

Aktueller Stand der Analytik von Lebensmittelallergenen

Stellungnahme

LChG-Arbeitsgruppe „Biochemische und molekularbiologische Analytik“

Stand: 04.12.2023

1 Allergenkennzeichnung/Aktions- und Beurteilungswerte

Menschen die an Lebensmittelallergien leiden können nach Verzehr bereits geringer Mengen eines Lebensmittels mit entsprechenden Inhaltsstoffen mit allergischen Reaktionen reagieren. Dies schließt mitunter schwere, teils lebensbedrohliche Reaktionen ein. Daher sind Betroffene darauf angewiesen, entsprechende allergenhaltige Lebensmittel zu erkennen und vermeiden zu können.

Allergene sind entsprechend der EU-Lebensmittel-Informationsverordnung (LMIV) [1] bei vorverpackter Ware sowie bei loser Abgabe, etwa in Gastronomiebetrieben (LMIDV) [2], zu kennzeichnen.

Allerdings werden, z. B. in der amtlichen Überwachung, nach wie vor nicht deklarierte Allergene festgestellt [3].

Nicht selten sind nach den bisherigen Erfahrungen auch herstellungsbedingte Einträge von allergenen Lebensmittelbestandteilen die Ursache. Diese fallen nicht unter die gesetzliche Kennzeichnungspflicht, da es sich nicht um Zutaten handelt [4]. Dies stellt wiederum ein schwer zu kalkulierendes Risiko für allergisch reagierende Personen da.

Um diese unbefriedigende Situation zu verbessern, etabliert beispielsweise die Lebensmittelindustrie im Rahmen des Allergen-Managements interne Aktionswerte für herstellungsbedingte unbeabsichtigte Einträge [5]. Auch Laboratorien der Lebensmittelüberwachung verwenden interne Aktionswerte für die Entscheidung, ob Lebensmittelinspektoren weitere Ermittlungsmaßnahmen im Betrieb ergreifen sollen [6-8].

Für die Überprüfung solcher Aktionswerte sind quantitative Methoden erforderlich, zumindest aber solche, die Allergene bzw. allergene Lebensmittelbestandteile bereits im Spurenbereich nachweisen können.

Seit 2020 erarbeitet eine FAO/WHO Expertengruppe verschiedene Empfehlungen zur Allergenkennzeichnung für das *Codex Committee on Food Labelling* (CCFL) und das *Codex Committee on Food Hygiene* (CCFH) mit dem Ziel, den weltweiten Umgang mit Allergenen zu harmonisieren. Der

Expertenausschuss veröffentlichte bereits einen Bericht zur Evaluation der prioritären Allergene [9], einen weiteren Bericht zur Evaluation von Schwellenwerten für die prioritären Allergene in Lebensmitteln [10], eine Zusammenfassung zur Evaluation einer vorsorglichen Allergenkennzeichnung der prioritären Allergene in Lebensmitteln [11] sowie eine Zusammenfassung der vorgeschlagenen Kennzeichnungsausnahmen [12].

Die folgende Stellungnahme gibt einen Überblick über den derzeitigen Stand der Allergenanalytik. Sie soll in erster Linie dazu dienen, im Hinblick auf die Festlegung von Aktions-/Schwellen- oder Grenzwerten die analytischen Möglichkeiten besser einschätzen zu können.

2 Analytische Methoden zum Nachweis von Lebensmittelallergenen

Derzeit werden überwiegend immunologische Verfahren (z. B. ELISA und Streifen-Schnelltests) sowie molekularbiologische Verfahren auf Basis der Real-Time-Polymerase-Kettenreaktion (RT-PCR) eingesetzt [13]. Darüber hinaus zeichnen sich vielversprechende Entwicklungen im Bereich der massenspektroskopischen LC-MS- Verfahren ab [14-20].

Bei den bislang eingesetzten Verfahren handelt es sich überwiegend um Nachweise der Spezies der allergenen Lebensmittelbestandteile (z. B. Erdnuss oder Sellerie), entweder über charakteristische DNA-Sequenzen oder speziestypische Proteine. Dies ist auch im Sinne der Nachweissicherheit sinnvoll. Wird mit einem Speziesnachweis beispielsweise Erdnuss als allergener Bestandteil eines Lebensmittels identifiziert, so ist zunächst von einem Vorhandensein potentiell allergener Erdnussproteine auszugehen. Die Etablierung von Nachweisverfahren, welche die verschiedenen majoren allergenen Proteine eines Lebensmittels erfassen, scheint wünschenswert. Dies ist grundsätzlich mittels Massenspektrometrie möglich, allerdings aktuell nur mit erheblichem Aufwand für eine begrenzte Zahl an allergieauslösenden Lebensmitteln. Außerdem können sich lebensmitteltechnologische Prozesse unter Umständen sehr unterschiedlich auf die Nachweisbarkeit einzelner Allergene auswirken.

Es hat sich in der Praxis bewährt, ELISA- und PCR-basierte Verfahren gegenseitig zur Bestätigung von Ergebnissen einzusetzen.

Ausnahmen bilden in diesem Kontext Nachweisverfahren für Milchproteine (Kasein, β -Lactoglobulin) und Hühnereiklarproteine (Ovalbumin, Ovomuroid, Lysozym). Immunologische Methoden bestimmen in diesem Fall die Konzentration von Milch- bzw. Eiweißprotein. Speziespezifische Nachweise für Kuh oder Huhn, wie sie mit der PCR vorgenommen werden, wären in diesem Fall nicht zielführend, da Milch- oder Eiweiß-Allergiker andere Bestandteile dieser Spezies ohne Probleme verzehren können (siehe auch den Hinweis unter 1.3 PCR-Verfahren). Allerdings ist immunologisch aufgrund der Ähnlichkeit der detektierten Proteine somit häufig die Tierart nicht bestimmbar, d. h. für Milchproteine könnte es sich um Kuh-, Ziegen oder Schafmilch handeln und für Eiweißproteine wären neben Hühnerei auch Wachtel- oder Enteneier mögliche Quellen.

In den Tabellen ist, aufgegliedert nach allergenem Lebensmittelbestandteil, der derzeitige Stand der Analytik zusammengefasst. Die in der Kennzeichnungsregelung (Anhang II der VO (EU) 1169/2011) mitgenannten Stoffe Sulfite und Laktose werden als Nicht-Allergene hier nicht behandelt.

Tabelle 1 stellt die von der WHO/FAO Expertengruppe publizierten Empfehlungen für Allergen-Referenzdosen [10] dar. Zusätzlich wird beispielhaft unter der Annahme einer Aufnahmemenge von 100 g Lebensmittel eine daraus resultierende notwendige Sensitivität der jeweiligen Analytik dargestellt.

Tabelle 2 beschreibt die bisher verfügbaren Standardverfahren. Die Art des Verfahrens und in Ringversuchen getestete Matrices sind aufgelistet.

Mittlerweile finden regelmäßig Laborvergleichsuntersuchungen im Bereich der Lebensmittelallergene statt [20-22].

Welche Methode zur Analyse geeignet ist, hängt von einer Reihe von Faktoren ab. Als Beispiel seien Matrices mit niedrigem pH-Wert (z. B. Fruchtsäfte, alkoholische Getränke) genannt, welche noch allergene Proteine enthalten können, aber keine intakte DNA. Hier wäre eine DNA-basierende Methode also wenig geeignet. Vergleichbare Beispiele gibt es für alle analytischen Verfahren und auch für die verschiedenen Matrices, wo es beispielsweise zu einer reduzierten Nachweisbarkeit bei prozessierten Materialien kommen kann.

