

§ 64 LFGB Kick-off Meeting zu „Anwendungspotenzial moderner Analysetechniken im Bereich Lebensmittel- und Futtermittelsicherheit und deren Authentizität“

Kathrin Szabo¹ · Lutz Grohmann¹ · Christine Klemm¹ · Sabine Mierke-Klemeyer¹ · Daniele Reimann¹ · Katrin Franks¹ · Manfred Stoyke¹

Published online: 11 April 2017

© The Author(s) 2017. Dieser Artikel ist auf Springerlink.com mit Open Access verfügbar.

Zusammenfassung Moderne Analysetechniken besitzen ein großes Anwendungspotenzial im Bereich der Lebensmittel- und Futtermittelsicherheit und der Authentizitätsprüfung von Lebensmitteln. Für die routinemäßige Anwendung dieser Verfahren fehlen bisher jedoch entsprechende Standardisierungskonzepte. Um die mit der Lebensmittelüberwachung betrauten Behörden validierte, leistungsfähige und standardisierte Methoden zur Verfügung zu stellen, ist eine Aufnahme dieser Methoden in die „Amtliche Sammlung von Verfahren zur Probenahme und zur Untersuchung (ASU)“ anzustreben. Auf Einladung des BVL berichteten am 14. November 2016 im Rahmen eines § 64 Kick-off Meetings Experten aus den Bereichen der Überwachung, der Wissenschaft und der beteiligten Wirtschaft über die bereits existierenden Anwendungsgebiete neuer Analyseverfahren und ihre bisherigen Erfahrungen hinsichtlich der Anwendung dieser Methoden. Die Teilnehmer der Veranstaltung befürworteten die Gründung neuer und spezialisierter § 64-Arbeitsgruppen mit den Schwerpunkten „Moderne molekularbiologische Methoden“ und „Massenspektrometrische Verfahren“. Ziel der neu zu gründenden Arbeitsgruppen ist es zunächst, allgemeine Leitfäden zur Validierung zu erstellen oder bestehende Ansätze auf Anwendbarkeit für die Methoden zu prüfen oder weiterzuentwickeln.

Mögliche thematische bzw. anwendungsbezogene Schnittstellen sollen erkannt, und bei der Erstellung entsprechender Leitfäden mit einbezogen werden.

Schlüsselwörter Moderne Analysetechniken · Massenspektrometrie · Digitale PCR · NGS · Lebensmittel · Standardisierung · Validierung · Amtliche Sammlung

Abstract The area of food and feed analysis has been benefiting from related disciplines by using modern analytical techniques. However, corresponding standardization concepts are not yet available for the routine application of these methods. In order to meet the requirements of the official authorities responsible for food monitoring, it is requested to validate and to transfer these methods to the “Official Collection of Methods of Analysis and Sampling (ASU)”. Following an invitation from the Federal Office for Consumer Protection and Food Safety (Bundesamt für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit, BVL) on November 14, 2016, experts from relevant fields gathered to discuss application of new analytical methods and their experiences. Within the framework of a § 64 kick-off meeting, possible “new topics” with regard to the application of these methods were discussed. Participants at the event supported the establishment of new specialized § 64 working groups focusing on “modern molecular biology methods” and “mass spectrometric methods”. The aim of the newly founded working groups is to create general guidelines for validation and to examine or to develop existing approaches on its applicability for these methods. Possible thematic or application-specific interfaces should be recognized

✉ Manfred Stoyke
manfred.stoyke@bvl.bund.de

¹ Bundesamt für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit, Mauerstr. 39-42, 10117 Berlin, Germany

and included in the preparation of appropriate guidelines.

Keywords Modern analytical methods · Mass spectrometry · Digital PCR · NGS · Food · Standardization · Validation · Official collection of methods

