

Analitika Alergena iz Perspektive Analitičara

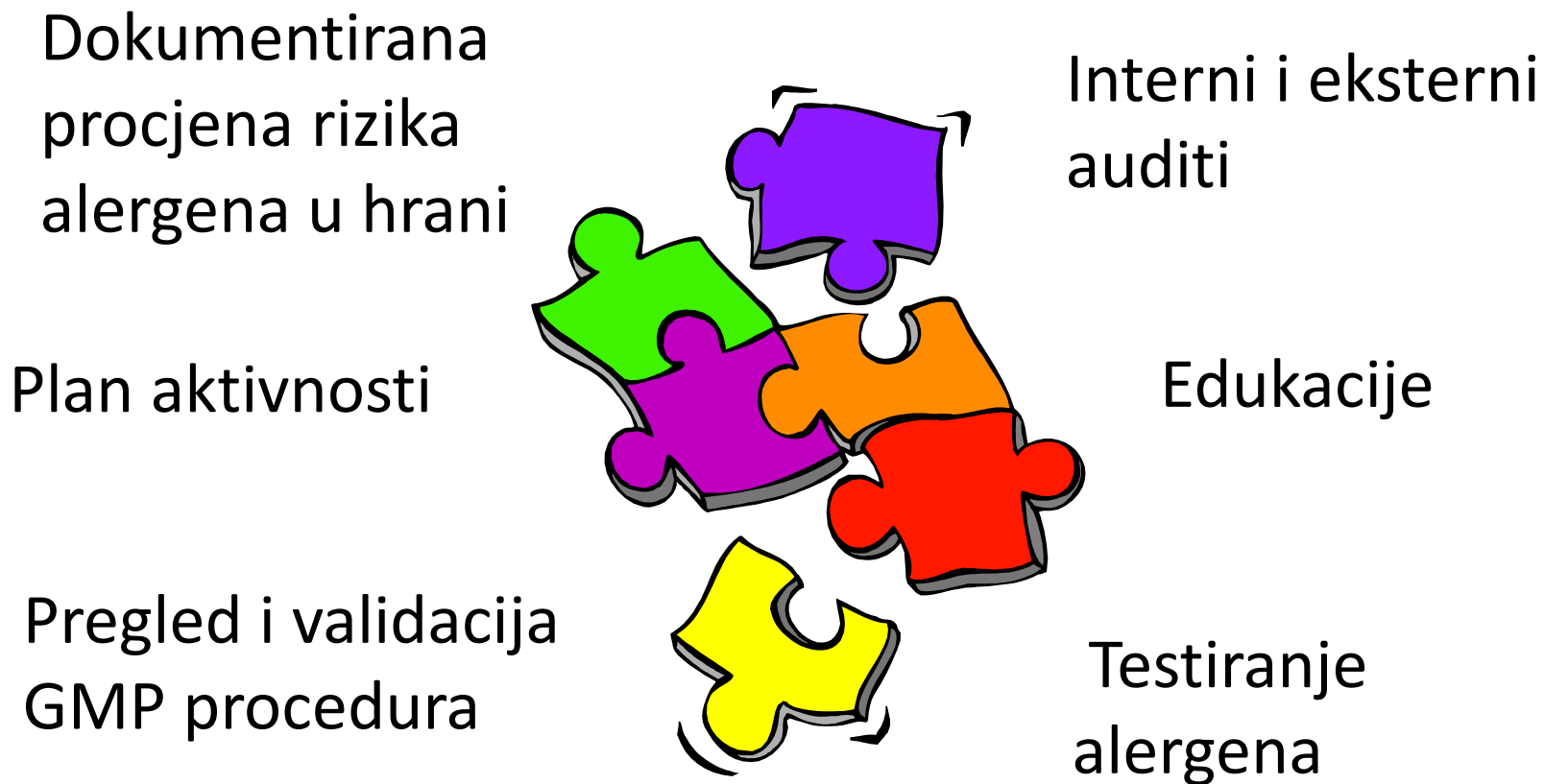
Pauline Titchener

Business Development Executive

Uloga testiranja alergena u hrani



Uloga testiranja alergena u hrani



ALLERGEN	TEST METHODS			SERVICE
	Hand-held test	ELISA	DNA	External Lab
Celery			✓	✓
Crustacea / Shellfish	✓	✓	✓	✓
Egg	✓	✓		✓
Fish			✓	✓
Gluten	✓	✓	✓	✓
Lupin		✓	✓	✓
Milk	✓	✓		✓
Mustard	✓	✓	✓	✓
Peanuts	✓	✓	✓	✓
Sesame	✓	✓	✓	✓
Soya	✓	✓	✓	✓
Sulphites				✓
	Tree Nuts			
- Almond	✓	✓	✓	✓
- Hazelnut	✓	✓	✓	✓
- Walnut	✓	✓	✓	✓
- Others	✓	✓	✓	✓

