jeweilige Lebensmittel bzw. die jeweilige Matrix.

Derzeit zielen Methoden zum Nachweis von Allergenen in Nahrungsmitteln in zwei prinzipielle Richtungen. Die Mehrzahl der z. Zt. etablierten Methoden basiert auf der direkten immunologischen Detektion des Allergie auslösenden Proteins mittels Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA). DNA-basierende Methoden, wie die Polymerase-Kettenreaktion (PCR), sind sehr spezifisch und stellen ein hoch sensitives Instrument zur Detektion des potentiell allergenen Nahrungsmittels dar. Allerdings detektieren sie das Allergie auslösende Agens nicht direkt. Die Ergebnisse korrelieren also nicht notwendigerweise direkt mit der tatsächlichen allergenen Belastung. Außerdem ist nicht auszuschließen, dass Proteine (Allergene) und DNA innerhalb des Produktionsprozesses unterschiedlich beeinflusst werden (van HENGEL, 2007; MONACI und VISCONTI, 2010). Trotz dieser limitierenden Faktoren bieten DNA basierte Methoden zur Allergenanalytik auch deutliche Vorteile. Der Analyt, die Ziel-DNA, ist bei der Extraktion weniger labil als ein zu extrahierendes Protein. Außerdem ist DNA gegenüber geographischen und saisonalen Einflüssen sehr stabil, während es nicht auszuschließen ist, dass sich die Protein-

zusammensetzung unter diesen Umständen verändert.

## Zielstellung

In der aktuellen Literatur ist eine Vielzahl von PCR-Primersystemen zur Bestimmung von Allergenen beschrieben. Nicht immer ist die Anwendbarkeit dieser Systeme für die Matrix Fleischerzeugnis geprüft bzw. verifiziert worden. Ziel der vorliegenden Arbeit war, in einer breit angelegten Studie die Eignung einer Auswahl dieser Systeme zu prüfen und ihre Leistungsfähigkeit bzw. Sensitivität in einer herkömmlichen PCR mit nachfolgender Polyacrylamidgelelektrophorese (PAGE) zu verifizieren. Dabei konnte auf bereits vorhandenes Probenmaterial zurückgegriffen werden.

## Material

Im Rahmen des EU-Projektes MolSpec-ID (QLK1-CT-02373) wurde eine Reihe von Fleischerzeugnissen definierter Zusammensetzung hergestellt. Diese enthalten auch potentiell allergene Bestandteile wie Weizen, Gerste, Roggen, Erbse, Soja, Erdnuss und Sellerie in Masseanteilen von 0,01 bis 1 %.

Die Rezepturen setzen sich außerdem wie folgt zusammen: Gesamtfleischanteil 50 % (Schwein, Ziege, Känguru und Strauß in veränderlichen Anteilen), Hafer (2,00-8,64 %), pflanzl. Öl (20 %), NaCl (1,5 %), Gewürze (0,25 %; Pfeffer (62 %), Muskat (25,2 %), Kardamom (12 %), Zimt (0,8 %)), Phosphat (0,22 %), Ascorbat (0,03 %).

Tab. 1: Fleischerzeugnisse mit unterschiedlichen Allergengehalten

Probe	Weizen	Gerste	Roggen	Erbse	Soja	Erdnuss	Sellerie
Anteil am Produkt in %							
S9	0,01	0	0,2	0,1	0,05	0,01	1
S10	0,05	1	0	0,2	0,1	0,05	0,2
S11	0,1	0,01	1	0	0,2	0,1	0,1
S12	0,2	0,05	0,01	1	0	0,2	0,05
S13	1	0,1	0,05	0,01	1	0	0,01
S14	0	0,2	0,1	0,05	0,01	1	0
S15	1	1,3	1,2	0,8	0,9	1,5	1,3

## Methoden

Aus diesen Proben wurde mittels eines modifizierten CTAB-Protokolls DNA extrahiert (BINKE, 2004). Für die Analyten Erdnuss und Gerste war ein weiterer Aufreinigungsschritt notwendig (QIAquick® PCR Purification Kit). Im Rahmen einer Literaturrecherche wurden potentiell geeignete

Primersysteme identifiziert. Diese wurden in einer Polymerase-Kettenreaktion mit anschließender gelelektrophoretischer Trennung und Anfärbung des Polyacrylamidgels mit Ethidiumbromid eingesetzt. Wenn notwendig, wurden Anpassungen im PCR-Protokoll vorgenommen. Außerdem wurden regelmäßig Positiv- und eine Vielzahl von Negativkontrollen mitgeführt.