1 Einleitung

Die Entwicklung neuer nukleinsäure-basierter und massenspektrometrischer Verfahren im Bereich der Lebensmittelanalytik hat in den letzten Jahren stark zugenommen: Next Generation Sequencing (NGS), Whole Genome Sequencing (WGS), digitale PCR, DNA-Barcoding, Proteomics und auch die „MALDI-TOF“ – mit diesen neuen, sehr leistungsfähigen Verfahren bzw. Analysetechniken lassen sich analytische Problemstellungen auch im Bereich der Lebensmittel- und Futtermittelsicherheit zeit- und ressourcenschonend bearbeiten. Insbesondere bei der gesundheitlichen Bewertung von Lebensmitteln ermöglicht die genauere Feintypisierung der mikrobiologischen Erreger bzw. die massenspektrometrische Aufklärung von DNA- oder Proteinstrukturen eine hohe Sensitivität und Spezifität. Voraussetzung für die Anwendung dieser Verfahren in der Routine sind standardisierte und validierte Analyseverfahren, die die Leistungsfähigkeit, Zuverlässigkeit und Vergleichbarkeit der Methoden garantieren. Eine Berücksichtigung neuer moderner Analyseverfahren in der ASU ist anzustreben, um den Untersuchungsbehörden der Länder für ihre Überwachungsaufgaben leistungsfähige und standardisierte Methoden zur Verfügung zu stellen.

2 Inhalte der Veranstaltung

Vor dem Hintergrund, einen Überblick über die bereits existierenden Anwendungsbereiche und die unterschiedlichen Ansätze zur Bearbeitung der Fragestellungen zu erhalten, wurden vom BVL Mitglieder bereits bestehender § 64-Arbeitsgruppen (AG) aus den relevanten Bereichen zu einem Kick-off Meeting nach Berlin eingeladen, auch mit dem Ziel zu prüfen, ob die Gründung von thematisch spezialisierten § 64-AG bereits sinnvoll ist. In zahlreichen Vorträgen stellten die aus den Bereichen der Lebensmittelüberwachung, der Wissenschaft und der beteiligten Wirtschaft stammenden Teilnehmer

die Bedeutung moderner Analyseverfahren und ihre Erfahrungen hinsichtlich der Anwendung dieser Methoden vor.

Die Vorträge der Teilnehmer umfassten zwei große Themenkomplexe:

- 15 Beiträge zu modernen, nukleinsäure-basierten Techniken wie Next Generation Sequencing (NGS), Targeted Sequencing oder Whole Genome Sequencing (WGS), digitale PCR (dPCR) und Multiplex PCR für die qualitative und quantitative molekularbiologische Analytik und
- acht Beiträge zu proteinbasierte, massenspektrometrische Verfahren wie MALDI-TOF (Matrix-Assistierte Laser-Desorption-Ionisierung mit der Flugzeitanalyse, Time Of Flight) und LC-MS/MS (Liquid-Chromatografie Massenspektrometrie).

Anschließend erfolgte eine Diskussion in thematisch ausgerichteten Gruppen zu möglichen Arbeitsschwerpunkten der neu zu bildenden Arbeitsgruppen. Hierbei wurden wichtige Grundlagen wie die Erarbeitung von Validierungsleitfäden und Mindestleistungskriterien für moderne Verfahren sowie die Notwendigkeit von gemeinsam zugänglichen und nutzbaren Datenbanken hervorgehoben.

2.1 Next generation sequencing

NGS wird bereits in der Tierartendifferenzierung als sogenanntes Targeted Sequencing und WGS in der Mikrobiologie zur Stammdiagnostik sowie in der Mikrobiomanalyse und in der GVO-Analytik zur Untersuchung nicht zugelassener (unbekannter) GVO angewendet (Holst-Jensen et al. 2016). Auch am BVL wurde bereits eine Pilotstudie mit dem Ziel der Entwicklung einer bioinformatischen Strategie zur Identifizierung und molekularen Charakterisierung von genetisch modifiziertem Reis durchgeführt (Wahler et al. 2013).

Mittels NGS lassen sich präzisere Informationen in verhältnismäßig kurzer Zeit erlangen, mit Hilfe derer ein zielgerichtetes Vorgehen, z. B. bei der Aufklärung und dem Management von lebensmittelbedingten Krankheitsausbrüchen, möglich ist. Darüber hinaus können zukünftig herkömmliche Testmethoden wie z. B. Serotypisierung, Antibiotikaresistenz- und Virulenzbestimmung ersetzt werden. In Deutschland konnte NGS schon erfolgreich im Rahmen einiger Ausbruchsauflösungen zur Charakterisierung der Ausbruchsstämme angewendet werden (Mellmann et al. 2011; Ruppitsch et al. 2015).