Daher ist es entscheidend, dass die Fitness-for-Purpose, also die Eignung der ausgewählten Methode für die jeweilige Matrix, evaluiert worden ist. Ist die Methode für eine gegebene Matrix nicht geeignet, sollte sie für deren Analyse nicht verwendet werden. Eine Fitness-for-Purpose-Bestimmung wird vom jeweiligen, den Test ausführenden Labor vorgenommen.

2.1 Immunologische Verfahren

2.1.1 ELISA-Verfahren

Derzeit sind zum Nachweis vieler in Anhang II der VO (EU) 1169/2011 genannten allergenen Lebensmittelbestandteile kommerzielle ELISA-Kits verfügbar. Eine regelmäßig aktualisierte Zusammenstellung von Anbietern von ELISA-Kits ist auf der Internetseite der Arbeitsgruppe zugänglich [23].

Zumeist handelt es sich um Sandwich-ELISA. Die verwendeten Antikörper sind überwiegend gegen verschiedene, z. T. allergene Proteine des jeweiligen allergenen Lebensmittelbestandteils gerichtet. Die seitens der Anbieter genannten Nachweisgrenzen liegen meist im einstelligen Milligramm-pro-Kilogramm-Bereich des allergenen Lebensmittelbestandteils. Allerdings ist hierbei darauf zu achten, worauf sich diese Angaben beziehen: den allergenen Lebensmittelbestandteil insgesamt (z. B. Erdnuss), die Trockenmasse (z. B. Erdnusspulver), die Proteinmasse des Allergie-auslösenden Lebensmittels (z. B. Erdnussprotein) oder auf einzelne (allergene oder toxische) Proteine (z. B. Ara h1). Dies führt teilweise zu sehr unterschiedlichen Angaben in Bezug auf die Nachweisgrenze. Niedrigere Zahlenwerte bedeuten nicht in allen Fällen eine bessere Sensitivität, sondern sind durch die Bezugsgröße (z. B. Bestandteil insgesamt versus Protein) verursacht.

Es ist anzumerken, dass die Prozessierung einen Einfluss auf die Nachweisgrenze haben kann. Die Prozessierung kann sowohl zu einer strukturellen Veränderung des Analyten führen, die einen Einfluss auf die Nachweisbarkeit im Test hat, als auch die Extrahierbarkeit des Analyten aus der Matrix erschweren. Für unterschiedlich verarbeitete Lebensmittel sind deshalb unter Umständen für den gleichen Analyten verschiedene Extraktionsmethoden zu verwenden. Ein typisches Beispiel ist der immunologische Nachweis von Eiproteinen. Aktuell gibt es nur wenige ELISA-Anbieter auf dem Markt, die hitzeprozessierte Proteine aus dem Eiklar erkennen. Die meisten anderen Tests reagieren ausreichend sensitiv nur mit

Proteinen aus nicht erhitztem Ei. Daher ist eine Prüfung der Validierungsdaten der Kit-Hersteller zu empfehlen, inwieweit der ausgewählte ELISA-Kit für den vorgesehenen Einsatz (Matrix, Verarbeitungsgrad) geeignet ist.

Die Kalibrierung der Tests über Standardmaterialien unterliegt den gleichen Gesetzmäßigkeiten. Es gibt die Möglichkeit, für die Standardmaterialien sowohl native (z. B. nicht geröstete Erdnuss) als auch prozessierte Materialien (z. B. geröstete Erdnuss) zu verwenden. In Ermangelung von Referenzmaterialien für die meisten Allergene (siehe 3.) entscheidet jeder Anbieter derzeit selbst, welches Standardmaterial verwendet wird, was mitunter zu abweichenden Ergebnissen je nach Hersteller führt.

In Ringversuchen gemäß § 64 LFGB getestet und als Standardmethode beschrieben wurden bisher Verfahren zur Bestimmung von Erdnuss und Haselnuss, jeweils in der Matrix Schokolade. Daneben haben noch international durchgeführte Ringversuche zur Untersuchung auf Gluten [24-30] (siehe Tabelle 2) sowie Ei und Milch [31] stattgefunden. Außerdem sind einige Organisationen im Bereich der Standardisierung tätig, z. B. Codex Alimentarius, AOAC (AOAC Official Method of Analysis OMA), AOAC leistungsgeprüfte Methode (AOAC Performance Tested Method PTM) sowie Methoden der AACCI (American Association of Cereal Chemists International).

Die ELISA-Verfahren gehören wie die Schnelltests zu den proteinbestimmenden Verfahren. Die Verfahren haben das Potenzial, allergene Proteine direkt zu detektieren. Die entscheidenden Qualitätsfaktoren eines ELISA sind der Antikörper, das Kalibrationsmaterial und die Extraktionsmethode. Die Antikörper eines ELISA bestimmt maßgeblich durch seine Spezifität dessen Leistungsfähigkeit. Neben der Gefahr von Kreuzreaktivitäten kann auch eine Veränderung der Proteine während der Lebensmittelproduktion ein potentiell Problem während der ELISA-Messung darstellen. Je nach Spezifität des Antikörpers oder Art des Extraktionspuffers können diese Veränderungen (z. B. Denaturierung, Glycosylierung, Fragmentierung) zu einem eingeschränkten Nachweis führen. Spezielle Extraktionspuffer oder kompetitive ELISA Systeme werden in solchen Fällen angeboten. Bei den meisten Herstellern von ELISA sind Validierungsdaten erhältlich, die über die Leistungsfähigkeit des jeweiligen Produktes Auskunft geben. Bislang sind noch keine ELISA kommerziell verfügbar, die mehrere allergene Lebensmittel (z. B. Erdnüsse und Haselnüsse) in einem Test nachweisen können (Multiplex-ELISA). Das größte Problem hierbei ist im Falle einer quantitativen Bewertung die Unterscheidung der einzelnen Anteile von möglicherweise gleichzeitig vorhandenen Allergenen am Gesamtergebnis. Multiplex-ELISA eignen sich deshalb eher für eine qualitative Bewertung als Screening-Methode. Aber auch in diesem Fall ist bei einem positiven Ergebnis nicht zu differenzieren, ob ein einzelnes Allergen oder eine Mischung verschiedener Allergene zu dem Befund geführt hat. Multiplex-Verfahren sind jedoch prinzipiell möglich. Allerdings sind andere Verfahren (z. B. PCR, LC-MS/MS) hierfür besser geeignet.

ELISA stellen neben der RT-PCR das Routineverfahren der Allergenanalytik dar und haben sich in vielen Diagnostikbereichen seit Jahrzehnten bewährt. Wesentliche Gründe dafür sind: einfache Anwendung, Quantifizierbarkeit, kostengünstige Geräte und Materialien, Schnelligkeit, die Möglichkeit zum Großdurchsatz, hohe Spezifität und Sensitivität. Aufgrund der komplexen Testabläufe handelt es sich derzeit überwiegend um laborbasierte Verfahren, die eine gewisse Grundausstattung voraussetzen. Zur Vereinfachung und Standardisierung der Abläufe werden immer häufiger ELISA-Automaten verwendet, die nach der Probenextraktion den eigentlichen Test selbstständig durchführen.

