



Institute for Agricultural and Fisheries Research

Detectie van voedselallergenen: Van regelgeving tot implementatie – analogie met GGO detectie?

Marc De Loose 

Breda, 19 April 2012 

AOAC-LL SYMPOSIUM: VOEDSELALLERGENEN

Institute for Agricultural and Fisheries Research
Technology and Food Science Unit
www.ilvo.vlaanderen.be
Agriculture and Fisheries Policy Area








Inleiding

- Wat is een GMO? Wat is een allergeen?
- Wat zijn de wettelijke definities?
- Wat wordt in het labo gedetecteerd?
- Hoe de analyseresultaten interpreteren in functie van de regelgeving en wat is de biologische relevantie?
- Zijn er grenswaarden?
- Zijn referentiematerialen beschikbaar?
- Wat zijn de uitdagingen voor het onderzoek?

•**Regelgeving** bepaalt de "spelregels" binnen een maatschappij: Dit bepaalt het minimum waaraan met geacht is zich te houden en het geeft een garantie van wat men zeker kan verwachten





•**Analyses** hebben als doel de implementatie van de regelgeving te controleren

•**Onderzoek** heeft als doel kennis te verwerven, o.a. om de implementatie mogelijk te maken (NRL), maar ook om te verduidelijken en om suggesties te formuleren voor verbetering

Waarom detectie?

GMO	Allergenen
EU regelgeving	EU regelgeving
Keuze vrijheid consument waarborgen	Informerend en bescherming van de patiënten met voedselallergie
Etiketering op basis van tracering	Etiketering van de gebruikte ingrediënten
Grenswaarde voor verplichte etikettering	Geen grenswaarde
Nul tolerantie voor niet geautoriseerde GMOs	Enkel de ingrediënten moeten getiketeerd worden
Rechtszekerheid: productie en handel	Rechtszekerheid: productie en handel maar ook in geval van incidenten
Enkel geautoriseerde GMOs en de ervan afgeleide producten kunnen gecommercialiseerd worden	Kunnen gecommercialiseerd worden

Detectie van "allergenen", ingredienten?

Voor wie?	Wat is de verwachte output	Wat is de target van de methode – welke analytische methode
Patient	Is de "veroorzaker" van de allergische reactie aanwezig, i.e. de bindingsplaats voor de antilichamen van de patient	Detectie van de epitopen die de allergische reactie induceren
Producent	Zijn de grondstoffen OK? Versleping onder controle? Hoe gedragen de targets voor detectie zich tijdens de processing?	Detectie van componenten die specifiek zijn voor een ingrediënt
Distributie	Zijn de producten adequaat gelabeld	Detectie van componenten die specifiek zijn voor een ingrediënt
Overheid/regelgeving	Is de regelgeving i.v.m. etikettering correct toegepast	Detectie van componenten die specifiek zijn voor een ingrediënt



Wat is de wettelijke definitie voor

"Allergen"

- **Ingredienten die de potentie hebben een allergische reactie (hypersensitiviteit) uit te lokken.**
- **De regelgeving omvat een lijst van ingredienten die verplicht vermeld worden. Er is ook een lijst van hiervan afgeleide producten die niet geëtiketeerd moeten worden.**
- **Wat is de definitie van een ingrediënt**

• *The following allergens when added, must be declared on product labels*
 Cereals containing gluten: Wheat, Oats, Barley, Rye, Kamut, ...; Peanuts; Tree nuts; Soybeans; Sesame seeds; Fish; Crustacea; Milk; Egg; Sulphites (at levels above 10mg/kg expressed as SO₂); Mustard; Celery; And most products derivatives of these foods - EU Directive 2000/13/EC as amended by 2003/89/EC.

GMO

What is a GMO – transgenic event (EU2001/18)

Art 2 Definition Art 2(2) "genetically modified organism (GMO)" means an organism, with the exception of human beings, in which the genetic material has been altered in a way that does not occur naturally by mating and/or natural recombination



"GMO"

What is a GMO – transgenic event (EU2001/18)

- **Art 2 Definition Art 2(2) "genetically modified organism (GMO)" means an organism, with the exception of human beings, in which the genetic material has been altered in a way that does not occur naturally by mating and/or natural recombination;**
 - Within the terms of this definition:
 - (a) genetic modification occurs at least through the use of the techniques listed in [Annex I A, Part 1](#);
 - (b) the techniques listed in [Annex I A, Part 2](#), are not considered to result in genetic modification;
- **Art 3 Exemptions**
 - 1. This Directive shall not apply to organisms obtained through the techniques of genetic modification listed in [Annex I A](#);
 - 2. This Directive shall not apply to the carriage of genetically modified organisms by rail, road, inland waterway, sea or air.

