



**Quantitative Allergen-Analytik als
Voraussetzung für harmonisierte
'action-level' (EU-VITAL)**

Matthias Kuhn

CONGEN

- Warum quantitative Allergen-Analytik?
- Wer benötigt die quantitative Information?
- EU: Allergen Nulltoleranz (technische Null; kleiner LOD)
- Codex: Gluten Free <20 ppm; low Gluten <100ppm
- Reicht größer bzw. kleiner 20 ppm als Information?

Zukunft:

- Grenzwerte bzw. 'action levels' in Bezug auf Deklaration (Beispiel: EU-VITAL (basierend auf VITAL))
- Verlässliche quantitative Analytik
- Referenzmaterial

ORANGEN-MANDEL-BUTTERGEBÄCK

Ⓓ Zutaten: Weizenmehl, Butter (24%), Zucker, Mandeln (6%), Kokosnuss, Vollei, Backtriebmittel (Natriumhydrogencarbonat, Dinatriumphosphat), Ingwer, Salz, natürliches Orangenaroma, Orangen.

Kann Spuren von Nüssen, Weizen, Gluten, Eiern und Milchprodukten enthalten. Kühl und trocken lagern.

Mindestens haltbar bis: s. Bodenunterseite.

ORANGE ALMOND BUTTER COOKIES

ⒼB Ingredients: Wheat flour, butter (24%), sugar, almonds (6.4%), Desiccated coconut, liquid whole egg, raising agents: sodium hydrogencarbonate (E500 ii), disodium

BISCUITS AU BEURRE AUX ORANGES ET AMANDES

Ⓕ Ingrédients: Farine de blé, beurre (24%), sucre, amandes (6.4%), noix de coco déshydratée, oeufs entier liquide, agent de levure: bicarbonate de sodium (E500 ii), phosphate disodique (E339 ii), gingembre, sel, arôme naturel d'orange, orange (0.05%). A consommer de préférence avant fin: voir au dos du paquet.

Conserver dans un endroit sec et frais. Placer dans un contenant hermétique après ouverture.

Traces éventuelles de noix.

Peut contenir des traces de fruits secs, blé, gluten, œufs et produits laitiers.



**Initiative for harmonized action
levels for the declaration of food
allergens**

EU- VITAL Konzept



VITAL = Voluntary Incidental Trace Allergen Labelling

- Festlegung von “Action levels” (AL)
Standardisierung für die Deklaration
- AL 1: keine Deklaration
- AL 2: kann Spuren von ... enthalten
- AL 3: enthält als Zutat
- Dimensionierung
mg **Protein**/ kg Lebensmittel

EU-VITAL = Vorschlag europäische Umsetzung

- alle in Richtlinie 2007/68 genannten Allergene enthalten
- Dimensionierung
mg **allergener Bestandteil**/ kg Lebensmittel

	action level 1	action level 2	action level 3
Milk	<50	50-500	>500
Egg	<20	20-200	>200
Soy	<25	25-250	>250
Fish	<100	100-1000	>1000
Peanut	<8	8-80	>80
Tree Nuts*	<10	10-100	>100
Sesame	<10	10-100	>100
Crustaceans	<10	10-100	>100
Gluten**	<20	20-100	>100
Celery	<20	20-200	>200
Lupine	<20	20-200	>200
Molluscs	<20	20-200	>200
Mustard	<20	20-200	>200
SO ₂	<10	10-100	>100

* Tree Nuts according to Commission directive 2007/68/EC: Hazelnuts, walnuts, Brazil nuts, pecan nuts, cashews, macadamia nuts, pistachio nuts, almonds
 ** according Commission regulation (EC) No 41/2009 concerning the composition and labelling of foodstuffs suitable for people intolerant to gluten; according Codex Alimentarius

- Die Unterschiede
- (1) Das VITAL-Modell listet weniger/andere zu kennzeichnende Allergene als in der EU beschrieben
- Ein hier vorgestelltes **EU-VITAL** Modell enthält alle Allergene gemäß der europäischen Richtlinie (s.u.).
- (2) Die Grenzwerte sind im VITAL-Modell als **allergenes Protein/Gesamtlebensmittel [ppm]** dimensioniert.
- Das **EU-VITAL** Modell listet die Grenzwerte wie in Europa bereits normiert (DIN EN 15634-1) auf:

mg allergene Bestandteile/kg Lebensmittel [ppm]

Deklaration Action Level

	Kennzeichnung	Deklaration
Action Level 1	keine erforderlich	-
Action Level 2	erforderlich	"enthält Spuren von ..."
Action Level 3	erforderlich	"enthält ... (als Zutat)"

Deklaration

Nebenstehende Tabelle zeigt die Deklaration der drei action level

Einheit / Dimensionierung

mg allergene Bestandteile/
kg Lebensmittel [ppm]

Action Level für Allergene gemäß EU-Richtlinie 2007/68/EG

Allergen	Action Level 1	Action Level 2	Action Level 3
Milch	< 50	50 - 500	> 500
Ei	< 20	20 - 200	> 200
Soja	< 25	25 - 250	> 250
Fisch	< 100	100 - 1.000	> 1.000
Erdnuss	< 8	8 - 80	> 80
Schalenfrüchte ¹	< 10	10 - 100	> 100
Sesam	<10	10 - 100	> 100
Krustentiere	< 10	10 - 100	> 100
Gluten ²	< 20	20 - 200	> 200
Sellerie	< 20	20 - 200	> 200
Lupine	< 20	20 - 200	> 200
Mollusken	< 20	20 - 200	> 200
Senf	< 20	20 - 200	> 200
SO ₂	< 10	10 - 100	> 100

action level

Nebenstehende Tabelle zeigt action level für ausgewählte Allergene

Einheit / Dimensionierung

mg allergene Bestandteile/
kg Lebensmittel [ppm]

¹ Schalenfrüchte gemäß Richtlinie 2007/68/EG der Kommission: Haselnuss, Walnuss, Paranuss, Cashewnuss, Macadamianuss, Pistazie, Mandel

² siehe Verordnung (EG) Nr. 41/2009 der Kommission zur Zusammensetzung und Kennzeichnung von Lebensmitteln, die für Menschen mit einer Glutenunverträglichkeit geeignet sind und siehe Codex Alimentarius

Problematik der praktischen Umsetzung

Referenzmaterial

→ kein standardisiertes Referenzmaterial

Konsequenz:

Uneinheitliche Herstellung interner Vergleichsmaterialien

Uneinheitliche Dotierungsmaterialien (Samen, Blatt, Mehl, etc...)