Nedostatan broj vrsta testova za detekciju svih alergena u hrani navedenih u regulativi

Potrebna je kombinacija vrste testova i analitičke usluge

Trenutne opcije za analizu alergena

ELISA	PCR	LCMS:MS
Veliki broj uzoraka, minimalna oprema i edukacija osoblja. Većina ELISA u mikrojažicama daje rezultate > 1h , brzi strip format za 5-10 minuta	Laboratorijska metoda zahtjeva specijalnu opremu & edukaciju. Rezultati dostupni za 5-6 h ili do 24 h ovisno o metodi .	Laboratorijska metoda zahtjeva specijalnu opremu & edukaciju. Visoko obučeno osoblje potrebno je za razvoj metode i interpretaciju rezultata. Rezultati dostupni za cca 48 h.
Većina dostupnih kitova dostupna je u strip formatu i ELISA formatu mikrojažica za cijelu paletu alergena	Metode dostupne za sve najvažnije alergene. Nije prikladna za jaja ili mlijeko.	Neki laboratoriji su u mogućnosti ponuditi analizu za validirane matrikse, mogućnost višestrukih analiza
Antitijela dizajnirana za detekciju proteina ciljanog alergena	Detektira DNA	Detektira ciljane peptide nakon digestivne ekstrakcije



Trenutne opcije za analizu alergena

ELISA	PCR	LCMS:MS
Osjetljivost <1 ppm LOD	Osjetljivost >10 ppm metoda jednostruke kopije, metoda višestruke kopije <10 ppm	10-100 ppm (ovisno o matrixu)
Kod nekih testova moguće unakrsne reakcije sa vrlo sličnim vrstama : <i>Prunus vrste npr.</i> badem/koštica breskve/ koštice višnje Gorušica/sjemenke <i>Brassica sp.</i>	Vrlo visoka specifičnost	Vrlo visoka specifičnost

Što uzeti u obzir pri odabiru metode

Faktori koju utječu na nadzor kontrole: plan uzorkovanja, učestalost uzorkovanja, vrsta uzorka, sukladnost metode i potrebe, primjenjivost, odobrenja metode, validacije metode, kalibracije, osjetljivost, specifičnost, preciznost, točnost, utjecaj matriksa, mjerne jedinice, kompetentnost, edukacija, dokumentacija, uvjeti, akreditacija laboratorija, troškovi, vrijeme

PAŽNJA: 'One size fits all' claims



Kada metode kontrole rade dobro ...

Allergic Living Allergies, Asthma & Gluten-free

FOOD ALLERGY | CELIAC | ASTHMA | BLOGS | POLLEN, PETS | HEALTHY HOME | SCHOOL | STING

Peanut & Tree Nut

Inside the Peanut-Tainted Cumin Recalls: What Happened?

By: [Patrick Bennett](#)

EMAIL | PRINT | [Share](#) 914 | [Tweet](#)

See our 2016 follow-up investigation [here](#).

Updated March 13, 2015 – As the widespread series of recalls of cumin products containing undeclared peanut continues across the United States, Allergic Living reached out to regulators and researchers to learn how this massive problem occurred, and how consumers with allergies can be protected.



Thinkstock

We can also report that the FDA has heard a dozen reports of allergic reactions related to the recalls, although the severity of them is not clear.

To start with the question of how so many spice and meat products – including nearly 600,000 pounds of beef, pork and chicken – came to contain peanut, the ultimate source and the means of contamination is still being determined. But there is some investigative progress.

Allergic Living is able to confirm that there were **two sets of cumin products recalls**: one for peanut and almond starting in fall 2014, and a second larger one for peanut only, starting in December 2014. Both were traced back to two separate Turkish suppliers, but so far there is no evidence the situations were related.

However, investigators say this doesn't necessarily mean that cumin from Turkey, or that cumin from other countries is safe – it's possible that contamination came from another country, such as India, and the contamination was traced back to Turkey.

"The spice chain is long and complex. It can

FREE NEWSLETTER
From Allergic Living

Ostaci kikirikija u kuminu na tržištu SAD

Sljedivost kontaminacije kikirikija do dva Turska dobavljača

Velike razlike u pronađenim vrijednostima pozitivnih uzoraka, neke < od 100 ppm, neke > 10,000 ppm +

...a kad ne rade ...