Europe decided that plants (GMOs) obtained with the same construct but that for which the transgenes are inserted in a different location they should be considered as two independent events



Overwegingen

Allergen

- Het zijn van nature bestaande producten
- Voor het gros van de consumenten vormen ze geen probleem en ze worden standaard gebruikt in de voeding
- De producent van voeding is verantwoordelijk voor het vermelden van de ingrediënten. Er is een verplichting voor ingrediënten die de potentie hebben om bij bepaalde patiënten een allergische reactie op te wekken
- Het is niet wettelijk bepaald hoe de ingrediënten dienen opgespoord te worden?
- Wie ontwikkelt de detectiemethode?
- Er is geen referentiemateriaal beschikbaar

GMO

- Deze producten zijn het resultaat van menselijke handelingen
- De geautoriseerde GMOs zijn veilig voor consumptie
- De "eigenaar" van het nieuwe product is verantwoordelijk voor het aantonen van de voedselveiligheid, veiligheid voor het milieu, het ontwikkelen van een detectie en kwantificeringsmethode en het ter beschikking stellen van referentiemateriaal
- Er is een wettelijke basis waaraan de detectiemethode moet voldoen, het ligt vast hoe en vanaf wanneer etiketering vereist is en er is guidance hoe de analytische resultaten dienen uitgedrukt te worden
- Er is coordinatie op Europees niveau via het ENGL en het EURL (DG JRC)



Overwegingen

Allergen

- De regelgeving: het gebruik ingrediënten die de potentie hebben om allergische respons op te wekken moet men etiketteren
- Hoe moeten we dit analytisch controleren. Geen regelgeving of guidance hieromtrent
- Hoe kunnen we dit analytisch controleren: Opsporen van iets dat specifiek is voor het ingrediënt. Kan dus op fenotypisch of genotypisch niveau
- Doel is zo gevoelig mogelijk detecteren:
 - een zo gevoelig mogelijk detectie van bepaalde chemische elementen (DNA, eiwit, metabool)
 - een detectietarget kiezen die zo abundant mogelijk aanwezig is in het ingrediënt

GMO

- Screening versus identificatie, of complementair
- Men kan de aanwezigheid van een GMO aantonen door een screening en daarna identificeren en kwantificeren ... laat toe de correcte toepassing van de regelgeving ivm autorisering en etiketering te controleren
- EU kiest voor een DNA gebaseerde detectie
- Eiwit gebaseerde GMO detectie kan maar is niet event specifiek
- Detectie van een element dat van nature niet voorkomt.
- De fusie van het ingebouwde DNA fragment met het er naast liggende DNA is specifiek voor een (geautoriseerde) GMO



Overwegingen

Allergen

- Er is in de regelgeving niet voorzien wat het verband is tussen wat we opsporen in de analyse en wat de allergische respons opwekt. Theoretisch is het aantonen van een ingrediënt specifieke component geen bewijs voor de aanwezigheid van de trigger van de allergische reactie.

GMO

- De "eigenaar" van het nieuwe product is verantwoordelijk voor het aantonen van de voedselveiligheid, veiligheid voor het milieu, het ontwikkelen van een detectie en kwantificeringsmethode en het ter beschikking stellen van referentiemateriaal
- Omdat het dossier ivm de risicoevaluatie direct gekoppeld is aan een unieke detectie en kwantificeringsmethode en de methode gebaseerd is op het aantonen van een uniek DNA fragment voor de GMO is er een direct verband



Regelgeving GGO


Legal context

DIRECTIVE 2001/18/EC on the deliberate release into the environment of genetically modified organisms and repealing Council Directive 90/220/EEC

Information on the genetic modification for the purposes of placing on one or several registers modifications in organisms, which can be used for the detection and identification of particular GMO products to facilitate post-marketing control and inspection.

This information should include where appropriate the lodging of samples of the GMO or its genetic material, with the competent authority and details of nucleotide sequences or other type of information which is necessary to identify the GMO product and its progeny, for example the methodology for detecting and identifying the GMO product, including experimental data demonstrating the specificity of the methodology.

