Analytische Methoden zur Detektion versteckter Allergene - Anwendungen und Limitationen

Autor(en): **Hischenhuber, Claudia**

Objekttyp: **Article**

Zeitschrift: **Mitteilungen aus Lebensmitteluntersuchungen und Hygiene = Travaux de chimie alimentaire et d'hygiène**

Band (Jahr): **93 (2002)**

Heft 6

PDF erstellt am: **24.05.2024**

Persistenter Link: https://doi.org/10.5169/seals-981742

Nutzungsbedingungen

Die ETH-Bibliothek ist Anbieterin der digitalisierten Zeitschriften. Sie besitzt keine Urheberrechte an den Inhalten der Zeitschriften. Die Rechte liegen in der Regel bei den Herausgebern.
Die auf der Plattform e-periodica veröffentlichten Dokumente stehen für nicht-kommerzielle Zwecke in Lehre und Forschung sowie für die private Nutzung frei zur Verfügung. Einzelne Dateien oder Ausdrucke aus diesem Angebot können zusammen mit diesen Nutzungsbedingungen und den korrekten Herkunftsbezeichnungen weitergegeben werden.
Das Veröffentlichen von Bildern in Print- und Online-Publikationen ist nur mit vorheriger Genehmigung der Rechteinhaber erlaubt. Die systematische Speicherung von Teilen des elektronischen Angebots auf anderen Servern bedarf ebenfalls des schriftlichen Einverständnisses der Rechteinhaber.

Haftungsausschluss

Alle Angaben erfolgen ohne Gewähr für Vollständigkeit oder Richtigkeit. Es wird keine Haftung übernommen für Schäden durch die Verwendung von Informationen aus diesem Online-Angebot oder durch das Fehlen von Informationen. Dies gilt auch für Inhalte Dritter, die über dieses Angebot zugänglich sind.

Ein Dienst der *ETH-Bibliothek*
ETH Zürich, Rämistrasse 101, 8092 Zürich, Schweiz, www.library.ethz.ch

http://www.e-periodica.ch

Analytische Methoden zur Detektion versteckter Allergene – Anwendungen und Limitationen*

Claudia Hischenhuber, Nestlé Research Center, Quality & Safety Assurance Department, Lausanne

Einleitung

Der Lebensmittelallergiker braucht ausreichende und korrekte Informationen über die Zusammensetzung der Nahrung, um sein/ihr spezifisches Lebensmittelallergen vermeiden zu können. Vorbeugende Massnahmen, die zum Ziel haben, potentielle allergische Reaktionen zu vermeiden, müssen sowohl von den allergischen Konsumenten als auch von den Nahrungsmittelproduzenten ergriffen werden: Der Lebensmittelallergiker muss eine gezielte Wahl treffen können und der Produzent muss ihm diese Wahl ermöglichen. Der Lebensmittelhersteller hat ein Instrumentarium zur Verfügung, welches ihm erleichtert, mit dem Allergenproblem fertig zu werden und das man mit drei Schlagworten zusammenfassen kann: adäquate GMP (Good Manufacturing Practices), volle Integration der Allergengefahren in den HACCP Plan (Hazard Analysis of Critical Control Points) und adäquate Lebensmittelkennzeichnung (1).

Um sicherzustellen, dass keine ungekennzeichneten «versteckten» Allergene in Rohmaterialien oder Fertigprodukten vorhanden sind, brauchen wir unter anderem analytische Methoden zur qualitativen/semiquantitativen Bestimmung von kritischen Allergenen. Die heute am meisten angewandten Methoden sind immunologische Tests (vor allem sogenannte ELISA Tests, enzyme linked immunosorbent assays, wobei verschiedene Formate zum Einsatz kommen und entweder Proteine oder monoklonale bzw. polyklonale Antikörper gegen die zu detektierenden Proteine auf einer Mikrotiterplatte fixiert sind). Manchmal werden auch andere immunologische Methoden, wie Westernblot, Immunelektrophorese oder Dipsticks (z.B. ein neu entwickelter Glutenschnelltest) verwendet. Schlussendlich wird auch die DNA-Analytik eingesetzt (qualitative oder semi-quantitative PCR), um indirekt über die DNS als Markersubstanz, das allergene Nahrungsmittel zu detektieren oder semi-quantitativ zu bestimmen.

* Vortrag gehalten an der 114. Jahresversammlung der Schweizerischen Gesellschaft für Lebensmittel- und Umweltchemie, Zürich, 30. August 2002

Mehrere Punkte sollten jedoch kritisch durchleuchtet werden, wenn man Methoden zur Allergendetektion in Lebensmitteln entwickelt, validiert und schliesslich anwendet, wie zum Beispiel: Ist die Nachweisgrenze sinnvoll? Ist der effektiv gemessene Parameter aussagekräftig? Ist die Methode für die fragliche Lebensmittelmatrix geeignet? Und schliesslich, ein nicht zu vernachlässigender Punkt: Geben die Analysenresultate individueller Muster eine sinnvolle Information bezüglich der Sicherheit eines bestimmten Produktes für den Allergiker?

Nachweisgrenze analytischer Methoden

Die Methoden sollten empfindlich genug sein, d.h. Allergenkonzentrationen, die in einer Mahlzeit allergische Reaktionen hervorrufen können, sollten nachweisbar sein. Heute kann leider noch keine präzise Antwort auf die Frage nach Allergenschwellenwerten für die wichtigsten kritischen allergenen Lebensmittel gegeben werden, d.h. für die sogenannten «Big eight» (Erdnüsse, Hartschalenobst, Milch, Ei, Soja, Fisch, Krustentiere, Weizen und andere glutenhaltige Zerealien). Trotz Fehlen einer definitiven Antwort gibt es wichtige wissenschaftliche Hinweise, wo diese Schwellenwerte ungefähr liegen, so wie die niedrigste Dosis, die bei oraler Provokation (double-blind, placebo controlled food challenges, DBPCFC) eine Reaktion hervorgerufen hat (2), klinische Experimente zur Bestimmung der Schwellenwertdosis (3), publizierte Fallstudien von unerwartetem Verzehr von Allergenen, wobei im Rest des fraglichen Lebensmittels die Allergenkonzentration bestimmt werden konnte (4) usw. Auch wenn weitere Forschungsergebnisse vorliegen, werden die Kliniker nicht garantieren können, dass der allerempfindlichste existierende Patient identifiziert wurde. Es sollte jedoch möglich werden, die Dosis der kritischen Allergene zu ermitteln, die die überwiegende Mehrzahl der Allergiker verträgt. Was Erdnüsse, Milch und Kabeljau betrifft, scheinen diese Mengen im niedrigen Milligrammbereich, bezogen auf das Gesamtprotein bzw. bezogen auf das allergenhaltige Lebensmittel, zu liegen. Folglich, wenn man das Gewicht eines Lebensmittels berücksichtigt, das während einer Mahlzeit gegessen wird, sollten Nachweisgrenzen im Bereich von einigen ppm (mg/kg Lebensmittel) ausreichend sein. Zur Zeit gibt es bereits mehrere kommerziell erhältliche ELISA Kits, die dieser Anforderung genügen, z.B. für Erdnüsse, Haselnüsse, Gluten, Ei und Milchproteine (Kasein und Molkenprotein). Unserer Meinung nach ist zur Zeit mehr Bedarf, empfindliche und zuverlässige Tests für die anderen Hauptallergene, wie Mandeln, Baumnüsse, Shrimps oder Fisch (individuelle Fischarten bzw. eine «Fischsonde») zu entwickeln als die Nachweisgrenzen weiter hinunterzudrücken. Wie sollten wir beispielsweise ein gerade noch positives Resultat für Haselnussprotein interpretieren, wenn, angenommen, die Nachweisgrenze wenige ppb beträgt?

Was wird eigentlich gemessen – was sollte gemessen werden?

Wenn wir bestimmen wollen, ob Spuren des potentiell schadenden Lebensmittels anwesend sind, gibt es mehrere mögliche Strategien: entweder, man misst ein

oder mehrere Proteine, die für allergische Reaktionen verantwortlich sind, oder einen Cocktail von mehr oder weniger allergenen Proteinen, oder ein spezifisches Protein, das zwar nicht besonders allergen, aber gut aus der Lebensmittelmatrix zu extrahieren ist, oder man misst gar eine andere Markersubstanz, deren Konzentration mit derjenigen der Allergene des Lebensmittels gut korreliert, z.B. Soja-DNS in Sojaproteinisolat. Auf der anderen Seite wäre es unsinnig, Soja-DNS als Markersubstanz für Sojasosse zu verwenden, da Soja-DNS aus diesem Produkt nur schwer oder gar nicht mittels PCR amplifizierbar ist, aber durchaus potentiell allergene Proteine und Peptide vorhanden sind. All diese Strategien haben offensichtlich Vor- und Nachteile. Es kann aber geschlossen werden, dass solange die Korrelation zwischen der gemessenen Substanz und den allergenen Proteinen besteht, die alternativen Strategien zur Lebensmittelanalyse oft zielführender sind als die Messung eines hochallergenen Proteins. Ferner sollte berücksichtigt werden, welche Proteinfraktion möglicherweise im Lebensmittel in Spuren vorhanden ist. So sollte klarerweise nicht ein Kaseintest, sondern ein Betalactoglobulintest verwendet werden, wenn man nach Molkenspuren sucht. Andererseits ist Kasein viel hitzestabiler und beim Untersuchen von Milchspuren in stark hitzebehandelten Lebensmitteln ist ein Kaseintest vorzuziehen.