• Grenzwerte

→ Nulltoleranz laut EG Richtlinie

→ Nachweis von „Null“ nicht möglich ('technische Null')

Konsequenz:

Nachweisgrenzen variieren je Nachweissystem und Hersteller

Positive Ergebnisse ohne Gehaltsbestimmung 1 ppm oder 1000 ppm (0,1%)

→ kann Spuren von Enthalten

• normierte Verfahren § 64 LFGB/DIN

→ **4 von 20** allergenen Bestandteilen (Soja, Erdnuss, Haselnuss, Sellerie)

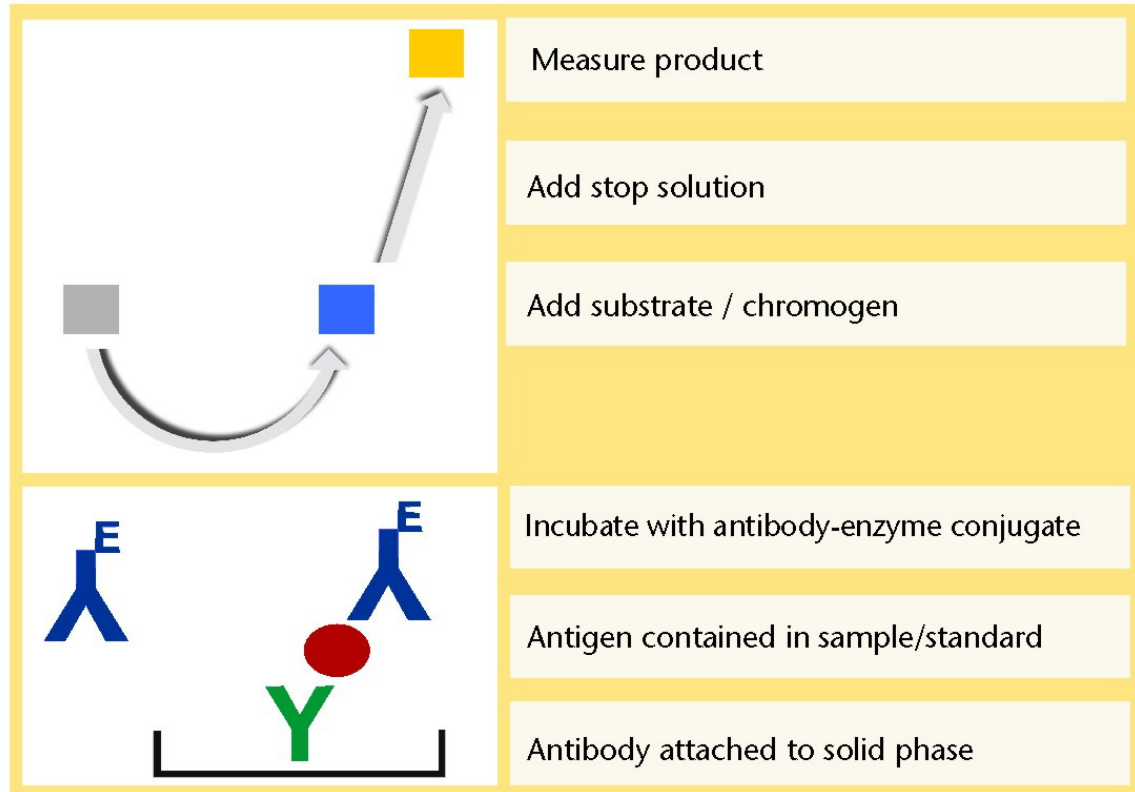
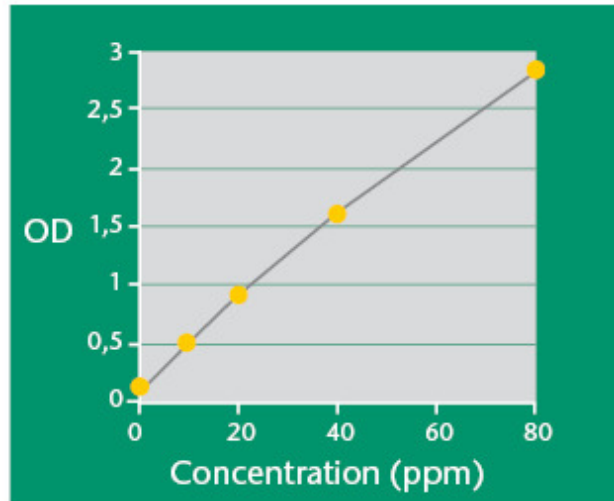
Konsequenz:

Verwendung verschiedenster (quantitativer) Nachweismethoden, -verfahren

Quantitative Methoden

- ELISA
- real time PCR

Sandwich ELISA



QUALITY ASSURANCE CERTIFICATE

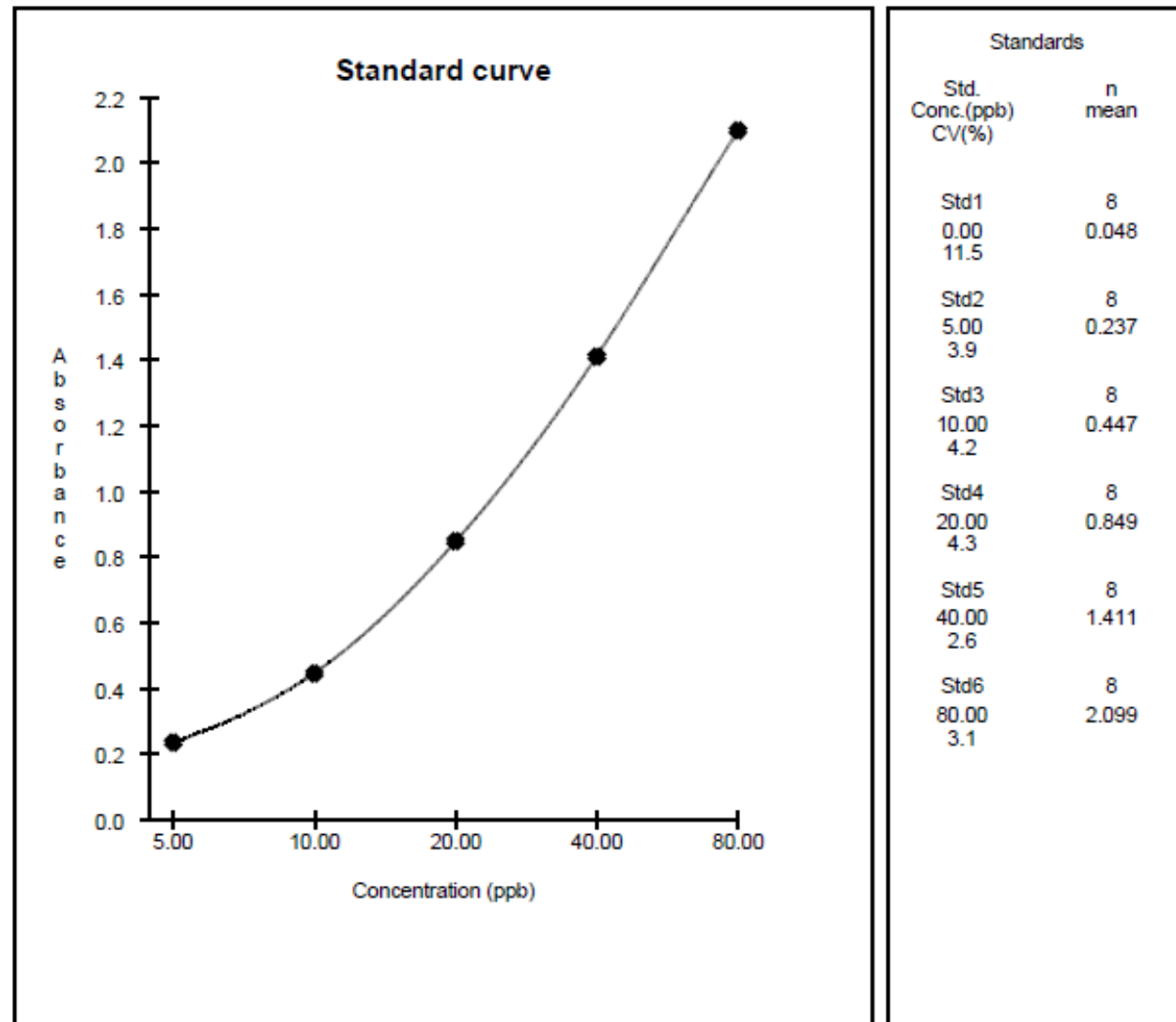
RIDASCREEN® Gliadin

Art. No.: R7001 Lot: 02499 Expiry: 2011-03

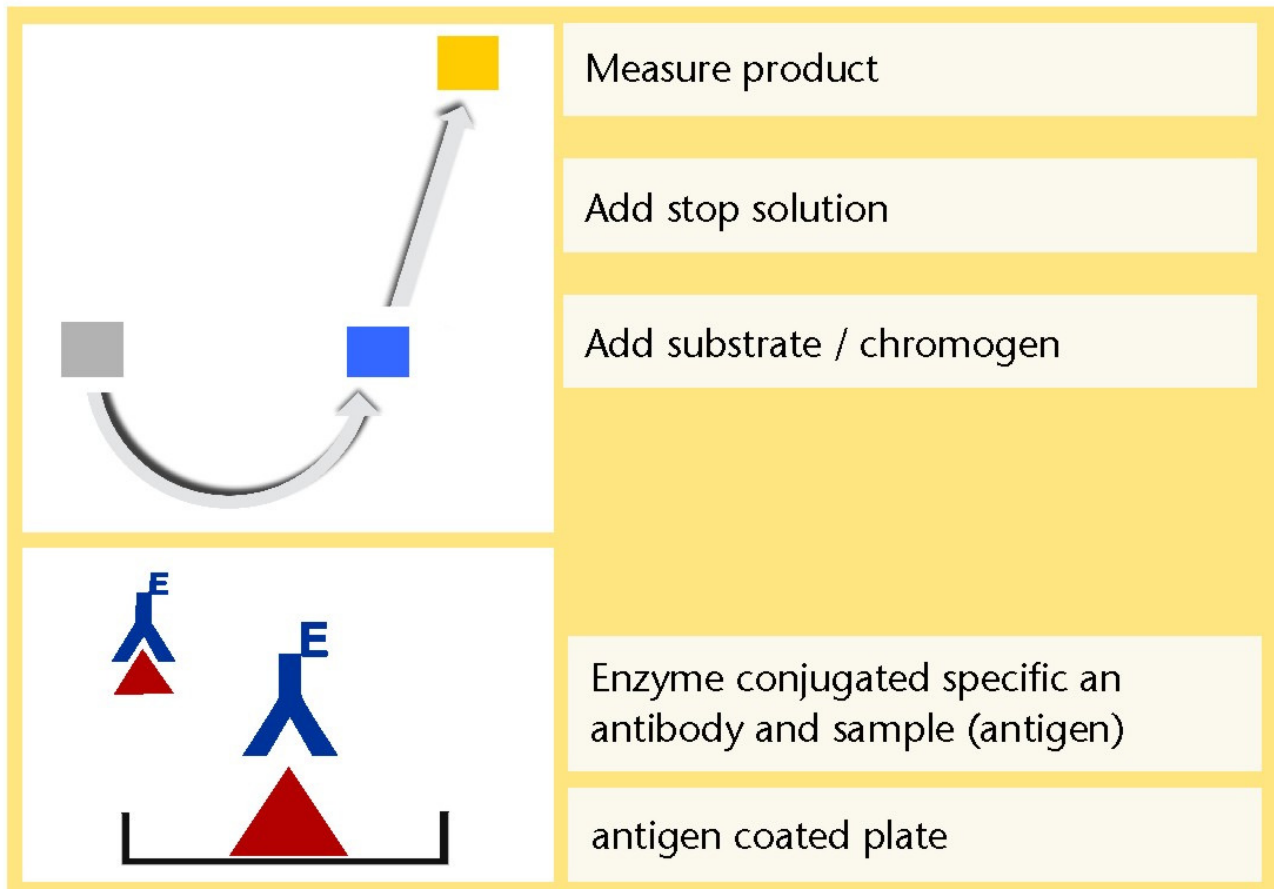
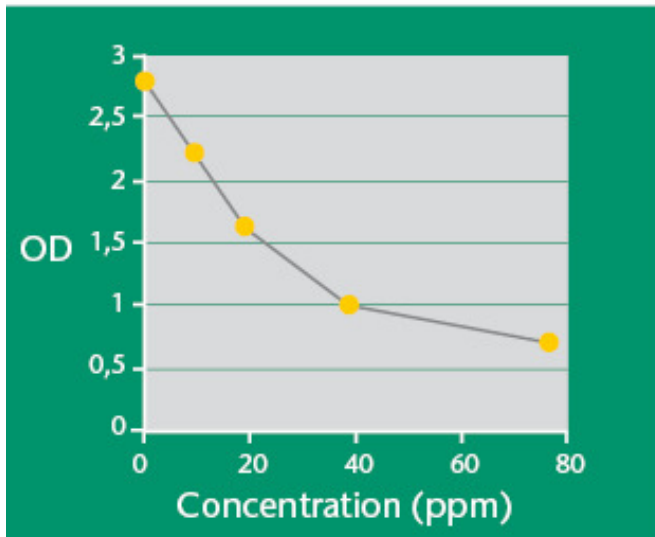
R-Biopharm AG, Darmstadt, Germany certifies that this batch has been approved by the Quality Assurance Department and conforms with specifications

Sandwich ELISA:

The higher the conc. the higher is the absorbance.