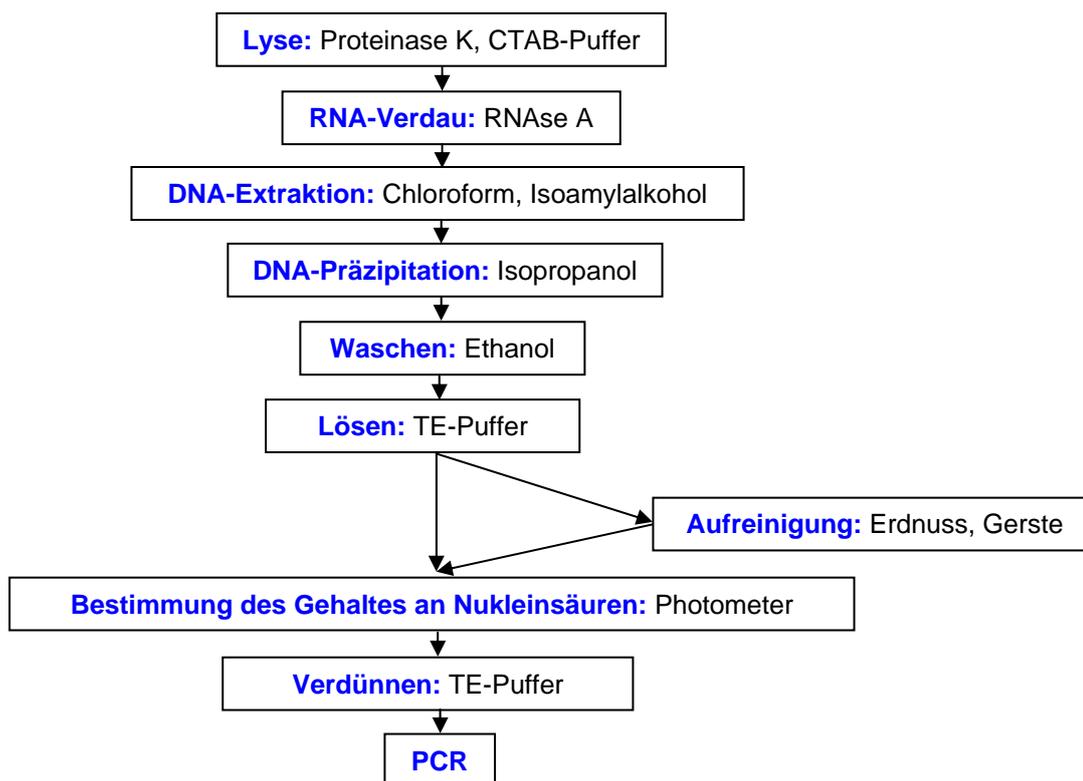


Abb. 1: Modifiziertes CTAB-Protokoll zur DNA-Extraktion

Tab. 2: Eingesetzte Primersysteme

Allergen	Literatur	Zielgen	Produktlänge [bp]
Weizen	JAMES und SCHMIDT (2004)	<i>trn L</i>	397
Weizen	SANDBERG <i>et al.</i> (2003)	<i>ω-Gliadin</i>	181
Gerste	SANDBERG <i>et al.</i> (2003)	<i>Hordein</i>	164
Roggen	SANDBERG <i>et al.</i> (2003)	<i>ω-Secalin</i>	181
Erbsen	BREŽNÁ <i>et al.</i> (2005)	<i>Intron zwischen trn L und trn F</i>	92
Soja	MEYER <i>et al.</i> (1996)	<i>LE1</i>	74
Erdnuss	HIRD <i>et al.</i> (2003)	<i>Ara h 2</i>	86
Sellerie	HUPFER <i>et al.</i> (2007)	<i>Mannitol-Dehydrogenase</i>	101

## Ergebnisse

Die Abbildungen 2 bis 9 zeigen die Ergebnisse der entsprechenden Polymerasekettenreaktionen unter Verwendung der oben beschriebenen Primersysteme. Im Anschluss an die PCR erfolgte eine Auftrennung der Amplifikationsprodukte mittels Polyacrylamidgelelektrophorese. Die Detektion erfolgte unter Anregung im ultravioletten Licht nach Zugabe vom Ethidiumbromid. Prinzipiell traten in keinem Fall Querempfindlichkeiten zwischen den untersuchten allergenen Spezies auf. In eini-

gen Fällen wurden unspezifische Amplifikationsprodukte beobachtet. Dies war vor allem der Fall bei der Bestimmung von Roggen-DNA nach SANDBERG *et al.* (2003). Alle Zielspezies konnten bis zu einem Gehalt von 0,05 w/w % bzw. 0,01 w/w % sicher nachgewiesen werden. Somit sind die geprüften Primersysteme unter Anwendung der oben beschriebenen Untersuchungsmethoden zum Nachweis der Zielspezies in geringsten Konzentrationen in Fleischerzeugnissen, speziell Brühwurst, geeignet.

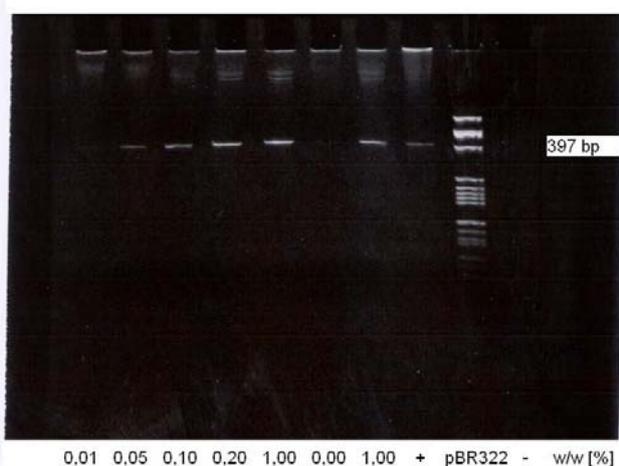


Abb. 2: Nachweis von Weizen-DNA in Fleischerzeugnissen mit Gehalten von 0,01 bis 1,00 % w/w.  
Primer: JAMES und SCHMIDT (2004),  
+ Positivkontrolle, - Negativkontrolle,  
pBR322 Molekulargewichtsmarker

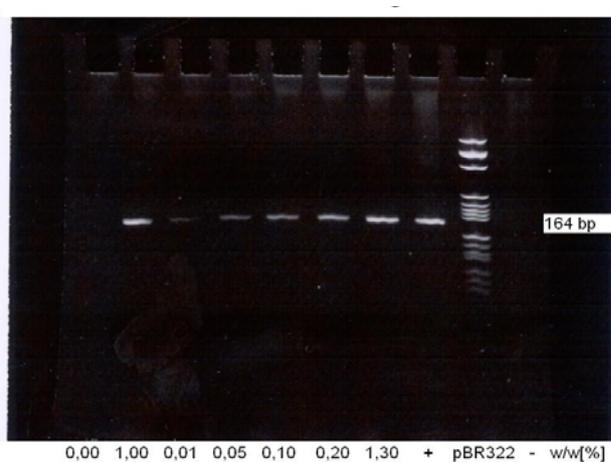


Abb. 4: Nachweis von Gersten-DNA in Fleischerzeugnissen mit Gehalten von 0,01 bis 1,00 % w/w.  
Primer: SANDBERG *et al.* (2003),  
+ Positivkontrolle, - Negativkontrolle,  
pBR322 Molekulargewichtsmarker