FoodQuality
news.com

FREE NEWSL

NEWS SECTORS BIG BRANDS TRENDS MULTIMEDIA TECHNOLOGIES EVENTS JOBS

NEWS > INDUSTRY NEWS

Text size Print Forward

f t G+ in + 70

Subscribe to our FREE newsletter Your e-mail address SUBSCRIBE

CUMIN PRODUCTS WERE RECALLED DUE TO ALMOND CONTAMINATION PROMPTING ALLERGY CONCERNS

Mahaleb caused false positive results in nuts and spices testing

By Joe Whitworth+ 

04-May-2015
Last updated on 15-May-2015 at 11:25 GMT



CFIA said there was cross-reactivity of mahaleb with the almond allergen test kit

Related tags: Nut, Almond, Peanut, Protein, Mahaleb, CFIA, FDA, FSA, Recall, Herbs, Spices, RASFF

Kao posljedica povećanog testiranja začina zbog slučaja kikirikija u kuminu, detektirane niske koncentracije badema (<20 ppm) u nekim začinima

Niske koncentracije potvrđene višestrukim ELISA testovima a u nekim slučajevima i putem PCR-a

Daljnja istraživanja putem LCMS:MS pokazala da je krivica u kontaminaciji Mahalebom

Mahaleb potječe od koštica šljiva i spada u rod Prunus ,u kojoj je i badem.

Potrebno je provesti istraživanje za dokaz kliničkog utjecaja takve križne reakcije

Ključni faktori koji utječu na testiranje

- Kakva je fizička narav alergena u hrani?
- Što uzeti u obzir kod uzorkovanja za alergene u hrani i gdje testirati za nadzor okoliša ?
- Učinak procesa prerade na alergene ?
- Utjecaj matriksa?
- Koja je metoda primjenjiva za analizu ?

Treba uzeti u obzir

- Osoblje koje radi ELISA testove treba imati iskustva ili biti obučeno od strane proizvođača kitova i slijediti propisane protokole testiranja
- Prostor gdje se testiranje provodi treba biti čist i mora se provoditi dobra laboratorijska praksa da bi se spriječila unakrsna kontaminacija npr. automatsko ispiranje
- Područje tj lokacija testiranja npr. moraju se poduzeti mjere opreza kako bi se prevenirala kontaminacija uzorka ili samog testa iz okoliša

Priroda alergena u hrani

- Hrana se uzgaja u prirodi, stupanj varijabilnosti u profilu proteina zbog agronomskih utjecaja i različitosti biljnih vrsta
- Za alergene prisutne na licu mjesta da li su oni partikularni ili lako dispergirani materijali? Koliko ih je u receptima proizvoda e.g.g. začinske mješavine?
- Također razmotriti odstupanja u sadržaju proteina u različitim vrstama alergenskih sastojaka



Priroda uzorka za analizu

- Sirovina
- Ostaci nakon pranja
- Ispirci (npr sol, šećer)
- Brisevi okoliša
- Zaostaci iz prethodne serije proizvodnje
- Poluproizvod
- Konačni proizvod

Brisevi okoliša mogu biti korisno sredstvo za dobivanje informacija potrebnih u postupku validacije i verifikacije čišćenja

Ali, rezultati uzoraka okoliša su nekada kvalitativni i izraženi u jedinicama koje ne omogućuju ispravnu komparaciju sa razinom aktivnosti

Uzorkovanje/ Gdje testirati?

- Budite svjesni mogućnosti miješanja sirovina npr. pšenica u zobu, kikiriki u drugim mahunarkama
- Analitička pogreška vezana je uz uzorkovanje, važno je da testirani uzorak odražava proizvodnu seriju i da distribucija alergena može biti slučajna ili „točkasta” (hot spot)
- Kao uzorke iz okoliša svakako uključite područja prolijevanja, indirektnog kontakta proizvoda s površinom, posuđe , opremu i djelatnike



Utjecaj procesa prerade

ELISA testovi se baziraju na reakciji antitijela sa ekstrahiranim proteinim stoga protein u uzorku mora biti što sličniji njegovom prirodnom obliku i lako ekstraktibilan

Neki primjeri gdje to ne mora biti slučaj :

- **Hidrolizirani proteini**
- **Fermentirani proizvodi i kulture**
- **Pospješivači procesa**
- **Enzim proteaza**
- **Neki koncentrirani dodaci hrani , okusi i boje**
- **Neki sastojci na uljnoj bazi (ulje, okusi na uljnoj bazi)**
- **Uzmite u obzir i utjecaj uvjeta u preradi hrane na detekciju alergena**