2.1.2 Schnelltests

Neben den quantitativen ELISA ergänzen die qualitativen sogenannten Lateral-Flow-Teststreifen die Analytik von allergenen Lebensmittelbestandteilen. Sie dienen dem schnellen und einfachen Nachweis von Allergenen beispielsweise im Rahmen des Allergenmanagements (HACCP) in Lebensmittelbetrieben. Dabei können die Teststreifen im gesamten Produktionsprozess, von der Kontrolle der Rohwaren bis zur Endkontrolle der Produkte sowie prozessbegleitender Hygienemaßnahmen, verwendet werden.

Die Teststreifen können für den Nachweis in Lebensmitteln genutzt werden, wobei zu beachten ist, dass sie sich bisher vorwiegend in der Analyse von Oberflächenwischtests oder bei der Untersuchung von Reinigungswässern etabliert haben. Aufgrund des primären Ziels einer schnellen Analyse am Ort der Untersuchung werden häufig einfache und schnelle Extraktionsverfahren durchgeführt. Für Hygieneuntersuchungen und Untersuchungen von einfachen Matrices (z. B. Rohware) sind diese meist gut geeignet. Besonders bei prozessierten Lebensmitteln ist die Eignung des Extraktionsverfahrens zu überprüfen. Die Nachweisgrenze der Tests bei Lebensmitteln liegt deshalb im Vergleich zu Umgebungsuntersuchungen meist in einem etwas höheren Konzentrationsbereich.

Die angegebenen Nachweisgrenzen liegen im unteren Milligramm-pro-Kilogramm-Bereich und unterscheiden sich nicht wesentlich von denen aktueller ELISA-Kits. Das bedeutet, dass bereits geringste Spuren allergener Lebensmittelbestandteile nachgewiesen werden können.

Allerdings ist zu beachten, dass die meisten Lateral-Flow-Teststreifen wie die ELISA nach dem Sandwich-Prinzip aufgebaut sind. Im Gegensatz zum ELISA reagieren im Lateral-Flow-Test Detektions- und Konjugatantikörper gleichzeitig mit der Probe (im ELISA erfolgt dies sukzessive). Bei sehr hohen Allergenkonzentration kann es deshalb zu einer Überladung des Streifens kommen. Freies Allergen reagiert sowohl mit der Detektionsbande als auch mit dem Konjugat und verhindert so die Ausbildung des Sandwich-Komplexes. Die Folge ist bei sehr hohen Allergenkontaminationen (> 1 g/kg) eine schwache oder ausbleibende Reaktion der Testbande und eine falsch-negative Interpretation der Probe. Es gibt einzelne Testanbieter auf dem Markt, die durch eine zusätzliche Bande auf dem Teststreifen sehr hohe Allergenkonzentrationen anzeigen und so eine falsche Interpretation einer nicht vorhandenen Testbande verhindern.

Inzwischen sind solche Schnelltests für die meisten der kennzeichnungspflichtigen allergenen Bestandteile verfügbar [23]. Die Teststreifen sind nicht zur Konzentrationsbestimmung oder Messung großer Allergenmengen entwickelt worden, sondern zum Spuren- bzw. Kontaminationsnachweis. Es ist darauf zu achten, ob die Nachweisgrenze für Lebensmittel oder die Oberflächenwischprozedur gilt. Auch im Teststreifen-System ist der Antikörper für die Qualität (also Spezifität) des Tests ausschlaggebend. Wie bei anderen Verfahren ist im Rahmen der Validierung zu prüfen, ob eine Eignung für prozessierte Lebensmittel besteht oder bestimmte Substanzen die Wiederfindung stören können.

Lateral-Flow-Teststreifen werden in Streifen- oder Kassetten-Formaten angeboten. Zubehörsets, um Oberflächenproben zu sammeln, werden ergänzend angeboten. Die notwendige Zeit zur Durchführung einer Analyse beträgt, je nach Kit und Analyt, zwischen 5 min und 30 min, und für die Untersuchung wird keine Laborausrüstung benötigt. Quantitative Aussagen sind derzeit noch nicht möglich.

2.2 PCR-Verfahren

Für alle zu kennzeichnenden allergenen Lebensmittelbestandteile sind Nachweisverfahren auf Basis der RT-PCR verfügbar. Allerdings ist der PCR-Nachweis für Ei und Milch weniger geeignet: die Sensitivität von DNA-basierten Nachweisen der Spezies Huhn und Rind reicht für die Allergenanalytik nicht aus, zudem lässt sich anhand des Nachweises von DNA aus Huhn bzw. Rind nicht unterscheiden, ob die Quelle der DNA Eier oder Milch bzw. Hühner- oder Rindfleisch war (s. o.).

Weiterhin wurden PCR-basierte Verfahren wie die MLPA (Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification) zum Nachweis von Fischen, Kopffüßern und Krustentieren [32] und isothermale Nachweisverfahren (Loop-mediated isothermal Amplification, LAMP) zum Screening auf die allergenen Spezies Sellerie, Senf und Fisch (Kabeljau) veröffentlicht [33, 34].

Auch gibt es für eine Reihe von Spezies standardisierte PCR-basierte Nachweisverfahren. Die Nachweisgrenzen in der untersuchten Matrix betragen jeweils ca. 1- 10 Milligramm des jeweiligen allergenen Lebensmittels pro Kilogramm. Nachweisgrenzen im Bereich von 1 mg/kg und weniger werden durch die Verwendung von Multicopy Zielsequenzen erreicht.

Für Fisch, glutenhaltiges Getreide (Weizen/Roggen), Lupine, Mandel, Paranuss, Sellerie, Senf (*Sinapis alba* bzw. *Brassica iuncea/Brassica nigra*), Sesam, Soja wurden in Modell-Matrices (Brühwurst, Reisgebäck und mehr) quantitative Daten erhalten, die zeigen, dass eine Quantifizierung mittels RT-PCR prinzipiell möglich ist [35-39]. Dies gilt auch für die Anwendung der sensitiveren PCR-Verfahren mit Multicopy Zielsequenzen. Gezeigt wurde dies im § 64 LFGB-Ringversuch für Erdnuss sowie als Multiplex RT-PCR für Erdnuss, Haselnuss, Walnuss und Cashew [39, 40].

Die prinzipielle Eignung des Standardadditionsverfahrens für die Quantifizierung mittels RT-PCR wurde in einem Ringversuch bestätigt [41].

Aus Laborvergleichsuntersuchungen sind bislang vergleichsweise nur wenige Daten von Laboren verfügbar, welche die RT-PCR zur Quantifizierung genutzt haben.

Multiplex PCR-Verfahren, insbesondere basierend auf Multicopy Zielsequenzen, bieten sich zum simultanen und sensitiven, halbquantitativen bis quantitativen Screening auf allergene Bestandteile an [37, 38, 40].

2.3 LC-MS/MS-Analytik

In den vergangenen Jahren wurde eine Reihe von Anwendungen der LC-MS/MS-Technik zum Nachweis und zur Bestimmung von allergenen Lebensmittelbestandteilen der relevanten Allergene veröffentlicht [42-44]. Bei diesem vielversprechenden Ansatz werden i. d. R. allergen-spezifische Peptidfragmente durch enzymatischen Verdau aus den majoren allergenen Proteinen der jeweiligen Lebensmittel freigesetzt, mittels Flüssigchromatographie aufgetrennt und die spezifischen Peptidmarker der allergenen Proteine massenspektrometrisch detektiert (LC-MS/MS-Technik). Üblicherweise werden die Peptidmarker mit gerichteten massenspektrometrischen Verfahren detektiert, dieser Ansatz wird auch als *targeted proteomics* bezeichnet [14].