Specific method and reference material




Regelgeving GGO

Legal context

REGULATION (EC) No 1829/2003 on genetically modified food and feed:

To facilitate controls on genetically modified food and feed, applicants for authorisation should propose appropriate methods for sampling, identification and detection, and deposit samples of the genetically modified food and feed with the Authority; methods of sampling and detection should be validated, where appropriate, by the Community reference laboratory.

Validated sampling and detection method




Regelgeving GGO

Legal context

REGULATION (EC) No 1830/2003 concerning the traceability and labelling of genetically modified organisms and the traceability of food and feed products produced from genetically modified organisms and amending Directive 2001/18/EC:

For products intended for direct processing, paragraph 1 shall not apply to traces of authorised GMOs in a proportion no higher than 0.9 % or lower thresholds established under the provisions of Article 30(2), provided that these traces are adventitious or technically unavoidable.

Quantitative detection method




Regelgeving GGO

Legal context

Recommendation [2004/787/EC](#) from the Commission of 4 October 2004 on technical guidance for sampling and detection of genetically modified organisms as or in products in the context of Regulation (EC) No [1830/2003](#) [Official Journal L 348 of 24.11.2004]

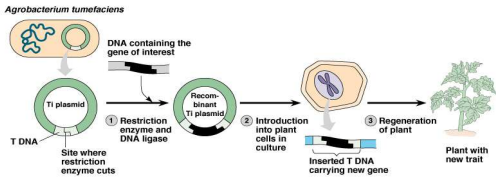
The results of quantitative analysis should be expressed as the percentage of GM-DNA copy numbers in relation to target taxon specific DNA copy numbers calculated in terms of haploid genomes.




Wat is een GMO

- Agrobacterium mediated Gene transfer
- Recombinant DNA technologie
- Transformatie van planten

Agrobacterium tumefaciens




©2008 Wesley Longman, Inc.




Wat is het verschil

GMO




Non-GMO



↓

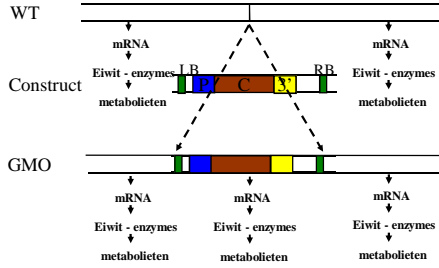
GMO differs from the conventional plant by the presence of a foreign DNA-fragment

The detection of the GMO is based on this small difference

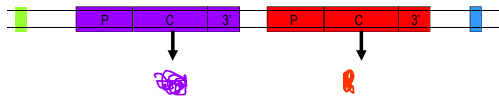


Wat is het verschil

What are the differences at genotypic and phenotypic level?



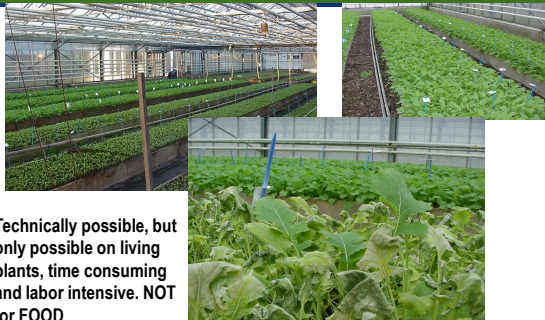
Hoe een verschil detecteren en onderscheid maken tussen GMOs



- Screening for phenotype
- Detection of genetic elements and derived products: Screening for the presence of GMOs
- Detection of fusion's between genetic elements
- Detection of fusion region between plant DNA and inserted DNA: Screening for the presence of a particular GMO



Fenotypische detectie en kwantificering

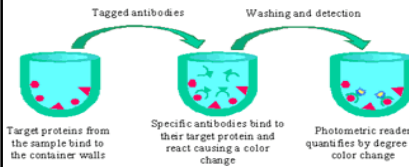


Technically possible, but only possible on living plants, time consuming and labor intensive. NOT for FOOD



Eiwit gebaseerde detectie

Principle of the ELISA Test



Only possible if the matrix to be analysed contain proteins and if antibodies are available.