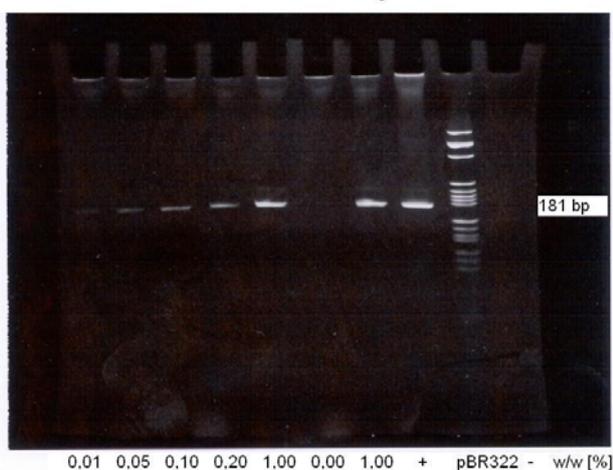


Abb. 3: Nachweis von Weizen-DNA in Fleischerzeugnissen mit Gehalten von 0,01 bis 1,00 % w/w.  
Primer: SANDBERG *et al.* (2003),  
+ Positivkontrolle, - Negativkontrolle,  
pBR322 Molekulargewichtsmarker

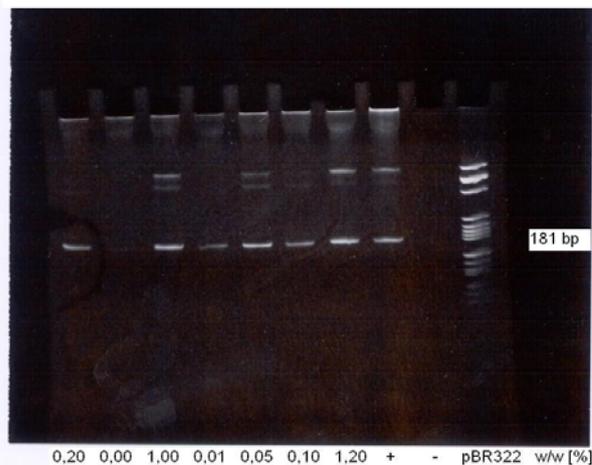


Abb. 5: Nachweis von Roggen-DNA in Fleischerzeugnissen mit Gehalten von 0,01 bis 1,00 % w/w.  
Primer: SANDBERG *et al.* (2003),  
+ Positivkontrolle, - Negativkontrolle,  
pBR322 Molekulargewichtsmarker

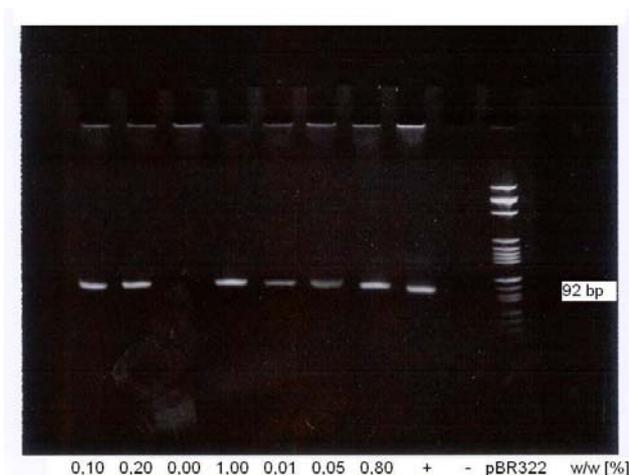


Abb. 6: Nachweis von Erbsen-DNA in Fleisch-erzeugnissen mit Gehalten von 0,01 bis 1,00 % w/w.  
Primer: BREŽNÁ *et al.* (2005),  
+ Positivkontrolle, - Negativkontrolle,  
pBR322 Molekulargewichtsmarker

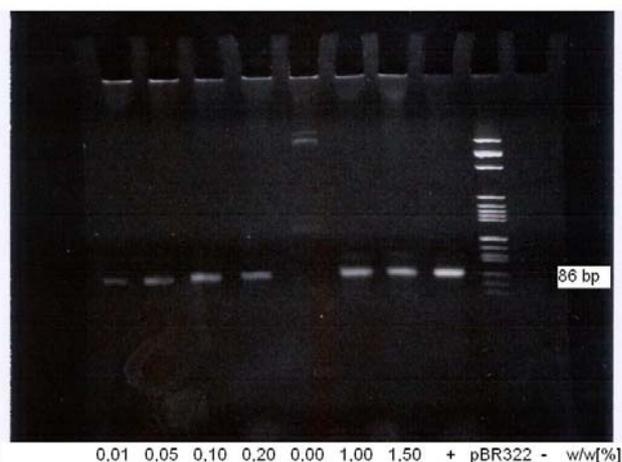


Abb. 8: Nachweis von Erdnuss-DNA in Fleisch-erzeugnissen mit Gehalten von 0,01 bis 1,00 % w/w.  
Primer: HIRD *et al.* (2003),  
+ Positivkontrolle, - Negativkontrolle,  
pBR322 Molekulargewichtsmarker

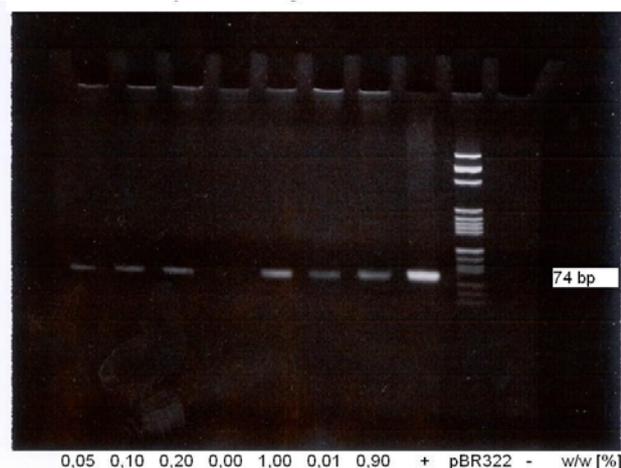


Abb. 7: Nachweis von Soja-DNA in Fleisch-erzeugnissen mit Gehalten von 0,01 bis 1,00 % w/w.  
Primer: MEYER *et al.* (1996),  
+ Positivkontrolle, - Negativkontrolle,  
pBR322 Molekulargewichtsmarker

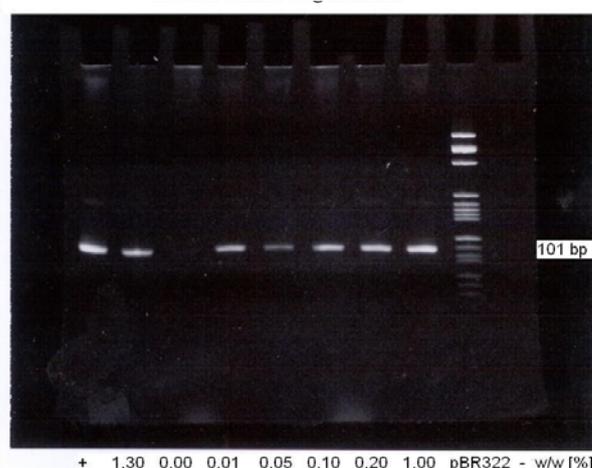


Abb. 9: Nachweis von Sellerie-DNA in Fleisch-erzeugnissen mit Gehalten von 0,01 bis 1,00 % w/w.  
Primer: HUPFER *et al.* (2007),  
+ Positivkontrolle, - Negativkontrolle,  
pBR322 Molekulargewichtsmarker

### Schlussfolgerung und Ausblick

Die Anwendung von in der Literatur beschriebenen Nachweismethoden für Allergene auf DNA-Basis auf eine andere Matrix bzw. ein neues Lebensmittel ist unter bestimmten Voraussetzungen möglich. In jedem Fall ist eine gründliche Überprüfung der Anwendbarkeit der DNA-Extraktionsmethoden unabdingbar. Die Tauglichkeit einer bestimmten Extraktionsmethode beeinflusst unmittelbar die Effektivität des späteren Nachweises. Ebenfalls überprüft

und angepasst werden müssen die entsprechenden PCR-Protokolle. Erst nach Validierung für die spezielle Matrix lassen sich Parameter wie Empfindlichkeit und Richtigkeit der Methoden abschätzen.