In einer Reihe von Studien konnte der simultane qualitative Nachweis allergener Lebensmittelbestandteile in verschiedenen Matrices gezeigt werden. Aktuelle Arbeiten fokussieren sich auf die Entwicklung von robusten und sensitiven Multiplexmethoden, die den Nachweis und die Bestimmung der kennzeichnungspflichtigen allergenen Lebensmittel simultan erlauben [45-47]. Grundsätzlich ist auch ein paralleler Nachweis verschiedener allergener Proteine eines Lebensmittels durchführbar. Dies ist insbesondere relevant, wenn allergene Lebensmittel wie beispielweise Ei oder Milch prozessiert und fraktioniert werden. Ein Vergleich mit kommerziellen ELISA-Methoden zeigte Vorteile der LC-MS/MS-Verfahren insbesondere bei prozessierten Produkten, die als Allergene Ei, Milch und Soja enthielten [42]. Für einen eindeutigen, hochspezifischen Nachweis werden mehrere Peptide eines allergenen Lebensmittels detektiert (i.d.R. 2-4) [14, 15, 48]. Dadurch können auch falsch-negative Ergebnisse reduziert werden, die durch Abbau oder Modifikation einzelner Zielsequenzen zustande kommen können. Die prinzipiell sehr gute Eignung der *targeted proteomics* zur Quantifizierung konnte bei verschiedenen Lebensmitteln und Matrices demonstriert werden, allerdings zeigen sich auch bei massenspektrometrischen Verfahren signifikante Matrixeffekte und Abhängigkeiten der Wiederfindung von der Prozessierung [50-52]. Ein aktueller Fokus der Methodenentwicklung sind daher neue Ansätze für Peptid- und Proteinstandards, die zukünftig eine sicherere Absolut-Quantifizierung erlauben sollen [53, 54]. Darüber hinaus werden neben gerichteten Verfahren auch zunehmend ungerichtete Verfahren im Bereich der hochauflösenden Massenspektrometrie entwickelt, die einen Nachweis von Kontaminationen mit allergenen Lebensmitteln ohne Vorauswahl und retrospektiv ermöglichen sollen [14, 48, 55].

Die Nachweisgrenze der LC-MS/MS-Verfahren deckt sich nach derzeitigen Erkenntnissen in Rohmaterialien mit der von typischen ELISA- oder PCR- Verfahren.

Die LC-MS/MS-basierte Allergenanalytik wird aktuell in nur relativ wenigen Routinelaboratorien eingesetzt, insbesondere, weil die Geräte in der Anschaffung verhältnismäßig teuer sind und zudem sehr fachkundiges Personal erforderlich ist. Die Etablierung der Probenvorbereitung und Datenauswertung dürfte aktuell eine weitere Hürde für die flächendeckende Übertragung in die Routineanalytik sein.

Es ist jedoch zu erwarten, dass massenspektrometrische Verfahren der Allergenanalytik durch weitere Umsetzung der Laborautomatisation und weiter steigender Bedeutung der Massenspektrometrie in der Routineanalytik in Zukunft deutlich zunehmende Verbreitung finden werden. Weitere Bestrebungen der Harmonisierung und die Entwicklung von Referenzverfahren sowie die Durchführung von Ringversuchen und Laborvergleichsuntersuchungen dürften diese Entwicklung weiter stützen [18, 19].

3 Referenz- und Kontrollmaterialien

Bei Referenzmaterialien ist zunächst zwischen zertifizierten und nicht-zertifizierten Referenzmaterialien zu unterscheiden. Zertifizierte Referenzmaterialien für die Allergenanalytik sind derzeit am Markt nicht verfügbar. Dies liegt zum einen daran, dass es für die Allergenanalytik keine definierten, anerkannten Referenzmethoden gibt. Die Zertifizierung eines Materials könnte dann auch nur methodenspezifisch erfolgen (z. B. für den immunologischen Nachweis). Zum anderen handelt es sich bei Lebensmittelallergenen nicht um einzelne, definierte Moleküle. Ein allergenes Lebensmittel wie Erdnuss enthält eine Vielzahl allergener Proteine. Diese müssten in ihrer Gesamtheit für die entsprechende Methodik definiert werden (z. B. Zielwert für eine immunologische Methode).

Allerdings bieten verschiedene kommerzielle Anbieter Qualitätskontrollen und nicht-zertifizierte Referenzmaterialien für die Allergenanalytik an. Diese sind in aller Regel nicht bezüglich bestimmter Eigenschaften in verschiedenen allergenanalytischen Methoden definiert. Zumeist werden nur Angaben zu allgemeinen Kriterien wie Proteingehalt, Kohlenhydrate, Fett, Wasser oder Asche gemacht. So bietet NIST für zwei Kontrollmaterialien (Haselnuss und Erdnuss) jetzt auch Informationen zur Reaktivität dieses Materials mit ELISA unterschiedlicher Hersteller an.

Die folgende Liste erhebt keinen Anspruch auf Vollständigkeit.

- A) Referenzmaterialien Hersteller
 - a. NIST Food Protein Allergen Program (<https://www.nist.gov/programs-projects/nist-food-protein-allergen-program>)
 - b. IRMM (Erdnuss, <https://crm.jrc.ec.europa.eu/p/q/peanut/IRMM-481-PEANUT-TEST-MATERIAL-KIT/IRMM-481>)
- B) PT-Anbieter
 - a. FAPAS (<https://fapas.com/shop/search?txtsearch=Allergen>)
 - b. LGC (<https://www.lgcstandards.com/DE/de/Food-and-Beverage/Allergens/cat/279551>)
 - c. DLA (<http://www.dla-lvu.de/DLA%20Startseite%20RM.html>)
 - d. LVU Lippold (<https://www.lvus.de/index.php/de/probenmaterialien>)
 - e. weitere
- C) ELISA Kit Hersteller
 - a. R-biopharm (<https://food.r-biopharm.com/news/first-validated-allergen-reference-material/>)
 - b. Romer Labs (https://www.romerlabs.com/de_de/shop/lebensmittelallergene/?rl_product_group=Referenzmaterialien)
 - c. weitere

Diese Materialien lassen sich in zwei Klassen kategorisieren:

3.1 Reine allergene Lebensmittelbestandteile (z. B. Erdnuss)

Diese Materialien können über herkömmliche Kriterien wie Proteingehalt, Kohlenhydrate, Fett, Wasser oder Asche und andere physikalisch-chemische Parameter spezifiziert werden. Solche Materialien können methodenunabhängig für weitere Dotierungsversuche und die Testvalidierungen verwendet werden (siehe 3.2). Eine weiterführende Charakterisierung, indem relevante allergene Proteine wie Ara h1, Ara h3 und Ara h6 für Erdnuss quantifiziert werden, ist für eine Vergleichbarkeit unterschiedlicher Chargen anzustreben. Zu erwähnen sind hier etwa Aktivitäten des NIST (NIST Food Protein Allergen Program), siehe auch obige Auflistung. Materialien der allergenen Lebensmittel sollten möglichst gering prozessiert sein. Jeder Prozessierungsschritt bedeutet ein höheres Maß an Einschränkung des Materials auf seine allgemeine analytische Verwendbarkeit. Falls prozessierte allergene Lebensmittel verwendet werden, sollte bekannt sein, auf welche Weise das Material prozessiert (z. B. erhitzt, entfettet) wurde.