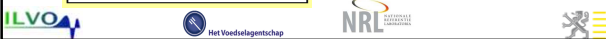
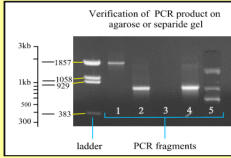
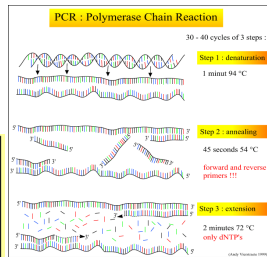
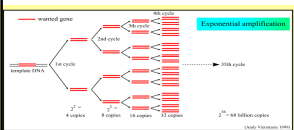
Epitopes might change during processing of the raw product, which might effect the quantification.

If the trait is not expressed detection is not possible



DNA gebaseerde detectie

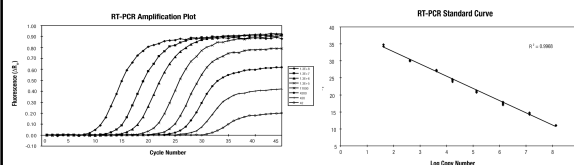
PCR



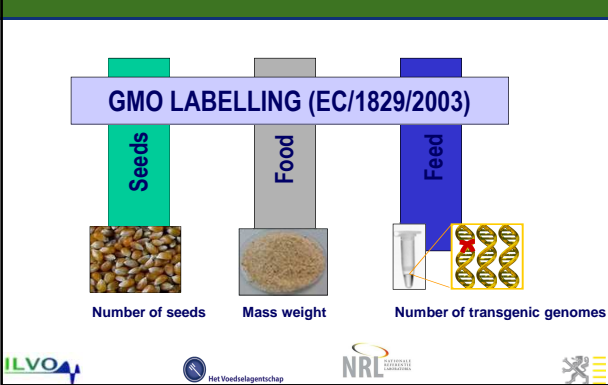
Relative kwantificering

Real-time PCR the technique

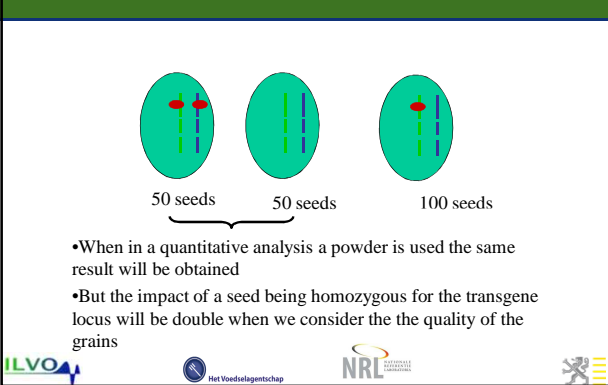
- Quantification with real-time PCR:
 - fluorescent signal < TaqMan probe or SYBR Green I dye
 - external calibrator series with well-known amount of target
 - fixing the **F-threshold value** and **threshold cycle numbers**
 - plotting initial target DNA concentration versus C_T value
 - measuring concentration of unknown sample with standard curve

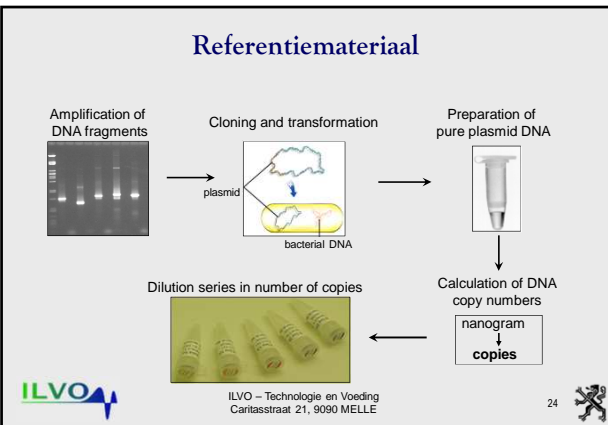


Welke eenheid voor het uitdrukken van het resultaat?



Welke eenheid voor het uitdrukken van het resultaat?





Welke target gebruiken voor de kwantificering - % GMO per ingrediënt

Does a product contain a GMO? If yes which GMO events are present.