Am Bundesinstitut für Risikobewertung (BfR) gibt es umfangreiche Aktivitäten hinsichtlich NGS im Bereich Mikrobiologie. In Planung sind der Aufbau der Gesamtgenomsequenzierung von Isolaten als Routinetool für die Typisierung von mikrobiellen Erregern als Service für die Nationalen Referenzlaboratorien, Metagenomstudien (kulturlose Direktidentifizierung, Mikrobiom in Lebensmitteln) sowie die Teilnahme an internationalen NGS Ringversuchen. Der Ausschuss „Mikrobiologische Typisierungsverfahren“ der BfR Kommissionen Biologische Gefahren und Hygiene ist mit der Bewertung von NGS und Online Umfragen zu Typisierungsverfahren betraut. Des Weiteren sollen Datenbanken und Auswertungspipelines zur Typisierung der Isolate für verschiedene Anwendungen wie z. B. Risikobewertung, Ausbruchsuntersuchungen, Früherkennung von Erregern, epidemische Klone sowie Source Attribution erstellt werden.

Zur Authentizitätskontrolle bei Fisch- und Fleischproben wird NGS bereits zum sogenannten Metabarcoding, mit dem sich Tier- oder Pflanzenarten anhand charakteristischer Abschnitte ihrer DNA eindeutig identifizieren lassen, in ersten Ansätzen angewendet (Ripp et al. 2014; Staats et al. 2016). Der routinemäßige Einsatz dieser Analytik erscheint zukünftig möglich zu sein. Einige Dienstleistungslaboratorien bieten derartige Untersuchungen bereits an.

Auch in anderen Ländern der EU wird NGS bereits in der Untersuchung von amtlichen Lebensmittelproben angewendet. In Großbritannien wird WGS von der Gesundheitsbehörde Public Health England seit 2014 zur Feintypisierung präsumtiver Salmonellen-Isolate eingesetzt und wurde darüber hinaus im Jahr 2014 zur Aufklärung eines europaweiten Salmonellenausbruchs angewendet (EFSA, ECDC 2014). In Dänemark wird WGS seit 2013 routinemäßig für die Untersuchung von Listerien und STEC/VTEC eingesetzt (FAO 2016). In Belgien konnte mithilfe von WGS die Sequenz eines gentechnisch veränderten *Bacillus subtilis* aufgeklärt werden, der illegal in die EU aus China eingeführt wurde (Barbau-Piednoir et al. 2015). Die Experten waren sich einig, dass für die Validierung und Standardisierung entsprechende Parameter und Kriterien festzulegen und Mindestleistungskriterien zu beschreiben sind. Darüber hinaus ist die Datenauswertung zu standardisieren und die Qualität der Daten in Datenbanken sicher zu stellen. Von Interesse sind hier auch die Anforderungen, die von Seiten der Akkreditierungsstellen an die Validierung dieser Methoden gestellt werden.

Auf europäischer Ebene bestehen bereits Bemühungen seitens des ECDC (European Centre for Disease Prevention and Control) bezüglich der Integration von NGS-Methoden in internationale Leitfäden (ECDC Scientific Advice 2015). Erste Ansätze zur Normung kommen auch von Seiten der ISO im Bereich der Biotechnologie und dem zuständigen TC 276 (ISO/AWI 20395 2017). Darüber hinaus befasste sich ein EU-Projekt mit der Erstellung von Leitlinien zu minimalen Leistungsparametern für die Entwicklung, Validierung und Anwendung molekularbiologischer Methoden, wie zum Beispiel für die digitale PCR und NGS (Decathlon 2016).

Auch die Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO) hat kürzlich in Zusammenarbeit mit der WHO ein Dokument publiziert, mit dem den Ländern Unterstützung bei der Verständigung über die Anwendungsmöglichkeiten von WGS im Bereich der Lebensmittelsicherheit gegeben werden soll (ECDC Scientific Advice 2015).

2.2 PCR-basierte und weitere molekularbiologische Nachweisverfahren

Die Polymerase-Kettenreaktion (PCR) stellt schon seit längerer Zeit ein sensitives Verfahren zur Speziesdifferenzierung im Bereich der pflanzlichen und tierischen Lebensmittel dar. Multiplex PCR-Verfahren werden zunehmend zur simultanen spezies-spezifischen Bestimmung verschiedener Tierarten, in der GVO-Analytik als Screening und in der Mikrobiologie eingesetzt.