Matrixeffekte

ELISA Tests können wunderbar für Lebensmittel wie Eiscreme funktionieren und ein kompletter Misserfolg für Bitterschokolade oder andere tanninhaltige Produkte sein, wenn ungeeignete Extraktionsprozeduren verwendet werden. Als Beispiel sei ein ELISA zum Erdnussnachweis genannt, mit dem erst dann gute Wiederfindungsraten für direkt inkorporierte Erdnüsse in Bitterschokolade gefunden wurden, als die Extraktionprozedur durch Zusatz von Fischgelatine modifiziert wurde. Die mangelhafte Extraktion wurde jedoch nicht erkannt, als nur Proteinlösungen zum Lebensmittel zugesetzt wurden (5). Eiprotein in stark erhitzten Lebensmitteln wie Biskuits oder sterilisierten Waren kann kaum aus dem Lebensmittel extrahiert bzw. nur ungenügend von Anti-Ovalbumin-Antikörpern erkannt werden, während gute Resultate für Eispuren in Teigwaren erzielt wurden. α-Gliadine sind kaum aus walzengetrockneten Kinderzerealien oder ähnlich erhitzten Produkten extrahierbar. Aus diesem Grund sollten Immunoassays zum Glutennachweis in verarbeiteten Lebensmitteln nicht mit α-Gliadin-Antikörpern, sondern mit Antikörpern gegen die hitzestabilen ω-Gliadine bzw. mit Gliadincocktail-Antikörpern verwendet werden.

Sinn und Unsinn von Allergenanalysen in Lebensmitteln

Im Fall eines Verdachts auf eine allergische Reaktion auf ein spezifisches Produkt kann die Analyse des übriggebliebenen Rests wertvolle Aufschlüsse geben.

Analysen können auch sehr nützlich zur Validierung der Reinigungseffizienz sein, wenn man auf einer Produktionslinie von einem ein spezifisches Allergen ent-

haltenden Lebensmittel auf ein anderes, dieses Allergen nicht enthaltendes umstellt. Man muss jedoch kritisch untersuchen, ob nicht die visuelle Inspektion der Linie und der Hausverstand sagen, dass die Beseitigung von kleinen Spuren unmöglich ist. In diesem Fall sind Allergentests unter Umständen sogar kontraproduktiv (z.B. wenn der Allergenkreuzkontakt heterogen verteilt ist). Was sagen negative Resultate von 10 Mustern aus, wenn im 11. Paket möglicherweise ein Haselnussstückchen versteckt ist? Die Kennzeichnung von möglichen Haselnussspuren ist in diesem Fall klarerweise angezeigt. Ein anderes Problem ist die Analyse von Rohmaterialien: wenn wir keine ausreichenden Kenntnisse der Installationen des Lieferanten haben, können Einzelanalysen von Rohmaterialmustern absolut unrepräsentativ sein. Als Beispiel sei ein Lieferant erwähnt, der auf derselben Linie Haselnuss- und Erdnusspaste herstellt. Die Analyse eines isolierten Musters Haselnusspaste auf Erdnussspuren kann negativ ausfallen, wenn die Probe lange nach dem Umstellen von einem Produkt auf das andere gezogen wurde. Hingegen kann man unter Umständen in einem Muster Haselnusspaste, das kurz nach Produktwechsel gezogen wurde, etwa 0,1 % Erdnussmaterial finden. Eine unabdingbare Voraussetzung für eine Minimisierung der Allergenrisiken durch Rohstoffe ist eine enge Zusammenarbeit des Lebensmittelherstellers mit seinen Rohstoff-Lieferanten. Die Lieferanten sollten dasselbe Problembewusstsein in Bezug auf Allergene wie in Bezug auf andere Lebensmittelsicherheitsfragen haben und die Allergene voll in ihr Qualitätssicherungssystem einbezogen haben.