Competitive ELISA



QUALITY ASSURANCE CERTIFICATE

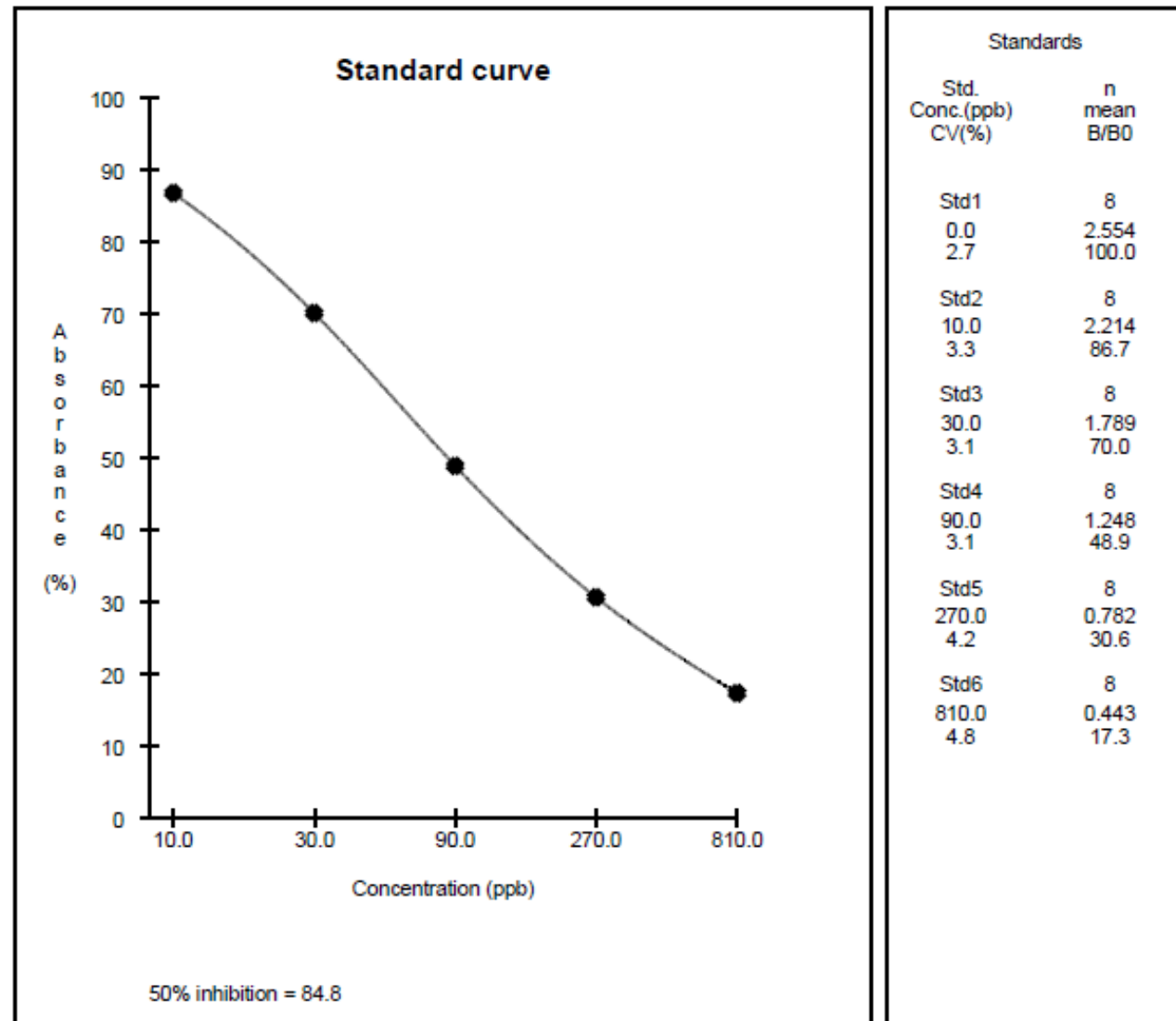
RIDASCREEN® β -Lactoglobulin

Art. No.: R4901 Lot: 02208 Expiry: 2009-06

R-Biopharm AG, Darmstadt, Germany certifies that this batch has been approved by the Quality Assurance Department and conforms with specifications

competitive ELISA:

The higher the conc. the lower is the absorbance.

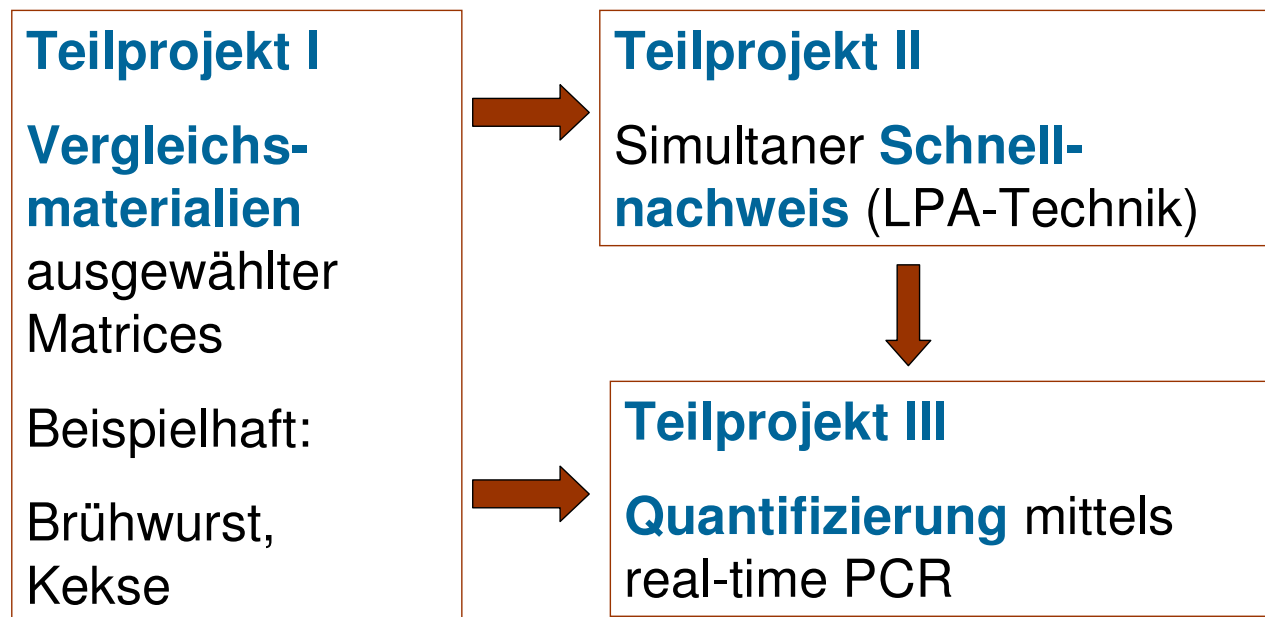


Quantitative Methoden

- ELISA
- real time PCR

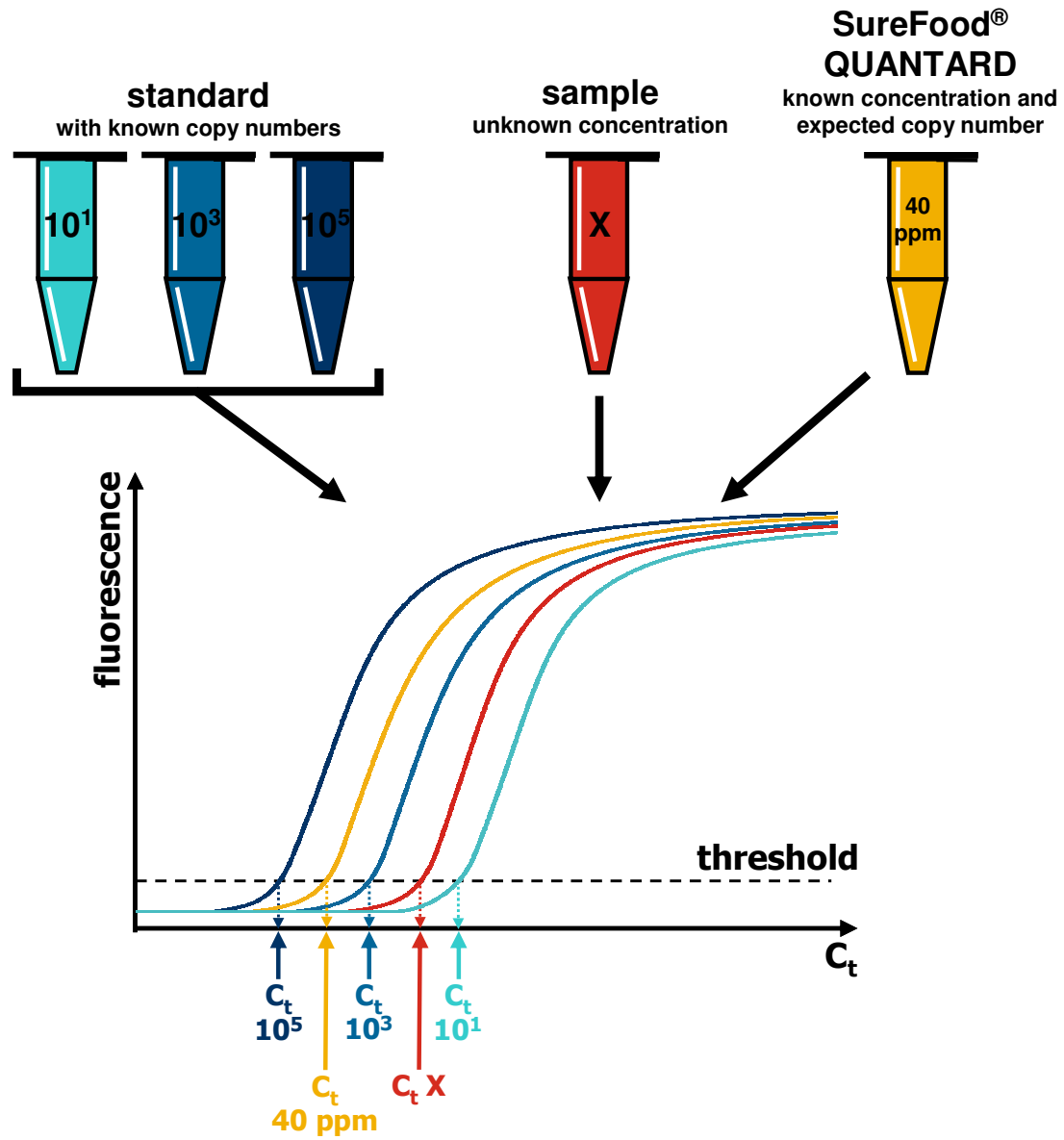
Verbundprojekt QUALITÄT

Verbundvorhaben Allergenanalytik CVUA Freiburg, LGL Oberschleißheim, Congen Biotechnologie



