

CONGEN

SureFood® ALLERGEN 4plex EU NUTS

Art. No. S3404
100 rxn

User Manual



June 2025

 Inhalt

1	Allgemeines	4
1.1	Beschreibung	4
1.2	Nachweisgrenze	4
1.3	DNA-Präparation	5
1.4	Kit-Inhalt und Lagerung	5
1.5	Zusätzliche benötigte Geräte und Materialien	5
1.6	Vorsichtsmaßnahmen	5
1.7	Geräteeinstellungen	6
1.8	Detektionskanaleinstellungen	6
2	Qualitative Analyse	8
2.1	Protokoll	8
2.1.1	Herstellen des Master-Mix	8
2.1.2	Herstellen des real-time PCR-Mix	8
2.2	Interpretation der Ergebnisse	9
3	Grenzen der Methode	10
4	Weitere Informationen	11
4.1	Weitere Dokumente und Hilfsmittel	11
4.2	Technischer Support	11
4.3	Vertrieb und Bestellung	11



Content

1 General Information12

1.1 Description12

1.2 Limit of Detection12

1.3 DNA preparation13

1.4 Kit components and storage13

1.5 Additionally required equipment and materials13

1.6 Precautions for users13

1.7 Setup.....14

1.8 Detection channel Set-up14

2 Qualitative Analysis16

2.1 Protocol16

2.1.1 Preparation of the master-mix16

2.1.2 Preparation of the real-time PCR-mix16

2.2 Interpretation of results17

3 Limitations of the method18

4 Further Information19

4.1 Product Information19

4.2 Technical Support19

4.3 Distribution and Ordering19

1 Allgemeines

1.1 Beschreibung

SureFood® ALLERGEN 4plex EU NUTS ist eine real-time PCR zum direkten qualitativen Nachweis und zur Differenzierung einer spezifischen DNA-Sequenz von Mandel (*Prunus dulcis*), Cashew (*Anacardium occidentale*), Pistazie (*Pistacia vera*), Erdnuss (*Arachis hypogaea*), Haselnuss (*Corylus avellana*), Walnuss (*Juglans regia*, *Juglans nigra*), Pekannuss (*Carya illinoensis*), Paranuss (*Bertholletia excelsa*) und Macadamia (*Macadamia tetraphylla*) gemäß Verordnung (EU) 1169/2011 in Lebensmitteln.

Der Test ist mit einer internen Amplifikationskontrolle (IAC) ausgestattet. Bei Anwesenheit von inhibitorischen Substanzen in der DNA wird das Signal der Amplifikationskontrolle gestört oder die Amplifikation unterdrückt. Einige Beispiele für PCR-inhibitorische Substanzen sind Alkohole (z.B. Ethanol, Isopropanol), Tenside (z.B. CTAB, SDS, Triton X100) und Salze (z.B. Natriumchlorid). Des Weiteren können Gewürze, Kräuter, Algen, Kakao und andere Probenmatrizes inhibierend wirken.

Das Nachweisverfahren kann mit allen gängigen real-time PCR Geräten, die mindestens vier Reporterfarbstoffe gleichzeitig in den Kanälen FAM, VIC/HEX, ROX und Cy5 detektieren können, verwendet werden. Die interne technische Geräteverifizierung erfolgte am Agilent AriaDx, Bio-Rad CFX96 Dx, Qiagen Rotor-Gene Q, R-Biopharm RIDA®CYCLER und Roche LightCycler® 480 II.

1.2 Nachweisgrenze

Die SureFood® ALLERGEN 4plex EU NUTS real-time PCR hat eine Nachweisgrenze von ≤ 1 mg / kg bei Verwendung des SureFood® PREP Advanced, Protokoll 1.

Die Nachweisgrenze des Gesamtverfahrens (DNA-Extraktion und real-time PCR) ist abhängig von der Probenmatrix, Prozessierungsgrad, DNA-Präparation und dem DNA-Gehalt.

Die SureFood® PCR Systeme sind sehr sensitiv. Demzufolge sind bereits sehr geringe Ziel-DNA Gehalte für eine Analyse ausreichend. Über die Bestimmung der Gesamt-DNA in der Probe werden keine Informationen über die Menge und die Qualität an Ziel-DNA erhalten.