Molekularbiologische Methoden werden zudem zur Differenzierung von Fischarten mittels DNA-Barcoding eingesetzt. Hierbei gilt die klassische Sequenzanalyse mit universellen Primern als Methode der Wahl. Sie ermöglicht eine umfassende Spezies-Differenzierung über die Sequenzierung mitochondrialer Markergene wie z. B. für Cytochrom-b- und die Cytochrom-c-Oxidase Untereinheit. Für letzteres wurde im Rahmen des EU-Projekts „Label-fish“ bereits eine entsprechende Arbeitsanweisung entwickelt und mittels international durchgeführtem Ringversuch validiert. Die Standardisierung fand bisher jedoch keine Berücksichtigung auf internationaler Ebene, so ist die Übernahme der Methoden beim CEN bisher noch nicht erfolgt. Dies lag u. a. auch daran, dass erst kürzlich beim CEN beschlossen wurde, den Arbeitsbereich des TC 275 um die Speziesanalytik zu erweitern und die WG 11 zukünftig mit der Normung von molekularbiologischen

Verfahren zur Bestimmung von Tier- und Pflanzenarten in Lebensmitteln zu betrauen.

Auch für den Nachweis von Lebensmittelallergenen kommen seit längerem überwiegend real-time PCR basierende Verfahren zum Einsatz. Dabei wird der Nachweis der Spezies der allergenen Lebensmittelbestandteile über charakteristische DNA-Sequenzen geführt. PCR-Nachweisverfahren finden darüber hinaus vielseitige Verwendung im Bereich der Mikrobiologie sowie in der GVO-Analytik.

Die § 64 LFGB Arbeitsgruppe „Entwicklung von Methoden zur Identifizierung von mit Hilfe gentechnischer Verfahren hergestellter Lebensmittel“ hat kürzlich Leitlinien für die zukünftige Durchführung von Validierungen von qualitativen real-time PCR Methoden im Einzellabor und im Ringversuch erarbeitet und veröffentlicht (BVL 2016a, b). Mit diesen Leitlinien wird beabsichtigt, dass die von der § 64 LFGB Arbeitsgruppe erarbeiteten real-time PCR Methoden die Leistungskriterien erfüllen können, die auf europäischer Ebene und auf internationaler Ebene festgelegt sind. Die Leitfäden sind auch für Validierungen und nachfolgende Normungsvorhaben anderer Länder wie z. B. China von Bedeutung. Es ist daher vorgesehen, die Leitlinien bei der ISO TC34 SC16 einzubringen.

Die digitale PCR (dPCR) gilt als ein mögliches alternatives Verfahren zur Quantifizierung, bei dem Kopienzahlen von Zielsequenzen in Proben direkt und ohne Kalibrierkurven quantifiziert werden. Erste Anwendungen der digitalen PCR liegen im Bereich der GVO Quantifizierung (Dobnik et al. 2015), der Speziesdifferenzierung von pflanzlichen und tierischen Lebensmittel (Bucher and Köppel 2016; Cai et al. 2014) sowie in der Mikrobiologie.

Die Experten waren sich einig, dass vorrangig die Validierungsparameter und Leistungskriterien der digitalen PCR festgelegt werden sollten, insbesondere hinsichtlich der Bewertung dieser Assays sowie der Nachweisgrenze. Als Basis hierfür kann eine kürzlich erschienene Publikation von Lievens et al. (2016) sowie die voraussichtlich 2017 erscheinende Empfehlung des „European Network of GMO Laboratories“ (ENGL) zur Anwendung der digitalen PCR dienen (ENGL 2017).

2.3 Moderne massenspektrometrische Verfahren

Methoden, die auf die Massenanalyse von Verbindungen basieren, wie MALDI-TOF-MS (Matrix-Assistierte Laser-Desorption-Ionisierung, Time Of Flight Massenspektrometrie) und LC-MS/MS (Liquid-Chromatografie

Tandem Massenspektrometrie) finden zunehmend auch in der Tierartendifferenzierung Anwendung, dem Allergennachweis (insbesondere Milch und Ei) sowie in der Mikrobiologie.

MALDI-TOF-MS basierte Diagnostik gilt vor allem bei der Identifizierung und Typisierung von Mikroorganismen aus Lebensmittelproben als wichtiges Screening-Verfahren für mikrobiologisches „Source Tracking“ im Rahmen von epidemiologischen Untersuchungen. MALDI-TOF-MS wird derzeit auch im Rahmen des Antibiotikaresistenzmonitorings am BVL zur Nachbestimmung vordifferenzierter Isolate angewendet.