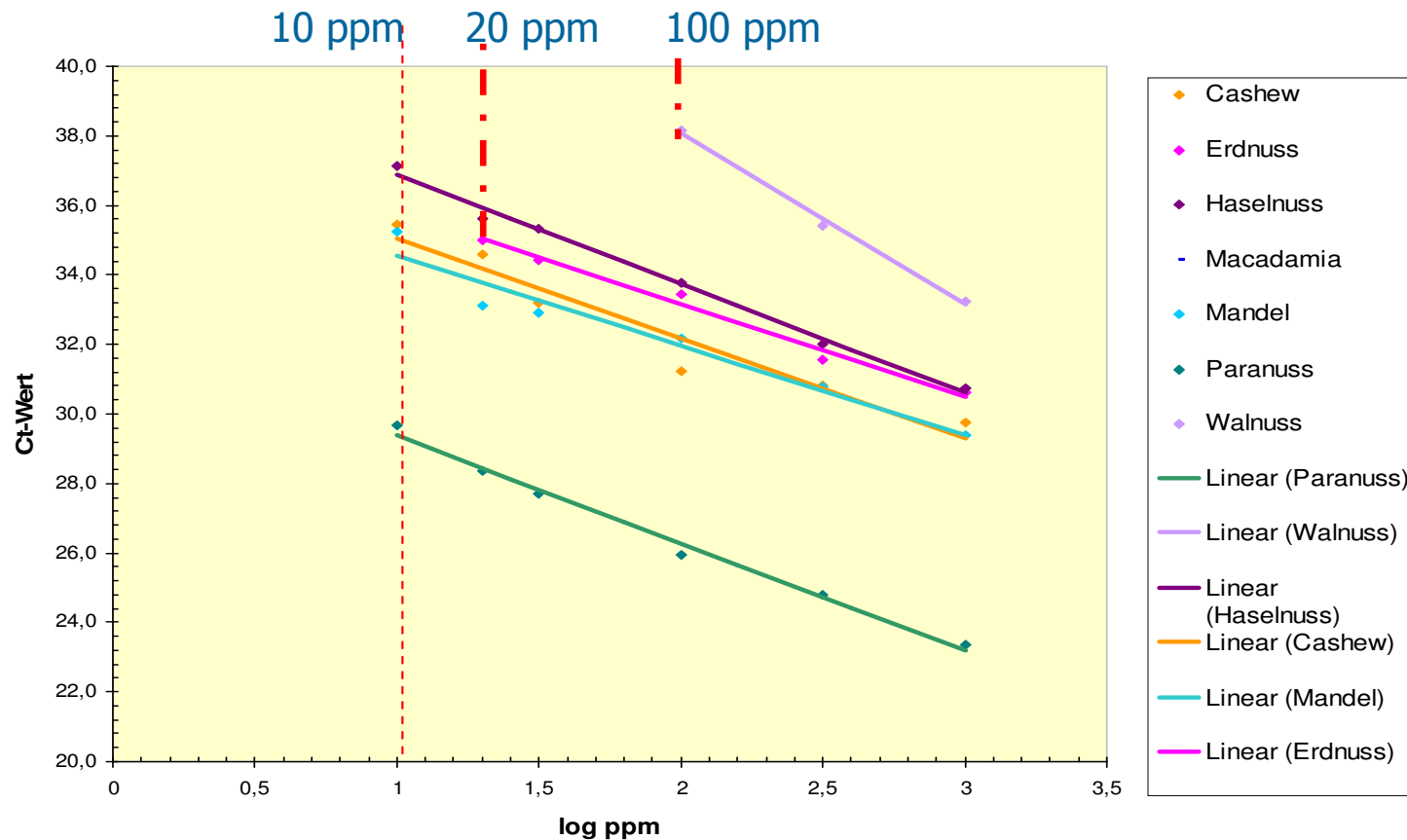
- Quantitativer Allergennachweis über die qPCR
Voraussetzungen
 - quantitatives Referenzmaterial
 - 'process efficiency' Referenzmaterial
 - Standard/Referenz DNA
- Korrelation mit 'ppm' Gehalt über Referenzmaterial Food

Beispiele GMO: relative Quantifizierung (% GMO)
 Pathogene: Absolute Quantifizierung (Zellzahl)



Teilprojekt III- Quantifizierung mittels real-time PCR

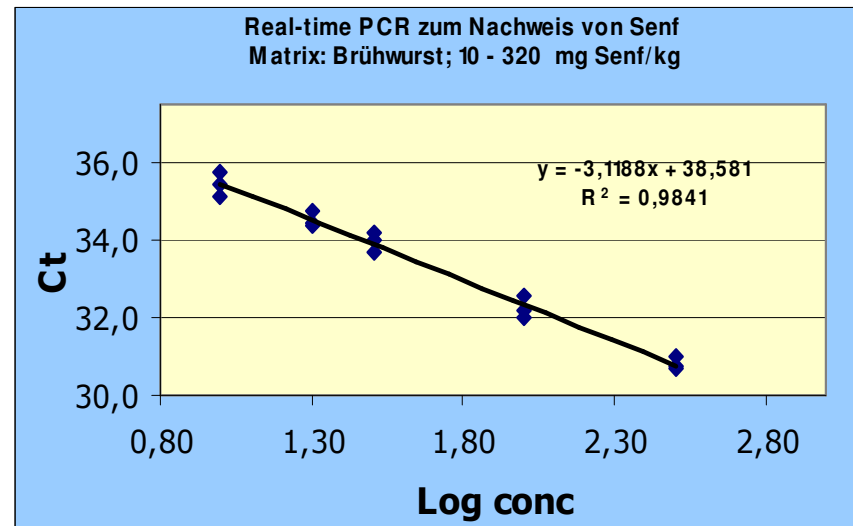
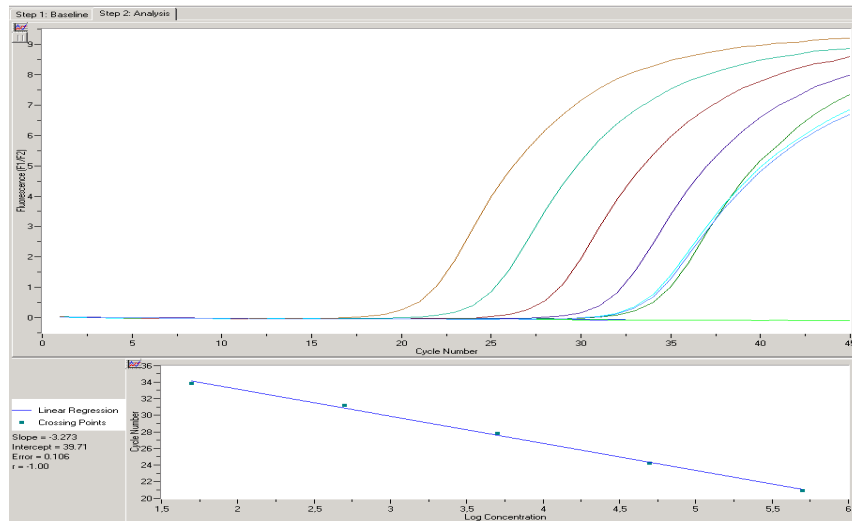
Bestimmung der Nachweisgrenze am Beispiel Nuss in Brühwurst