Primjeri problematičnih matriksa

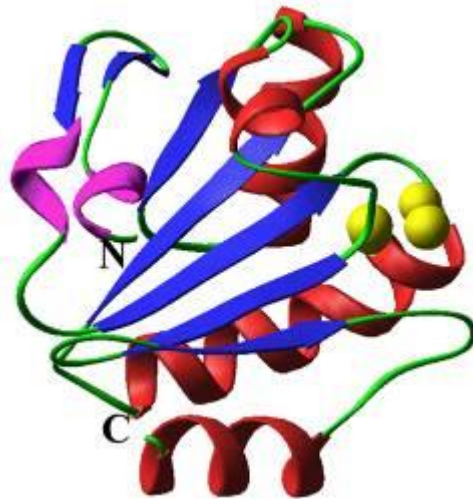
VRSTA	PRIMJER
Visoko procesuirani	Rafinirana ulja
Hidrolizirani sastojci	Pivo
Sadrže tanin	Tamna čokolada
Visoke kiselosti	Ukiseljeni proizvodi
Visoke slanosti	Kocke juhe
Visoke masnoće i /ili visoki sadržaj šećera	Mliječni proizvodi
Koncentrirani ekstrakti	Okusi

Gdje je moguće, koristiti:
„spike” materijale
prethodno pozitivne
uzorke
referentni materijal
proficiency uzorke

**Potreba za Referentni Materijal/ Materijal za kontrolu kvalitete/
prethodno pozitivne uzorke:**

Savršeni reprezentativni materijal rijetko postoji , a s druge strane potrebno je koristiti poznatu referencu u svrhu komparacije metoda

Granice detekcije: što mjerimo?



VS



[CEN/TC 275/WG 12](#)
Food allergens

The method shall be validated for the matrix to be analysed and standards available for establishing a standard curve from which calculation of the protein content in test samples is performed.

Protein vs Konverzija ostatka u hrani

Food type	Average protein content	Limit of quantitation (LOQ) of Veratox kits using standard extraction on a ppm total allergenic food scale	LOQ of Veratox kits using standard extraction techniques on a ppm protein scale
Milk	35.1%	2.5 ppm nonfat dried milk (NFDM)	0.878 ppm protein
Casein	35.1%	2.5 ppm NFDM	0.878 ppm protein
Egg	47.35%	2.5 ppm total egg	1.184 ppm protein
Soy	47.01%	2.5 ppm soy flour	1.175 ppm protein
Peanut	25.8%	2.5 ppm total peanut	0.645 ppm protein
Hazelnut	14.95%	2.5 ppm total hazelnut	0.374 ppm protein
Mustard	26.08%	2.5 ppm total mustard	0.652 ppm protein
Almond	21.22%	2.5 ppm total almond	0.531 ppm protein
Gliadin	75.0%	2.5 ppm total gliadin	1.875 ppm protein
Shrimp (crustacea)	22.78%	2.5 ppm total shrimp	0.570 ppm protein
Lupine	15.57%	2.5 ppm total lupine	0.389 ppm protein

SOURCE: United States Department of Agriculture National Nutrient Database Release 24. (Varieties and cultivars can vary in protein content.)

Predmet : Bez glutena i mlijeka iz pekare

- Sirovine u procesu proizvodnje ne sadrže gluten niti mlijeko .
- Uzorci konačnog proizvoda za svaku proizvedenu seriju poslani na externu analizu korištena ELISA A.
- Trgovac šalje nasumične uzorke na analizu i dobiva rezultate pozitivne na mlijeko iz drugog laboratorija koji koristi ELISA B test.
- Ponovno testirani uzorci iz iste serije sa ELISA A i nisu detektirani pozitivni rezultati
- Pojedinačni sastojci testirani sa ELISA A i ELISA B , niti jedna analiza nije detektirala pozitivne rezultate

Primjer...postavite prava pitanja

- Daljnja ispitivanja pokazala su da ELISA A detektira kazein, a ELISA B detektira ukupno mlijeko
- Sirutka se nije koristila kao sastojak na mjestu proizvodnje . Zbog trenutno limitiranog kapaciteta proizvođača, mješanje i spajanje suhih sastojaka podugovorno je povjereno trećoj strani
- Mješanje kod podugovorne strane poštovalo zahtjev za gluten free ali nisu imali informaciju i za milk free zahtjev , stga je nakon mješanja sastojaka sa sirutkom u prahu provedeno samo suho čišćenje

Rješenje primjera & Korektivne akcije

- Postavljene dodatne dokumentirane procedure vezane uz procjenu rizika i provedbu plana kontrole
- Uključena bolja komunikacija i interna edukacija od nabave do proizvodnje te na nivou direktora tvrtke
- Proizvodnja proširena sa novim pogonom za mješanje i odobrena dodatna testiranja mješanog materijala od treće strane
- ELISA testiranja sirovine na licu mjesta , a konačnog proizvoda povjerena analitici u akreditiranom laboratoriju na ugovornoj bazi

Što uzeti u obzir kod validacije ELISA metode

442 ABBOTT ET AL.: JOURNAL OF AOAC INTERNATIONAL VOL. 93, NO. 2, 2010

SPECIAL SECTION ON FOOD ALLERGEN TESTING

Validation Procedures for Quantitative Food Allergen ELISA Methods: Community Guidance and Best Practices