Maize wt
Maize GMO
Maize wt + Maize GMO
Soya GMO
Soya wt
Soya GMO + Soya wt
Maize wt + Maize GMO + Soya wt
Maize wt + Maize GMO + Soya GMO + Soya wt

ILVO
Het Voedselagentschap
NRL
Logo

Welke target gebruiken voor de kwantificering - % GMO per ingrediënt

Construct A
Construct B
Construct C

Transgenic plants
GMP A1
GMP A2
GMP A3
GMP A4
GMP A5
GMO B1
GMO B2
GMO C1

GMO B2XC1
How to quantify stacked gene constructs?

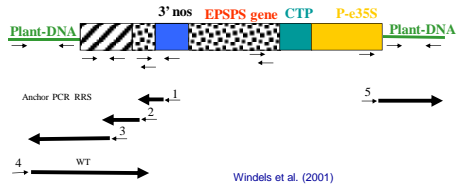
ILVO
Het Voedselagentschap
NRL
Logo

Anchor PCR

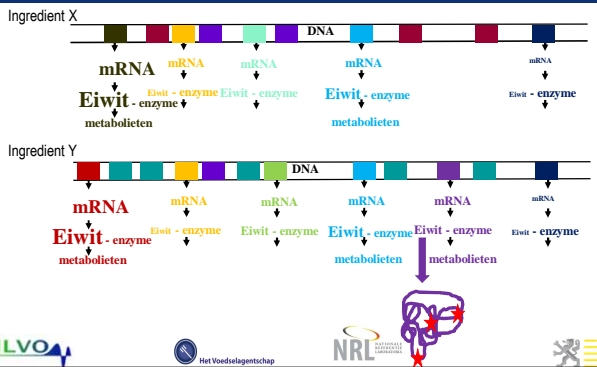
digestion
adapter ligation
anchor PCR
Polyacrylamide gel analysis - Radioactive detection