→ nicht alle Verfahren für Quantifizierung im unteren ppm Bereich geeignet,
Optimierung der Nachweissysteme erforderlich

Teilprojekt III- Quantifizierung mittels real-time PCR

Quantitative Bestimmung am Beispiel Senf in Brühwurst



- DNA Extraktion unproblematisch, 5 -10 ppm detektierbar
- Linerarität gegeben
- quantitative Bestimmung von Proben mit unbekanntem Gehalt möglich

'Matrix adaptierte' Quantifizierung von allergenen Bestandteilen mittels real-time PCR

Durchführung

Extraktion von Probe und Referenzmaterial mit bekanntem Gehalt an allergenem Bestandteil in einer Lebensmittelmatrix

z.B. 4 mg Senf / kg LM

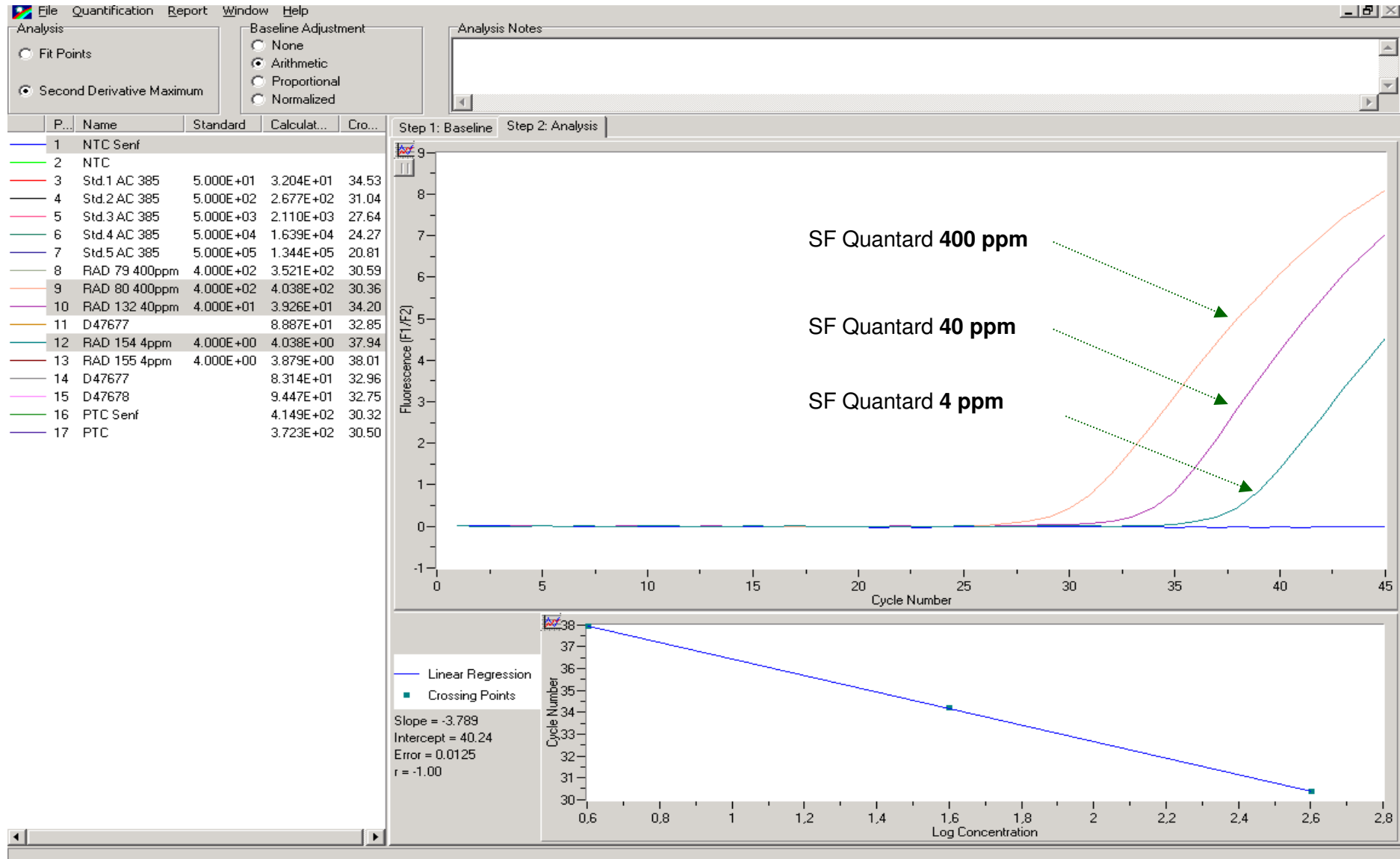
40 mg Senf / kg LM

400 mg Senf / kg LM

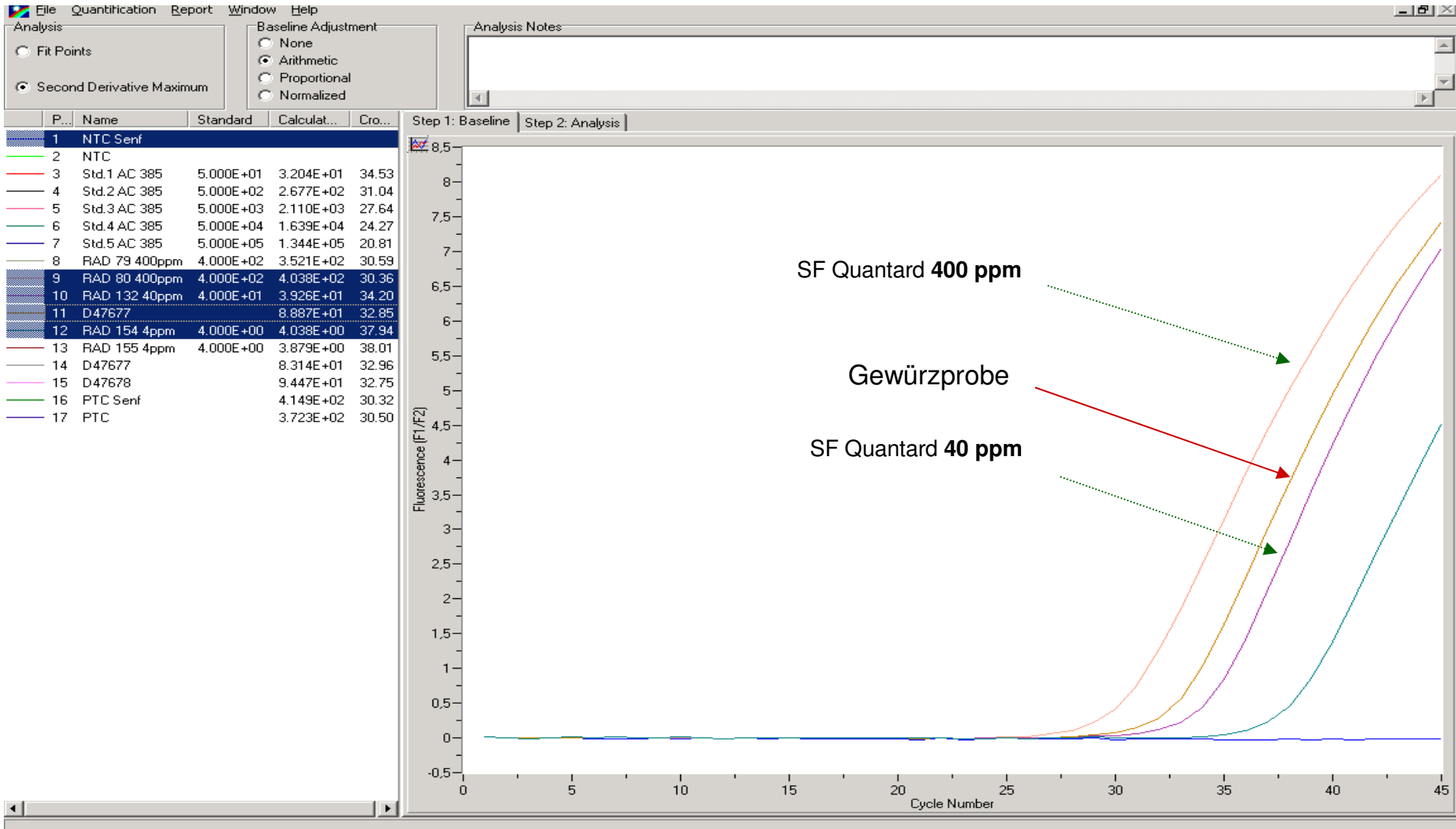
real-time PCR mit Probe und Referenzmaterial, Referenzmaterialien definiert als Standards mit bekannten Konzentrationen