3.2 Mit Allergenen dotierte Lebensmittelmatrices

Für die Methodenvalidierung sowie für analytische Qualitätssicherung sehr hilfreich sind Materialien verschiedener Matrices, welchen der allergene Lebensmittelbestandteil zugefügt wurde. Einige kommerzielle Anbieter vertreiben Materialien auf Basis unterschiedlicher Matrices, die mit diversen Allergenen dotiert sind. Materialien aus früheren Laborvergleichsuntersuchungen sind allgemein verfügbar und auch analytisch gut charakterisiert. Unter dieser Voraussetzung bieten sie sich daher derzeit für die laborinterne Methodenvalidierung und Qualitätssicherung an (siehe 3. B: PT-Anbieter).

Bei solchen Materialien sollten neben grundlegenden Eigenschaften wie Homogenität auch Informationen über die Herstellungsweise zur Verfügung stehen; etwa ob es sich um gespiktes oder natürlich kontaminiertes Material handelt. Im Falle von gespiktem Material ist es wichtig, bei prozessierten Lebensmitteln darauf zu achten, ob die Zugabe des Allergens vor oder nach der Prozessierung erfolgte. Weiterhin sind Informationen über das gespikte allergene Material essentiell (siehe 3.1), auch hinsichtlich dessen Prozessierungsgrades.

Schließlich besteht ein erheblicher Unterschied darin, ob z. B. ein Brotteig mit bekannter Zusammensetzung vor dem Backen mit einem Mandelpulver versetzt und anschließend bei 180 °C für 30 min gebacken wurde oder ob dem fertig ausgebackenen und fein gemahlene(n) Brot nachträglich dieses Mandelpulver zugesetzt wurde.

4 Messunsicherheit

Auch in Ermangelung zertifizierter Referenzmaterialien ist die Ermittlung einer Messunsicherheit nach den in der analytischen Chemie üblichen Verfahren (EURACHEM/CITAC Guide CG 4) bei der routinemäßigen Allergen-Analytik in der Regel mit großen Schwierigkeiten verbunden. Zudem geben die einschlägigen Normen zur Allergenanalytik nur sehr rudimentäre Empfehlungen zur Angabe einer Messunsicherheit, die als nicht ausreichend einzustufen sind, insbesondere, da der Bias nicht berücksichtigt ist. Die Arbeitsgruppe nimmt auf der Homepage zu dem Thema Stellung und empfiehlt, in Prüfberichten die Messunsicherheit bei quantitativen Allergen-ELISA- oder Allergen-PCR-Verfahren – soweit mit den Validierungsdaten vereinbar – mit ± 50 % des berichteten Allergen-Gehaltes als relativen Wert anzugeben [56].

5 Zusammenfassung und Ausblick

Für alle kennzeichnungspflichtigen Allergene sind routinetaugliche Nachweisverfahren verfügbar. Die Ergebnisse von Ringversuchen und Laborvergleichsuntersuchungen zeigen, dass ein Nachweis ab ca. 1 bis 10 Milligramm des Gesamtproteins des allergenen Lebensmittels sowohl mit ELISA als auch PCR Verfahren prinzipiell, d. h. in vielen Matrices möglich ist.

Auch die LC-MS/MS-Technik hat das Potential, je nach Matrix entsprechend niedrige Konzentrationen nachzuweisen. Dies muss jedoch noch anhand geeigneter Standardmaterialien im Rahmen von Ringversuchen oder Laborvergleichsuntersuchungen belegt werden.

Nach wie vor ist die Verfügbarkeit von Referenzmaterialien stark eingeschränkt. Erfahrungen aus Ringversuchen haben gezeigt, dass die Verfügbarkeit von Referenzmaterialien die Methodenstandardisierung entscheidend erleichtert und verbessert. Die Methodenstandardisierung selbst erleichtert wiederum die Vergleichbarkeit und Bewertung der unterschiedlichen analytischen Ansätze zum Nachweis allergener Lebensmittelbestandteile. Normen wie DIN EN 15633-1:2019 und DIN EN 15842:2019 leisten ihren Beitrag zur Standardisierung. Referenzmaterialien für die Allergenanalytik, welche nach DIN EN ISO 17034 akkreditiert sind, sind momentan nicht auf dem Markt erhältlich.

Daher bleibt eine absolute Quantifizierung weiterhin eine Herausforderung und erfordert eine möglichst genaue Spezifizierung der Analysenbedingungen wie Methode bzw. Testkit sowie des zur Kalibrierung eingesetzten Standardmaterials.

Tabelle 1: Anforderungen an die Allergenanalytik (beispielhaft für Portionsgröße 100 g)

allergenes Lebensmittel	empfohlene Referenzdosis ED ₀₅ (mg Protein*) [10]	abgeleitete Konzentration: (mg Protein/kg LM)**
Walnuss (für Pecannuss empfohlen)	1,0	10
Cashew (für Pistazie empfohlen)	1,0	10
Mandel (empfohlen)	1,0	10
Erdnuss	2,0	20
Sesam	2,0	20
Kuhmilch	2,0	20
Hühnerei	2,0	20
Haselnuss	3,0	30
Weizen	5,0	50
Fisch	5,0	50
Krustentiere (Garnelen)	200	2000

* Milligramm Gesamtprotein des allergenen Lebensmittels

** aus Referenzdosis [10] abgeleitete Konzentration in Milligramm Gesamtprotein des allergenen Lebensmittels pro kg Lebensmittel (angenommene Portionsgröße = 100 g)

Tabelle 2: Übersicht zum Stand der Allergenanalytik; Standardisierung

Legende:

mAK: monoklonale Antikörper

pAK: polyklonale Antikörper

Zielregion Real-time PCR: nuk-s = nukleär (single copy), nuk-m = nukleär (multi copy), mito = mitochondrial, Chloro = Chloroplast; rDNA = ribosomale RNA Gene;

AACCI

WG PAT

§ 64 = Methode in Amtlicher Sammlung von Untersuchungsverfahren.

allergenes Lebensmittel (s. Anhang II der VO 1169/2011)		Standardisierung/Ringversuche				
		veröffentlicht von	Methode	Matrix	Literatur	
Eier		-	-	-	-	
Erdnüsse		§ 64 L00.00-69 (Stand 2003-12)/	Erdnuss Sandwich ELISA	Lebensmittel wie Schokolade		
		EN 15634-4:2023 / § 64 L44.00-11 (Stand 2013-01)	Real-time PCR (nuk-s)	Schokolade		
		§ 64 L00.00-169 (Stand 2019-07)	Real-time PCR (mito)	diverse LM wie Reis- und Weizenkeks. Milchpulver und Brühwurst (DNA-Extrakte)	[39]	
		§ 64 L00.00-175 (Stand 2022-04)	Multiplex Real-time PCR (mito)	diverse LM wie Reiskeks, Saucenpulver, Bratling und Brühwurst (DNA-Extrakte)	[40]	
Fische	Fisch (ohne Knorpel- fische)	§ 64 L00.00-167 (Stand 2019-03)/	Real-time PCR (nuk-s)	Lebensmittel wie Brühwurst, Reiskeks, Sauce und Garnelensalat	[39]	
Glutenhal- tiges Getreide		Gluten (aus Weizen)	WG PAT	Sandwich ELISA (R5 mAK)	Brot, Teig, Stärke, Mehl, Snack	[24, 25]
		Gluten (aus Weizen)	AACCI	Teststreifen (R5 mAK)	Mehl, Keks, Snack	[57]
		Gluten (aus Weizen)	AACCI / WG PAT	competitive ELISA (R5 mAK)	Bier, Sirup, Sauerteig	[25]
		Gluten (aus Weizen)	AACCI / WG PAT	Sandwich ELISA (G12 mAK)	Reismehl, - kuchen, -brot	[28]
		Weizen / Roggen	§ 64 L08.00-66 (Stand 2016-10)	Real-time PCR (nuk-s)	Brühwurst	
Krebstiere		-	-	-	-	
Lupine		§ 64 L08.00-58(V) (Stand 2011-06)	Real-time PCR (rDNA)	Brühwurst		
		§ 64 L18.00-22 (Stand 2014-08)	Multiplex Real-time PCR (rDNA)	Reis- und Weizenkekse, Saucenpulver	[37]	