ILVO
Het Voedselagentschap
NRL
Logo

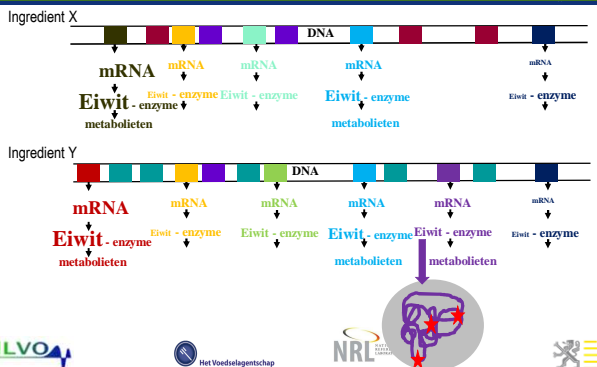
RR soya: a case study

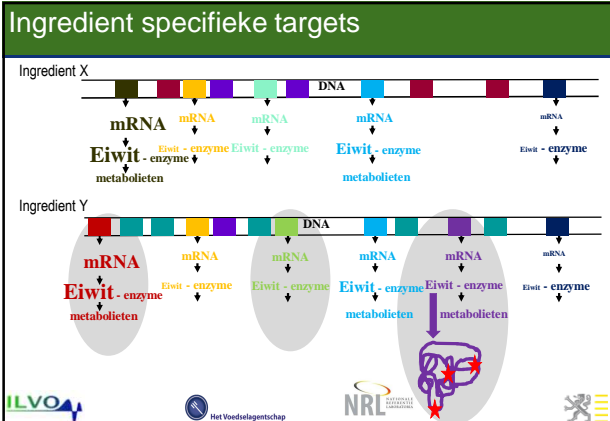


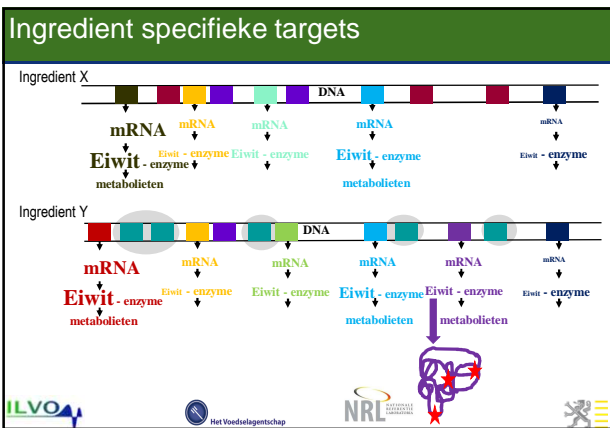
Detectie van ingrediënten – ja

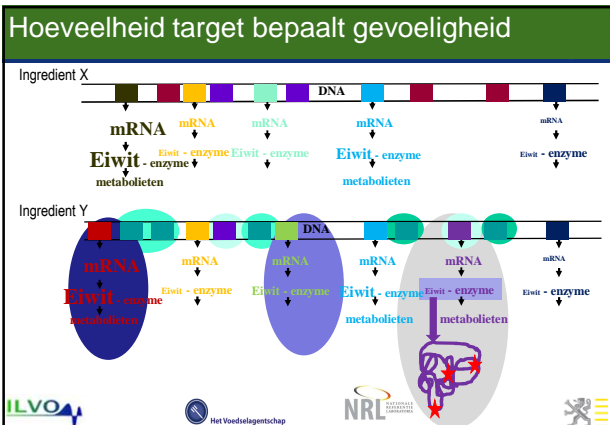


Detectie van voedselallergenen – ja als

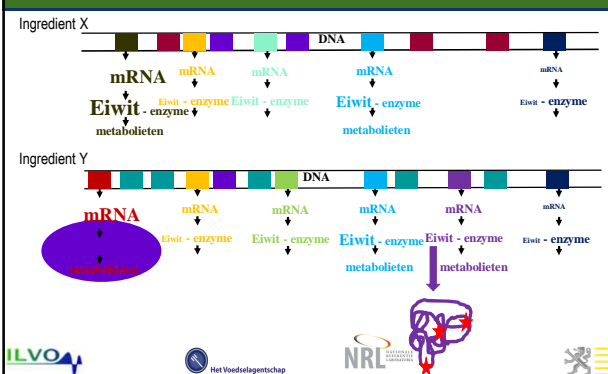




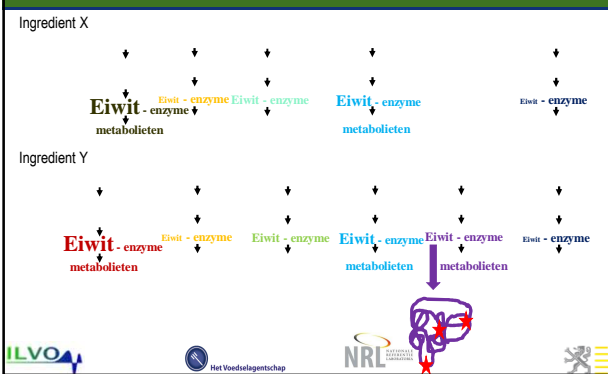




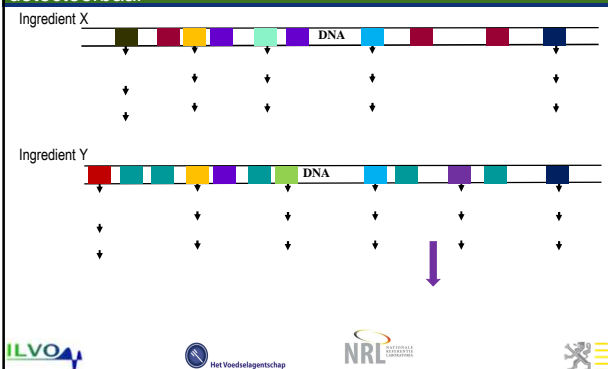
Na processing ...Target voor detectie daalt ...

