



Algemene gegevens	
PPS-nummer	AF-16094
Titel	LC-MS methoden voor detectie voedselallergenen
Thema	AgriFood
Uitvoerende kennisinstelling(en)	Wageningen Plant Research, WUR
Projectleider onderzoek (naam en e-mailadres)	Twan America, twan.america@wur.nl
Penvoerder PPS (namens private partij, naam)	Pieter Vos Bedrijf: Nutrilab B.V. p.vos@nutrilab.nl
Contactpersoon overheid	
Adres van de projectwebsite	https://www.wur.nl/nl/Onderzoek-Resultaten/Onderzoeksprojecten-LNV/Expertisegebieden/kennisonline/LC-MS-methoden-voor-detectie-voedselallergenen.htm
Startdatum	21 jan 2017
Einddatum	31 maart 2019

Goedkeuring penvoerder/consortium	
De eindrapportage dient te worden besproken met de penvoerder/het consortium. De TKI('s) nemen graag kennis van eventuele opmerkingen over de rapportage.	
De penvoerder heeft namens het consortium de eindrapportage	<input checked="" type="checkbox"/> goedgekeurd <input type="checkbox"/> niet goedgekeurd
Eventuele opmerkingen over de eindrapportage:	

Consortium	
Zijn er wijzigingen geweest in het consortium/de projectpartners? Zo ja, benoem deze	Het bedrijf Intertaste BV is overgenomen door Euroma Bv.

Inhoudelijke samenvatting van het project	
Probleemomschrijving	Volgens EU regulatie 1169/2011 worden voedselproducenten verplicht om de mogelijke aanwezigheid van 14 bronnen van allergenen (i.e. gluten, schaaldieren, ei, vis, soja, pinda, melk, noten, selderij, mosterd, sesam, lupine, weekdieren (mossel) en zwaveldioxide/sulfiet) te labelen op hun product. De detectie van deze allergenen gebeurt momenteel grotendeels middels ELISA analyse. Deze ELISA analyses hebben enkele beperkingen en/of nadelen. Zo wordt detectie meestal gedaan op productgroep en niet specifiek op de allergene componenten (epitopen) in het product. De antilichamen die gebruikt worden in de ELISA analyse herkennen vaak meer dan de specifieke epitopen en zijn niet voldoende specifiek in hun herkenning (kruisreactiviteit). Tevens worden de ELISA analyses per productgroep apart uitgevoerd. Er is geen multiplex methode beschikbaar waarmee meerdere (of de gehele set) allergeengroepen tegelijk kunnen worden gemeten. LC-MS/MS levert de mogelijkheid om zeer selectief en zeer gevoelig meerdere eiwitsequenties te detecteren in één enkele analyse.

Doelen van het project	<p>Het doel van dit TKI was om gerichte LC-MRM-MS methodes te ontwikkelen voor multiplex detectie en kwantificering van meerdere allergenen in diverse levensmiddel producten en grondstoffen. Deze multiplex detectie zal dan dienen als een alternatief voor de huidige procedures waarbij per allergen een aparte ELISA assay moet worden uitgevoerd. LC-MRM-MS is (naar verwachting) meer specifiek dan ELISA, met wellicht vergelijkbare gevoeligheid. Het voordeel van multiplex detectie is kostenbesparing en een effectievere analyse. Voor de ontwikkeling van een multiplex LC-MRM detectie van meerdere allergenen zijn echter talrijke keuzes die moeten worden gemaakt teneinde een robuuste, gevoelige methode met goede reproduceerbaarheid te verkrijgen. In ons project zullen we een aantal van deze optimalisatie stappen doorlopen teneinde een praktisch toepasbare methode op te leveren.</p> <p>Er zijn 14 product groepen die als allergen op voedselproducten moet worden gedeclareerd. Echter, per productgroep zijn er tientallen mogelijke peptide targets die als allergen epitoom kunnen fungeren. Een selectie voor de best detecteerbare peptides sequenties zal per groep worden gemaakt op basis van een reeks van criteria.</p>
------------------------	---

Resultaten	
Beoogde resultaten uit het projectplan	<p>Het ontwikkelen van targeted LC-MS MRM methodes voor detectie van meerdere allergenen tegelijk uit de 13 product groepen waarvoor product labeling is vereist.</p> <p>Een selectie van peptides als targets voor detectie,</p> <p>Het combineren van optimale set van targets in een enkele methode</p> <p>Het meten van allergen in diverse "spiked" voedselmatrices</p> <p>Het testen en optimaliseren van extractie procedures voor het opwerken van voedsel matrix samples.</p>
Behaalde resultaten	<p>De nadruk bij WUR lag op de analyse van diverse noot variëteiten. In totaal zijn monsters van pinda, amandel, cashew, hazelnoot, macadamia, paranoot, pistache, pecannoot en walnoot van marktpartijen / bronnen uit verschillende werelddelen getest, zowel rauw als geroosterd In totaal 27 verschillende noot monsters, ongebrand en gebrand, werden aangeleverd door DeliNuts (Ede, NL). Uit LC-MS DDA analyses konden de meest representatieve en intense peptide piek signalen worden geselecteerd, waarbij de variatie tussen verschillende bronnen van eenzelfde noot in overweging kon worden genomen. Tevens kon het effect van het roosteren van de noot op de eiwit en peptide samenstelling worden bepaald. Vervolgens is een selectie van peptides gemaakt waarvoor een gerichte (targeted) LC-MRM methode werd opgezet.</p> <p>Door een combinatie van de verschillende peptides per noot apart te meten maar ook in de mengsels van de noten kon een verdere selectie worden gemaakt om een combinatiemethode op te zetten waarbij alle noten in 1 meting konden worden bepaald. Verdunningsreeksen van een mengsel van noten in standaard referentie matrix maar ook in koekdeeg (gebakken koekjes) zijn gemaakt. Op basis van deze verdunningsreeksen kon een contaminatie van circa 1 ppm per noot worden gedetecteerd. Echter de reproduceerbaarheid van de metingen werd beperkt door onvoldoende homogeniteit van het "spiked" koek monster.</p> <p>De noodzaak van gebruik van optimaal homogeen referentie materiaal en van representatieve matrix als referentie verdunningsreeks werd hierbij des te meer aangetoond.</p> <p>Bij Nutrilab is parallel aan bovenstaande gewerkt aan het opzetten van targeted MRM methodes op basis van literatuurgegevens die beschikbaar kwamen voor de overige voedselallergenen zoals, ei, melk, soja en garnaal. Daarnaast zijn voor selderij en mosterd selectieve peptide signalen geselecteerd ten behoeve van targeted MRM detectie.</p>

	<p>Verskillende concentraties van deze allergenen zijn gemengd met een standaard matrix en uitgebreid gehomogeniseerd. Deze referentie matrixen zijn vervolgens gebruikt voor verdere testen van extractie en detectie methodes.</p> <p>Een standaard extractie protocol is opgesteld, waarbij monstername en homogeniteit werd geoptimaliseerd. Per type allergeen groep wordt referentie materiaal in standaard matrix, als ook toegevoegd aan het meetmonster meegenomen in de meetreeks om interferentie en matrix effecten op zowel extractie als LC-MS detectie te detecteren.</p> <p>De gevoeligheid en selectiviteit ten opzichte van ELISA detectie is vergeleken.</p>
Geef een toelichting op eventuele wijzigingen t.o.v. het projectplan.	Er waren geen belangrijke wijzigingen in het projectplan.

Wat heeft het project opgeleverd voor	
Betrokken kennis instellingen (wetenschappelijk, nieuwe technologie, samenwerking)	<p>Het project heeft kennis opgeleverd over</p> <ul style="list-style-type: none"> • de diversiteit en onderlinge verhouding van diverse allergene eiwitten in met name de negen belangrijkste noten (inclusief pinda). Het effect van roosteren op de onderlinge intensiteiten van geselecteerde peptides is bepaald. • Het effect van diverse extractie protocollen op de selectiviteit, de effectiviteit en de reproduceerbaarheid van de metingen. • Het uitwerken van de workflow van non-targeted detectie tot combinatie van selectieve peptides van meerdere eiwit bronnen in complexe voedsel matrix achtergrond. • Het belang van zeer uitvoerige homogenisatie van referentie matrixen • De noodzaak van het gebruik van interne respectievelijk "spiked" standaarden als referentie en controle signaal
Betrokken bedrijven (toepassing van resultaten in de praktijk, en op welke termijn?)	<ul style="list-style-type: none"> • Het gebruik van diverse gerichte (targeted) MRM methodes voor de detectie van allergenen in voedselmatrixen • Het belang van zeer uitvoerige homogenisatie van referentie matrixen • De noodzaak van het gebruik van interne respectievelijk "spiked" standaarden als referentie en controle signaal • De targeted MRM detectie wordt momenteel in de praktijk toegepast voor diverse voedsel monsters, en wordt als alternatief of complementair aan ELISA detectie gebruikt.
Maatschappij (sociaal, milieu, economie)	<p>De ontwikkelde methodes zijn een aanvulling op ELISA detectie van allergenen, en vormen een aanzet tot verdere standaardisering, op Europees niveau. Als zodanig zal dit bijdrage aan verdere controle op de voedselveiligheid voor allergenen detectie in de levensmiddelenindustrie.</p> <p>Helaas is het vaststellen van standaarden in referentie materiaal en maximum gehalten van contaminatie een complexe discussie waarbij veel partijen met uiteenlopende belangen betrokken zijn.</p>
Evt. andere stakeholders (spin offs)	

Follow-up	
Is er sprake van een of meer octrooi-aanvragen (first filings) vanuit deze PPS?	nee
Komen er vervolg projecten? Zo ja, geef een toelichting (bv. contractonderzoek dat voortkomt uit dit project, aanvullende subsidies die zijn verkregen, nieuwe PPS)	Title project: Dutch initiative for evaluation and quality assurance of fast methods in food safety testing Nummer: LWV19252 In samenwerking met WFSR te Wageningen

Opgeleverde producten gedurende de gehele looptijd van de PPS (geef de titels en/of omschrijvingen van de producten / deliverables of een link naar de producten op de projectwebsite of andere openbare websites)
<u>Wetenschappelijke artikelen:</u> Er is (nog) geen publicatie van de opgestelde methodes. Dit werd onder andere bemoeilijkt door het uitkomen van zeer vergelijkbare publicaties van een andere groep in het afgelopen jaar.
<u>Externe rapporten:</u>
<u>Artikelen in vakbladen:</u> Allergie en Voedsel, September 2019: Snel en simpel meten wat er in je eten zit https://www.voedselallergie.nl/previews/2019-3/4/index.html
<u>Inleidingen/posters tijdens workshops, congressen en symposia:\</u> Poster en Presentatie op Food Allergy Forum 2019, CASA Amsterdam: https://www.srpfoodallergy.com/wp-content/uploads/2018/12/brochure-FAF2019-1.pdf Presentatie op FHI LabAnalyse, Den Bosch, 7 nov2019: https://fhi.nl/agenda/labanalyse-2019/
<u>TV/ Radio / Social Media / Krant:</u>
<u>Overig (Technieken, apparaten, methodes etc.):</u>