Tabelle 2: Übersicht zum Stand der Allergenanalytik; Standardisierung (Forts.)

allergenes Lebensmittel (s. Anhang II der VO 1169/2011)		Standardisierung/Ringversuche			
		veröffentlicht von	Methode	Matrix	Literatur
Milch		-	-	-	-
Schalenfrüchte	Mandeln	§ 64 L18.00-20 (Stand 2014-08)	Real-time PCR (nuk-s)	Reis- und Weizenkekse, Saucenpulver	[37]
		§ 64 L18.00-22 (Stand 2014-08)	Multiplex Real-time PCR (nuk-s)	Reis- und Weizenkekse, Saucenpulver	[37]
	Haselnüsse	CEN/TS 15633-2: 2013	Sandwich ELISA (mAK)	Lebensmittel wie Zerealien, Eiscreme, Kekse, Schokolade, Würstchen, Hüttenkäse, Joghurt, Salatdressing und Schokolade	
		CEN/TS 15633-3: 2013	Sandwich ELISA (pAK)	Lebensmittel z. B. Mehrkorn-Zerealien, feinerbe Schokolade (45 % Kakao) und Eiscreme	
		EN 15634-3: 2023 / § 64 L44.00-08 (Stand 2010-01)	Real-time PCR (nuk-s)	Schokolade	-
		§ 64 L00.00-175 (Stand 2022-04)	Multiplex Real-time PCR (rDNA)	diverse LM wie Reiskeks, Saucenpulver, Bratling und Brühwurst (DNA-Extrakte)	[40]
	Walnuss	§ 64 L00.00-175 (Stand 2022-04)	Multiplex Real-time PCR (Chloro)	diverse LM wie Reiskeks, Saucenpulver, Bratling und Brühwurst (DNA-Extrakte)	[40]
	Cashew	§ 64 L00.00-175 (Stand 2022-04)	Multiplex Real-time PCR (rDNA)	diverse LM wie Reiskeks, Saucenpulver, Bratling und Brühwurst (DNA-Extrakte)	[40]
	Pecanuss	-	-	-	-
	Paranuss	§ 64 L18.00-21 (Stand 2014-08)	Real-time PCR (nuk-s)	Reis- und Weizenkekse, Saucenpulver	[37]
		§ 64 L18.00-22 (Stand 2014-08)	Multiplex Real-time PCR (nuk-s)	Reis- und Weizenkekse, Saucenpulver	[37]
	Pistazie	-	-	-	-
	Macadamia	-	-	-	-

Tabelle 2: Übersicht zum Stand der Allergenanalytik; Standardisierung (Forts.)

allergenes Lebensmittel (s. Anhang II der VO 1169/2011)		Standardisierung/Ringversuche			
		veröffentlicht von	Methode	Matrix	Literatur
Sojabohnen		EN 15634-5:2023 / § 64 L08.00-59 (Stand 2013-01)	Real-time PCR (nuk-s)	Brühwurst	[35]
		§ 64 L08.00-65 (Stand 2017-10)	Multiplex Real-time PCR (nuk-s)	Brühwurst	[38]
		§ 64 L16.01-09 (Stand 2022-04)	Real-time PCR (nuk-s)	Getreidemehle wie Mais- und Weizenmehl	[41]
Sellerie		EN 15634-2:2019 / § 64 L08.00-56 (Stand 2020-02)	Real-time PCR (nuk-s)	Brühwurst	
		§ 64 L08.00-65 (Stand 2017-10)	Multiplex Real-time PCR (nuk-s)	Brühwurst	[38]
Senf	Senf, weiß (<i>Sinapis alba</i>)	EN 15634-5:2023 / § 64 L08.00-59 (Stand 2013-01)	Real-time PCR (nuk-s)	Brühwurst	
		§ 64 L08.00-65 (Stand 2017-10)	Multiplex Real-time PCR (nuk-s)	Brühwurst	[38]
	Senf, braun/schwarz (<i>Brassica juncea / Brassica nigra</i>)	§ 64 L08.00-64 (Stand 2016-10)	Real-time PCR (nuk-m)	Brühwurst	
		§ 64 L08.00-65 (Stand 2017-10)	Multiplex Real-time PCR (nuk-m)	Brühwurst	[38]
Sesam		§ 64 L18.00-19 (Stand 2014-08)	Real-time PCR (nuk-s)	Reis- und Weizenkekse, Saucenpulver	[37]
		§ 64 L18.00-22 (Stand 2014-08)	Multiplex Real-time PCR (nuk-s)	Reis- und Weizenkekse, Saucenpulver	[37]
Weichtiere		-	-	-	-

6 Literatur

1. Verordnung (EU) Nr. 1169/2011. Amtsblatt L 304 (22/11/2011). Europäisches Parlament und Rat der Europäischen Union, Brüssel. S. 18.
2. Verordnung zur Durchführung unionsrechtlicher Vorschriften betreffend die Information der Verbraucher über Lebensmittel (Lebensmittelinformations-Durchführungsverordnung) vom 5. Juli 2017 (BGBl. I S. 2272), zuletzt geändert durch Artikel 4 der Verordnung vom 18. November 2020 (BGBl. I S. 2504).
3. Jahresbericht der Lebensmittelüberwachung in Baden-Württemberg 2021. <https://www.ua-bw.de/pub/default.asp>; letzter Zugriff am 21.11.2023
4. Bekanntmachung der Kommission zur Umsetzung von Managementsystemen für Lebensmittelsicherheit unter Berücksichtigung von guter Hygienepraxis und auf die HACCP-Grundsätze gestützten Verfahren einschließlich Vereinfachung und Flexibilisierung bei der Umsetzung in bestimmten Lebensmittelunternehmen. Amtsblatt C 355/01 (16/09/2022).
5. The Allergen Bureau. <http://www.allergenbureau.net/>; letzter Zugriff am 21.11.2023
6. Waiblinger H.U. Überwachung der Allergenkennzeichnung, in: Allergene in Lebensmitteln. Loseblattausgabe. Hrsg. Busch, Waiblinger. Behr's Verlag. Stand 10/2023
7. Waiblinger H.U. Existierende Aktionswerte, in: Allergene in Lebensmitteln. Loseblattausgabe. Hrsg. Busch, Waiblinger. Behr's Verlag. Stand 10/2023
8. Arbeitskreis der auf dem Gebiet der Lebensmittelhygiene und der Lebensmittel tierischer Herkunft tätigen Sachverständigen (ALTS) sowie Arbeitskreis Lebensmittelchemischer Sachverständiger der Länder und des Bundesamtes für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit (ALS): Beurteilungswerte Allergene. Beschluss ALTS 2020/86/10. *Journal of Consumer Protection and Food Safety* (2021) <https://doi.org/10.1007/s00003-021-01323-3>
9. World Health Organization & Food and Agriculture Organization of the United Nations. (2022). Risk assessment of food allergens: part 1: review and validation of Codex alimentarius priority allergen list through risk assessment: meeting report. *World Health Organization*. <https://doi.org/10.4060/cb9070en>. Lizenz: CC BY-NC-SA 3.0 IGO
10. World Health Organization & Food and Agriculture Organization of the United Nations. (2022). Risk assessment of food allergens: part 2: review and establish threshold levels in foods for the priority allergens: meeting report. *World Health Organization*. <https://doi.org/10.4060/cc2946en> Lizenz: CC BY-NC-SA 3.0 IGO
11. World Health Organization & Food and Agriculture Organization of the United Nations (2021). Summary report of the ad hoc joint FAO/WHO expert consultation on risk assessment of food allergens. Part 3: review and establish precautionary labelling in foods of the priority allergens. https://cdn.who.int/media/docs/default-source/food-safety/jemra/3rd-allergen-summary-report-13dec2021.pdf?sfvrsn=5415608_7; letzter Zugriff am 21.11.2023
12. World Health Organization & Food and Agriculture Organization of the United Nations (2023). Ad hoc Joint FAO/WHO expert consultation on risk assessment of food allergens - Part 4: review and establish exemption for the food allergens. https://cdn.who.int/media/docs/default-source/food-safety/jemra/4th-allergen-summary-report-nov2022.pdf?sfvrsn=6603dbb9_3; letzter Zugriff am 21.11.2023
13. Holzhauser T. et al. (2020) Are current analytical methods suitable to verify VITAL® 2.0/3.0 allergen reference doses for EU allergens in foods? *Food and Chemical Toxicology* 145:111709. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2020.111709>.
14. Brockmeyer, J. (2018) Novel approaches for the MS-based detection of food allergens: high resolution, MS3, and beyond. *Journal of AOAC International*. 101:124–131. <https://doi.org/10.5740/jaoacint.17-0402>
15. Johnson, P. E.; Baumgartner, S.; Aldick, T.; Bessant, C.; Giosafatto, V.; Heick, J.; Mamone, G.; O'Connor, G.; Poms, R.; Popping, B.; Reuter, A.; Ulberth, F.; Watson, A.; Monaci, L.; Mills, E. N. C. (2011) Current perspectives and recommendations for the development of mass spectrometry methods for the determination of allergens in foods. *Journal of AOAC International* 94:1026–1033. <https://doi.org/10.1093/jaoac/94.4.1026>

16. Monaci, L.; Angelis, E. de; Montemurro, N.; Pilolli, R. (2018) Comprehensive overview and recent advances in proteomics MS based methods for food allergens analysis. *TrAC-Trends in Analytical Chemistry* 106:21–36. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2018.06.016>
17. Nitride, C.; Lee, V.; Baricevic-Jones, I.; Adel-Patient, K.; Baumgartner, S.; Mills, E. N. C. (2018) Integrating allergen analysis within a risk assessment framework: approaches to development of targeted mass spectrometry methods for allergen detection and quantification in the iFAAM Project. *Journal of AOAC International* 101:83–90. <https://doi.org/10.5740/jaoacint.17-0393>
18. Planque, M.; Arnould, T.; Delahaut, P.; Renard, P.; Dieu, M.; Gillard, N. (2019) Development of a strategy for the quantification of food allergens in several food products by mass spectrometry in a routine laboratory. *Food Chemistry* 274:35–45. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2018.08.095>
19. Stoyke, M., Becker, R., Brockmeyer, J., Jira, W., Popping, B., Uhlig, S., Wittke, S. (2019) German government official methods board points the way forward: launch of a new working group for mass spectrometry for protein analysis to detect food fraud and food allergens. *Journal of AOAC International* 102:1280-1285. <https://doi.org/10.1093/jaoac/102.5.1280>
20. Dienstleistung Lebensmittel Analytik GbR, Großhansdorf, D. <http://www.dla-lvu.de/>; letzter Zugriff am 21.11.2023
21. Lvu Lippold GbR, Durchführung von Laborvergleichsuntersuchungen. Herbolzheim, D. <https://www.lvus.de/index.php/de/laborvergleichsuntersuchungen>; letzter Zugriff am 21.11.2023
22. FAPAS. The Food and Environment Research Agency. YORK (UK). <https://fapas.com/shop/search?producttypes=1> letzter Zugriff am 21.11.2023
23. Lebensmittelchemische Gesellschaft, Arbeitsgruppe Biochemische und molekularbiologische Analytik. Suppliers of Allergen Test Kits. <https://www.gdch.de/netzwerk-strukturen/fachstrukturen/lebensmittelchemische-gesellschaft/arbeitsgruppen/biochemische-und-molekularbiologische-analytik.html>; letzter Zugriff am 21.11.2023
24. Immer U., Haas-Lauterbach S. (2012): Gliadin as a measure of gluten in foods containing wheat, rye, and barley-enzyme immunoassay method based on a specific monoclonal antibody to the potentially celiac toxic amino acid prolamins sequences: collaborative study. *Journal of AOAC International* 95(4):1118-1124. https://doi.org/10.5740/jaoacint.CS2012_01
25. Mendez E., Vela C., Immer U., Janssen FW. (2012) Report of a collaborative trial to investigate the performance of the R5 enzyme linked immunoassay to determine gliadin in gluten-free food. *European Journal of Gastroenterology & Hepatology* 17(10):1053-1063. <https://doi.org/10.1097/00042737-200510000-00008>
26. Köhler P. et al. (2013) *Cereal Foods World* 58(1):36–40
27. Köhler P. et al. (2013) *Cereal Foods World* 58(3):154–158
28. Scherf K.A. (2016) Gluten Analysis of Wheat Starches with Seven Commercial ELISA Test Kits - Up to Six Different Values. *Food Analytical Methods* 10:234–246. <https://doi.org/10.1007/s12161-016-0573-8>
29. Lacorn M. et al. (2019) Quantification of Wheat, Rye, and Barley Gluten in Oat and Oat Products by ELISA RIDASCREEN® Total Gluten: Collaborative Study, First Action 2018.15. *Journal of AOAC International* 102:1535–1543. <http://doi.org/10.1093/jaoac/102.5.1535>.
30. Don C., Halbmayr-Jech L., Rogers A., Koehler P. (2014) ACCI approved methods technical committee report: Collaborative study on the immunochemical quantitation of intact gluten in rice flour and rice-based products using G12 sandwich ELISA. *Cereal Foods World* 59:187–193.
31. Johnson P. et al. (2014) A multi-laboratory evaluation of a clinically-validated incurred quality control material for analysis of allergens in food. *Food Chemistry* 148:30–36. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2013.09.115>
32. Unterberger C., Lubner F., Demmel A., Grünwald K., Huber I., Engel K.-H., Busch U. (2014) Simultaneous detection of allergenic fish, cephalopods and shellfish in food by multiplex ligation-dependent probe amplification. *European Food Research and Technology* 239:559–566. <http://doi.org/10.1007/s00217-014-2251-7>
33. Zahradnik C., Martzy R., Mach R.L., Krska R., Farnleitner A.H., Brunner K. (2014) Detection of the food allergen celery via loop-mediated isothermal amplification technique. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 406:6827–6833. <https://doi.org/10.1007/s00216-014-7873-x>

