

FAQ

SureFood® ALLERGEN



November 2024

CONGEN

 **Inhalt**

1	Rechtliche Regelung Allergen-Kennzeichnung	4
2	Welche Tupfer eignen sich für die Allergenanalytik?	4
3	Was muss bei stark quellenden Proben beachtet werden?.....	4
4	Können alle Matrizes qualitativ mittels 4plex PCR auf Allergene analysiert werden?	4
5	Können alle Matrizes quantitativ mittels PCR auf Allergene analysiert werden?	4
6	Kann der SureFood® Allergen QUANTARD 40 für Spike-Experimente verwendet werden?	4
7	Warum enthält der SureFood® Allergen QUANTARD 40 auch Milch und Ei?.....	5
8	Muss der DNA-Gehalt der Probe bzw. des SureFood® Allergen QUANTARD 40 gemessen oder eingestellt werden?	5
9	Wie kann man die Nachweisgrenze der SureFood® ALLERGEN PCR Kits (Art. Nr. S3601 bis S3620) überprüfen?	5
10	Kann ich die QUANTARD 40 - DNA verdünnen, um die Nachweisgrenze der SureFood® Allergen PCR Kits zu überprüfen?...	5
11	Wie hoch ist die Messunsicherheit der quantitativen Allergen PCR?	5
12	Ist der Cp-Wert für alle Allergene im SureFood® Allergen QUANTARD 40 gleich?	5
13	Welche Cp-Schwankungen sind zwischen verschiedenen SureFood® Allergen QUANTARD 40 Lots möglich?.....	5
14	Was ist bei der Bewertung der internen Amplifikationskontrolle (IAC) zu beachten?	5

FAQ ALLERGENE

November 2024



Content

1 Legal Regulation of Allergen Labeling..... 6

2 Which swabs are suitable for allergen analysis? 6

3 What must be considered with highly swelling samples? 6

4 Can all matrices be qualitatively analyzed for allergens using 4plex PCR? 6

5 Can all matrices be quantitatively analyzed for allergens using PCR? 6

6 Can the SureFood® Allergen QUANTARD 40 be used for spike experiments? 6

7 Why does the SureFood® Allergen QUANTARD 40 also contain milk and egg? 7

8 Does the DNA content of the sample or the SureFood® Allergen QUANTARD 40 need to be measured or adjusted? 7

9 How can the detection limit of the SureFood® ALLERGEN PCR Kits (Art. No. S3601 to S3620) be verified? 7

10 Can I dilute the QUANTARD 40 DNA to verify the detection limit of the SureFood® Allergen PCR Kits? 7

11 What is the measurement uncertainty of quantitative allergen PCR? 7

12 Is the Cp value the same for all allergens in the SureFood® Allergen QUANTARD 40? 7

13 What Cp fluctuations are possible between different SureFood® Allergen QUANTARD 40 lots? 7

14 What should be considered when evaluating the internal amplification control (IAC)? 7

FAQ ALLERGENE

November 2024

1 Rechtliche Regelung Allergen-Kennzeichnung

Nach der aktuellen Rechtslage ist eine Kennzeichnung nur für Zutaten zwingend erforderlich. Seit 2014 regelt die Lebensmittelinformationsverordnung (EU) Nr. 1169/2011 die Kennzeichnung von Lebensmittelallergenen.

Hersteller können unbeabsichtigte Verunreinigungen, sogenannte „Cross-Contacts“, kennzeichnen. Es gibt jedoch keine gesetzliche Regelung, ab welchem Gehalt dies erfolgen muss. Die Kennzeichnung von Spuren, die als Verunreinigung eingetragen wurden, dient meist der Absicherung in Bezug auf die Produkthaftung. Wenn zum Beispiel ein Allergiker einen mit Erdnüssen kontaminierten Müsliriegel isst und einen anaphylaktischen Schock erleidet, könnte der Hersteller zur Verantwortung gezogen werden, falls er von der Erdnuss-Verunreinigung wusste und keine Kennzeichnung vorgenommen hat. Dies fällt unter die Sorgfaltspflichten.