Im Bereich der Tierarten-Differenzierung gelten massenspektrometrische Verfahren als relativ neue Technik, die in der Forschung stetig weiter entwickelt jedoch nur vereinzelt in der Routineanalytik eingesetzt werden. Insbesondere der gezielte massenspektrometrische Nachweis von Markerpeptiden, das sogenannte Targeted Proteomics, sowie die Ambient Mass Spectrometry (AMS) haben großes Potenzial als alternative Methoden in der Speziesanalytik.

MALDI-TOF-MS wird bereits für die Tierartenidentifizierung von Insekten, die als Lebensmittel Verwendung finden sollen, eingesetzt. Des Weiteren ist eine Fischartbestimmung mittels MALDI-Biotyping geplant, bei der über eine entsprechende Proteinfingerprint-Datenbank eine einfache und schnelle Identifikation von Speisefischen ermöglicht wird.

„ANIMAL-ID“ (Animal-ID 2017), ein vom BMEL im Rahmen des Innovationsprogramms gefördertes Forschungsverbundprojekt beschäftigt sich derzeit mit der „Entwicklung und Validierung innovativer Methoden zur Rückverfolgbarkeit und Authentifizierung von tierischen Proteinen in Lebens- und Futtermitteln“. Im Rahmen dessen wird auch die Entwicklung und Validierung von LC-MS-basierter Methoden zur Detektion von Tierarten in prozessierten Lebens- und Futtermitteln bearbeitet.

Für die Einführung von LC-MS/MS basierter Allergenanalytik bzw. Speziesanalytik sind teure Geräte und geschultes Personal erforderlich, daher werden diese Methoden bisher nur in wenigen Laboratorien eingesetzt. Zudem existieren derzeit noch nicht für alle Allergene geeignete Markerpeptide bzw. geeignete interne Standards und Referenzmaterialien. Das Max Rubner-Institut veröffentlichte hierzu kürzlich in Zusammenarbeit mit der Hochschule Aalen eine LC-MS/MS-Methode zur simultanen Detektion von Lupine, Erbse und Soja in Fleisch-erzeugnissen (Hoffmann et al. 2017).

Die Experten des Kick-off Meetings brachten zum Ausdruck, dass bei massenspektrometrischen Verfahren für die Authentizitätsprüfung von Tierarten, Pflanzen und Pilzen sowie im Bereich der mikrobiologischen Speziesidentifikation und Typisierung Standardisierungsbedarf besteht.

Darüber hinaus wurde von den Experten angeregt, dass die Entwicklung eines Leitfadens für die Methodvalidierung von MALDI-TOF-Analysen im Vordergrund stehen soll und die Verwendung von Datenbanken der Gerätehersteller diskutiert werden muss. Ein weiterer wichtiger Punkt ist die Erstellung und Pflege eigener Bundesländer-übergreifenden Datenbanken sowie deren Nutzung und die Qualitätssicherung von offenen Datenbanken.

3 Zusammenfassung

Im Rahmen der Veranstaltung zeigte sich, dass die aufgeführten modernen Analyseverfahren und -techniken ein großes Anwendungspotenzial im Bereich der Lebensmittel- und Futtermittelsicherheit und der Lebensmittelauthentizität besitzen. Für den routinemäßigen Einsatz dieser Verfahren und zur rechtssicheren Bestätigung von Befunden sind jedoch die Standardisierung der Analytik und der Datenauswertung unerlässlich. Im Rahmen der Veranstaltung konnten folgende Erkenntnisse bezüglich der zukünftigen Anwendung moderner Analyseverfahren und -techniken im Bereich der Lebensmittelsicherheit identifiziert werden:

- **Standardisierung** Erste Standardisierungsmaßnahmen sollten die Erarbeitung von Validierungsleitfäden und Mindestleistungskriterien für Verfahren wie digitale PCR, NGS, WGS und Massenspektrometrie beinhalten. Darüber hinaus sind gemeinsam zugängliche und nutzbare sowie qualitätsgesicherte Datenbanken notwendig, um standardisierte und valide Auswertungsverfahren für eine sichere Beurteilung analytischer Daten zu gewährleisten.
- **Gründung von thematisch spezialisierten § 64-Arbeitsgruppen** Sowohl nukleinsäurebasierte Analysemethoden als auch proteinbasierte, massenspektrometrische Verfahren besitzen ein großes Potenzial für die Routineanalytik in der Lebensmittelüberwachung. Daher wurde die Gründung neuer spezialisierter Arbeitsgruppen mit den Schwerpunkten „Moderne molekularbiologische Methoden“ und

„Massenspektrometrische Verfahren“ von allen Teilnehmern der Veranstaltung befürwortet.