MICHAEL ABBOTT, STEPHEN HAYWARD, WILLIAM ROSS, and SAMUEL BENREJEB GODEFROY
Health Canada, Food Directorate, Health Products and Food Branch, PL 2201C, Ottawa, ON, Canada, K1A 0L2
FRANZ ULMERH and ARJON J. VAN HENGEL
European Commission, Joint Research Centre, Institute for Reference Materials and Measurements, Retieseweg 111, 2440 Geel, Belgium
JAMES ROBERTS
National Measurement Institute, Department of Innovation, Industry, Science and Research, 1 Skakin St, Pyrmble NSW 2073, Australia
HIROSHI AKIYAMA
National Institute of Health Sciences, 1-18-1 Kamiyoga, Setagaya-ku, Tokyo 158-8501, Japan
BERT POPPING
Eurofins Scientific, 69a Kilnwick Rd, Pocklington Yorkshire, YO42 2JY, United Kingdom
JUPTER M. YEUNG¹
Nestlé Nutrition, Product Technology Center-Fremont, 445 State St, Fremont, MI 49413-0001
PAUL WEBLING
General Mills, Inc., 330 University Ave SE, Minneapolis, MN 55414
STEVE L. TAYLOR
Food Allergy Research and Resource Program, University of Nebraska, Lincoln, NE
ROLAND EISENST PONS
ICC-International Association for Cereal Science and Technology, Vienna, Austria
PHILIPPE DELAHAUT
CER Groupe-Laboratoire d'Hormonologie, Rue du Point du Jour, 8, B-6900 Marloie, Belgium

This document provides supplemental guidance on specifications for the development and implementation of studies to validate the performance characteristics of quantitative ELISA methods for the determination of food allergens. It is intended as a companion document to other existing publications on method validation. The guidance is divided into two sections: information to be provided by the method developer on various characteristics of the method, and implementation of a multilaboratory validation study. Certain criteria included in the guidance are allergen-specific. Two food allergens, egg and milk, are used to demonstrate the criteria guidance. These recommendations will be the basis of the harmonized validation protocol for any food allergen ELISA method, whether proprietary or nonproprietary, that will be submitted to AOAC and/or regulatory authorities or other bodies for status recognition. Regulatory authorities may have their own particular requirements for data packages in addition to the guidance in this

document. Future work planned for the implementation and validation of this guidance will include guidance specific to other priority allergens.

Although there are a number of documents published on method validation (1, 2) which target analytical methods in general, and there are numerous publications on validation of ELISA methods for pesticides, these documents do not address specific areas of concern for food allergen analysis, such as reference materials, spiking methods, or choice of matrices. In the absence of a universally recognized reference standard for food allergen ELISAs, many organizations and end-users use different validation protocols and different analytical standards. Such inconsistency and duplication inevitably has a negative economic impact on the food allergen community. This document is designed to accompany the AOAC Guidelines for Collaborative Study Procedures to Validate Characteristics of a Method of Analysis (1), and to provide guidance specific to the validation of quantitative ELISA-based methods for food allergens. This protocol was designed to meet or exceed the minimum requirements set forth in Appendix D of the AOAC Guidelines; it was developed with input from a wide range of experts in the area

Received April 21, 2009. Accepted by AIT September 6, 2009.
Corresponding author's e-mail: Michael.Abbott@hc-sc.gc.ca
¹ Part of this work was done while author Yeung was employed by the Grocery Manufacturers Association.

- Unakrsne reakcije
- Limit detekcije i limit kvantifikacije
- „Iskorištenje” kontaminiranih uzoraka pri niskim, srednjim i visokim vrijednostima kalibracijske krivulje
- „Iskorištenje” za uzorke hrane kontaminirane ciljanim materijalom
- „Iskrištenje „ za prehrambene proizvode označene sa sadržajem ciljanog materijal
- Usporedbe sa alternativnim metodama
- Robustnost npr. temperatura, vrijeme, varijable kod operatera

Primjer Beta Site podataka za Veratox R5 Gliadin

Sample Type	Beta Site Data Veratox R5 Gliadin ELISA				Alternative Gliadin ELISA Method Determined Sample Values	
	Range	Mean ppm	Std Dev	% CV	Range	Mean ppm
Soy Crisp	0.0-0.9	0.36	0.31	N/A	BLD	BLD
Soup Mix	3.6-8.3	5.6	0.75	13.4	3.5-5.7	4.8
Corn Cereal	7.8-12.8	9.8	1.47	14.9	6.6-13	10.6
Oat Cereal	18.8-34.2	28.6	3.97	13.9	24-35.5	29.6
Crackers	0.0-0.8	0.2	0.27	N/A	BLD	BLD
Cake Mix	6.1-12.7	9.0	1.71	18.9	5.8-8.9	7.6
Soy Flour	18.3-34.3	23.2	4.24	18.3	14.0-27.3	17.1
Cereal	14.2-29.4	20.5	4.66	22.7	13.5-24.5	19
Soy Crisp	21.1-41.6	28.6	6.34	22.1	24-36	30
Rice Cereal	34.8-54.8	44.9	5.97	13.3	44-60	50
Cheese Mix	9.8-17.2	13.6	1.85	13.6	12.2-16.7	15
Cake Mix	5.6-12.5	9.6	1.87	19.5	5.8-8.9	7.6