Im Sinne des vorbeugenden Verbraucherschutzes hat die amtliche Überwachung in Deutschland Beurteilungswerte für Allergene festgelegt, um Analyseergebnisse einheitlich zu bewerten. Diese Werte basieren auf den aktuellen wissenschaftlichen Daten des VITAL 3.0 Konzepts, sind jedoch nicht rechtlich bindend. Liegen die Werte über den Beurteilungsgrenzen, wird geprüft, ob es sich um eine Zutat handelt und gegebenenfalls die Sorgfalt des Betriebs überprüft.

2 Welche Tupfer eignen sich für die Allergenanalytik?

Für die Probenahme in der Allergenanalytik empfehlen wir sterile, trockene Viskose- oder Wattestäbchen (ohne Holzstiel). Kurz vor der Probenahme sollten die Tupfer mit destilliertem Wasser angefeuchtet werden, um die entsprechende Fläche abzutupfen. Danach stecken Sie den Tupfer zurück in das Röhrchen. In der PCR-Allergenanalytik ist kein Transportmedium nötig. Die DNA bleibt stabil, und zur DNA-Extraktion wird nur der Tupfer abgeschnitten und lysiert.

3 Was muss bei stark quellenden Proben beachtet werden?

Bei stark quellenden Proben kann es notwendig sein, während der Lyse in der DNA-Extraktion zusätzlichen Lysis-Puffer hinzuzufügen. Wenn gleichzeitig der SureFood® Allergen QUANTARD 40 extrahiert wird, um eine Quantifizierung durchzuführen, wird dieser wie üblich extrahiert. Das Volumen des Lysis-Puffers wird dabei nicht erhöht.

4 Können alle Matrices qualitativ mittels 4plex PCR auf Allergene analysiert werden?

Bei Mischproben kann es bei ungleichen Mischungsverhältnissen (z.B. 99,9 % Mandel und 0,1 % Cashew) zu einem Sensitivitätsverlust im Nachweiskanal mit der geringeren Konzentration kommen, besonders wenn in einem Kanal ein Cp-Wert vor 20 erreicht wird.

Daher wurde im Validation Report der Verifizierungspunkt "Nachweisgrenze in DNA-Mischungen" aufgenommen. Damit soll sichergestellt werden, dass ein gering konzentrierter Analyt trotz der Hintergrundmatrix detektiert werden kann. Dabei ist zu beachten, dass die Hintergrundmatrix immer Teil des Gesamtsystems sein muss und einen eigenen Nachweis bildet.

5 Können alle Matrices quantitativ mittels PCR auf Allergene analysiert werden?

Nein, Tupfer, Schwämme, Wasch- und Reinigungslösungen sowie feste Fette können nicht mit PCR auf Allergene quantifiziert werden.

Grund:

- Die Allergen-Quantifizierung erfolgt mit dem externen Referenzmaterial SureFood® Allergen QUANTARD 40 und SureFood® PREP Advanced. Dieses Vergleichsmaterial basiert auf Maismehl und enthält 40 mg allergenen Lebensmittelbestandteil pro kg Maismehl. Für die Analyse mit externem Referenzmaterial ist es entscheidend, dass alle Schritte der Probenaufbereitung identisch durchgeführt werden. Andernfalls sind die Ergebnisse der Probe nicht mit denen des Referenzmaterials vergleichbar. Daher werden nur feste Proben quantifiziert.
- Proben mit hohem Fettanteil erfordern eine spezielle Behandlung bei der DNA-Extraktion. Feste Proben mit hohem Fettanteil werden nicht quantitativ untersucht, da der SureFood® PREP Advanced Spin-Filter-basiert ist und Fette den Spin-Filter verstopfen können. Der Fettanteil muss zuerst entfernt werden, z.B. durch Hexan-Fällung, wodurch die Voraussetzung der identischen Probenaufbereitung entfällt.
- Es ist ebenfalls wichtig, dass die Proben homogen sind. Andernfalls sind die quantitativen Ergebnisse nicht reproduzierbar und aussagekräftig.

6 Kann der SureFood® Allergen QUANTARD 40 für Spike-Experimente verwendet werden?

Ja, der SureFood® Allergen QUANTARD 40 kann zur Durchführung von Spiking Experimenten und zur internen Verifizierung verwendet werden.