Für die vorliegenden Systeme war dies der Fall. In der Zukunft soll der Einsatz der empfindlicheren Real-Time PCR geprüft werden. Besonderes Augenmerk wird hier auf den sogenannten Glutenbildnern Weizen, Gerste und Roggen mit Bezug auf die Spezifität der PCR liegen.

Die vorliegenden Ergebnisse wurden im Rahmen einer Praktikumsarbeit durch Herrn Mathias Passing, Fachhochschule Weihenstephan, Fachbereich Biotechnologie erarbeitet.

## Literatur

Binke, R. (2004): Optimierung von DNA-analytischen Methoden zur Identifizierung und Quantifizierung von tierischen Bestandteilen in Fleischerzeugnissen, Dissertation, Universität Hamburg, Fachbereich Chemie

Brežná, B., Hudecová, L., und Kuchta, T. (2006): Detection of pea in food by real-time polymerase chain reaction (PCR). *Eur Food Res Technol*, 222, 600-603

Hird, H., Lloyd, J., Goodier, R., Brown, J. und Reece, P. (2003): Detection of peanut using real-time polymerase chain reaction. *Eur Food Res Technol*, 217, 265-268

Hupfer, C., Waiblinger, H-U. und Busch, U. (2007): Development and validation of a real-time PCR detection method for celery in food. *Eur Food Res Technol*, 225, 329-335

James, D. und Schmidt, A.-M. (2004): Use of an intron region of a chloroplast tRNA gene (*trnL*) as a target for PCR identification of specific food crops including sources of potential allergens. *Food Research International*, 37, 395-402

Lebensmittel-Kennzeichnungsverordnung (1999) in der Fassung der Bekanntmachung vom 15. Dezember 1999. *Bundesgesetzblatt*, I, S. 2464

Meyer, R., Chardonens, F., Hübner, P und Lüthy, J. (1996): Polymerase chain reaction (PCR) in the quality and safety assurance of food: detection of soya in processed meat products. *Z Lebensm Unters Forsch*, 203, 339-344

Monaci, L. und Visconti, A. (2010): Immunochemical and DNA-based methods in food allergen analysis and quality assurance perspectives. *Trends in Food Science & Technology*, 21, 272-283

Richtlinie 2007/68/EG (2007) der Kommission vom 27. November 2007 zur Änderung von Anhang IIIa der Richtlinie 2000/13/EG des Europäischen Parlaments und des Rates hinsichtlich bestimmter Lebensmittelzutaten (Text von Bedeutung für den EWR). *Amtsblatt der Europäischen Union*, L 310, 11-14

Sandberg, M., Lundberg L., Ferm, M. und Malmheden Yman, I. (2003): Real time PCR for the detection and discrimination of cereal contamination in gluten free foods. *Eur Food Res Technol*, 217, 344-349

Stellungnahme des BfR (2009): Bessere Allergenkennzeichnung von Lebensmitteln für den Verbraucher: Schwellenwerte können derzeit noch nicht zuverlässig festgelegt werden. Nr. 002/2010

Van Hengel, A. J. (2007): Food allergen detection methods and the challenge to protect food-allergic consumers. *Anal Bioanal Chem*, 389, 111-118

Verordnung zur Änderung der Lebensmittelkennzeichnungsverordnung und der Kosmetik-Verordnung (2007) vom 18. Dezember 2007. *Bundesgesetzblatt*, I, S. 3011