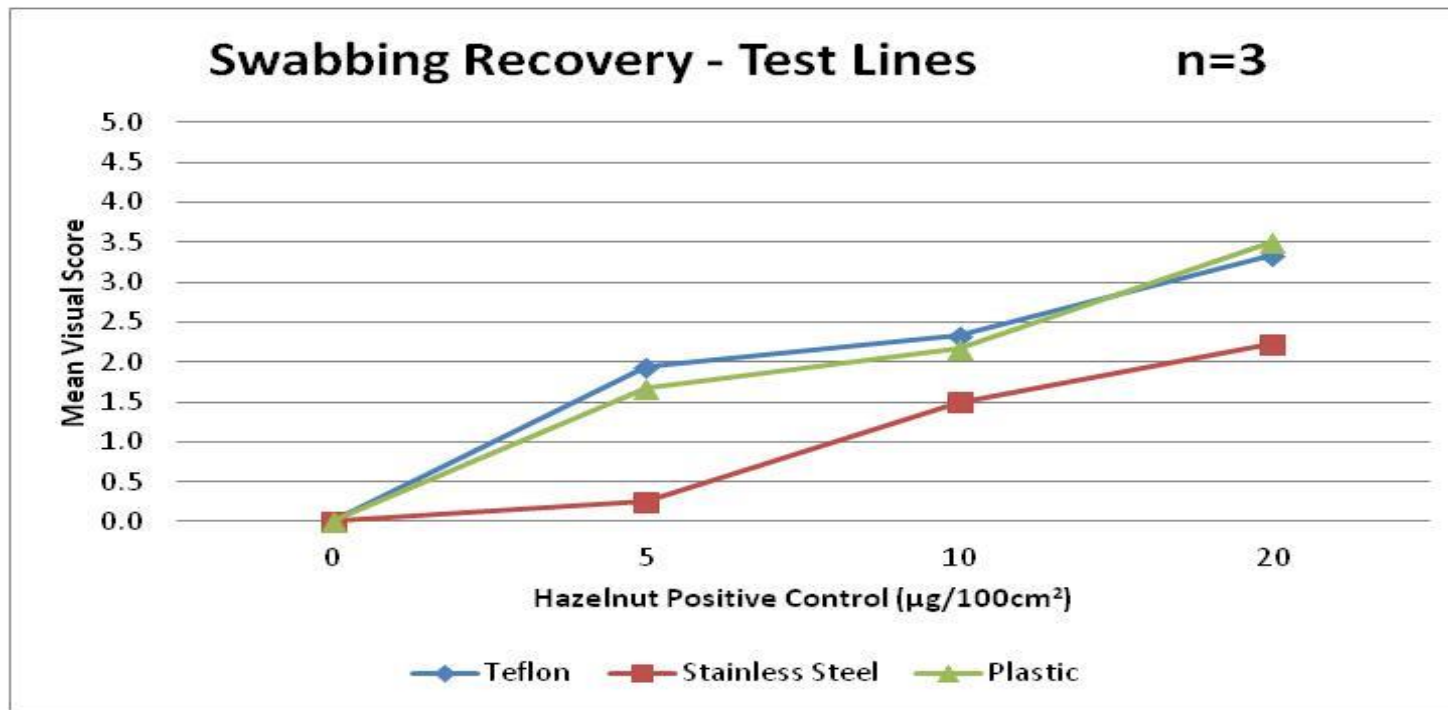
Korištenje Lateral Flow Testova za validaciju postupaka čišćenja s ciljem optimizacije GMP