FAQ ALLERGENE

November 2024

7 Warum enthält der SureFood® Allergen QUANTARD 40 auch Milch und Ei?

Der SureFood® Allergen QUANTARD 40 ist ein universelles externes Referenzmaterial. Es wurde für die absolute Quantifizierung allergener Bestandteile in Lebensmitteln mit Gehalten von 1 mg bis 400 mg allergenem Bestandteil/ kg Lebensmittel entwickelt.

Es enthält alle gemäß Verordnung (EU) Nr. 1169/2011 kennzeichnungspflichtigen allergenen Lebensmittelbestandteile, außer Laktose und Sulfid, in einer Konzentration von 40 mg/kg.

8 Muss der DNA-Gehalt der Probe bzw. des SureFood® Allergen QUANTARD 40 gemessen oder eingestellt werden?

Für die qualitative und quantitative Allergen-Analyse mit den SureFood® ALLERGEN PCR Kits ist es nicht nötig, den DNA-Gehalt der Probe oder des Referenzmaterials SureFood® ALLERGEN QUANTARD 40 zu messen oder einzustellen.

Der Gesamt-DNA-Gehalt liefert keine Informationen über den Anteil an Lebensmittelallergen-DNA in einer Probe. Der DNA-Gehalt des QUANTARD 40 besteht aus einem sehr geringen Anteil an Lebensmittelallergen-DNA und einem deutlich größeren Anteil an Mais-DNA. Daher ist die Messung des DNA-Gehalts nicht hilfreich.

9 Wie kann man die Nachweisgrenze der SureFood® ALLERGEN PCR Kits (Art. Nr. S3601 bis S3620) überprüfen?

Für die Überprüfung der Nachweis- und Bestimmungsgrenze kann bei Bedarf der SureFood® QUANTARD Allergen 1 ppm als externes Referenzmaterial (Art. Nr. S3305) verwendet werden.

10 Kann ich die QUANTARD 40 - DNA verdünnen, um die Nachweisgrenze der SureFood® Allergen PCR Kits zu überprüfen?

Der SureFood® Allergen QUANTARD 40 ist ein externes Referenzmaterial zur absoluten Quantifizierung von Lebensmittelallergenen. Es besteht aus allergenfreiem Maismehl, dem homogenisierte allergene Lebensmittelbestandteile hinzugefügt wurden. Ziel war es, ein Referenzmaterial mit hohem Hintergrund-DNA-Gehalt zu schaffen, das einer echten Lebensmittelmatrix sehr nahe kommt. Eine Verdünnung der QUANTARD 40-DNA wird nicht empfohlen, da sie sowohl das Lebensmittelallergen als auch die Hintergrundmatrix verdünnt.

Für die Überprüfung der Nachweis- und Bestimmungsgrenze der SureFood® ALLERGEN Kits (Art. Nr. S3601 bis S3620) wird der SureFood® QUANTARD Allergen 1 ppm (Art. Nr. S3305) empfohlen.

11 Wie hoch ist die Messunsicherheit der quantitativen Allergen PCR?

Die quantitative Allergen-PCR mit SureFood® ALLERGEN Kits (Art. Nr. S3601 bis S3620) hat eine Messunsicherheit von bis zu 30 % (siehe Validierungsberichte). Nahe der Bestimmungsgrenze kann die Messunsicherheit bis zu 100 % erreichen.

12 Ist der Cp-Wert für alle Allergene im SureFood® Allergen QUANTARD 40 gleich?

Nein, der Cp-Wert des SureFood® Allergen QUANTARD 40 ist von Allergen zu Allergen unterschiedlich. Die Gründe dafür liegen in der Wahl des Targets.

13 Welche Cp-Schwankungen sind zwischen verschiedenen SureFood® Allergen QUANTARD 40 Lots möglich?

Jede neue Charge des SureFood® Allergen QUANTARD 40 wird auf Homogenität gemäß IUPAC getestet.

Während der Herstellung der SureFood® ALLERGEN PCR Kits werden die Cp-Werte der Positivkontrolle, der Standard-DNA und des SureFood® Allergen QUANTARD 40 dokumentiert und überwacht. Zum Beispiel bleibt der Cp-Wert für Senf im SureFood® Allergen QUANTARD 40 konstant. Wenn die gleiche DNA-Extraktion für die Probe und das Referenzmaterial verwendet wird und die Kriterien für die Standardgerade aus dem Handbuch eingehalten werden, ist eine Quantifizierung problemlos möglich.