Insbesondere MALDI-TOF-MS hat in der mikrobiologischen Diagnostik große Bedeutung gewonnen und besitzt ein hohes Potenzial für die zukünftige Routineanalytik. Die weiteren Entwicklungen konzentrieren sich gegenwärtig auf eine Verbesserung der Datenanalyse sowie die Errichtung valider qualitätsgesicherter Datenbanken. Ziel der neu zu gründenden Arbeitsgruppen ist es zunächst, allgemeine Leitfäden zur Validierung zu erstellen oder bestehende Ansätze auf Anwendbarkeit für diese Methoden zu prüfen oder weiterzuentwickeln. Mögliche thematische bzw. anwendungsbezogene Schnittstellen sollen erkannt und bei der Erstellung entsprechender Validierungsparameter mit einbezogen werden.

Das Ziel der Veranstaltung, einen intensiven Informations- und Erfahrungsaustausch auf wissenschaftlicher Ebene über die Berücksichtigung moderner Analyseverfahren und -techniken in spezialisierten § 64-Arbeitsgruppen zu führen wurde erreicht. Die Teilnehmer der Veranstaltung sind bereit, auch zukünftig ihre Erfahrungen in die Arbeit der AG der § 64-Geschäftsstelle der ASU zur Standardisierung von neuen Methoden mit einzubringen. Seitens der Geschäftsstelle soll hier allen Teilnehmern nochmal ein recht herzlicher Dank für die aktive Mitarbeit ausgesprochen, und der Wunsch der § 64-Geschäftsstelle zum Ausdruck gebracht werden, weitere interessierte Mitglieder zur aktiven Mitarbeit in gegebenenfalls neu zu gründenden AG bzw. Unterarbeitsgruppen zu gewinnen.

Open Access This article is distributed under the terms of the Creative Commons Attribution 4.0 International License (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided you give appropriate credit to the original author(s) and the source, provide a link to the Creative Commons license, and indicate if changes were made.

Literatur

- Animal-ID (2017) <http://www.bmel.de/DE/Ministerium/Bildung/Forschung/Texte/Forschungs-förderung-Animal-ID.html>. (Zugriff am 16.02.2017)
- Barbau-Piednoir E, De Keersmaecker SCJ, Wuyts V, Gau C, Pirovano W, Costessi A, Philipp P, Roosens NH (2015) Genome sequence of EU-unauthorized genetically modified *Bacillus subtilis* strain 2014-3557 overproducing riboflavin, isolated from a vitamin B2 80% feed additive. *Genome Announc* 3(2):e00214–e00215. doi:10.1128/genomeA.00214-15

- Bucher TB, Köppel R (2016) Duplex digital droplet PCR for the determination of non-Basmati rice in Basmati rice (*Oryza sativa*) on the base of a deletion in the fragrant gene. *Eur Food Res Technol* 242:927–934
- BVL (2016a) Leitlinien zur Einzellabor-Validierung qualitativer real-time PCR Methoden. http://www.bvl.bund.de/SharedDocs/Downloads/09_Untersuchungen/Leitlinien%20zur%20Einzellabor%20Validierung.html?nn=3778146. (Zugriff am 27.02.2017)
- BVL (2016b) Leitlinien zur Ringversuchs-Validierung von qualitativen real-time PCR Methoden. http://www.bvl.bund.de/SharedDocs/Downloads/09_Untersuchungen/Leitlinien%20zur%20Ringversuchs%20Validierung.html?nn=3778146. (Zugriff am 27.02.2017)
- Cai Y, Li X, Lv R, Yang J, Li J, He Y, Pan L (2014) Quantitative analysis of pork and chicken products by droplet digital PCR. *Biomed Res Int*, ID, p 810209
- Decathlon (2016) Minimum performance parameters. <http://www.decathlon-project.eu/content/d-61-minimum-performance-parameters>. (Zugriff am 27.02.2017)
- Dobnik D, Spilsberg B, Košir AB, Holst-Jensen A, Žel J (2015) Multiplex quantification of 12 European Union authorized genetically modified maize lines with droplet digital polymerase chain reaction. *Anal Chem* 87:8218–8226
- EFSA, ECDC (2014) Joint ECDC–EFSA Rapid Outbreak assessment: Multi-country outbreak of *Salmonella enteritidis* infections associated with consumption of eggs from Germany. http://ecdc.europa.eu/en/press/news/_layouts/forms/News_DispatchForm.aspx?ID=1051&List=8db7286c-fe2d-476c-9133-18ff4cb1b568&Source=http%3A%2F%2Fecdc.europa.eu%2FEN%2FPRESS%2Fnews%2FPages%2FNews.aspx%3Fp%3D32
- ENGL (2017) Working group on digital PCR (WG-dPCR). <http://gmo-crl.jrc.ec.europa.eu/ENGL/docs/WG-dPCR-Mandate.pdf>. (Zugriff am: 16.02.2017)
- European Centre for Disease Prevention and Control, Scientific Advice (ECDC) (2015) Expert opinion on the introduction of next-generation typing methods for food- and waterborne diseases in the EU and EEA. ECDC Stockholm. (<http://ecdc.europa.eu/en/publications/Publications/food-and-waterborne-diseases-next-generation-typing-methods.pdf>). (Zugriff am: 16.02.2017)
- FAO (2016) Applications of Whole genome sequencing in food safety management. <http://www.fao.org/3/a-i5619e.pdf>. (Zugriff am: 16.02.2017)
- Hoffmann B, Müncha S, Schwägele F, Neustüß C, Jira W (2017) A sensitive HPLC-MS/MS screening method for the simultaneous detection of lupine, pea, and soy proteins in meat products. *Food Control* 71:200–209
- Holst-Jensen A, Spilsberg B, Arulandhu AJ, Kok E, Shi J, Zel J (2016) Application of whole genome shotgun sequencing for detection and characterization of genetically modified organisms and derived products. *Anal Bioanal Chem* 408:4595–4614
- ISO/AWI 20395 (2017) Quality considerations for targeted nucleic acid quantification methods http://www.iso.org/iso/home/store/catalogue_tc/catalogue_detail.htm?csnumber=67893. (Stand: 27.02.2017)
- Lievens A, Jacchia S, Kagkli D, Savini C, Querci M (2016) Measuring digital PCR quality: performance parameters and their optimization. *PLOS One*. doi:10.1371/journal.pone.0153317
- Mellmann A, Harmsen D, Cummings CA, Zentz EB, Leopold SR, Rico A, Prior K, Szczepanowski R, Ji Y, Zhang W, McLaughlin SF, Henkhaus JK, Leopold B, Bielaszewska M, Prager R, Brzoska PM, Moore RL, Guenther S, Rothberg JM, Karch H (2011) Prospective genomic characterization of the German enterohemorrhagic *Escherichia coli* O104:H4 outbreak by rapid next generation sequencing technology. *PLoS One* 6:e22751. doi:10.1371/journal.pone.0022751
- Ripp F, Krombholz CF, Liu Y, Weber M, Schäfer A, Schmidt B, Prager R, Hankeln T (2014) All-Food-Seq (AFS): a quantifiable screen for species in biological samples by deep DNA sequencing. *BMC Genomics* 15:639
- Ruppitsch W, Prager R, Halbedel S, Hyden P, Pietzka A, Huhulescu S, Lohr D, Schönberger K, Aichinger E, Hauri A, Stark K, Vygen S, Tietze E, Allerberger F, Wilking H (2015) Ongoing outbreak of invasive listeriosis, Germany, 2012 to 2015. *Euro Surveill*. doi:10.2807/1560-7917.ES.2015.20.50.30094
- Staats M, Arulandhu AJ, Gravendeel B, Holst-Jensen A, Scholtens I, Peelen T, Prins TW, Kok E (2016) Advances in DNA metabarcoding for food and wildlife forensic species identification. *Anal Bioanal Chem* 408:4615–4630
- Wahler D, Schausser L, Bendiek J, Grohmann L (2013) Next-generation sequencing as a tool for detailed molecular characterisation of genomic insertions and flanking regions in genetically modified plants: a pilot study using a rice event unauthorised in the EU. *Food Anal Methods* 6:1718–1727