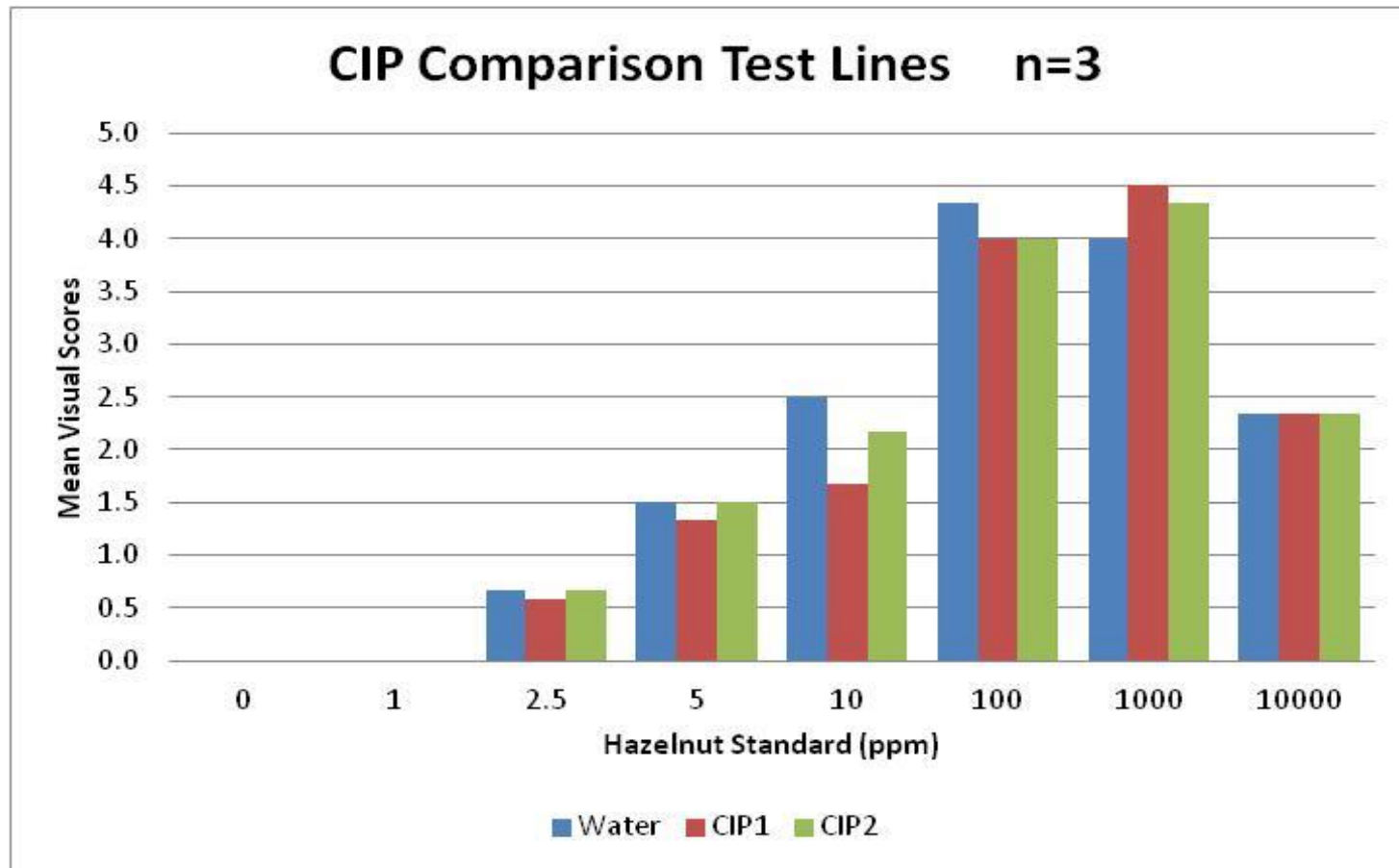
- **Lateral flow testovi** namjenjeni su detekciji alergena na najučinkovitiji način u uzorcima iz okoliša i ostacima ispirnih otopina. Mogu se koristiti i za testiranje sirovina i proizvoda nakon validacije.
- Svaki proizvodni proces i tvornica su drugačiji, stoga da bi se kontrola alergena u hrani dovela do željenog nivoa važno je provesti validaciju za svaku vrstu matriksa koji će se analizirati