Die Bestimmung in ppm bzw. mg/kg ist nur im Bereich von 1-400 ppm Senf möglich. Unterhalb der Bestimmungsgrenze ist eine quantitative Aussage nicht möglich. In diesem Fall wäre die Bewertung positiv unterhalb der Bestimmungsgrenze.

14 Was ist bei der Bewertung der internen Amplifikationskontrolle (IAC) zu beachten?

Die SureFood® PCR Kits haben eine interne Amplifikationskontrolle (IAC). Wenn inhibitorische Substanzen in der DNA vorhanden sind, wird das Signal der Amplifikationskontrolle gestört oder die Amplifikation unterdrückt.

Hohe Konzentrationen des Amplikons, also stark positive Proben, können ebenfalls zu einem schwachen oder fehlenden Signal der IAC führen. Ein Cp-Wert für die IAC ist nicht notwendig, um ein positives Ergebnis der Positivkontrolle zu erhalten.

Die Amplifikation der IAC muss nur bei negativen Proben bewertet werden, d.h. wenn sich keine Amplifikation in den Nachweiskanälen zeigt.

1 Legal Regulation of Allergen Labeling

According to current legislation, labeling is mandatory only for ingredients. Since 2014, the Food Information Regulation (EU) No. 1169/2011 governs the labeling of food allergens.

Manufacturers can label unintended contaminations, known as "cross-contacts." However, there is no legal regulation on the level at which this must occur. The labeling of traces entered as contamination is mainly for liability protection. For example, if an allergic person eats a muesli bar contaminated with peanuts and suffers an anaphylactic shock, the manufacturer could be held accountable if they knew about the peanut contamination and did not label it. This falls under the duty of care.

In terms of preventive consumer protection, official monitoring in Germany has established assessment values for allergens to uniformly evaluate analysis results. These values are based on the current scientific data of the VITAL 3.0 concept but are not legally binding. If the values exceed the assessment limits, it is checked whether it is an ingredient and, if necessary, the diligence of the company is reviewed.

2 Which swabs are suitable for allergen analysis?

For sampling in allergen analysis, we recommend sterile, dry viscose or cotton swabs (without a wooden stick). The swabs should be moistened with distilled water shortly before sampling to swab the relevant area. Then place the swab back in the tube. In PCR allergen analysis, no transport medium is needed. The DNA remains stable, and for DNA extraction, only the swab is cut off and lysed.

3 What must be considered with highly swelling samples?

For highly swelling samples, it may be necessary to add additional lysis buffer during DNA extraction. If SureFood® Allergen QUANTARD 40 is being extracted simultaneously for quantification, it is extracted as usual. The volume of the lysis buffer is not increased.

4 Can all matrices be qualitatively analyzed for allergens using 4plex PCR?

In mixed samples, there may be a loss of sensitivity in the detection channel with the lower concentration due to unequal mixing ratios (e.g., 99.9% almond and 0.1% cashew), especially if a Cp value before 20 is reached in one channel.

Therefore, the verification point "Limit of detection (LoD) in DNA mixtures" was included in the Validation Report. This is to ensure that a low-concentration analyte can be detected despite the background matrix. It should be noted that the background matrix must always be part of the overall system and form its own detection.

5 Can all matrices be quantitatively analyzed for allergens using PCR?

No, swabs, sponges, washing and cleaning solutions, and solid fats cannot be quantified for allergens using PCR.

Reason:

- Allergen quantification is performed with the external reference material SureFood® Allergen QUANTARD 40 and SureFood® PREP Advanced. This reference material is based on cornmeal and contains 40 mg of allergenic food component per kg of cornmeal. For analysis with external reference material, it is crucial that all sample preparation steps are carried out identically. Otherwise, the sample results are not comparable with those of the reference material. Therefore, only solid samples are quantified.
- Samples with high fat content require special treatment during DNA extraction. Solid samples with high fat content are not quantitatively analyzed because the SureFood® PREP Advanced is spin-filter-based, and fats can clog the spin filter. The fat content must first be removed, e.g., by hexane precipitation, which eliminates the requirement for identical sample preparation.
- It is also important that the samples are homogeneous. Otherwise, the quantitative results are not reproducible and meaningful.