34. Focke F., Haase I., Fischer M. (2013) Loop-Mediated Isothermal Amplification (LAMP): Methods for plant species identification in food. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 61:2943–2949.
35. Saull J., Duggan C., Hobbs G., Edwards T. (2016) The detection of atlantic cod (*gadus morhua*) using loop mediated isothermal amplification in conjunction with a simplified DNA extraction process. *Food Control* 59:306–313. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2015.05.038>
36. Siegel M., Schnur K., Boernsen B., Pietsch K., Waiblinger H.U. (2012) First ring-trial validation of real-time PCR methods for the quantification of allergenic food ingredients. *European Food Research and Technology* 235:619–630. <https://doi.org/10.1007/s00217-012-1788-6>
37. Siegel M., Mutschler A., Börsen B., Pietsch K. und Waiblinger H.U. (2013) Food matrix standards for the quantification of allergenic food ingredients using real-time PCR. *European Food Research and Technology* 237:185–197. <https://doi.org/10.1007/s00217-013-1978-x>
38. Waiblinger H.U., Boernsen B., Näumann G., Koepfel R. (2014) Ring trial validation of single and multiplex real-time PCR methods for the detection and quantification of the allergenic food ingredients sesame, almond, lupine and Brazil nut. *Journal of Consumer Protection and Food Safety* 9(3):297–310. <https://doi.org/10.1007/s00003-014-0868-x>
39. Waiblinger H.U., Boernsen B., Geppert C., Demmel A., Peterseil V., Koepfel R. (2017) Ring trial validation of single and multiplex real-time PCR methods for the detection and quantification of the allergenic food ingredients mustard, celery, soy, wheat and rye. *Journal of Consumer Protection and Food Safety* 12(1):55–72. <https://doi.org/10.1007/s00003-016-1063-z>
40. Waiblinger H.U., Boernsen B., Geppert C., Ladenburger E.M., Koepfel R., Maede D. (2019) Collaborative trial validation of RT-PCR methods for the detection and quantification of the allergenic foods fish and peanut. *Journal of Consumer Protection and Food Safety* 14(1):301–311. <https://doi.org/10.1007/s00003-019-01235-3>
41. Waiblinger H.U., Geppert C., Bartsch D., Neumann K., Hochegger R., Peterseil V., Koepfel R., Frenzel J. (2022) Collaborative trial validation of a new multiplex real-time PCR to sensitively detect allergenic nuts in food. *Journal of Consumer Protection and Food Safety* 17:265–277 <https://doi.org/10.1007/s00003-022-01385-x>
42. BVL (2016) Amtliche Sammlung von Untersuchungsverfahren: Methode L16-01-9 Bestimmung von Soja in Getreidemehl mittels real-time PCR (Stand 2022-04)
43. Heick, J.; Fischer, M.; Poepping, B. (2011) First screening method for the simultaneous detection of seven allergens by liquid chromatography mass spectrometry. *Journal of Chromatography A* 1218:938–943. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2010.12.067>
44. Korte, R.; Monneuse, J.-M.; Gemrot, E.; Metton, I.; Humpf, H.-U.; Brockmeyer, J. (2016) New high-performance liquid chromatography coupled mass spectrometry method for the detection of lobster and shrimp allergens in food samples via multiple reaction monitoring and multiple reaction monitoring cubed. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 64:6219–6227.
45. Monaci, L.; Angelis, E. de; Guagnano, R.; Ganci, A. P.; Garaguso, I.; Fiocchi, A.; Pilolli, R. (2020) Validation of a MS based proteomics method for milk and egg quantification in cookies at the lowest VITAL levels: An alternative to the use of precautionary labeling. *Foods* 9(10):1489. <https://doi.org/10.3390/foods9101489>
46. Pilolli, R.; Nitride, C.; Gillard, N.; Huet, A.-C.; van Poucke, C.; Loose, M. de; Tranquet, O.; Larre, C.; Adel-Patient, K.; Bernard, H.; Mills, E. N. C.; Monaci, L. (2020) Critical review on proteotypic peptide marker tracing for six allergenic ingredients in incurred foods by mass spectrometry. *Food Research International*. 128:108747. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2019.108747>
47. Huet, A.-C.; Paulus, M.; Henrotin, J.; Brossard, C.; Tranquet, O.; Bernard, H.; Pilolli, R.; Nitride, C.; Larre, C.; Adel-Patient, K.; Monaci, L.; Mills, E. N. C.; Loose, M. de; Gillard, N.; van Poucke, C. (2022) Development of incurred chocolate bars and broth powder with six fully characterised food allergens as test materials for food allergen analysis. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 414:2553–2570. <https://doi.org/10.1007/s00216-022-03912-z>
48. Korte, R.; Brockmeyer, J. (2016) MRM3-based LC-MS multi-method for the detection and quantification of nut allergens. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 408:7845–7855. <https://doi.org/10.1007/s00216-016-9888-y>

49. Korte, R.; Lepski, S.; Brockmeyer, J. (2016) Comprehensive peptide marker identification for the detection of multiple nut allergens using a non-targeted LC-HRMS multi-method. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 408:3059–3069. <https://doi.org/10.1007/s00216-016-9384-4>
50. Planque, M.; Arnould, T.; Dieu, M.; Delahaut, P.; Renard, P.; Gillard, N. (2017) Liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry for detecting ten allergens in complex and incurred foodstuffs. *Journal of Chromatography A* 1530:138–151. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2017.11.039>
51. Croote, D.; Braslavsky, I.; Quake, S. R. (2019) Addressing Complex Matrix Interference Improves Multiplex Food Allergen Detection by Targeted LC-MS/MS. *Analytical Chemistry* 91:9760–9769.
52. Mattarozzi, M.; Careri, M. (2019) The role of incurred materials in method development and validation to account for food processing effects in food allergen analysis. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 411:4465–4480. <https://doi.org/10.1007/s00216-019-01642-3>
53. Korte, R.; Oberleitner, D.; Brockmeyer, J. (2019) Determination of food allergens by LC-MS: Impacts of sample preparation, food matrix, and thermal processing on peptide detectability and quantification. *Journal of Proteomics* 196:131–140. <https://doi.org/10.1016/j.jprot.2018.11.002>
54. Gavage, M.; van Vlierberghe, K.; van Poucke, C.; Loose, M. de; Gevaert, K.; Dieu, M.; Renard, P.; Arnould, T.; Filee, P.; Gillard, N. (2020) Comparative study of concatemer efficiency as an isotope-labelled internal standard for allergen quantification. *Food Chemistry* 332:1274130. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2020.127413>
55. Nitride, C.; Norgaard, J.; Omar, J.; Emons, H.; Estes, M.-J. M.; O'Connor, G. (2019) An assessment of the impact of extraction and digestion protocols on multiplexed targeted protein quantification by mass spectrometry for egg and milk allergens. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 411:3463–3475. <https://doi.org/10.1007/s00216-019-01816-z>
56. Bräcker, J., Brockmeyer, J., (2018) Characterization and detection of food allergens using high-resolution mass spectrometry: current status and future perspective. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 66:8935–8940.
57. Lebensmittelchemische Gesellschaft, Arbeitsgruppe Biochemische und molekularbiologische Analytik (2022) Positionspapier: Messunsicherheit in der Allergen-Analytik. https://www.gdch.de/fileadmin/downloads/Netzwerk_und_Strukturen/Fachgruppen/Lebensmittelchemiker/Arbeitsgruppen/analytik/posi_Messunsicherheit_in_der_Allergen-Analytik_2022.pdf; letzter Zugriff am 21.11.2023
58. Lacorn M. et al. (2016) Determination of gluten in processed and nonprocessed corn products by qualitative R5 immunochromatographic dipstick: Collaborative study, first action 2015.16. *Journal of AOAC International* 99:730–737. <http://doi.org/10.5740/jaoacint.16-0017>