Hinweis: Bei Mischproben kann es bei ungleichen Mischungsverhältnissen zu einem Sensitivitätsverlust in dem Nachweiskanal mit der geringeren Konzentration kommen, besonders wenn in einem Kanal ein Cp-Dx vor 20 erreicht wird.

1.3 DNA-Präparation

Für die DNA-Präparation wird der SureFood® PREP Advanced (Art. Nr. S1053), Protokoll 1 empfohlen.

1.4 Kit-Inhalt und Lagerung

Kit Code	Reagenz	Menge	Deckelfarbe
1	Reaction Mix	2 x 1050 µl	Gelb
2	Taq Polymerase	1 x 80 µl	Dunkelrot
3	Positive Control	1 x 200 µl	Hellblau

Die Reagenzien sind lichtgeschützt bei -28 bis -16°C zu lagern. Die Taq Polymerase kann bei mehrfacher Verwendung am selben Tag bei +2 bis +8°C gelagert werden.

Hinweis: Die Taq Polymerase kann in gefrorenem oder nicht gefrorenem Zustand vorliegen. Dies hat keinen Einfluss auf die Qualität der Taq Polymerase oder die Performance der real-time PCR.

1.5 Zusätzliche benötigte Geräte und Materialien

- DNA-Extraktionskit (z.B. SureFood® PREP Advanced Art. Nr. S1053)
- Real-time PCR Gerät mit vier Detektionskanälen (510 nm, 580 nm, 610 nm und 660 nm)
- Real-time PCR Verbrauchsmaterialien (Platten, Gefäße, Folien, Deckel)
- Pipetten, Pipettenspitzen mit Filtern
- Einmalhandschuhe, puderfrei
- Vortexmischer
- Mikrozentrifuge mit Rotor für Reaktionsgefäße

1.6 Vorsichtsmaßnahmen

- Eine räumliche Trennung von Extraktion, PCR-Ansatz und PCR ist zu beachten, um Querkontaminationen zu vermeiden.
- Dieser Test ist nur von molekularbiologisch geschultem Laborpersonal durchzuführen.
- Die Gebrauchsanweisung zur Durchführung des Tests ist strikt einzuhalten.
- Während des Umgangs mit Proben Einmalhandschuhe tragen und nach Abschluss des Tests die Hände waschen.
- In den Bereichen, in denen mit Proben gearbeitet wird, nicht rauchen, essen oder trinken.
- Testkit nach Erreichen des Verfallsdatums nicht mehr verwenden.
- Alle Reagenzien und Materialien müssen nach Gebrauch sachgerecht und eigenverantwortlich entsorgt werden. Bitte beachten Sie bei der Entsorgung die jeweils national geltenden Vorschriften.

1.7 Geräteeinstellungen

	Blockcycler & R-Biopharm RIDA®CYCLER	Rotorcycler
Initial Denaturation (HOLD)	5 min, 95°C	1 min, 95°C
Cycles	35	35
Denaturation	15 sec, 95°C	10 sec, 95°C
Annealing/Extension (CYCLE)	30 sec, 60°C	15 sec, 60°C
Temperature Transition Rate/ Ramp Rate	Maximum	Maximum

1.8 Detektionskanaleinstellungen

Real-time PCR Gerät	Nachweis	Detektions- kanal	Quencher	Bemerkung
Agilent AriaDx/Mx	Mandel / Cashew / Pistazie	FAM	+	
	IAC	HEX	+	
	Erdnuss / Haselnuss / Walnuss	ROX	+	
	Pekannuss / Paranuss / Macadamia	Cy5	+	
Bio-Rad CFX96/Dx/ Opus	Mandel / Cashew / Pistazie	FAM	+	Baseline Einstellungen: - Baseline subtracted curve fit - Apply fluorescnce drift correction
	IAC	VIC/HEX	+	
	Erdnuss / Haselnuss / Walnuss	ROX	+	
	Pekannuss / Paranuss / Macadamia	Cy5	+	
R-Biopharm RIDA®CYCLER	Mandel / Cashew / Pistazie	green	+	Ignore cycles before, wenn zu Beginn des Laufs eine signifikante Abweichung in der Grundlinie vorliegt. Siehe Seite 47 Bedienungs-anleitung des Cyclers, Abschnitt 12.1.2 Parameter der Cycling-Analyse.
	IAC	yellow	+	
	Erdnuss / Haselnuss / Walnuss	orange	+	
	Pekannuss / Paranuss / Macadamia	red	+	
Qiagen Rotor- Gene Q	Mandel / Cashew / Pistazie	green	+	Achtung: Nur 0,1 ml Reaktionsgefäße verwenden. Die Gain-Einstellungen müssen für alle Kanäle auf 5 (Werkeinstellung) eingestellt sein.
	IAC	yellow	+	
	Erdnuss / Haselnuss / Walnuss	orange	+	
	Pekannuss / Paranuss / Macadamia	red	+	

SureFood® ALLERGEN 4plex
EU Nuts (100 rxn)

Art. Nr. S3404

Juni 2025

Real-time PCR Gerät	Nachweis	Detektions- kanal	Quencher	Bemerkung
Roche LightCycler® 480 II	Mandel / Cashew / Pistazie	465-510	+	Das SureCC Color Compensation Kit I (Art. Nr. F4009) wird benötigt.
	IAC	533-580	+	
	Erdnuss / Haselnuss / Walnuss	533-610	+	
	Pekannuss / Paranuss / Macadamia	618-660	+	

2 Qualitative Analyse

2.1 Protokoll

2.1.1 Herstellen des Master-Mix

Die Gesamtzahl der für die PCR benötigten Reaktionen (Proben und Kontrollreaktionen) ist zu berechnen.

Folgende Kontrollen werden empfohlen: Negativkontrolle, Extraktionskontrolle und Positive Control.

Der Reaction Mix enthält eine interne Amplifikationskontrolle (Inhibitionskontrolle) pro Reaktion.

Benötigte Reaktionen für den qualitativen EU Nuts-Nachweis:

3 Reaktionen für Kontrollen* (1x Negativkontrolle, 1x Extraktionskontrolle, 1x Positive Control)

Je Probe: mindestens 1 Reaktion für jede Proben-DNA

Des Weiteren wird empfohlen den Mix mit 10 % zusätzlichem Volumen anzusetzen, um einen Pipettierverlust auszugleichen. Vor der Benutzung die Reagenzien auftauen, mischen und zentrifugieren.

Beispiel für die Berechnung und Herstellung von 10 Reaktionen:

Komponenten des Master-Mix	Menge pro Reaktion	10 Reaktionen (zusätzlich 10 %)
Reaction Mix	19,3 µl	212,3 µl
Taq Polymerase	0,7 µl	7,7 µl
Gesamtvolumen	20 µl	220 µl

Master-Mix mischen und anschließend kurz zentrifugieren.

2.1.2 Herstellen des real-time PCR-Mix

- Pipettieren von 20 µl des Master-Mix in das jeweilige Reaktionsgefäß.
- Verschließen der Negativkontrolle.
- Pipettieren von 5 µl der Proben-DNA in die vorgesehenen Reaktionsgefäße.
Verschließen der Gefäße.
- Pipettieren von 5 µl Positive Control in die vorgesehenen Reaktionsgefäße.
Verschließen der Reaktionsgefäße.
- Kurzes Zentrifugieren der Reaktionsgefäße mit wenigen Umdrehungen pro Minute.
- Reaktionsgefäße in das real-time PCR Gerät einsetzen und entsprechend der Geräteeinstellungen starten.

*** Beschreibung der einzelnen Kontrollen**

- Negativkontrolle: besteht nur aus dem Master-Mix
- Extraktionskontrolle: die Extraktion wird ohne Probe durchgeführt – nur PREP Reagenzien
- Positive Control: Master-Mix und die im Kit beigelegte Positive Control

2.2 Interpretation der Ergebnisse

Die Auswertung der Ergebnisse wird mit der Analyse Software der jeweiligen real-time PCR Geräte nach den Angaben des Herstellers durchgeführt.

Die Kontrollreaktionen müssen die korrekten Ergebnisse zeigen.

Im FAM-Kanal wird der Parameter Mandel, Cashew und Pistazie im ROX-Kanal der Parameter Erdnuss, Haselnuss und Walnuss und im Cy5-Kanal der Parameter Pekannuss, Paranuss und Macadamia detektiert (siehe Tabelle). Im VIC/HEX-Kanal wird eine interne Amplifikationskontrolle (IAC) detektiert.

Eine Probe wird **positiv** für den jeweiligen Parameter bewertet, wenn die Proben-DNA eine Amplifikation im jeweiligen Kanal zeigt. Hohe Konzentrationen des Amplikons können zu einem schwachen oder fehlenden Signal der IAC führen.

Ein Cp-Wert für die IAC ist nicht erforderlich um ein positives Ergebnis der Positive Control zu erhalten.

Eine Probe wird als **negativ** für den jeweiligen Parameter bewertet, wenn die Proben-DNA keine Amplifikation im jeweiligen Kanal zeigt und die zugehörige interne Kontrolle (VIC/HEX-Kanal) **positiv** mit einer Cp-Abweichung ≤ 2 zur Negativkontrolle ist. Sollte die Proben-DNA im VIC/HEX-Kanal **keine Amplifikation** oder eine Cp-Abweichung > 2 zur Negativkontrolle zeigen, sind in der Proben-DNA Inhibitoren enthalten, die die PCR unterdrücken. Ein starker Abfall des Fluoreszenzsignals kann ebenfalls eine Inhibition anzeigen. In diesen Fällen muss die Isolierung und Reinigung der DNA aus der entsprechenden Probe verbessert werden. Alternativ kann die DNA verdünnt (Empfehlung 1:2 in PCR-Wasser) und wiederholt auf Inhibition getestet werden. Beachten Sie bitte, dass sich die Nachweisgrenze für die Probe im spezifischen Nachweissystem mit dem gewählten Verdünnungsfaktor ändert.

Ergebnis im jeweiligen Kanal				Interpretation
FAM-Kanal Mandel / Cashew / Pistazie	ROX-Kanal Erdnuss / Haselnuss / Walnuss	Cy5-Kanal Pekannuss / Paranuss / Macadamia	VIC/HEX-Kanal IAC	
positiv	negativ	negativ	positiv/negativ	Mandel-, Cashew- und/oder Pistazie-DNA nachweisbar
negativ	positiv	negativ	positiv/negativ	Erdnuss-, Haselnuss- und/oder Walnuss-DNA nachweisbar
negativ	negativ	positiv	positiv/negativ	Pekannuss-, Paranuss- und/oder Macadamia-DNA nachweisbar
negativ	negativ	negativ	positiv	Negativ, Ziel -DNA nicht nachweisbar
negativ	negativ	negativ	negativ	nicht auswertbar

Hinweis: Die in der obenstehenden Tabelle dargestellten Ergebnisse dienen lediglich als Beispiel. Darüber hinaus sind weitere Kombinationen möglich.

Die folgende Tabelle zeigt die Spezifikationsbereiche der Kit Kontrollen

	Spezifikationsbereich	Interne Amplifikationskontrolle (IAC)
Negativkontrolle	negativ	$25 \leq Cp \leq 34$
Positive Control (FAM – Mandel / Cashew / Pistazie)	$22 \leq Cp \leq 30$	nicht relevant
Positive Control (ROX – Erdnuss / Haselnuss / Walnuss)	$22 \leq Cp \leq 30$	nicht relevant
Positive Control (CY5 – Pekannuss / Paranuss / Macadamia)	$22 \leq Cp \leq 30$	nicht relevant

3 Grenzen der Methode

- Die Anwesenheit von PCR-Inhibitoren kann zu nicht auswertbaren Ergebnissen führen.
- Äußerst niedrige Konzentrationen der Zielsequenzen, die unter dem Detektionslimit (LoD) liegen, können zu nicht reproduzierbaren Ergebnissen führen.
- Ein negatives Ergebnis schließt nicht aus, dass eine Allergenkontamination unterhalb der Nachweisgrenze dieses Tests vorliegt oder dass andere Allergie-auslösende Substanzen wie z.B. Proteine oder Lipide, in einer Probe enthalten sein können.
- Bei stark prozessierten Proben kann es zu einer Verschiebung der Nachweisgrenze kommen. Faktoren wie hohe Drücke, mechanischen Belastungen, chemische Behandlung, extreme Temperaturen und/oder extreme pH-Werte während des Verarbeitungsprozesses – wie z.B. bei der Konservenherstellung – können Nukleinsäuren beschädigen oder abbauen. Das bedeutet, dass die Empfindlichkeit des Testkits verringert sein kann und möglicherweise nicht alle ursprünglichen Bestandteile erfasst werden.
- Das Pekannuss-Nachweisverfahren weist eine Querempfindlichkeit zu Schuppenrinden-Hickorynuss (*Carya ovata*) von 100 % auf.