6 Can the SureFood® Allergen QUANTARD 40 be used for spike experiments?

Yes, the SureFood® Allergen QUANTARD 40 can be used for conducting spiking experiments and internal verification.

7 Why does the SureFood® Allergen QUANTARD 40 also contain milk and egg?

The SureFood® Allergen QUANTARD 40 is a versatile external reference material. It was developed to accurately quantify allergenic components in foods from 1 mg to 400 mg per kg.

It contains all allergenic food components that must be labeled according to Regulation (EU) No. 1169/2011, except lactose and sulfite, at a concentration of 40 mg/kg.

8 Does the DNA content of the sample or the SureFood® Allergen QUANTARD 40 need to be measured or adjusted?

For qualitative and quantitative allergen analysis with the SureFood® ALLERGEN PCR Kits, it is not necessary to measure or adjust the DNA content of the sample or the reference material SureFood® ALLERGEN QUANTARD 40.

The total DNA content does not provide information about the proportion of food allergen DNA in a sample. The DNA content of SureFood® ALLERGEN QUANTARD 40 consists of a very small proportion of food allergen DNA and a significantly larger proportion of corn DNA. Therefore, measuring the DNA content is not helpful.

9 How can the detection limit of the SureFood® ALLERGEN PCR Kits (Art. No. S3601 to S3620) be verified?

For verifying the detection and determination limit, the SureFood® QUANTARD Allergen 1 ppm can be used as external reference material (Art. No. S3305).

10 Can I dilute the QUANTARD 40 DNA to verify the detection limit of the SureFood® Allergen PCR Kits?

The SureFood® Allergen QUANTARD 40 is an external reference material for the absolute quantification of food allergens. It consists of allergen-free cornmeal to which homogenized allergenic food components have been added. The goal was to create a reference material with a high background DNA content that closely resembles a real food matrix. Diluting the QUANTARD 40 DNA is not recommended, as it dilutes both the food allergen and the background matrix.

To verify the detection and determination limit of the SureFood® ALLERGEN Kits (Art. No. S3601 to S3620), the SureFood® QUANTARD Allergen 1 ppm (Art. No. S3305) is recommended.

11 What is the measurement uncertainty of quantitative allergen PCR?

The quantitative allergen PCR with SureFood® ALLERGEN Kits (Art. No. S3601 to S3620) has a measurement uncertainty of up to 30% (see validation reports). Near the determination limit, the measurement uncertainty can reach up to 100%.

12 Is the Cp value the same for all allergens in the SureFood® Allergen QUANTARD 40?

No, the Cp value of the SureFood® Allergen QUANTARD 40 varies from allergen to allergen. The reasons for this origin in the choice of target.

13 What Cp fluctuations are possible between different SureFood® Allergen QUANTARD 40 lots?

Each new batch of the SureFood® Allergen QUANTARD 40 is tested for homogeneity according to IUPAC.

During the production of the SureFood® ALLERGEN PCR Kits, the Cp values of the positive control, the standard DNA, and the SureFood® Allergen QUANTARD 40 are documented and monitored. For example, the Cp value for mustard in the SureFood® Allergen QUANTARD 40 remains constant. If the same DNA extraction is used for the sample and the reference material and the criteria for the standard curve from the manual are met, quantification is easily possible.

The determination in ppm or mg/kg is only possible in the range of 1-400 ppm mustard. Below the determination limit, a quantitative statement is not possible. In this case, the assessment would be positive below the determination limit.

14 What should be considered when evaluating the internal amplification control (IAC)?

The SureFood® PCR Kits have an internal amplification control (IAC). If inhibitory substances are present in the DNA, the signal of the amplification control is disturbed or the amplification is suppressed.

High concentrations of the amplicon, i.e., strongly positive samples, can also lead to a weak or absent signal of the IAC. A Cp value for the IAC is not necessary to obtain a positive result for the positive control.

The amplification of the IAC must only be evaluated for negative samples, i.e., when no amplification is visible in the detection channels.