Primjer podataka validacije za lateral flow test

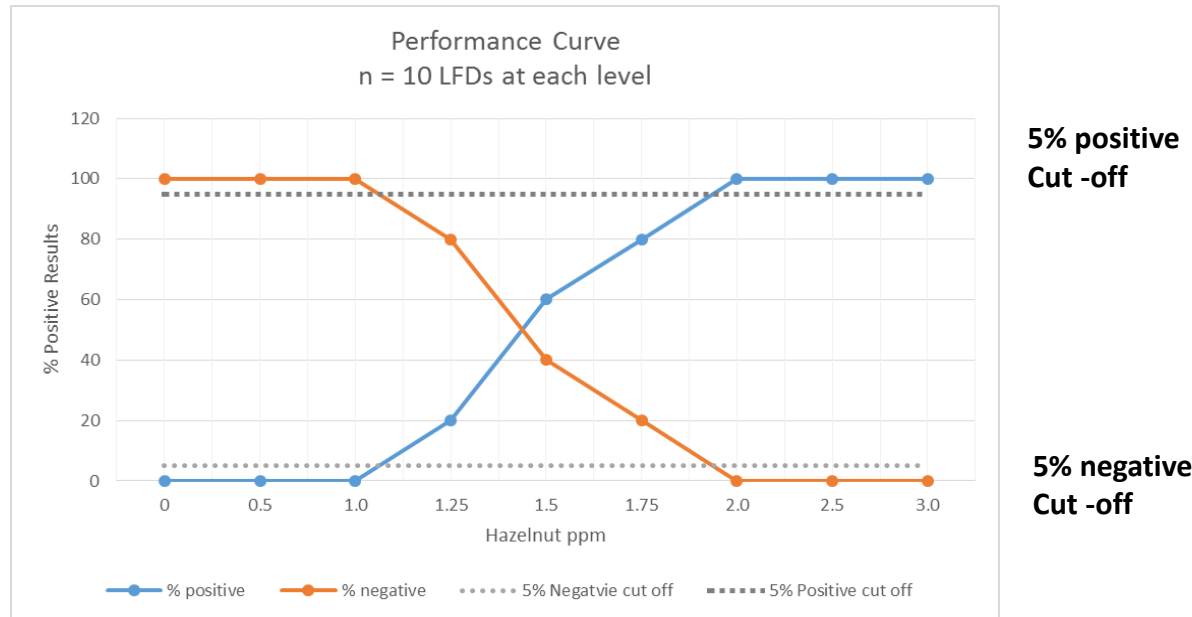
Dokaz ostatka ekstrakta lješnjaka s različitih površina okoliša kao što su inox, plastika i teflon.



Primjer podataka lateral flow testova



Primjer podataka mjerne nesigurnosti



U gore navedenom primjeru područje nesigurnosti je između 1.06ppm i 1.94ppm stoga je moguće pretpostaviti slijedeće:

Sa intervalom pouzdanosti 95% uzorci manje od 1.06 ppm će biti negativni

Sa intervalom pouzdanosti 95% uzorci više od 1.94ppm će biti pozitivni

- Povećati osjetljivost ELISA testova...
Ovisi o granicama alergena, kroz poboljšanja u ekstrakciji ili novoj generaciji antitijela
- Istovremena analiza više različitih alergena – multitestovi npr. orašasti plodovi
- Nove tehnologije
 - iSPR biosensori – detektiraju konatminante s površine vezanjem na microchip
 - Microsferna protočna citometrija

Multitestovi: Reveal za orašaste plodove



Vrijeme testiranja: 10 min

Broj testova: 10 uzoraka/briseva

Resultati: 2 testne linije

1 linija negativno

2 linije pozitivno

**Jedinstveni laterl flow test
detektira pojedinačni ili
kombinaciju od šest orašastih
plodova:**

Badem

Lješnjak

Pekan

Orah

Indij.oraš.

Pistachio



Osjetljivost sažetak

Treenut	Form	Sensitivity (ppm)
Walnut	Shelled English	1
	Red	1
	Black	1
	Defatted	1
	Oil Roasted	10
	Meal	1
Hazelnut	Shelled	5
	Flour	2.5
	Oil Roasted	20
	DuChilly	2.5
	Defatted	1
	Dry Roasted DuChilly	2.5
Cashew	Raw	2.5
	Flour	5
	Oil Roasted	5
	Dry Roasted	5
	Defatted	2.5
Pecan	Shelled Pecan	5
	Shelled Hard	5
	Shelled Paper	10
	Meal	10
	Oil Roasted	5
	Defatted	2.5
Pistachio	Shelled	10
	Flour	5
	Oil Roasted	10
	Dry Roasted	10
	Defatted	2.5
Almond	Shelled	2.5
	Flour	2.5
	Oil Roasted	50* estimated
	Dry Roasted	5
	Defatted	1

- Uzorkovanje određuje što ćete / nećete naći
- Uzmite u obzir prirodu i fizikalna svojstva alergena koje želite detektirati da biste odabrali najpogodniji test
- ELISA je još uvijek metoda odabira za većinu alergena, ograničenja su prihvatljiva ako se poduzmu potrebni koraci za njihovo upravljanje npr. validacija da bi se utvrdio faktor iskorištenja , tamo gdje je to moguće
- Upitni ELISA rezultati trebaju se potvrditi koristeći alternativne metode
- Nekad analitika alergena može biti izazovna i u tim slučajevima kombinacija različitih dostupnih metoda analize može biti od pomoći

- Anaphylaxis campaign
<http://www.anaphylaxis.org.uk/>
- VITAL 2.0 <http://www.allergenbureau.net/>
- Campden BRI Guideline 71
<http://www.campdenbri.co.uk/>
- FARRP <http://farrp.unl.edu/>

Hvala na pažnji Pitanja?

Neogen Europe Ltd

www.neogeneurope.com info@neogeneurope.com

Tel: +44 (0) 1292 525600 Fax: +44 (0) 1292 525 601