Quantitatives Ergebnis des allergenen Bestandteils im LM

Quantifizierung von Senf in einer Gewürzmischung mittels SureFood Quantard Allergen Mustard

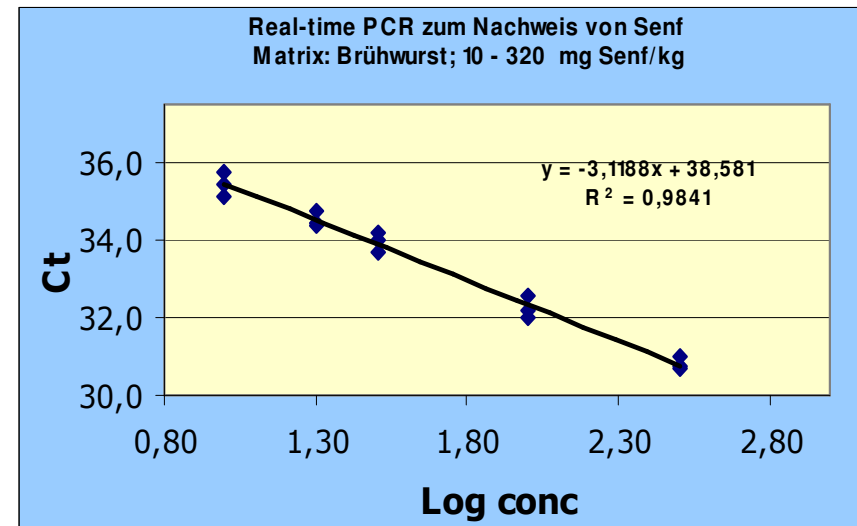
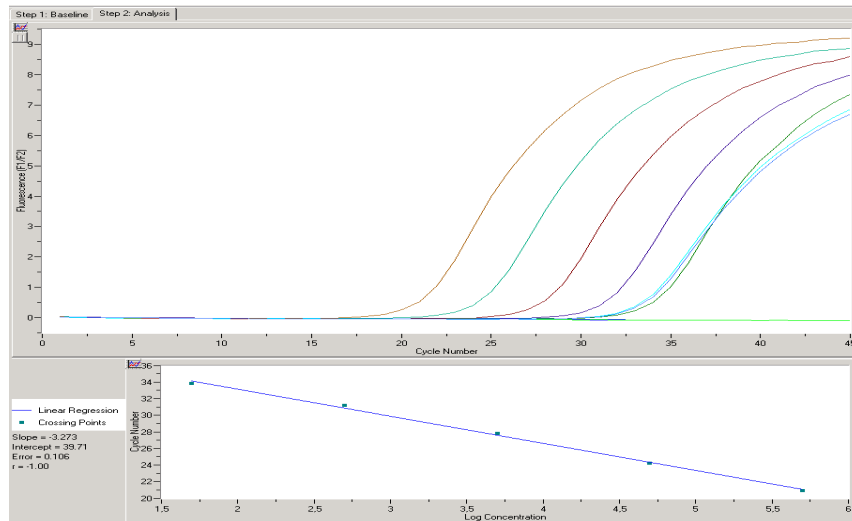


Quantifizierung von Senf in einer Gewürzmischung mittels SureFood Quantard Allergen Mustard



Teilprojekt III- Quantifizierung mittels real-time PCR

Quantitative Bestimmung am Beispiel Senf in Brühwurst



- DNA Extraktion unproblematisch, 5 -10 ppm detektierbar
- Linearität gegeben
- quantitative Bestimmung von Proben mit unbekanntem Gehalt möglich

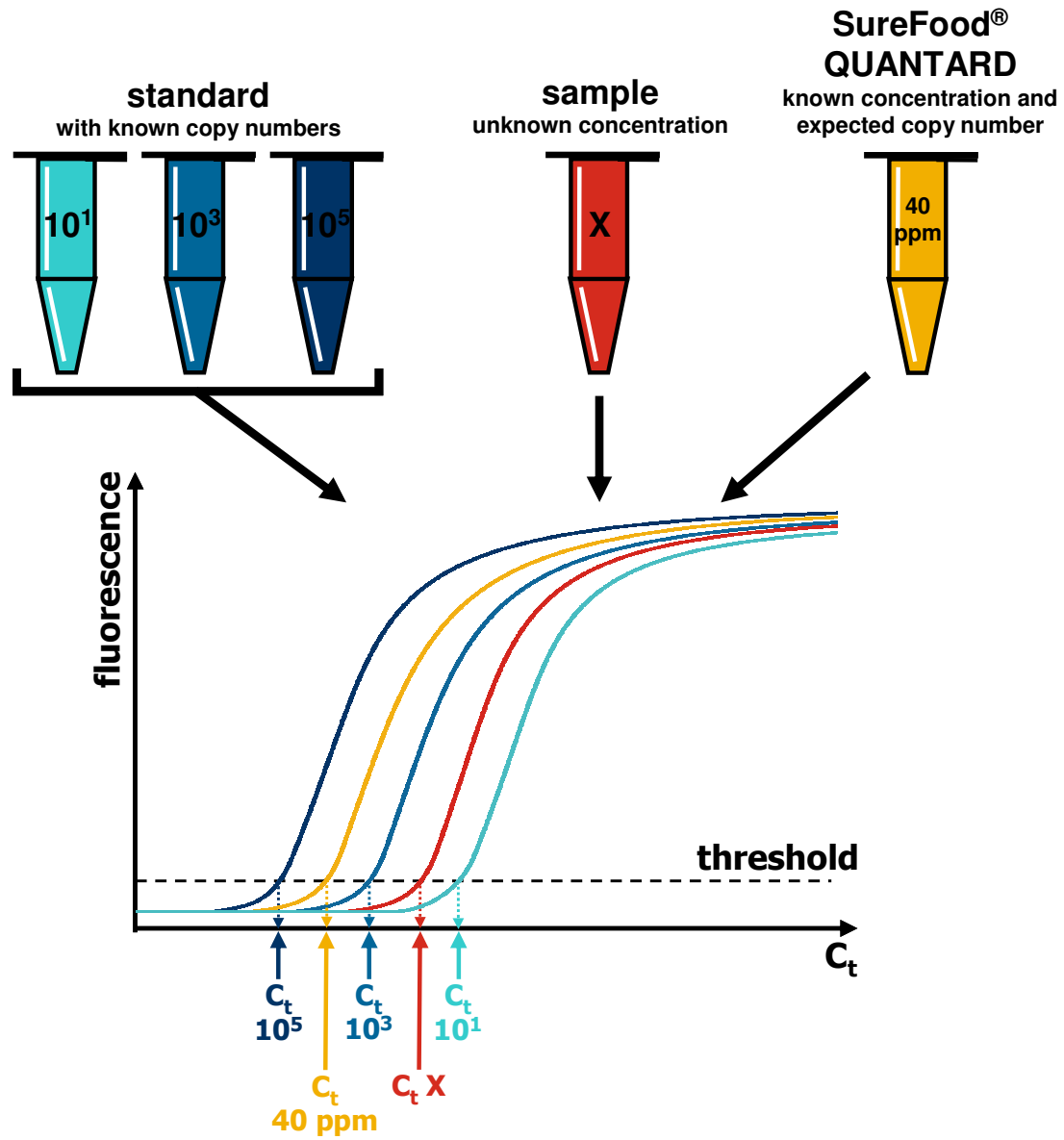
Quantifizierung von Senf in einer Gewürzmischung mittels SureFood Quantard Allergen Mustard