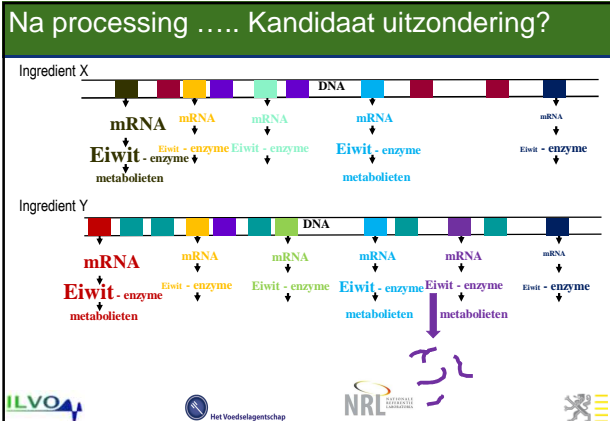


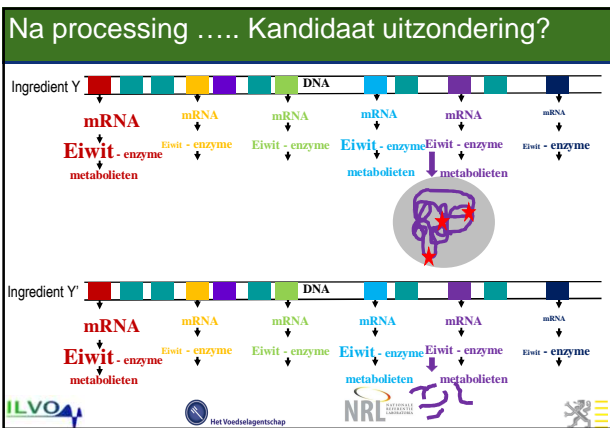
Na processing

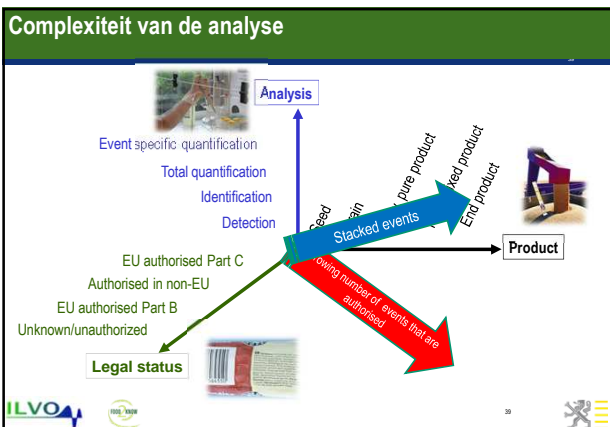


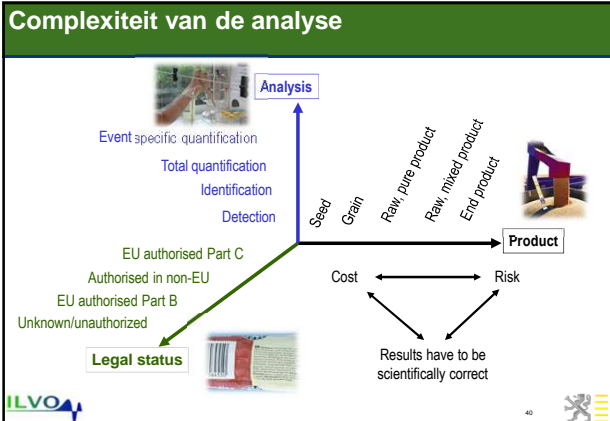
Na processing, geen eiwit wel DNA Ingredient detecteerbaar











- ### Conclusies
- Detectie van ingrediënten is mogelijk. Het kan zowel op fenotypisch (eiwit, metabolieten) of genotypisch niveau
 - Er is een zekere gelijkenis met GGO detectie, zeker op technisch vlak
 - De bekomen informatie is nodig en voldoende in functie van de implementatie van de regelgeving
 - Deze informatie is nuttig voor de patient
 - Verbeteringspunten voor analyse (detectie van ingrediënten)
 - Referentiemateriaal
 - Verder uniformiseren van de analyse procedures op EU niveau; ev. EURL allergenen?
 - Grenswaarden? Rechtszekerheid voor de producent.
 - Kennis over het gedrag van de detectietargets tijdens processing
 - Robuustheid, gevoeligheid en stabiliteit van antilichaam gebaseerde detectiesystemen verbeteren
 - MS gebaseerde technieken ter bevestiging
 - Verfijnen van de analyse: evolueren van een ingrediënt gebaseerde detectie naar een detectie van de allergen veroorzakende componenten
- Logos for ILVO, Het Voedselagentschap, and NRL are at the bottom.

Institute for Agricultural and Fisheries Research

Bedankt voor uw aandacht

CER OF group, Het Voedselagentschap, NRL

Breda, 19 April 2012
AOAC-LL SYMPOSIUM: VOEDSELALLERGENEN

Institute for Agricultural and Fisheries Research
Technology and Food Science Unit
www.ilvo.vlaanderen.be
Agriculture and Fisheries Policy Area

Logos for ILVO and a small icon are at the bottom.