4 Weitere Informationen

4.1 Weitere Dokumente und Hilfsmittel

- Detaillierte Informationen zur Einstellung bestimmter real-time PCR Geräte (Download: www.congen.de/download)
- Produktbegleitende Unterlagen (Download: www.congen.de/eifu/)
- Validierungsreport auf Anfrage

4.2 Technischer Support

Bei Fragen zur Durchführung wenden sie sich bitte an Ihren Distributor oder per E-Mail an sales@r-biopharm.de.

4.3 Vertrieb und Bestellung

R-Biopharm AG
An der neuen Bergstrasse 17,
64297 Darmstadt, Germany
Phone: +49 (0) 61 51 - 81 02-0
Fax: +49 (0) 61 51 - 81 02-20
E-Mail: orders@r-biopharm.de
www.r-biopharm.com



1 General Information

1.1 Description

The SureFood® ALLERGEN 4plex EU NUTS is a real-time PCR for the direct, qualitative detection and differentiation of specific almond (*Prunus dulcis*), cashew (*Anacardium occidentale*), pistachio (*Pistacia vera*), peanut (*Arachis hypogaea*), hazelnut (*Corylus avellana*), walnut (*Juglans regia*, *Juglans nigra*), pecan (*Carya illinoensis*), brazil nut (*Bertholletia excelsa*) and macadamia (*Macadamia tetraphylla*) DNA sequences according to directive (EC) 1169/2011 in food.

Each reaction contains an internal amplification control (IAC). If the DNA contains PCR inhibiting substances, the signal of the amplification control will be affected or the amplification will be suppressed. Examples for PCR inhibiting substances are alcohols (e.g. ethanol, isopropanol), surfactants (e.g. CTAB, SDS, Triton X100) and salts (e.g. sodium chloride). In addition spices, herbs, algae, cocoa and further sample matrices might have PCR inhibiting effects.

The real-time PCR assay can be performed with commonly used real-time PCR instruments, equipped for detection of four fluorescence emissions at the channels FAM, VIC/HEX, ROX and Cy5 at the same time. The internal technical verification of instruments was performed on Agilent AriaDx, Bio-Rad CFX96 Dx, Qiagen Rotor-Gene Q, R-Biopharm RIDA®CYCLER, and Roche LightCycler® 480 II.

1.2 Limit of Detection

The SureFood® ALLERGEN 4plex EU NUTS real-time PCR has a limit of detection of ≤ 1 mg / kg using SureFood® PREP Advanced, protocol 1.

The limit of detection of the complete method (DNA extraction and real-time PCR) depends on sample matrix, processing grade, DNA preparation and DNA content.

The SureFood® PCR systems are very sensitive and therefore even a small amount of target DNA is sufficient for a successful analysis. The concentration of total DNA in the sample does not allow a conclusion on the quantity and quality of the target DNA.

Note: Inconsistent mixing ratios may cause a loss of sensitivity in the low concentration channel in mixed samples especially with high amplicon concentrations (Cp value < 20).

1.3 DNA preparation

For DNA preparation the use of SureFood® PREP Advanced (Art. No. S1053), protocol 1 is recommended.

1.4 Kit components and storage

Kit Code	Reagent	Amount	Lid Color
1	Reaction Mix	2 x 1050 µl	Yellow
2	Taq Polymerase	1 x 80 µl	Dark Red
3	Positive Control	1 x 200 µl	Light Blue

Store all reagents at -28 to -16°C and protected from light. The Taq Polymerase can be stored at +2 to +8°C for multiple uses on the same day.

Note: The Taq Polymerase may be in a frozen or unfrozen state. This does not affect the quality of the Taq Polymerase or the performance of the real-time PCR.

1.5 Additionally required equipment and materials

- DNA extraction kit (e.g. SureFood® PREP Advanced Art. No. S1053)
- real-time PCR instrument with four detection channels (510 nm, 580 nm, 610 nm and 660 nm)
- real-time PCR consumables (plates, tubes, foils, caps)
- pipettes with filter tips
- powder-free disposable gloves
- Vortex mixer
- micro centrifuge with a rotor for the reaction tubes

1.6 Precautions for users

- Extraction, PCR preparation and the PCR run should be separated in different rooms to avoid cross-contaminations.
- This test must only be performed by laboratory personnel trained in molecular biology methods.
- Strictly follow the working instructions.
- When handling samples, wear disposable gloves. After finishing the test, wash your hands.
- Do not smoke, eat or drink in areas where samples or test reagents are being used.
- Do not use the kit after the expiration date.
- All reagents and materials used have to be disposed properly after use. Please refer to the relevant national regulation for disposal.

1.7 Setup

	Blockcycler & R-Biopharm RIDA®CYCLER	Rotorcycler
Initial Denaturation (HOLD)	5 min, 95°C	1 min, 95°C
Cycles	35	35
Denaturation	15 sec, 95°C	10 sec, 95°C
Annealing/Extension (CYCLE)	30 sec, 60°C	15 sec, 60°C
Temperature Transition Rate/ Ramp Rate	Maximum	Maximum

1.8 Detection channel Set-up

Real-time PCR device	Detection	Detection channel	Quencher	Note
Agilent AriaDx/Mx	almond / cashew / pistachio	FAM	+	
	IAC	HEX	+	
	peanut / hazelnut / walnut	ROX	+	
	pecan / brazil nut / macadamia	Cy5	+	
Bio-Rad CFX96/Dx/Opus	almond / cashew / pistachio	FAM	+	Baseline Settings: • Baseline subtracted curve fit • Apply fluorescence drift correction
	IAC	VIC/HEX	+	
	peanut / hazelnut / walnut	ROX	+	
	pecan / brazil nut / macadamia	Cy5	+	
R-Biopharm RIDA®CYCLER	almond / cashew / pistachio	green	+	Ignore cycles before , if there is a significant deviation in the baseline at the start of the run. Please see page 45 of the cycler operating instructions, section 12.1.2 Cycling analysis parameter
	IAC	yellow	+	
	peanut / hazelnut / walnut	orange	+	
	pecan / brazil nut / macadamia	red	+	
Qiagen Rotor- Gene Q	almond / cashew / pistachio	green	+	Note: Please use only 0.1 ml reaction tubes. The gain settings must be set to 5 (factory default) for all channels.
	IAC	yellow	+	
	peanut / hazelnut / walnut	orange	+	
	pecan / brazil nut / macadamia	red	+	

Real-time PCR device	Detection	Detection channel	Quencher	Note
Roche LightCycler® 480 II	almond / cashew / pistachio	465-510	+	The SureCC Color Compensation Kit I (Art. No. F4009) is required.
	IAC	533-580	+	
	peanut / hazelnut / walnut	533-610	+	
	pecan / brazil nut / macadamia	618-660	+	

2 Qualitative Analysis

2.1 Protocol

2.1.1 Preparation of the master-mix

Calculate the total number of reactions needed (samples and control reactions) for the specific PCR assay.

Recommended control reactions for the specific PCR assay: negative control, extraction control and Positive Control.

The reaction mix contains an internal amplification control (inhibition control) per reaction.

Reactions needed for the qualitative EU Nuts detection:

3 reactions for controls* (1x negative control, 1x extraction control, 1x Positive Control)

For each sample: at least 1 reaction for each sample DNA

It is also recommended to prepare the master-mix with 10% additional volume in order to compensate reagent loss. Allow the reagents to thaw, mix and centrifuge before opening and use.

Example for the calculation and preparation of 10 reactions:

Components of the master-mix	Amount per reaction	10 reactions (with 10% excess)
Reaction Mix	19.3 µl	212.3 µl
Taq Polymerase	0.7 µl	7.7 µl
Total volume	20 µl	220 µl

Mix each master-mix well and centrifuge shortly before use.

2.1.2 Preparation of the real-time PCR-mix

- Pipette 20 µl of the master-mix into appropriate tubes/wells.
- Close the negative control.
- Pipette 5 µl of sample DNA into the designated tubes/wells and close them.
- Pipette 5 µl of Positive Control into the designated tubes/wells and close them.
- Centrifuge all tubes/plates shortly at low speed.
- Place tubes/plates into the real-time PCR instrument and start the run according to the setup.

* Description of the controls

- Negative control: only master-mix
- Extraction control: the extraction is performed without the sample – only PREP reagents
- Positive Control: master-mix and within the kit's provided Positive Control

2.2 Interpretation of results

The evaluation has to be made according to the usual analysis program recommended by the real-time PCR instrument manufacturer.

The control reactions have to show the correct results.

Almond, cashew and/or pistachio DNA is detected in the FAM-channel, peanut, hazelnut and/or walnut DNA is detected in the ROX-channel and pecan, brazil nut and/or macadamia DNA is detected in the Cy5-channel (see table). In the VIC/HEX-channel the internal amplification control (IAC) is detected.

A sample is stated **positive** for the respective parameter, if the sample DNA shows amplification in the respective channel. High amplicon concentrations can result in a weak or absent signal of the IAC.

A Cp value for the IAC is not needed to obtain a positive result of the Positive Control.

A sample is stated **negative** for the respective parameter, if the sample DNA shows no amplification in the respective channel and if the internal control (VIC/HEX-channel) of the sample is **positive** with a shift in Cp-value ≤ 2 compared to the negative control.

If the sample DNA in the VIC/HEX-Channel shows **no amplification** or a shift in Cp-value > 2 compared to the negative control, it contains PCR inhibiting substances. A significant decrease in the fluorescence signal can also show the presence of PCR inhibiting substances. Under these circumstances DNA isolation and purification of the sample need to be improved. Alternatively the DNA can be diluted (recommendation 1:2 in PCR-water) and analysed again for inhibition. Please note that the dilution factor also affects the detection limit of the specific PCR assay.

Result in the respective channel				Interpretation
FAM channel almond / cashew / pistachio	ROX channel peanut / hazelnut / walnut	Cy5 channel pecan / brazil nut / macadamia	VIC/HEX channel IAC	
positive	negative	negative	positive/negative	almond-, cashew- and/or pistachio-DNA detected
negative	positive	negative	positive/negative	peanut-, hazelnut- and/or walnut-DNA detected
negative	negative	positive	positive/negative	pecan-, brazil- nut and/or macadamia-DNA detected
negative	negative	negative	positive	Negative, target DNA is not detected
negative	negative	negative	negative	invalid

Note: The results displayed in the table above represent merely an example. Additional combinations are also possible.

The following table shows the specification ranges of the kit controls

	Specification range	Internal amplification control (IAC)
negative control	negative	$25 \leq C_p \leq 34$
Positive Control (FAM –almond / cashew / pistachio)	$22 \leq C_p \leq 30$	not relevant
Positive Control (ROX – peanut / hazelnut / walnut)	$22 \leq C_p \leq 30$	not relevant
Positive Control (CY5 – pecan / brazil nut / macadamia)	$22 \leq C_p \leq 30$	not relevant

3 Limitations of the method

- The presence of PCR inhibitors may cause invalid results.
- Extremely low levels of target below the limit of detection (LoD) may be detected, but results may not be reproducible.
- Samples tested negative still could contain an allergen contamination below the limit of detection of the assay, or they might contain other allergen components like proteins or lipids for example.
- In highly processed samples, the detection limit may be shifted. Factors such as high pressures, mechanical stresses, chemical treatment, extreme temperatures and/or extreme pH values during manufacturing process – such as in canning production – can damage or degrade nucleic acids. This means that the sensitivity of the test kit may be reduced and not all original components may be detected.
- The pecan detection system shows 100% cross reactivity to shagbark hickory (*Carya ovata*).

4 Further Information

4.1 Product Information

- Detailed information about setup of several real-time PCR devices (Download: www.congen.de/en/downloads)
- Product-related documents (Download: www.congen.de/en/eifu/)
- Validation Report upon request

4.2 Technical Support

For further questions please contact your distributor or send an e-mail to sales@r-biopharm.de.

4.3 Distribution and Ordering

R-Biopharm AG
An der neuen Bergstrasse 17,
64297 Darmstadt, Germany
Phone: +49 (0) 61 51 - 81 02-0
Fax: +49 (0) 61 51 - 81 02-20
E-Mail: orders@r-biopharm.de
www.r-biopharm.com