Zusammenfassung

Nutzen und Limitationen der analytischen Methoden zur Detektion versteckter Lebensmittelallergene werden diskutiert. Die gegenwärtig verfügbaren Methoden, basierend auf der immunologischen Detektion von Proteinen oder basierend auf der Detektion anderer Markersubstanzen, wie z.B. der DNS des Allergien auslösenden Lebensmittels, werden kurz besprochen und folgende Punkte kritisch durchleuchtet: Wo soll die Nachweisgrenze liegen? Ist der effektiv gemessene Parameter aussagekräftig, d.h. ist er repräsentativ für die vorhandenen Allergene? Ist die Methode für die fragliche Lebensmittelmatrix geeignet? Und schliesslich, ein nicht zu vernachlässigender Punkt: Geben die Analysenresultate individueller Muster eine sinnvolle Information bezüglich der Sicherheit eines bestimmten Produktes für den Allergiker? Es wird geschlossen, dass Allergenanalysen nicht immer der Weisheit letzter Schluss zum Schutz des allergischen Konsumenten sind, sondern der Lebensmittelhersteller muss HACCP, GMP und Etikettierungsstrategien implementiert haben, um die Lebensmittelallergenprobleme in den Griff zu bekommen.

Résumé

L'utilité et les limitations des méthodes analytiques pour la détection des allergènes alimentaires « cachés » sont discutées. Les méthodes actuellement à disposition basées sur la détection immunologique des protéines ou la détection d'autres marqueurs – comme par example l'ADN – sont brièvement dicutées. Les points suivants sont evalués de manière critique : Quelle limite de détection est exigée? Est-ce que le paramètre effectivement mesuré, est-il approprié, c'est-à-dire, est-il représentatif pour les allergènes présents? Est-ce que la méthode est appropriée pour la matrice de l'aliment? Et finalement : est-ce que les résultats d'analyse d'échantillons individuels donnent-ils une information utile concernant la sécurite alimentaire pour le consommateur allergique? On conclut que l'analyse des allergènes dans les aliments n'est pas toujours le rémède miracle pour la protection du consommateur allergique, mais le producteur d'aliments doit avoir implémenté des stratégies de HACCP, GMP et d'étiquetage approprié afin de gérer les problèmes d'allergènes dans les produits alimentaires.

Summary "Analytical Methods for the Detection of Hidden Allergens – Their Use and Limitations"

The use and the limits of analytical methods for the detection of hidden allergens is discussed. The presently available methods, either based on the immunological detection of proteins or based on the detection of other marker substances such as the DNA of the allergenic food, are briefly discussed. The following points are critically evaluated: What is the appropriate detection limit? Is the effectively measured parameter relevant, i.e. representative for the allergens present in the food? Is the method approporiate for the respective food matrix? And last but not least, do the analytical results for individual samples give useful information on the safety of a specific product for the allergic individual? It is concluded that allergen tests are not always the best means to protect the consumer, but the producer must have implemented appropriate HACCP, GMP and labelling strategies to manage the food allergen issues.

Key words

Allergens, Detection, ELISA, PCR, Food allergy

Literatur

1 *Huggett, A.C.* and *Hischenhuber, C.:* Food manufacturing initiatives to protect the allergic consumer. Allergy **53** (Suppl. 46), 89–92 (1998).

2 *Taylor, S.L., Hefle, S.L., Bindslev-Jensen, C., Bock, S.A., Burks, A.W., Christie, L., Hill, D.J., Host, A., Hourihane, J.O'B., Lack, G., Metcalfe, D.D., Moneret-Vautrin, D.A., Vadas, P.A., Rancé, F., Skrypec, D.J., Trautman, T.A., Malmheden Yman, I.* and *Zeiger, R.S.:* Factors affecting the determination of threshold doses for allergenic foods: How much is too much? Report of an international conference sponsored by Food Allergy Research & Resource Program. J. Allergy Clin. Immunol. **109**, 24–30 (2002).

3 *Hourihane, J.O'B., Kilburn, S.A., Nordlee, J.A., Hefle,S.L., Taylor, S.L.* and *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. **100**, 596–600 (1997).
4 *Kjelkevik, R., Edberg, U.* and *Malmheden Yman, I.:* Labelling of potential allergens in food. Environmental Toxicology and Pharmacology **4**, 157–162 (1997).
5 *Keck-Gassenmeier, B., Bénet, S., Rosa, C.* and *Hischenhuber, C.:* Determination of peanut traces in food by a commercially-available ELISA test. Food & Agric. Immunol. **11**, 243–250 (1999).

Korrespondenzadresse: Dr. Claudia Hischenhuber, Nestec SA Centre de Recherche, Vers-chez-les-Blanc, Case Postale 44, CH-1000 Lausanne 26