Ergebnis

- Abschätzung
→ 40 ppm > Gewürzprobe < 400 ppm
- Quantitatives Ergebnis
→ **89** mg allergener Bestandteil / kg Lebensmittel

Zusammenfassung

- einheitliche DNA Extraktion für Referenzmatrix und Probe
- Quantifizierung über Referenzproben mittels real-time PCR möglich



Vorteile

- Berücksichtigt Effizienz der DNA Extraktion
- leicht adaptierbar (Schwellenwerte)
- einsetzbar für alle qPCR Systeme
- einsetzbar für alle Probenaufbereitungssysteme
- keine aufwendigen DNA Standard nötig

Limitierungen

- Matrixeffekte könne unterschiedlich sein (Mischung!)

Vergleich immunologische Verfahren und PCR

Anhang III a (Richtlinie 2003/89/EG)

ELISA

PCR

PCR oder ELISA

- **Glutenhaltiges Getreide (Weizen, Roggen, Gerste, Hafer, Dinkel, Kamut)**
- **Krebstiere**
- **Eier**
- **Fisch**
- **Erdnüsse**
- **Soja**
- **Milch (einschließlich Laktose)**
- **Schalenfrüchte, d. h. Mandel, Haselnuss, Walnuss, Cashewnuss, Pecannuss, Paranuss, Macadamianuss**
- **Sellerie**
- **Senf**
- **Sesamsamen**
- **Schwefeldioxid und Sulfite (bei mehr als 10 mg/kg od. 10 ml/l)**
- **Lupine**
- **Weichtiere (Schnecken, Muscheln, Kopffüßer)**

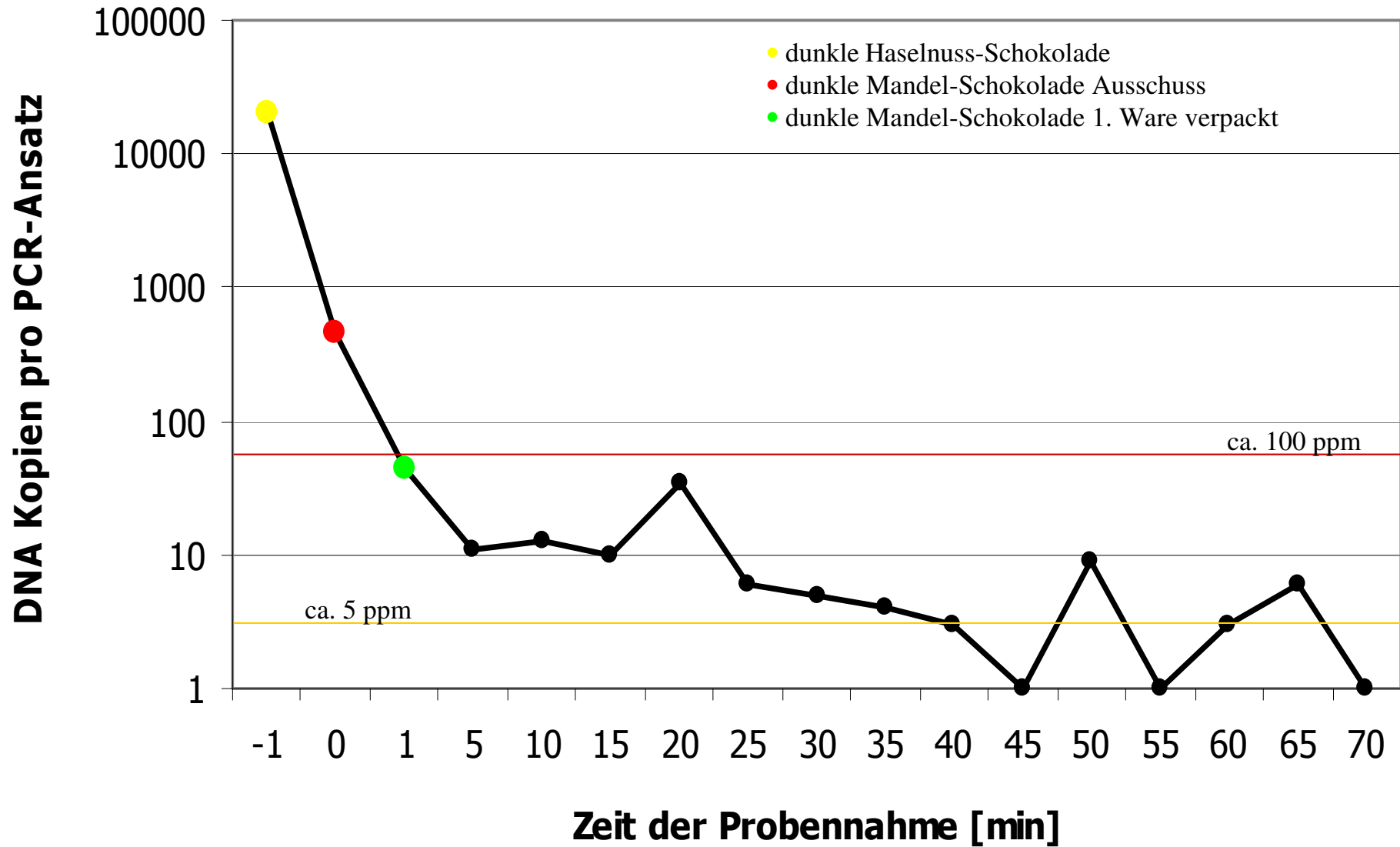
Erfahrungen aus der Praxis

- Untersuchung einer Produktionsstrasse

Herstellung von **Haselnuss**schokolade
im Anschluss Herstellung von **Mandels**schokolade

- Probennahme Ende Haselnusschokoladenproduktion bis Beginn Mandelschokoladenproduktion
 - Punkt 0 Abschluss Haselnuss
 - Punkt 1 Abschluss Ausschuss (Festlegung durch Hersteller)
 - Punkt 2 Fertigung Mandelschokolade

Erfahrungen aus der Praxis- Verschleppung von Haselnuss in der Schokoladenproduktion





CONGEN