

**DLA**  
Dienstleistung  
Lebensmittel  
Analytik GbR

**Auswertungs-Bericht**  
Laborvergleichsuntersuchung

**03/2016**

**Allergene III:**

**β-Lactoglobulin, Casein und Gluten in  
Kindernahrung**

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

proficiency-testing@dla-lvu.de    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 Probenversand und Informationen zur Untersuchung.....	6
2.3 Ergebnisübermittlung.....	6
3. Auswertung.....	7
3.1 Konsenswert der Teilnehmer (zugewiesener Wert).....	7
3.2 Robuste Standardabweichung.....	8
3.3 Ausschluss von Ergebnissen und Ausreißer.....	8
Ausschluss von Ergebnissen .....	8
3.4 Zielstandardabweichung (für die Eignungsbeurteilung).....	9
3.4.1 Allgemeines Modell nach Horwitz.....	9
3.4.2 Auswertung eines Versuchs zur Präzision .....	9
3.4.3 Werte aus Erkenntnissen .....	11
3.5 z-Score.....	12
3.6 z'-Score.....	13
3.7 Quotient S*/opt.....	13
3.8 Standardunsicherheit des zugewiesenen Werts.....	13
3.9 Graphische Darstellung der Bezugswerte.....	14
3.10 Wiederfindungsraten: Dotierung.....	14
4. Ergebnisse.....	15
4.1 Vergleichsuntersuchung Milch.....	17
4.1.1 ELISA-Ergebnisse: $\beta$ -Lactoglobulin.....	17
4.1.2 ELISA-Ergebnisse: Casein.....	22
4.2 Vergleichsuntersuchung Gluten.....	27
4.2.1 ELISA-Ergebnisse: Gluten.....	27
4.2.2 PCR-Ergebnisse: Glutenhaltige Getreide.....	33
5. Dokumentation.....	34
5.1 Angaben der Teilnehmer.....	34
5.1.1 ELISA: $\beta$ -Lactoglobulin.....	34
5.1.2 ELISA: Casein.....	36
5.1.3 ELISA: Gluten.....	38
5.1.4 PCR: Glutenhaltige Getreide.....	40
5.2 Homogenität.....	41
5.2.1 Mischungshomogenität vor der Abfüllung.....	41
6. Verzeichnis der teilnehmenden Institute in alphabetischer Reihenfolge.....	42
7. Verzeichnis relevanter Literatur.....	43

## 1. Einleitung

Die Teilnahme an Laborvergleichsuntersuchungen (LVU) ist ein unverzichtbarer Baustein für das Qualitäts-Management-System eines jeden, mit der Untersuchung von Lebensmitteln, Futtermitteln, kosmetischen Mitteln 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 für die erforderliche Verifizierung oder Validierung der durchgeführten Untersuchungsmethode [1, 5].

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, 3].

## 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 Gemisch zweier handelsüblicher Kindernahrungsmittel "Hirse-Brei" ab dem 4. Monat und "Reis-Brei" ab dem 6. Monat (gekennzeichnet als milchfrei und glutenfrei). Die Grundzusammensetzung war für beide Proben A und B gleich (s. Tabelle 1). Nach Zerkleinern, Sieben und Homogenisieren der Grundmischung wurde zur Herstellung von Probe B stufenweise jeweils ein Aliquot der Grundmischung dem Dotierungsmaterial mit den allergenen Zutaten Magermilchpulver und Weizenmehl zugesetzt und jeweils homogenisiert.

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

Die Proben wurden nach dem Homogenisieren zu Portionen von ca. 25 g in metallisierte PET-Folienbeutel abgefüllt.

Tabelle 1: Zusammensetzung der DLA-Proben

Zutaten	Probe A	Probe B
Bio-Hirse-Brei mit Reis, Kinderbrei nach dem 4. Monat Zutaten: Hirsevollkornmehl (75%), Reissvollkornmehl (25%), Vitamin B1 Nährwertangaben pro 100 g: Eiweiß 11 g, Kohlenhydrate 78 g, Fett 3,7 g	50,0 g/100 g	48,5 g/100 g
Bio-Reis-Brei mit Mais und Hirse, Kinderbrei nach dem 6. Monat Zutaten: Reissvollkornmehl (70%), Maismehl (20%), Hirsevollkornmehl (10%), Vitamin B1 Nährwertangaben pro 100 g: Eiweiß 8,6 g, Kohlenhydrate 80 g, Fett 2,8 g	50,0 g/100 g	48,5 g/100 g
Dotierungsmaterialprobe	-	2,97 g/100 g

Tabelle 2: Zugesezte Mengen allergener Zutaten

Zutaten	Dotierungsmaterialprobe	Probe B
Kartoffelmehl	93 %	2,76 %
<i>Milch:</i>		
- als Magermilchpulver	19600 mg/kg (1,96 %)	582 mg/kg
- davon Gesamtprotein*	5740 mg/kg	192 mg/kg
- davon Casein*	4590 mg/kg	154 mg/kg
- davon $\beta$ -Lactoglobulin*	574 mg/kg	19,2 mg/kg
<i>Weizen:</i>		
- als Weizenmehl Typ 1050	15300 mg/kg (1,53 %)	349 mg/kg
- davon Gesamtprotein*	1840 mg/kg	41,8 mg/kg
- davon <i>Gluten</i> **	1650 mg/kg	37,6 mg/kg
<i>Sojamehl</i>	2,01 %	0,060 %
Haselnussmus	1,18 %	0,035 %

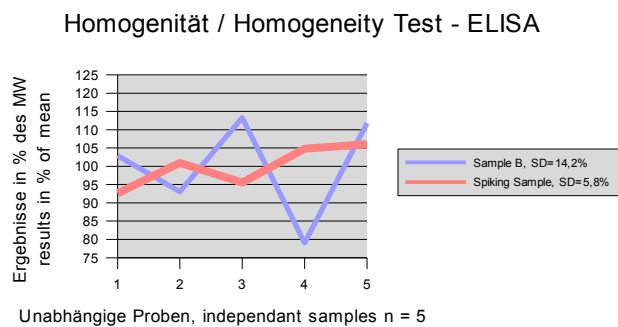
\* gemäß Deklaration und Literaturangaben berechnet

\*\* Definition für "Gluten" der Glutenunverträglichkeit-Kennzeichnungs-Verordnung (EU/41/2009) entspricht laut Literaturdaten ca. 85-91% des Weizenproteins

### 2.1.1 Homogenität

Die **Mischungshomogenität vor der Abfüllung** wurde in 8-fach Bestimmung mittels **Microtracer-Analyse** untersucht. Es handelt sich um eine normierte Methode, die Bestandteil des internationalen GMP-Zertifizierungssystems für Futtermittel ist [14]. Vor der Mischung werden mit Farbstoff beschichtete Eisenpartikel in  $\mu\text{m}$ -Größe zur Probe gegeben und die Partikelzahl wird nach der Homogenisierung in entnommenen Aliquoten bestimmt. Die Bewertung der Mischungshomogenität erfolgt auf Grundlage der Poissonverteilung anhand des chi-Quadrat-Tests. Eine Wahrscheinlichkeit von  $\geq 5\%$  ist gleichzusetzen mit einer guten homogenen Mischung und von  $\geq 25\%$  mit einer exzellenten Mischung [14, 15]. Die Microtracer-Analyse der vorliegenden LVU-Proben hat eine Wahrscheinlichkeit von 43% für die Dotierungsmaterialprobe und von 49% für die dotierte Probe B ergeben. