

**DLA**  
Dienstleistung  
Lebensmittel  
Analytik GbR

**Auswertungs-Bericht**  
Laborvergleichsuntersuchung

**01/2016**

**Allergene I:**  
**Ei und Fisch**  
**in Saucenpulver**

Dienstleistung Lebensmittel Analytik GbR  
Waldemar-Bonsels-Weg 170  
22926 Ahrensburg, Germany

[proficiency-testing@dla-lvu.de](mailto:proficiency-testing@dla-lvu.de)    [www.dla-lvu.de](http://www.dla-lvu.de)

Koordinator der LVU:  
Dr. Matthias Besler

## Inhalt

1. Einleitung.....	3
2. Durchführung.....	3
2.1 Untersuchungsmaterial.....	3
2.1.1 Homogenität.....	5
2.2 Untersuchung.....	5
2.3 Ergebnisübermittlung.....	5
3. Auswertung.....	6
3.1 Konsenswert der Teilnehmer (zugewiesener Wert).....	6
3.2 Standardabweichung.....	7
3.3 Ausschluss von Ergebnissen und Ausreißer.....	7
Ausschluss von Ergebnissen .....	7
3.4 Zielstandardabweichung (für die Eignungsbeurteilung).....	7
3.4.1 Allgemeines Modell nach Horwitz.....	7
3.4.2 Auswertung eines Versuchs zur Präzision .....	7
3.4.3 Werte aus Erkenntnissen .....	9
3.5 z-Score.....	10
3.6 Quotient .....	10
3.7 Standardunsicherheit.....	11
3.8 Graphische Darstellung der Bezugswerte.....	11
3.9 Wiederfindungsraten: Dotierung.....	11
4. Ergebnisse.....	12
4.1 Vergleichsuntersuchung Ei.....	14
4.1.1 ELISA-Ergebnisse: Ei (als Volleipulver).....	14
4.1.2 PCR-Ergebnisse: Ei.....	20
4.2 Vergleichsuntersuchung Fisch.....	21
4.2.1 ELISA-Ergebnisse: Fisch (frischer Köhler).....	21
4.2.2 PCR-Ergebnisse: Fisch.....	27
5. Dokumentation.....	29
5.1 ELISA: Ei.....	29
5.2 ELISA: Fisch.....	31
5.3 PCR: Ei (Huhn-DNA).....	33
5.4 PCR: Fisch.....	34
6. Verzeichnis der teilnehmenden Institute in alphabetischer Reihenfolge.....	35
7. Verzeichnis relevanter Literatur.....	36

## 1. Einleitung

Die Teilnahme an Laborvergleichsuntersuchungen (LVU) ist ein unverzichtbarer Baustein für das Qualitäts-Management-System eines jeden, mit der Untersuchung von Lebensmitteln, Futtermitteln, Kosmetik und Bedarfsgegenständen befassten Labors. Die Durchführung von Laborvergleichsuntersuchungen ermöglicht den teilnehmenden Instituten die eigene analytische Kompetenz unter realen Bedingungen nachzuweisen. Gleichzeitig erhalten sie wertvolle Daten zur Validität der durchgeführten Untersuchungsmethode.

Das Ziel von DLA ist es, LVU für ausgesuchte Parameter in praxisrelevanten Konzentrationen und Matrices anzubieten.

Durchführung und Auswertung der vorliegenden Laborvergleichsuntersuchung erfolgten nach den technischen Anforderungen der DIN EN ISO/IEC 17043 (2010) und DIN ISO 13528-2009 bzw. ISO 13528-2015.

## 2. Durchführung

### 2.1 Untersuchungsmaterial

Zur Untersuchung wurden zwei LVU-Proben für den Nachweis von Allergenen im mg/kg-Bereich und eine Dotierungsmaterialprobe zur Verfügung gestellt. Die Dotierungsmaterialprobe enthält die betreffenden allergenen Zutaten im Bereich von 1-10 % und wurde der dotierten LVU-Probe zugesetzt. Die Untersuchungsergebnisse der Dotierungsmaterialprobe sollen im Vergleich zur dotierten LVU-Probe die Möglichkeit geben, die Nachweisbarkeit der Allergene ohne und mit Einfluss der Lebensmittelmatrix bzw. -prozessierung zu charakterisieren.

Bei dem Untersuchungsmaterial handelt es sich um ein handelsübliches Instantsoßen-Pulver. Die Grundzusammensetzung war für beide Proben A und B gleich (s. Tabelle 1). Nach Sieben und Homogenisieren der Grundmischung wurde zur Herstellung von Probe B stufenweise jeweils ein Aliquot der Grundmischung dem Dotierungsmaterial mit den allergenen Zutaten Ei- und Fischpulver zugesetzt.

Die Proben wurden nach dem Homogenisieren zu Portionen von ca. 25 g abgefüllt.

Die Zusammensetzung der Dotierungsmaterialprobe und die Gehalte der allergenen Zutaten in Probe B sind Tabelle 2 zu entnehmen.

Tabelle 1: Zusammensetzung der DLA-Proben

Zutaten	Probe A	Probe B
<b>Bratensauce (Pulver)</b> Zutaten: Stärke, Palmöl, jodiertes Speisesalz, Reismehl, Maltodextrin, Hefeextrakt, Aromen, Tomaten, Karamellzuckersirup, Paprika, Zucker, Knoblauch, Zwiebeln, Pfeffer, Sonnenblumenöl Nährwertangaben pro 100 g: Eiweiß 7,8 g, Kohlenhydrate 52 g, Fett 20 g  Allergen-Hinweis: kann Spuren von Ei, Gluten, Milch und Sellerie enthalten.	100 g/100 g	99,6 g/100 g
Dotierungsmaterialprobe	-	0,36 g/100g

Tabelle 2: Zugesezte Mengen allergener Zutaten

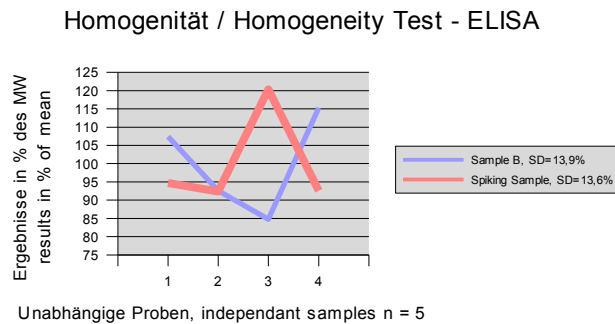
Zutaten	Dotierungsmaterialprobe	Gehalt in Probe B
Kartoffelmehl Nährwertangaben pro 100g: Protein 0 g	94,9 %	0,34 %
<i>Vollei-Pulver</i> Zutaten: Hühnerei (pasteurisiert, sprühgetrocknet) Nährwertangaben pro 100g: Protein > 45 g	21900 mg/kg (= 2,19 %)	78 mg/kg
- davon Protein, gesamt*	10500 mg/kg	38 mg/kg
- davon Eiklarprotein*	5690 mg/kg	20 mg/kg
<i>Fisch-Pulver</i> Zutaten: Köhler ( <i>Pollachius virens</i> ) (gekocht, getrocknet und gemahlen) Nährwertangaben pro 100g: Protein 87 g	28700 mg/kg (= 2,87 %)	103 mg/kg
- davon Fischprotein*	25000 mg/kg	89 mg/kg
umgerechnet auf: - Köhler, frisch ** (Nassgewicht, Muskelgewebe)	144000 mg/kg	514 mg/kg

\* Proteingehalt gemäß Kennzeichnung/Spezifikation/Literatur berechnet

\*\* mit einem Wassergehalt von 80% (Nährwerttabellen, Souci/Fachmann/Kraut)

### 2.1.1 Homogenität

Die Homogenität der dotierten Probe B und der Dotierungsmaterialprobe wurde anhand des Eiklarproteingehalts mittels ELISA-Tests geprüft (s. Abb. 1) und mit einer Standardabweichung zwischen den Proben von < 15% für das verwendete Verfahren als hinreichend gesichert angesehen (17, 18, 20).



**Abb. 1:** Homogenitätsprüfung der DLA-Probe B und Dotierungsmaterialprobe  
Darstellung der Ergebnisse relativ in Prozent des arithmetischen Mittelwerts

## 2.2 Untersuchung

An jedes teilnehmende Institut wurden in der 2. Kalenderwoche 2016 je eine Portion der Untersuchungsmaterialien A und B sowie eine Dotierungsmaterialprobe verschickt. Die Untersuchungsverfahren wurden freigestellt. Die Untersuchungen waren durchzuführen bis spätestens 26. Februar 2016.

## 2.3 Ergebnisübermittlung

Die Ergebnisabgabe erfolgte einheitlich auf, an die teilnehmenden Institute versandten Übermittlungsbögen bzw. -dateien. Zur Auswertung kamen einerseits die Ergebnisse als positiv/negativ Angaben und andererseits angegebene Gehalte an allergenen Zutaten in mg/kg z.B. als Volleipulver bzw. Frischfisch. Die den Positiv-Proben zugesetzte Fisch-Spezies wurde den Teilnehmern im Versandanschreiben mitgeteilt.

Im Zuge der Auswertung wurde darüber hinaus bei einigen Teilnehmern die Art der Angabe der quantitativen Ergebnisse von DLA durch Nachfragen per eMail abgesichert.

Abgefragt und dokumentiert wurden die o.g. Ergebnisse sowie Angaben zu den Testmethoden wie Spezifitäten, Testkit-Hersteller und Stichpunkte zur Durchführung der Methoden.

Falls Teilnehmer mehrere Ergebnisse für denselben Parameter abgegeben haben, die mit unterschiedlichen Methoden erhalten wurden, wurden diese Ergebnisse mit derselben Auswertenummer mit einem Buchstaben als Suffix unter Angabe der jeweiligen Methode ausgewertet.

Ein Teilnehmer hat keine Ergebnisse eingereicht. Alle anderen Teilnehmer haben fristgerecht Ergebnisse abgegeben.

### 3. Auswertung

Verschiedene ELISA-Methoden zur quantitativen Bestimmung von Allergenen in Lebensmitteln können verschiedene Antikörper-Spezifitäten aufweisen, mit unterschiedlichem Referenzmaterial kalibriert worden sein und sich unterschiedlicher Extraktionsverfahren bedienen. Die verschiedenen ELISA-Methoden können daher zu einer unterschiedlichen Bewertung des Gehalts eines Analyten führen (20, 21, 22, 23). Aus diesem Grund werden die Ergebnisse, wenn möglich in der Auswertung verschiedenen Bezugswerten gegenübergestellt.

Dadurch soll jedes einzelne Ergebnis im Vergleich mit dem Mittelwert aller eingesandten Ergebnisse und/oder im Vergleich mit dem Mittelwert der Ergebnisse derselben Methode bewertet werden können. Zum Vergleich mit der rechnerisch zugesetzten Menge wurde das Zusatzniveau in den graphischen Darstellungen der Ergebnisse mit angegeben.

Für quantitative Ergebnisse der Dotierungsmaterialprobe und der dotierten Probe wurden anhand der bekannten Zusammensetzung Wiederfindungsraten berechnet und zur Information angegeben. Hierbei erfolgte keine statistische Auswertung. Die angegebenen Wiederfindungsraten dienen ausschließlich einer Einschätzung von Matrix- und/oder Prozessierungseinflüssen.

Die ELISA- und PCR-Ergebnisse wurden qualitativ anhand des Prozentsatzes positiver bzw. negativer Ergebnisse bewertet. Sofern  $\geq 75$  % positive oder negative Ergebnisse vorlagen, wurde für die betreffende Probe ein Konsens-Ergebnis (positiv oder negativ) festgestellt.

#### 3.1 Konsenswert der Teilnehmer (zugewiesener Wert)

Als zugewiesener Wert (X) für die Auswertung wird der robuste Mittelwert der eingesandten Ergebnisse unter der Annahme einer Normalverteilung verwendet („Konsenswert der Teilnehmer“). Die Berechnung erfolgt nach Algorithmus A gemäß Anhang C der ISO 13528 (6).

Sofern eine Prüfung der Verteilung der eingesandten Ergebnisse u.a. anhand der Kern-Dichte-Schätzung (6, 23) Hinweise für Quellen von höherer Variabilität, wie z.B. eine bimodale Verteilung der Ergebnisse, ergibt, werden Ursachen dafür gesucht. In Frage kommt häufig die Verwendung unterschiedlicher Untersuchungsmethoden. Ist dies der Fall, werden nach Möglichkeit getrennte Auswertungen mit eigenen Bezugswerten  $\xi$  vorgenommen.

Bei den ELISA-Methoden zur Bestimmung von Allergenen wird, wenn möglich, stets so vorgegangen:

- i) **Robuster Mittelwert aller Ergebnisse** -  $X_{ALL}$
- ii) **Robuster Mittelwert von Einzelmethoden** -  $X_{METHOD\ i}$   
mit mindestens 5 quantitativen Ergebnisangaben.

Einzelergebnisse die außerhalb des angegebenen Messbereiches eines teilnehmenden Labors liegen (z.B. mit der Angabe  $> 25$  mg/kg oder  $< 2,5$  mg/kg) oder die Angabe „0“ werden für die statistische Auswertung generell nicht berücksichtigt (6).

### 3.2 Standardabweichung

Zum Vergleich mit der Zielstandardabweichung wird die robuste Standardabweichung ( $S^*$ ) verwendet. Die Berechnung erfolgt nach Algorithmus A gemäß Anhang C der ISO 13528 (6).

Folgende robuste Standardabweichungen werden herangezogen:

- i) **Robuste Standardabweichung aller Ergebnisse** -  $S^*_{ALL}$
- ii) **Robuste Standardabweichung von Einzelmethode** -  $S^*_{METHOD i}$   
mit mindestens 5 quantitativen Ergebnisangaben.

### 3.3 Ausschluss von Ergebnissen und Ausreißer

Ergebnisse können vorab von der statistischen Auswertung ausgeschlossen werden, wenn offensichtliche grobe Fehler, wie z. B. falsche Einheiten, Dezimalstellen oder Angaben für einen falschen Prüfgegenstand vorliegen (1, 6).

Ergebnisse, die mit unterschiedlichen Verfahren erhalten wurden und zu einer erhöhten Variabilität und/oder zu einer bi- oder mehrmodalen Verteilung der Ergebnisse führen, werden separat behandelt oder, wenn dafür zu wenige Ergebnisse vorliegen, ausgeschlossen. Hierfür erfolgt die Prüfung der Ergebnisse anhand der Kern-Dichte-Schätzung (6, 23).

Auf Ausreißer wird mittels robuster Statistik geprüft: Ergebnisse, die um mehr als das Dreifache der robusten Standardabweichung vom robusten Mittelwert abweichen, werden als Ausreißer eingestuft (6). Ermittelte Ausreißer werden informativ genannt sofern gleichzeitig der z-Score des Teilnehmers  $< -2$  oder  $> 2$  ist. Aufgrund der Anwendung der robusten Statistik werden Ausreißer nicht ausgeschlossen, sofern keine anderen Gründe vorliegen (6).

### 3.4 Zielstandardabweichung (für die Eignungsbeurteilung)

Die Zielstandardabweichung des Bezugswertes wird nach unten dargestellten, unterschiedlichen Verfahren bestimmt.

#### *3.4.1 Allgemeines Modell nach Horwitz*

Die relative Zielstandardabweichung in % des Bezugswertes wird i.d.R. nach folgender Gleichung (Horwitz) berechnet

$$\hat{\sigma}_{(\%) } = 2^{(1-0,51\log X)}$$

hieraus wird die Zielstandardabweichung in mg/kg berechnet

$$\hat{\sigma} = X * \hat{\sigma}_{(\%) } / 100.$$

Die Zielstandardabweichung nach Horwitz wird z.Z. in der Praxis von ELISA-Verfahren mit Messwerten im mg/kg Bereich nur in Ausnahmefällen erreicht.

### 3.4.2 Auswertung eines Versuchs zur Präzision

Aus der Vergleichsstandardabweichung  $\sigma_R$  und der Wiederholstandardabweichung  $\sigma_r$  eines Versuchs zur Präzision einer Methode (z.B. aus Ringversuchen nach ASU §64 LFGB) wird die Standardabweichung zwischen Laboratorien  $\sigma_L$  berechnet:

$$\sigma_L = \sqrt{(\sigma_R^2 - \sigma_r^2)} .$$

Aus den obigen Größen und der Anzahl der Wiederholmessungen  $n$  der laufenden Vergleichsuntersuchung wird nun die Zielstandardabweichung berechnet:

$$\hat{\sigma} = \sqrt{(\sigma_L^2 + (\sigma_r^2/n))} .$$

Da in der vorliegenden Vergleichsuntersuchung die Anzahl der Wiederholmessungen  $n = 1$  ist, ist die Vergleichsstandardabweichung  $\sigma_R$  gleich der Zielstandardabweichung  $\hat{\sigma}$ .

Nachstehend sind die relativen Vergleichsstandardabweichungen aus Ringversuchen einiger ELISA-Methoden nach ASU §64 angegeben (24, 25, 26):

Methoden	Parameter	Matrix	Mittelwerte	Relative $\sigma_R$	Literatur
ELISA	Sojaprotein	Brühwurst	0,36 - 4,07%	14 - 28%	L 06.00-56
ELISA (Herst. A)	Erdnuss	Vollmilchschokolade	5,9 - 174 mg/kg	20 - 31%	L 00.00-69
ELISA (Herst. B)	Erdnuss	Vollmilchschokolade	10,1 - 216 mg/kg	14 - 32%	L 00.00-69
ELISA (Herst. A)	Erdnuss	Feinherbschokolade	5,7 - 148 mg/kg	22 - 33%	L 00.00-69
ELISA (Herst. A)	Haselnuss	Feinherbschokolade	1,6 - 16,3 mg/kg	12 - 33%	L 44.00-7
ELISA (Herst. A)	Haselnuss	Feinherbschokolade	2,4 - 21,3 mg/kg	14 - 19%	L 44.00-7

Aus den o.g. Präzisionsdaten der ASU §64 Methoden ergeben sich relative Zielstandardabweichungen im Bereich von 12 - 33%.

Das IRMM (Institute for Reference Materials and Measurements) hat in einem Ringversuch die Eignung fünf verschiedener ELISA-Test-Kits zur Bestimmung von Erdnuss getestet (22). Die Mittelwerte lagen im Konzentrationsbereich von 0,3 - 16,1 mg/kg bzw. 1,2 - 20,4 mg/kg. Die jeweils niedrigsten relativen Vergleichsstandardabweichungen der fünf Test-Kits lagen für die Matrix Bitterschokolade bei 20 - 42% und für Kekse bei 23 - 61%.



### 3.4.3 Werte aus Erkenntnissen

Die Zielstandardabweichung kann für die Eignungsbeurteilung auf einen Wert festgesetzt werden, der dem Leistungsfähigkeitsniveau entspricht, das der Koordinator für ein wünschenswertes Ziel für die teilnehmenden Laboratorien hält (6).

Anforderungen an die Leistungsfähigkeit der Analysemethoden zur quantitativen Bestimmung von Allergenen in Lebensmitteln sind u.a. vom Ministry of Health and Welfare (MHLW) in Japan (17), von der Arbeitsgruppe 12 „Lebensmittelallergene“ des Technischen Komitees CEN/TC 275 (14 - 16), von einer internationalen "Food Allergen Working Group" unter der Leitung der AOAC Presidential Task Force on Food Allergens (18) und vom Codex Alimentarius Committee (CAC/GL 74-2010) (13) erarbeitet worden.

Die hier relevanten ELISA- bzw. PCR-Validierungskriterien der Gremien sind in den Tabellen 3 und 4 angegeben.

Tabelle 3: ELISA-Validierungskriterien

Literatur (17, 18, 20)	Wiederfindungsrate	Wiederholstandard- abweichung	Vergleichsstandard- abweichung
MHLW 2006	50 - 150%		≤ 25%
CEN 2009		≤ 20%	
AOAC 2010	50 - 150%	6,9 - 34,4% <sup>(a)</sup>	19,5 - 57,2 <sup>(a)</sup>
CAC 2010	70 - 120%	≤ 25%	≤ 35%

(a) = Beispiel aus hypothetischem Ringversuch im Konzentrationsbereich von 0,5 - 5 mg/kg

Tabelle 4: PCR-Validierungskriterien

Literatur (21)	Wiederfindungsrate	Wiederholstandard- abweichung	Vergleichsstandard- abweichung
CAC 2010	± 25% <sup>(a)</sup>	≤ 25%	≤ 35%

(a) = Trueness / Richtigkeit

Aufgrund der derzeitigen Leistungsfähigkeiten von ELISA- bzw. PCR-Methoden zur quantitativen Bestimmung von Allergenen in Lebensmitteln, die sich aus den Präzisionsdaten von Versuchen und aus den o.g. Validierungsanforderungen ableiten lassen, legen wir für die relative Zielstandardabweichung  $\hat{\sigma}$  einen Wert von 25% fest.

Diese Zielstandardabweichung wurde zur statistischen Bewertung der Ergebnisse mittels z-Score herangezogen und auf alle unter 3.1 angegebenen Bezugswerte angewandt.

### 3.5 z-Score

Der z-Score wird herangezogen zur Beurteilung der Ergebnisse der teilnehmenden Laboratorien. Er besagt um welches Vielfache der Zielstandardabweichung ( $\hat{\sigma}$ ) das Ergebnis (x) des betreffenden teilnehmenden Instituts vom Bezugswert (X) abweicht (6).

Die Berechnung erfolgt nach

$$z = (x - X) / \hat{\sigma} ;$$

die Anforderungen an die Analytik gelten im Allgemeinen als erfüllt, wenn

$$-2 \leq z \leq 2 .$$

Zur Bewertung wurden nachstehende z-Scores mit einer Zielstandardabweichung von 25% in der Auswertung angegeben:

- i) **z-Score** -  $Z_{ALL}$  (bezogen auf alle Ergebnisse)
- ii) **z-Score** -  $Z_{METHOD i}$  (bezogen auf Einzelmethoden)

#### 3.5.1 Warn- und Eingriffssignale

Gemäß der ISO-Norm 13528 für statistische Verfahren für Eignungsprüfungen wird empfohlen, dass ein Ergebnis, das einen z-Wert  $> 3,0$  oder  $< -3,0$  ergibt, als „Eingriffssignal“ zu werten ist (6). Gleichermaßen ist ein z-Wert  $> 2,0$  oder  $< -2,0$  als „Warnsignal“ zu beurteilen. Ein einzelnes „Eingriffssignal“ oder aber „Warnsignale“ bei zwei aufeinander folgenden LVU-Runden sind als Beleg dafür zu werten, dass eine Anomalie aufgetreten ist, die untersucht werden muss. Eine Fehler- bzw. Ursachenanalyse kann durch Prüfung des Analysenablaufs inkl. Verständnis und Umsetzung der Messung durch das Personal, Einzelheiten des Messablaufs, Kalibrierung von Geräten und Zusammensetzung von Reagenzien, Übertragungs- bzw. Berechnungsfehler, Richtigkeit und Präzision sowie Einsatz von Referenzmaterial durchgeführt werden. Falls notwendig, muss auf die Probleme durch angemessene Korrekturmaßnahmen reagiert werden (6).

DLA stellt in den z-Score-Abbildungen die Grenzen für die Warn- und Eingriffssignale als gelbe bzw. rote Linien dar. Die jeweiligen Werte haben gemäß ISO 13528:2009 nur Gültigkeit sofern  $\geq 10$  Ergebnisse vorliegen (6).

### 3.6 Quotient $S^x/\hat{\sigma}$

In Anlehnung an den Horrat-Wert kann die Bewertung einer Laborvergleichsuntersuchung als aussagekräftig gelten, wenn der Quotient von robuster Standardabweichung und Zielstandardabweichung nicht über 2 liegt. Ein über 2 liegender Wert bedeutet, dass die Präzision nicht zufriedenstellend ist, d.h., dass die Präzision aus analytischen Gründen zu variabel ist oder die festgestellte Variation höher ist als für die angewandte Methode geschätzt wurde. Somit ist eine Vergleichbarkeit der Messergebnisse nicht gewährleistet (11).

### 3.7 Standardunsicherheit des zugewiesenen Werts

Jeder Bezugswert (zugewiesener Wert) ist mit einer Standardunsicherheit behaftet, die von der Analysenmethode, Unterschieden der eingesetzten Analysenmethoden, dem Probenmaterial und der Anzahl der Teilnehmer (P) einer LVU beeinflusst wird. Die Standardunsicherheit ( $u_x$ ) wird für die vorliegende LVU wie folgt berechnet (6).

$$u_x = 1,25 * S^x / \sqrt{(p)}$$

Ist  $u_x \leq 0,3 * \hat{\sigma}$  muss die Standardunsicherheit des Bezugswertes nicht berücksichtigt werden (6).

### 3.8 Graphische Darstellung der Bezugswerte

Die Bezugswerte (zugewiesene Werte und Zusatzniveau) werden als farbige Linien in den Abbildungen der Ergebnisse dargestellt. Dies ermöglicht einen optischen Vergleich der Einzelergebnisse mit den verschiedenen Bezugswerten für das Zusatzniveau eines Analyten einerseits und die robusten Mittelwerte über alle Methoden bzw. über Einzelmethoden andererseits.

### 3.9 Wiederfindungsraten: Dotierung

Für die Ergebnisse von Dotierungsmaterialprobe und dotierter Probe werden Wiederfindungsraten in Bezug auf die zugesetzten Allergene (Zusatzniveau) berechnet. Die Bezugswerte ergeben sich aus den unter 2.1 Untersuchungsmaterial in Tabelle 1 angegebenen Gehalten. Als Akzeptanzbereich AB für die Bewertung der Teilnehmerergebnisse wird der von der AOAC vorgeschlagene Bereich von 50 - 150% für die Wiederfindungsraten von Allergen-ELISAs herangezogen (18). Für quantitative PCR-Bestimmungen wird ebenfalls dieser Akzeptanzbereich herangezogen.

## 4. Ergebnisse

Alle folgenden Tabellen sind anonymisiert. Den teilnehmenden Laboratorien wird mit dem Versand dieser Auswertung ihre individuelle Auswertenummer mitgeteilt.

Die folgenden Ergebnisseiten sind für die allergenen Bestandteile jeweils gleich aufgebaut. Es werden zunächst die Ergebnisse aller Methoden zu einem Parameter für die Probe A und dann für die Probe B angegeben. Die Ergebnisse der Dotierungsmaterialprobe werden zusammen mit der jeweiligen dotierten Probe behandelt.

Um die **Vergleichbarkeit von quantitativen Ergebnissen** zu gewährleisten, wurden Teilnehmerergebnisse mit unterschiedlichen Angaben (z.B. als Protein oder allergenes Lebensmittel) soweit möglich von DLA harmonisiert.

ELISA-Ergebnisse, die als Eiklarproteine oder Eiprotein (Eiklar- und Eigelbproteine) angegeben wurden, sind in Volleipulver umgerechnet worden. Sofern angegeben wurden die Vorgaben des betreffenden Testkit-Herstellers berücksichtigt. Es wurde ein Anteil von 26,0 % Eiklarproteine in Volleipulver und ein Anteil von 48,1 % Eiproteine in Volleipulver zugrunde gelegt.

ELISA-Ergebnisse, die als Kabeljau (bzw. Fisch allgemein) angegeben wurden (Testkit AgraQuant), sind mit dem entsprechenden Umrechnungsfaktor für Köhler (Coalfish) von 3,2 multipliziert worden.

Für die Berechnung der Wiederfindungsraten wurde der Zusatz von Fischpulver in Frischfisch (Nassgewichte) umgerechnet. Dabei wurde ein Wassergehalt von 80 % zugrunde gelegt (Souci/Fachmann/Kraut Nährwerttabellen).

Die Auswertung erfolgte getrennt nach ELISA und PCR-Ergebnissen. Die Ergebnisse wurden nach durchgeführten Methoden zusammengefasst und die Auswertenummern innerhalb der Gruppen aufsteigend sortiert.

Qualitativ werden die Ergebnisse anhand des Prozentsatzes positiver bzw. negativer Ergebnisse bewertet. Sofern  $\geq 75$  % positive oder negative Ergebnisse vorlagen, wurde für die betreffende Probe ein Konsens-Ergebnis (positiv oder negativ) festgestellt. Für jeden Teilnehmer wird in Bezug auf die Konsens-Ergebnisse eine qualitative Bewertung vorgenommen. Hier wurde die Übereinstimmung mit den Konsens-Werten in Prozent angegeben.

Gegebenenfalls werden anschließend die Ergebnisse aller Methoden und von Einzelmethoden mit mindestens 5 quantitativen Ergebnissen statistisch ausgewertet.

In den Fällen, in denen eine statistische Auswertung der quantitativen Messergebnisse durchgeführt wurde, werden die Ergebnisse tabellarisch folgendermaßen aufgeführt :

Auswertenummer	Ergebnis	Ergebnis	z-Score $X_{ALL}$	z-Score $X_{M i}$	Methode	Hinweis
	pos/neg	[mg/kg]	X All	X Method i		

Die Kenndaten der jeweiligen Vergleichsuntersuchung werden aufgeführt, falls wenigstens 50% positive Ergebnisangaben und mindestens 5 quantitative Messergebnisse vorliegen:

Kenndaten	Alle Ergebnisse [mg/kg]	Methode i [mg/kg]
Bezugswert (X)	$X_{ALL}$	$X_{Method i}$
Anzahl der berücksichtigten Messergebnisse		
Robuster Mittelwert (X)		
Robuste Standardabweichung ( $S^*$ )		
Median		
Zielkenndaten:		
Zielstandardabweichung ( $\hat{\sigma}$ )		
untere Grenze des Zielbereichs ( $X - 2 \hat{\sigma}$ )		
obere Grenze des Zielbereichs ( $X + 2 \hat{\sigma}$ )		
Quotient $S^*/\hat{\sigma}$		
Standardunsicherheit $u_x$		
Quotient $u_x/\hat{\sigma}$		
Anzahl der Ergebnisse im Zielbereich		

Im Anschluss erfolgt die Darstellung der Wiederfindungsraten für die Ergebnisse von Dotierungsmaterialprobe und dotierter Probe. Die Anzahl der Ergebnisse im Akzeptanzbereich von 50-150% wird aufsummiert.

## 4.1 Vergleichsuntersuchung Ei

### 4.1.1 ELISA-Ergebnisse: Ei (als Volleipulver)

#### Qualitative Auswertung der Ergebnisse: Proben A und B

Auswertenummer	Probe A	Probe A	Probe B	Probe B	Qualitative Bewertung	Methode	Hinweis
	pos/neg	[mg/kg]	pos/neg	[mg/kg]	Übereinstimmungen mit Konsenswerten		
1	negativ		positiv	123	2/2 (100%)	AQ	Ergebnis umgerechnet *
4	negativ	< 1,5	positiv	102	2/2 (100%)	AQ	Ergebnis umgerechnet *
9	negativ	< 0,39	positiv	119	2/2 (100%)	BK	
10	negativ	< 1,9	positiv	105	2/2 (100%)	BK	Ergebnis umgerechnet *
16	negativ		positiv		2/2 (100%)	ES	
18	negativ	< 1,5	positiv	92	2/2 (100%)	IL	Ergebnis umgerechnet *
7	negativ	< 0,7	positiv	77	2/2 (100%)	MR	
8	negativ	< 0,6	positiv	81,3	2/2 (100%)	MR	Ergebnis umgerechnet *
11	negativ	nd	positiv	96	2/2 (100%)	MR	Ergebnis umgerechnet *
2	negativ	< 0,5	positiv	86,5	2/2 (100%)	RS	
3	negativ	< 0,19	positiv	>127	2/2 (100%)	RS	Ergebnis umgerechnet *
5	negativ	< 0,5	positiv	62,9	2/2 (100%)	RS	Mittelwert von DLA berechnet
6	negativ	< 0,5	positiv	<50	2/2 (100%)	RS	
12	negativ	< 0,5	positiv	79	2/2 (100%)	RS	
13	negativ		positiv	89,5	2/2 (100%)	RS	
14	negativ	< 0,5	positiv	120	2/2 (100%)	RS	
17	negativ		positiv	>3,6	2/2 (100%)	RS	

\* Umrechnung s. S. 12

	Probe A	Probe B
Anzahl positiv	0	17
Anzahl negativ	17	0
Prozent positiv	0	100
Prozent negativ	100	0
Konsenswert	negativ	positiv

#### Methoden:

AQ = AgraQuant, RomerLabs  
 BK = BioKits, Neogen  
 ES = ELISA Systems

IL = Immunolab  
 MR = Morinaga  
 RS = Ridascreen®, R-Biopharm

#### Anmerkung:

Es wurden zum Nachweis von Hühnerei mittels ELISA zu 100% negative Ergebnisse für Probe A und zu 100% positive Ergebnisse für Probe B erhalten. Die Konsenswerte stehen somit in qualitativer Übereinstimmung mit der Dotierung von Probe B.

**Quantitative Auswertung der Ergebnisse: Probe B**

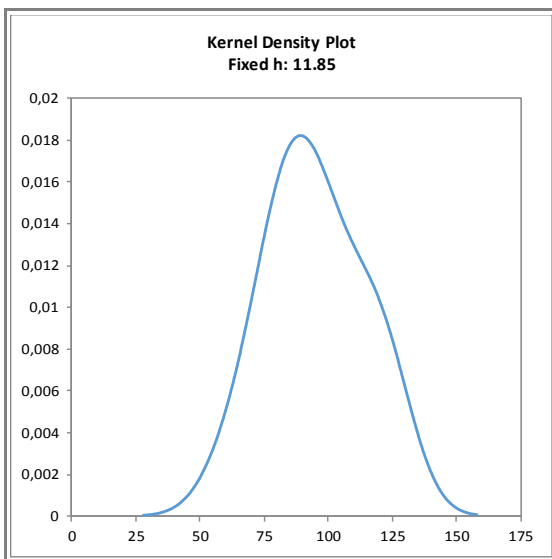
Auswertenummer	Volleipulver	z-Score $X_{ALL}$	z-Score $X_{RS}$	Methode	Hinweis
	[mg/kg]	Bezug $X_{ALL}$	$X_{Methode RS}$		
1	123	1,2		AQ	Ergebnis umgerechnet *
4	102	0,3		AQ	Ergebnis umgerechnet *
9	119	1,0		BK	
10	105	0,4		BK	Ergebnis umgerechnet *
16				ES	
18	92	-0,1		IL	Ergebnis umgerechnet *
7	77	-0,8		MR	
8	81,3	-0,6		MR	Ergebnis umgerechnet *
11	96	0,0		MR	Ergebnis umgerechnet *
2	86,5	-0,4	0,0	RS	
3	>127			RS	Ergebnis umgerechnet *
5	62,9	-1,4	-1,1	RS	Mittelwert von DLA berechnet
6	<50			RS	
12	79	-0,7	-0,4	RS	
13	89,5	-0,2	0,1	RS	
14	120	1,1	1,5	RS	
17	>3,6			RS	

\* Umrechnung s. S. 12

**Methoden:**

AQ = AgraQuant, RomerLabs  
 BK = BioKits, Neogen  
 ES = ELISA Systems

IL = Immunolab  
 MR = Morinaga  
 RS = Ridascreen®, R-Biopharm



**Abb. 2:** Kerndichte-Schätzung aller ELISA-Ergebnisse  $E_i$  (mit  $h = 0,5 \times \hat{\sigma}$  von  $X_{ALL}$ )

Kenndaten: Quantitative Auswertung Ei (als Volleipulver)

**Probe B**

<b>Kenndaten</b>	<b>Alle Ergebnisse</b> [mg/kg]	<b>Methode RS</b> [mg/kg]
Bezugswert (X)	$\mathbf{X}_{ALL}$	$\mathbf{X}_{Methode\ RS}$
Anzahl der berücksichtigten Messergebnisse	13	5
Robuster Mittelwert (X)	94,9	87,6
Robuste Standardabweichung (S <sup>x</sup> )	20,6	21,9
Median	92,0	86,5
<b>Zielkenndaten:</b>		
Zielstandardabweichung ( $\hat{\sigma}$ )	23,7	21,9
untere Grenze des Zielbereichs	47,5	43,8
obere Grenze des Zielbereichs	142	131
Quotient $S^x/\hat{\sigma}$	0,87	1,1
Standardunsicherheit $u_x$	7,16	13,2
Quotient $u_x/\hat{\sigma}$	0,30	0,60
Anzahl der Ergebnisse im Zielbereich	13 (100%)	5 (100%)

**Methode:**

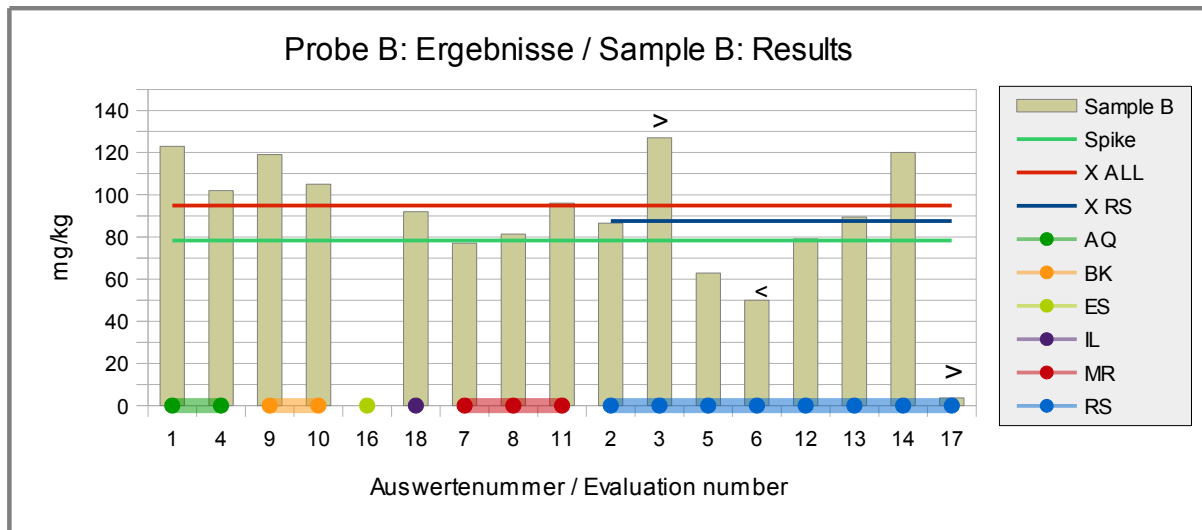
RS = R-Biopharm, Ridascreen Fast®

Anmerkungen zu den Kenndaten und Vergleich der Bezugswerte:

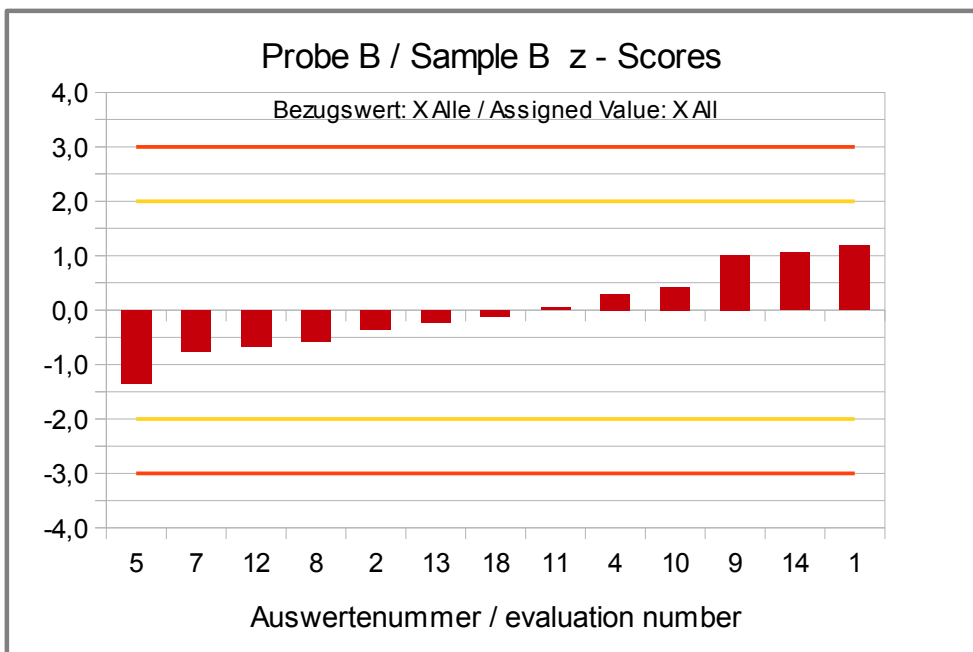
Die Auswertungen der Ergebnisse aller Methoden und von Methode RS zeigten eine geringe Variabilität der Ergebnisse. Der Quotient  $S^x/\hat{\sigma}$  lag deutlich unter 2,0. Die robuste Standardabweichung liegt im Bereich von etablierten Werten für die Vergleichsstandardabweichung der eingesetzten Bestimmungsmethoden (vgl. 3.4.2 Auswertung eines Versuchs zur Präzision und 3.4.3 Werte aus Erkenntnissen). Die Vergleichbarkeit der Ergebnisse ist gegeben.

Die robusten Mittelwerte der Auswertungen lagen mit 122% und 112% etwas über dem Zusatzniveau von Volleipulver zu Probe B, aber innerhalb der relevanten Anforderungen für die eingesetzten Methoden (s. 3.4.3 und "Wiederfindungsraten für Ei" S.19).

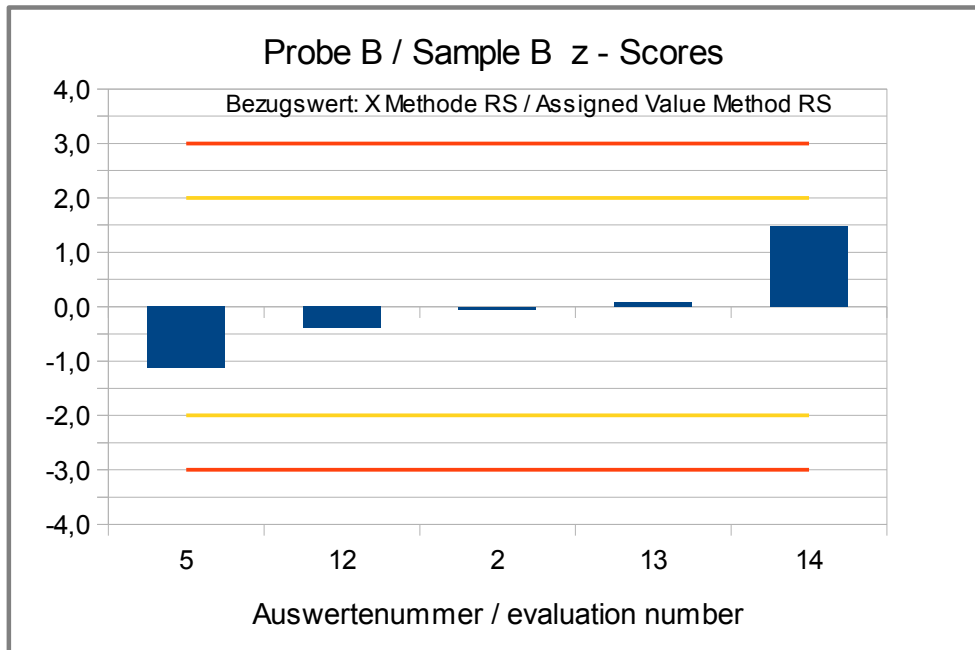




**Abb. 3:** ELISA-Ergebnisse Ei (als Volleipulver)  
 grüne Linie = Zusatzniveau  
 rote Linie = Bezugswert robuster Mittelwert aller Ergebnisse  
 blaue Linie = Bezugswert robuster Mittelwert Ergebnisse Methode RS  
 runde Symbole = Zuordnung der Methoden (s. Legende)



**Abb. 4:** z-Scores (ELISA-Ergebnisse als Volleipulver)  
 Bezugswert robuster Mittelwert aller Ergebnisse



**Abb. 5:** z-Scores (ELISA-Ergebnisse als Volleipulver)  
 Bezugswert robuster Mittelwert Ergebnisse Methode RS  
 (R-Biopharm, Ridascreen Fast)

**Wiederfindungsraten für Ei (als Volleipulver):  
Dotierungsmaterialprobe und Probe B**

Auswertenummer	Dotierungsmaterial	Wiederfindungsrate	Probe B	Wiederfindungsrate	Methode	Hinweis
	[mg/kg]	[%]	[mg/kg]	[%]		
1	27800	127	123	157	AQ	Ergebnis umgerechnet *
4	28000	128	102	130	AQ	Ergebnis umgerechnet *
9	12510	57	119	152	BK	
10	31700	145	105	134	BK	Ergebnis umgerechnet *
16					ES	
18	29200	133	92	117	IL	Ergebnis umgerechnet *
7			77	98	MR	
8	na		81,3	104	MR	Ergebnis umgerechnet *
11	27200	124	96	123	MR	Ergebnis umgerechnet *
2	24447	112	86,5	110	RS	
3	>127		> 127		RS	Ergebnis umgerechnet *
5	14627	67	62,9	80	RS	Mittelwert von DLA berechnet
6	2567,5	12	< 50		RS	
12	21500	98	79	101	RS	
13	27535	126	89,5	114	RS	
14	38000	174	120	153	RS	
17			> 3,6		RS	

\* Umrechnung s. S. 12

AB*	50-150 %	AB*	50-150 %
Anzahl im AB	10	Anzahl im AB	10
Prozent im AB	83	Prozent im AB	77

\* Akzeptanzbereich der AOAC für Allergen-ELISAs

Wiederfindungsrate  
100% Bezugsgröße:  
Volleipulver, s. Seite 4

**Methoden:**

AQ = AgraQuant, RomerLabs  
BK = BioKits, Neogen  
ES = ELISA Systems

IL = Immunolab  
MR = Morinaga  
RS = Ridascreen®, R-Biopharm

Anmerkung:

83% der Teilnehmer haben in der Dotierungsmaterialprobe mittels ELISA eine Wiederfindungsrate im Bereich der AOAC-Anforderung von 50-150% erhalten. Bei der mit dem Dotierungsmaterial hergestellten Saucenpulver-Probe B lagen 77% der Wiederfindungsraten in diesem Akzeptanzbereich.

**4.1.2 PCR-Ergebnisse: Ei**

Auswertenummer	Probe A	Probe A	Probe B	Probe B	Qualitative Bewertung	Methode	Hinweis
	pos/neg	[mg/kg]	pos/neg	[mg/kg]	Übereinstimmungen mit Konsenswerten		
15	negativ		negativ			div	Nachweisgrenze 0,1%

**Methoden:**

div = keine genaue Angabe / andere Methode

**Anmerkung:**

Zum Nachweis von Huhn-DNA mittels PCR wurde jeweils ein negatives Ergebnis für die Proben A und B erhalten. Für die Dotierungsmaterialprobe wurde ein positives Ergebnis erhalten (s. Dokumentation).

**Quantitative Auswertung der Ergebnisse: Probe B**

Eine Auswertung der quantitativen Ergebnisse erfolgte nicht, weil zu wenige Ergebnisse vorlagen.

**Wiederfindungsraten für Ei: Dotierungsmaterialprobe und Probe B**

Eine Berechnung der Wiederfindungsraten konnte nicht vorgenommen werden, weil keine quantitativen Ergebnisse vorlagen.

## 4.2 Vergleichsuntersuchung Fisch

### 4.2.1 ELISA-Ergebnisse: Fisch (frischer Köhler)

#### Qualitative Auswertung der Ergebnisse: Proben A und B

Auswertenummer	Probe A	Probe A	Probe B	Probe B	Qualitative Bewertung	Methode	Hinweis
	pos/neg	[mg/kg]	pos/neg	[mg/kg]	Übereinstimmungen mit Konsenswerten		
2	negativ	< 12,8	positiv	85,1	2/2 (100%)	AQ	
4	negativ	< 12,8	positiv	70,7	2/2 (100%)	AQ	Ergebnis umgerechnet *
5a	negativ	< 12,8	positiv	84,43	2/2 (100%)	AQ	
7			positiv	79,7	1/2 (50%)	AQ	Ergebnis umgerechnet *
8	negativ	< 12,8	positiv	65,6	2/2 (100%)	AQ	Ergebnis umgerechnet *
11	negativ		positiv	70,4	2/2 (100%)	AQ	Ergebnis umgerechnet *
5b	negativ	< 13,55	positiv	15,11	2/2 (100%)	BC	
10	negativ	< 5	positiv	8,7	2/2 (100%)	BC	Fischart nicht angegeben
18	negativ	< 6,4	positiv	64	2/2 (100%)	IL	

\* Umrechnung s. S. 12

	Probe A		Probe B	
Anzahl positiv	0		9	
Anzahl negativ	8		0	
Prozent positiv	0		100	
Prozent negativ	100		0	
Konsenswert	negativ		positiv	

#### Methoden:

AQ = AgraQuant, RomerLabs  
BC = Bio-check, imutest ELISA

IL = Immunolab

#### Anmerkung:

Es wurden zum Nachweis von Fisch mittels ELISA zu 100% negative Ergebnisse für Probe A und zu 100% positive Ergebnisse für Probe B erhalten. Die Konsenswerte stehen somit in qualitativer Übereinstimmung mit der Dotierung von Probe B.

**Quantitative Auswertung der Ergebnisse: Probe B**

Auswertenummer	Köhler, frisch	z-Score $X_{ALL}$	z-Score $X_{AQ}$	Methode	Hinweis
	[mg/kg]	Bezug $X_{ALL}$	$X_{Methode\ AQ}$		
2	85,1	0,6	0,5	AQ	
4	70,7	-0,2	-0,3	AQ	Ergebnis umgerechnet *
5a	84,43	0,5	0,4	AQ	
7	79,7	0,3	0,2	AQ	Ergebnis umgerechnet *
8	65,6	-0,5	-0,5	AQ	Ergebnis umgerechnet *
11	70,4	-0,2	-0,3	AQ	Ergebnis umgerechnet *
5b	15,11			BC	**
10	8,7			BC	** , Fischart nicht angegeben
18	64	-0,6		IL	

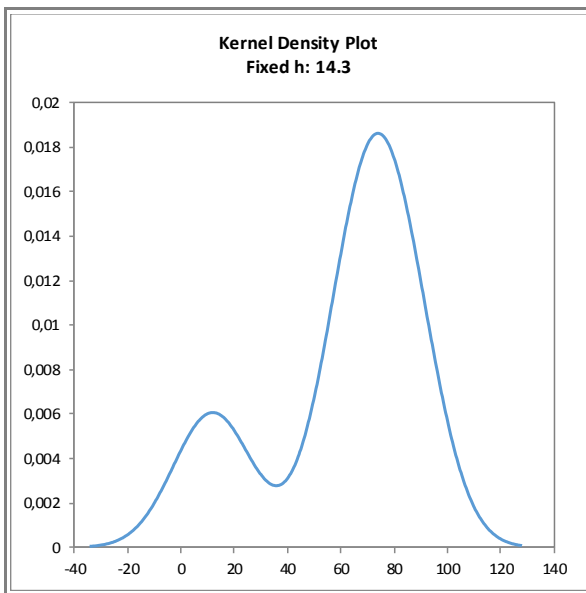
\* Umrechnung s. S. 12

\*\* BC Ergebnisse nicht berücksichtigt

**Methoden :**

AQ = AgraQuant, RomerLabs  
 BC = Bio-check, imutest ELISA

IL = Immunolab



**Abb. 6:** Kerndichte-Schätzung aller ELISA-Ergebnisse Fisch (mit  $h = 0,5 \times \hat{\sigma}$  von  $X_{ALL}$ )

Anmerkung:

Für die statistische Auswertung wurden die Ergebnisse der Methode BC ausgeschlossen, da sie eine bimodale Verteilung der Ergebnisse verursachen (s. Abb. 6).

Kenndaten: Quantitative Auswertung Fisch (als frischer Köhler)

**Probe B**

<b>Kenndaten</b>	<b>Alle Ergebnisse</b> [mg/kg]	<b>Methode AQ</b> [mg/kg]
Bezugswert (X)	$\mathbf{X}_{ALL}$	$\mathbf{X}_{Methode\ AQ}$
Anzahl der berücksichtigten Messergebnisse	7 *	6
Robuster Mittelwert (X)	74,3	76,0
Robuste Standardabweichung (S <sup>x</sup> )	9,91	9,29
Median	70,7	75,2
<b>Zielkenndaten:</b>		
Zielstandardabweichung ( $\hat{\sigma}$ )	18,6	19,0
untere Grenze des Zielbereichs	37,1	38,0
obere Grenze des Zielbereichs	111	114
Quotient $S^x/\hat{\sigma}$	0,53	0,49
Standardunsicherheit $u_x$	4,68	4,74
Quotient $u_x/\hat{\sigma}$	0,25	0,25
Anzahl der Ergebnisse im Zielbereich	7 (100%)	6 (100%)

\* die Ergebnisse der Methode BC wurden nicht berücksichtigt

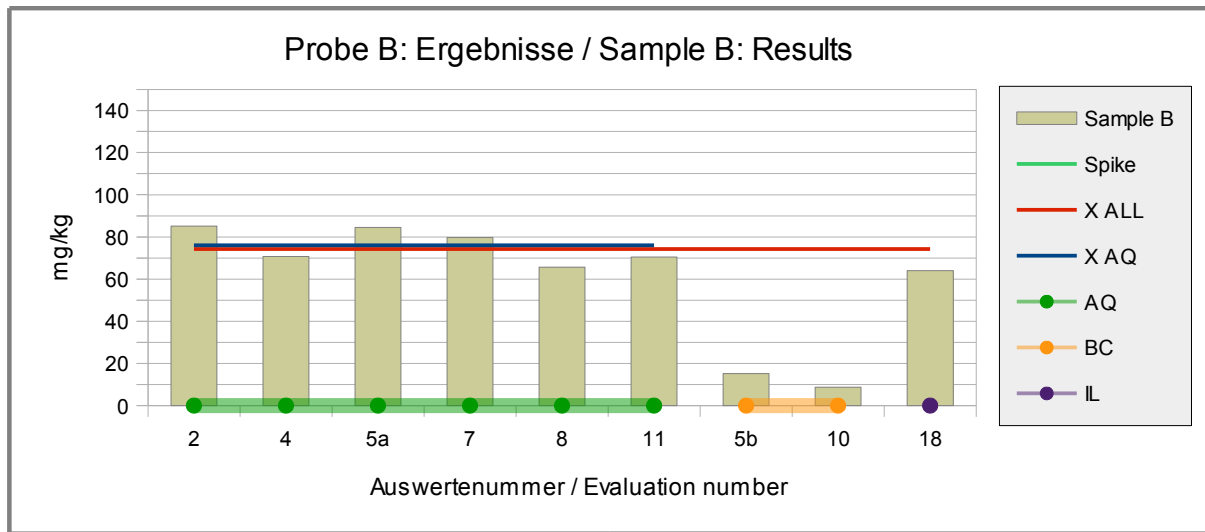
**Methode:**

AQ = AgraQuant, RomerLabs

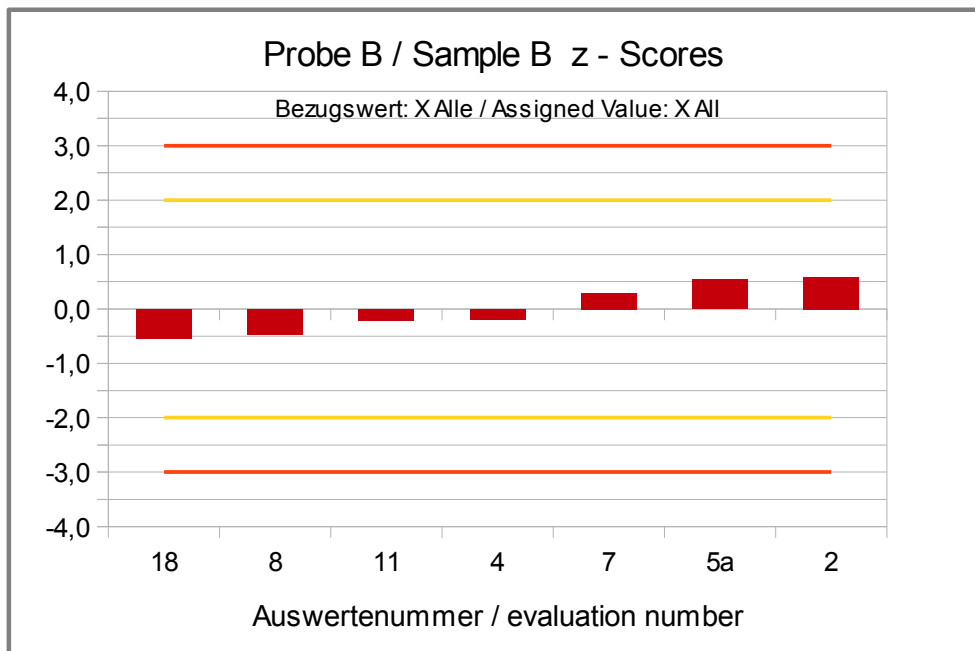
Anmerkungen zu den Kenndaten und Vergleich der Bezugswerte:

Die Auswertungen der Ergebnisse aller Methoden und von Methode AQ zeigten eine geringe Variabilität der Ergebnisse. Der Quotient  $S^x/\hat{\sigma}$  lag deutlich unter 2,0. Die robuste Standardabweichung liegt im Bereich von etablierten Werten für die Vergleichsstandardabweichung der eingesetzten Bestimmungsmethoden (vgl. 3.4.2 Auswertung eines Versuchs zur Präzision und 3.4.3 Werte aus Erkenntnissen). Die Vergleichbarkeit der Ergebnisse ist gegeben.

Die robusten Mittelwerte der Auswertungen lagen mit jeweils ca. 15% deutlich unter dem Zusatzniveau von Fisch zu Probe B und erfüllen nicht die relevanten Anforderungen für die eingesetzten Methoden. Hier ist zu berücksichtigen, dass die ELISA-Ergebnisse als Frischfisch (Köhler) berechnet wurden. Zugewetzt wurde aber Fischpulver, das auf Grund der Prozessierung ggf. zu einem geringeren Prozentsatz detektiert wird. Geeignete Umrechnungsfaktoren, wie von einigen Testkit-Herstellern angegeben, könnten zur Verbesserung der Ergebnisse führen (s. 3.4.3 und "Wiederfindungsraten für Fisch" S.26).

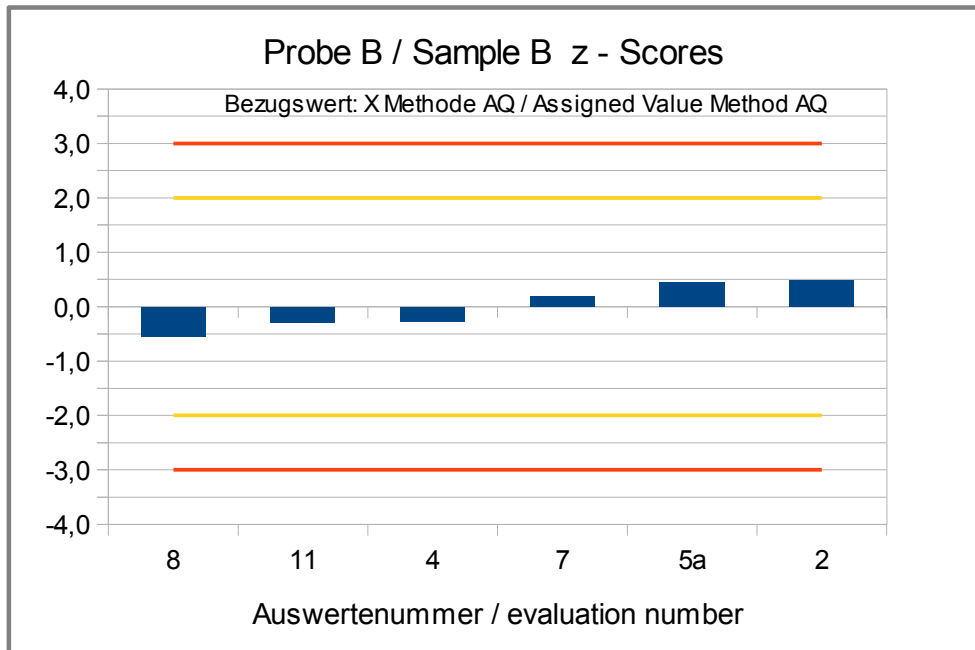


**Abb. 7:** ELISA-Ergebnisse Fisch (als frischer Köhler)  
 grüne Linie = Zusatzniveau (514 mg/kg, nicht dargestellt)  
 rote Linie = Bezugswert robuster Mittelwert aller Ergebnisse  
 blaue Linie = Bezugswert robuster Mittelwert Ergebnisse Methode AQ  
 runde Symbole = Zuordnung der Methoden (s. Legende)



**Abb. 8:** z-Scores (ELISA-Ergebnisse als frischer Köhler) Probe B  
 Bezugswert robuster Mittelwert aller Ergebnisse  
 (ohne Methode BC)





**Abb. 9:** z-Scores (ELISA-Ergebnisse als frischer Köhler) Probe B  
 Bezugswert robuster Mittelwert Ergebnisse Methode AQ  
 (AgraQuant, RomerLabs)

**Wiederfindungsraten für Fisch (als frischer Köhler):  
Dotierungsmaterialprobe und Probe B**

Auswertenummer	Dotierungsmaterial	Wiederfindungsrate	Probe B	Wiederfindungsrate	Methode	Hinweis
	[mg/kg]	[%]	[mg/kg]	[%]		
2	29650	21	85,1	17	AQ	
4	15600	11	70,7	14	AQ	Ergebnis umgerechnet *
5a	17954	12	84,43	16	AQ	
7	18600	13	79,7	16	AQ	Ergebnis umgerechnet *
8	na		65,6	13	AQ	Ergebnis umgerechnet *
11	29100	20	70,4	14	AQ	Ergebnis umgerechnet *
5b	5116	4	15,11	3	BC	**
10	13900	10	8,7	2	BC	** , Fischart nicht angegeben
18	22400	16	64	12	IL	

\* Umrechnung s. S. X

\*\* BC Ergebnisse nicht berücksichtigt

AB*	50-150 %	AB*	50-150 %
Anzahl im AB	0	Anzahl im AB	0
Prozent im AB	0	Prozent im AB	0

\* Akzeptanzbereich der AOAC für Allergen-ELISAs

Wiederfindungsrate  
100% Bezugsgröße:  
Frischer Köhler, s. Seite 4

**Methoden:**

AQ = AgraQuant, RomerLabs  
BC = Bio-check, imutest ELISA

IL = Immunolab

Anmerkung:

Mittels ELISA-Methoden lag keine Wiederfindungsrate für die Dotierungsmaterialprobe oder für die mit dem Dotierungsmaterial hergestellte Saucenpulver-Probe B im Bereich der AOAC-Anforderung von 50-150%.

Zu beachten ist, dass sowohl die Ergebnisse als auch die Bezugsgröße für die Wiederfindungsraten als frischer Köhler berechnet wurden. Tatsächlich zugesetzt wurde aber Fischpulver, das laut Testkit-Herstellern auf Grund der Prozessierung ggf. zu einem geringeren Prozentsatz detektiert wird. In den Testkit-Anleitungen einiger Hersteller sind entsprechende Umrechnungsfaktoren angegeben.

**4.2.2 PCR-Ergebnisse: Fisch**

Auswertenummer	Probe A	Probe A	Probe B	Probe B	Qualitative Bewertung	Methode	Hinweis
	pos/neg	[mg/kg]	pos/neg	[mg/kg]	Übereinstimmungen mit Konsenswerten		
2	negativ		positiv		2/2 (100%)	SFA-ID	
3	negativ	< 0,4	positiv	> 0,4	2/2 (100%)	SFA-ID	
6	negativ		positiv		2/2 (100%)	SFA-ID	
7a	negativ	< 5	positiv	44	2/2 (100%)	SFA-ID	als Kabeljaupulver
9	negativ		positiv		2/2 (100%)	SFA-ID	
15	negativ		positiv		2/2 (100%)	SFA-ID	
17	negativ		positiv		2/2 (100%)	SFA-ID	
1	negativ		positiv		2/2 (100%)	div	
7b	negativ	< 20	positiv	33	2/2 (100%)	div	als Kabeljaupulver
12	negativ		positiv		2/2 (100%)	div	
13	negativ		positiv		2/2 (100%)	div	
14	negativ	-	positiv	-	2/2 (100%)	div	

	Probe A	Probe B
Anzahl positiv	0	12
Anzahl negativ	12	0
Prozent positiv	0	100
Prozent negativ	100	0
Konsenswert	negativ	positiv

**Methoden:**

SFA ID = Sure Food Allergen ID,  
R-Biopharm / Congen

div = keine genaue Angabe / andere Methode

**Anmerkung:**

Zum Nachweis von Fisch mittels PCR wurden 100% negative Ergebnisse für Probe A und 100% positive Ergebnisse für Probe B erhalten. Die Konsenswerte stehen somit in qualitativer Übereinstimmung mit der Dotierung von Probe B.

**Quantitative Auswertung der Ergebnisse: Probe B**

Eine Auswertung der quantitativen Ergebnisse erfolgte nicht, weil zu wenige Ergebnisse vorlagen.

**Wiederfindungsraten für Fisch (als Fischpulver):  
Dotierungsmaterialprobe und Probe B**

Auswertenummer	Dotierungsmaterial	Wiederfindungsrate	Probe B	Wiederfindungsrate	Methode	Hinweis
	[mg/kg]	[%]	[mg/kg]	[%]		
2					SFA-ID	
3	> 0,4		> 0,4		SFA-ID	
6					SFA-ID	
7a	130000	453	44	43	SFA-ID	als Kabeljaupulver
9					SFA-ID	
15					SFA-ID	
17					SFA-ID	
1					div	
7b	65000	226	33	32	div	als Kabeljaupulver
12					div	
13					div	
14			-		div	

	AB*	50-150 %	AB*	50-150 %
Anzahl positiv	Anzahl im AB	0	Anzahl im AB	0
Anzahl negativ				
Prozent positiv	Prozent im AB	0	Prozent im AB	0
Prozent negativ				
Konsenswert				

Wiederfindungsrate  
100% Bezugsgröße:  
Köhler als Fisch-Pulver, s. Seite 4

\* Akzeptanzbereich der AOAC für Allergen-ELISAs

**Methoden:**

SFA ID = Sure Food Allergen ID,  
R-Biopharm / Congen

div = keine genaue Angabe / andere Methode

Anmerkung:

Ein Teilnehmer hat quantitative Ergebnisse angegeben, die mit zwei unterschiedlichen PCR-Methoden erhalten wurden. Die Wiederfindungsraten lagen für die die Dotierungsmaterialprobe oberhalb und für die mit dem Dotierungsmaterial hergestellte Saucenpulver-Probe B unterhalb des Akzeptanzbereichs von 50-150%.

Zu beachten ist, dass als Bezugsgröße für die Wiederfindungsraten der Fisch-Pulver-Gehalt von Köhler wie auf Seite 4 angegeben verwendet wurde, die PCR-Ergebnisse jedoch als Kabeljaupulver angegeben wurden.

## 5. Dokumentation

### Angaben der Teilnehmer

#### 5.1 ELISA: Ei

##### Primärdaten

Auswertenummer	Ergebnis Probe A		Ergebnis Probe B		Ergebnis Dotierungsprobe		Angabe quantitatives z.B. Lebensmittel / Protein	Meth. Abk.	Methode
	qualitativ	mg/kg	qualitativ	mg/kg	qualitativ	mg/kg			
1	negativ		positiv	32	positiv	7232	Eiklarproteine, gesamt	AQ	AgraQuant Egg (COKAL0848), RomerLabs
4	negativ	<0.4	positiv	26,4	positiv	7277	Eiklarproteine, gesamt	AQ	Romer Labs AgraQuant Egg White
9	-	< NWG (< 0,1 mg/kg Eiklar-protein)	-	119	-	12510	Volleipulver	BK	BioKits Egg Assay Kit, Neogen
10	-	< 0,5	-	27,3	-	8250	Eiklarproteine, gesamt	BK	BioKits Egg Assay Kit, Neogen
16	negativ		positiv		positiv		Eiklarproteine, gesamt	ES	ELISA-Systems Egg Residue Detection ELISA
18	negativ	< 0.4	positiv	24	positiv	7600	Eiklarproteine, gesamt	IL	Immunolab Eiklar ELISA
7	negativ	< 0,7	positiv	77	-		Volleipulver	MR	andere: Egg (Ovalbumin) ELISA Kit. Morinaga Institute of Biological Science (MloBS), Yokohama, Japan.
8	-	<0,3	-	39,1	-	na	Eiklarproteine, gesamt	MR	Morinaga Egg protein Elisa Kit 1410A
11	negativ	nd	positiv	46	positiv	13100	Eiprotein, gesamt	MR	Morinaga Egg
2	negativ	< 0,5	positiv	86,5	positiv	24447	Volleipulver	RS	Ridascreen Fast Ei (R6402), r-Biopharm
3	negativ	<0.049	positiv	>33	positiv	>33	Eiklarproteine, gesamt	RS	Ridascreen Fast Ei (R6402), r-Biopharm
5	negativ	<0.5	positiv	62,68	positiv	14554	Volleipulver	RS	Ridascreen Fast Ei (R6402), r-Biopharm
5	negativ	<0.13	positiv	16,4	positiv	3821	Eiklarproteine, gesamt	RS	Ridascreen Fast Ei (R6402), r-Biopharm
6	negativ	<0,5	positiv	<50	positiv	2567,5	Ei	RS	r-biopharm, RIDASCREEN®FAST Egg (R6402)
12	negativ	<0,5	positiv	79	positiv	21500	Volleipulver	RS	Ridascreen Fast Ei (R6402), r-Biopharm
13	negativ		positiv	89,5	positiv	27535	Volleipulver	RS	Ridascreen Fast Ei (R6402), r-Biopharm
14	negativ	<0,5	positiv	120	positiv	38000	Volleipulver	RS	Ridascreen Fast Ei (R6402), r-Biopharm
17	negativ		positiv	>3,6	-		Volleipulver	RS	Ridascreen Fast Ei (R6402), r-Biopharm
17	negativ		positiv	>3,6	-		Volleipulver	RS	Ridascreen Fast Ei (R6402), r-Biopharm

#### Methoden:

AQ = AgraQuant, RomerLabs  
 BK = BioKits, Neogen  
 ES = ELISA Systems

IL = Immunolab  
 MR = Morinaga  
 RS = Ridascreen®, R-Biopharm

## Weitere Angaben zu den Methoden

Auswertenummer	Meth. Abk.	Spezifität	Hinweise zur Methode (Extraktion und Bestimmung)	Sonstige Hinweise
		Antikörper	z.B. Extraktionslösung / Zeit / Temperatur	
1	AQ			
4	AQ			
9	BK	Ovomucoid (Gal d 1)	nach Testanleitung	
10	BK	Ovomucoid	1 g Probe + 10 ml vorgewärmter Extraktionspuffer (Tris mit Gelatine). Inkubation 15 min bei RT unter schütteln.	
16	ES			
18	IL			
7	MR			
8	MR			
11	MR		1g Probe/19mL Kit-Extraktionslösung; Extraktion für 10 min bei 100°C	Einzelergebnis
2	RS		nach Herstelleranleitung	
3	RS			
5	RS	Ovalbumin und Ovomuroid	nach Herstelleranleitung	
5	RS	Ovalbumin und Ovomuroid	nach Herstelleranleitung	Berechnung der Ergebnisse als Vollpulver gemäß R-Biopharm Kit-Anleitung
6	RS		nach Herstelleranleitung	
12	RS			
13	RS	Ovalbumin und Ovomuroid	gemäß Testkit-Anleitung Verdünnung Probe B 1:50; Probe C 1:5000	
14	RS		nach Hersteller Angabe	
17	RS			
17	RS			

**5.2 ELISA: Fisch***Primärdaten*

Auswertenummer	Ergebnis Probe A		Ergebnis Probe B		Ergebnis Dotierungsprobe		Angabe quantitatives z.B. Lebensmittel / Protein	Meth. Abk.	Methode
	qualitativ	mg/kg	qualitativ	mg/kg	qualitativ	mg/kg			
									Test-Kit + Anbieter
2a	negativ	< 4,0	positiv	26,6	positiv	9266	frischer Kabeljau	AQ	AgraQuant ELISA Fish (COKAL2548), RomerLabs
2b	negativ	< 12,8	positiv	85,1	positiv	29.650	frischer Kabeljau, umgerechnet auf frischen Köhler	AQ	AgraQuant ELISA Fish (COKAL2548), RomerLabs
4	negativ	<4	positiv	22,1	positiv	4877	Fisch	AQ	Romer Labs AgraQuant Fish
5a	negativ	<12.8	positiv	84,43	positiv	17954	Fisch, frisch	AQ	AgraQuant ELISA Fish (COKAL2548), RomerLabs
7	-		positiv	24,9	positiv	5800	Kabeljau, frisch	AQ	AgraQuant ELISA Fish (COKAL2548), RomerLabs
8	-	<4	-	20,5	-	na	Fisch, frisch	AQ	AgraQuant ELISA Fish (COKAL2548), RomerLabs
11	negativ	nicht detektiert	positiv	22	positiv	9100	Fisch, frisch	AQ	AgraQuant ELISA Fish (COKAL2548), RomerLabs
5b	negativ	<13.55	positiv	15,11	positiv	5116	Fisch, frisch	BC	Bio-check / imutest Fish-check ELISA
10	-	< 5	-	8.7	-	13900	Fisch, frisch	BC	Bio-check / imutest Fish-check ELISA
18	negativ	< 2	positiv	20 (64)	positiv	7000 (22400)	Fisch, frisch, Dorsch	IL	Immunolab Fish ELISA (FIS-E01)

**Methoden:**

AQ = AgraQuant, RomerLabs  
 BC = Bio-check, imutest ELISA

IL = Immunolab

## Weitere Angaben zu den Methoden

Auswertenummer	Meth. Abk.	Spezifität	Hinweise zur Methode (Extraktion und Bestimmung)	Sonstige Hinweise
		Antikörper	z.B. Extraktionslösung / Zeit / Temperatur	
2a	AQ		nach Herstelleranleitung	
2b	AQ		nach Herstelleranleitung	Faktor 3,2
4	AQ			Umrechnungsfaktoren für verschiedene Fischarten können verwendet werden. Die Species wurde nicht mitgeteilt. **
5a	AQ		nach Herstelleranleitung	Berechnet als frischer Köhler
7	AQ	Fischprotein		
8	AQ			
11	AQ		1g Probe/20mL Kit-Extraktionslösung; extrahiert für 15min in 60°C Schüttelwasserbad; 3 x 20min Inkubationen vor Messung bei 450nm.	Einzelergebnis
5b	BC		nach Herstelleranleitung	Berechnet als frischer Köhler
10	BC	Parvalbumins (Gad c1)	0,4 g Proben + 3,5 ml Extraktionslösung (Tris-Glycin). Inkubation 19 min bei RT davon 4 min unter schütteln.	
18	IL			siehe unten*

\* für Probe B wurden 20 ppm Dorsch (frisch) gemessen was nach Umrechnung 64 ppm Köhler entspricht, umgerechnet auf die Trockenmasse sind dies 4 ppm Dorsch (trocken), bzw. 13 ppm Köhler (trocken)

für Spike wurden 7000 ppm Dorsch (frisch) gemessen was nach Umrechnung 22400 ppm Köhler entspricht, umgerechnet auf die Trockenmasse sind dies 1400 ppm Dorsch (trocken), bzw. 4500 ppm Köhler (trocken)

Der Proteingehalt bezogen auf den frischen Fisch liegt bei beiden Fischarten bei ca. 18% was bezogen auf die Trockenmasse ca. 90% ausmacht.

\*\* Die Species wurde den Teilnehmern im Anschreiben mit dem Probenversand von DLA mitgeteilt (s. Seite 5).



**5.3 PCR: Ei (Huhn-DNA)**

Primärdaten

Auswertenummer	Ergebnis Probe A		Ergebnis Probe B		Ergebnis Dotierungsprobe		Angabe quantitatives Ergebnis als	Meth. Abk.	Methode
	pos / neg	mg/kg	pos / neg	mg/kg	pos / neg	mg/kg			
15	negativ		negativ		positiv			div	Hausmethode

**Methoden:**

div = keine genaue Angabe / andere Methode

Weitere Angaben zu den Methoden

Auswertenummer	Meth. Abk.	Spezifität	Hinweise zur Methode (Extraktion und Bestimmung)	Sonstige Hinweise
		Target-Sequenz / -DNA	z.B. Extraktion / Enzyme / Clean-Up / Real Time PCR / Gelelektrophorese / Cyclen	
15	div	Cytochrom b/ Ovalbumin/ Vitellogenin	Extraktion: NucleoSpin Food (Macherey Nagel)/ Real Time PCR/ 45 Cyclen	Nachweisgrenze (0,1%)

**5.4 PCR: Fisch**

*Primärdaten*

Auswertenummer	Ergebnis Probe A		Ergebnis Probe B		Ergebnis Dotierungsprobe		Angabe quantitatives Ergebnis als	Meth. Abk.	Methode
	pos / neg	mg/kg	pos / neg	mg/kg	pos / neg	mg/kg			
									Test-Kit + Anbieter
2	negativ		positiv		positiv		DNA-Fisch	SFA-ID	Sure Food Allergen ID Fish, Congen / r-Biopharm
3	negativ	<0.4ppm	positiv	>0.4ppm	positiv	>0.4ppm	DNA-Fisch	SFA-ID	Sure Food Allergen ID, Congen / r-Biopharm
6	negativ		positiv		positiv		Fisch-DNS	SFA-ID	r-biopharm, SureFood® ALLERGEN ID Fish (S3110)
7a	negativ	< 5	positiv	44	positiv	130000	Kabeljaupulver, gefriergetrocknet	SFA-ID	Sure Food Allergen ID, Congen / r-Biopharm
9	negativ		positiv		positiv		DNA-Fisch	SFA-ID	SureFood ALLERGEN ID Fish, Congen
15	negativ		positiv		positiv			SFA-ID	Sure Food Allergen ID, Congen / r-Biopharm
17	negativ		positiv		-		DNA-Fisch	SFA-ID	Sure Food Allergen ID, Congen / r-Biopharm
1	negativ		positiv		positiv		DNA-Fisch	div	Hausverfahren
7b	negativ	< 20	positiv	33	positiv	65000	Kabeljaupulver, gefriergetrocknet	div	Benedetto MC., Abete S., Squadrone S. (2011) Towards a quantitative application of real-time PCR technique for fish DNA detection in feedstuff. Food Chemistry 126, 1436-1442.
12	negativ		-		positiv		DNA-Fisch	div	andere: bitte eingeben!
13	negativ		positiv		positiv		DNA-Fisch	div	
14	negativ	-	positiv	-	positiv		DNA-Fisch	div	interne Methode

**Methoden:**

SFA ID = Sure Food Allergen ID, R-Biopharm / Congen

div = keine genaue Angabe / andere Methode

*Weitere Angaben zu den Methoden*

Auswertenummer	Meth. Abk.	Spezifität	Hinweise zur Methode (Extraktion und Bestimmung)	Sonstige Hinweise
		Target-Sequenz / -DNA	z.B. Extraktion / Enzyme / Clean-Up / Real Time PCR / Gelelektrophorese / Cyclen	
2	SFA-ID		SureFood PREP ALLERGEN, R-Biopharm, S1053	
3	SFA-ID			
6	SFA-ID		nach Herstelleranleitung	
7a	SFA-ID		CTAB-Präzipitationsmethode	Quantifizierung über Matrix-Kontrollstandards (Reiskeks)
9	SFA-ID	unbekannt, lt. Hersteller charakteristischer Abschnitt der Fisch-DNA	DNA-Extraktion mit 2 g-Protokoll des Dneasy mericon Food Kits der Firma Qiagen und SureFood PREP Advanced, Kit, Protokoll1, Firma Congen/r-biopharm	
15	SFA-ID	unbekannt	Extraktion: NucleoSpin Food (Macherey Nagel)/ Real Time PCR/ 35 Cyclen	
17	SFA-ID			
1	div			
7b	div	andere: 12S ribosomale RNA (12S rRNA)	CTAB-Präzipitationsmethode	Quantifizierung über Matrix-Kontrollstandards (Reiskeks)
12	div	Hausmethode	CTAB-Extraktion	
13	div	18S-rRNA	2 g Einw aage, Lysat doppelt aufgearbeitet mit Machery & Nagel Food Kit; konventionelle PCR	Remmler et al.; Forschungsprojekt Technische Universität Graz Nr. 1245
14	div	Fisch Myostatin	CTAB / Protease K / Chloroform + Promega Wizard/ Real-time PCR/ - / 45 Zyklen	

## 6. Verzeichnis der teilnehmenden Institute in alphabetischer Reihenfolge

Teilnehmer / Participant	Ort / Town	Land / Country
		Deutschland
		SPANIEN
		Deutschland
		FRANKREICH
		CANADA
		CANADA
		ITALIEN
		Deutschland
		Deutschland
		Deutschland
		Deutschland
		Deutschland
		Deutschland
		ITALIEN
		SCHWEDEN
		GROSSBRITANIEN
		GROSSBRITANIEN
		SCHWEDEN
		Deutschland

*[Die Adressdaten der Teilnehmer wurden für die allgemeine Veröffentlichung des Auswertebereichs nicht angegeben.]*

*[The address data of the participants were deleted for publication of the evaluation report.]*

## 7. Verzeichnis relevanter Literatur

1. DIN EN ISO/IEC 17043:2010; Konformitätsbewertung - Allgemeine Anforderungen an Eignungsprüfungen / Conformity assessment - General requirements for proficiency testing
2. Verordnung / Regulation 882/2004/EU; Verordnung über amtliche Kontrollen / Regulation on official controls
3. DIN EN ISO/IEC 17025:2005; Allgemeine Anforderungen an die Kompetenz von Prüf- und Kalibrierlaboratorien / General requirements for the competence of testing and calibration laboratories
4. Richtlinie / Directive 1993/99/EU; über zusätzliche Maßnahmen im Bereich der amtlichen Lebensmittelüberwachung / on additional measures concerning the official control of foodstuffs
5. ASU §64 LFGB : Planung und statistische Auswertung von Ringversuchen zur Methodvalidierung
6. ISO 13528:2015 & DIN ISO 13528:2009; Statistische Verfahren für Eignungsprüfungen durch Ringversuche / Statistical methods for use in proficiency testing by interlaboratory comparisons
7. The International Harmonised Protocol for the Proficiency Testing of Analytical Laboratories ; J.AOAC Int., 76(4), 926 - 940 (1993)
8. The International Harmonised Protocol for the Proficiency Testing of Analytical Chemistry Laboratories; Pure Appl Chem, 78, 145 - 196 (2006)
9. Evaluation of analytical methods used for regulation of food and drugs; W. Horwitz; Analytical Chemistry, 54, 67-76 (1982)
10. A Horwitz-like funktion describes precision in proficiency test; M. Thompson, P.J. Lowthian; Analyst, 120, 271-272 (1995)
11. Protocol for the design, conduct and interpretation of method performance studies; W. Horwitz; Pure & Applied Chemistry, 67, 331-343 (1995)
12. Recent trends in inter-laboratory precision at ppb and sub-ppb concentrations in relation to fitness for purpose criteria in proficiency testing; M. Thompson; Analyst, 125, 385-386 (2000)
13. ASU §64 LFGB L 00.00-69 Bestimmung von Erdnuss-Kontaminationen in Lebensmitteln mittels ELISA im Mikrotiterplattensystem (2003)
14. ASU §64 LFGB L 44.00-7 Bestimmung von Haselnuss-Kontaminationen in Schokolade und Schokoladenwaren mittels ELISA im Mikrotiterplattensystem (2006)
15. ASU §64 LFGB L 06.00-56 Bestimmung von Sojaprotein in Fleisch und Fleischerzeugnissen Enzymimmunologisches Verfahren (2007)
16. IRMM, Poms et al.; Inter-laboratory validation study of five different commercial ELISA test kits for determination of peanut residues in cookie and dark chocolate; European Commission, Joint Research Centre, Belgium; GE/R/FSQ/D08/05/2004
17. Ministry of Health and Welfare, JSM, Japan 2006
18. DIN EN ISO 15633-1:2009; Nachweis von Lebensmittelallergenen mit immunologischen Verfahren - Teil 1: Allgemeine Betrachtungen
19. DIN EN ISO 15842:2010 Lebensmittel - Nachweis von Lebensmittelallergenen - Allgemeine Betrachtungen und Validierung von Verfahren
20. Working Group Food Allergens, Abbott et al., Validation Procedures for Quantitative Food Allergen ELISA Methods: Community Guidance and Best Practices JAOAC Int. 93:442-50 (2010)
21. Working Group on Prolamin Analysis and Toxicity (WGPAT): Méndez et al. Report of a collaborative trial to investigate the performance of the R5 enzyme linked immunoassay to determine gliadin in gluten-free food. Eur J Gastroenterol Hepatol. 17:1053-63 (2005)
22. DLA Publikation: Performance of ELISA and PCR methods for the determination of allergens in food: an evaluation of six years of proficiency testing for soy (Glycine max L.) and wheat gluten (Triticum aestivum L.); Scharf et al.; J Agric Food Chem. 61(43):10261-72 (2013)

23. AMC Kernel Density - Representing data distributions with kernel density estimates, amc technical brief, Editor M Thompson, Analytical Methods Committee, AMCTB No 4, Revised March 2006 and Excel Add-in Kernel.xla 1.0e by Royal Society of Chemistry

**DLA-01/2016-Allergene I**

Von 19 Teilnehmern haben 18 mindestens ein Ergebnis eingereicht. Die Auswertung erfolgte hinsichtlich der Parameter Ei und Fisch für ELISA- (qualitativ und quantitativ) und für PCR-Methoden (qualitativ). Zusätzlich wurden für jeden Teilnehmer Wiederfindungsraten für die Dotiermaterialprobe und die dotierte Probe ermittelt. Details zu den einzelnen Parametern inklusive separater Auswertung nach Testkit-Herstellern sind dem Auswertebereicht zu entnehmen.

8 Teilnehmer hatten ihren Sitz im Europäischen Ausland (Frankreich, Großbritannien, Italien, Schweden, Spanien) und zwei Teilnehmer im Nicht-EU-Ausland (Kanada).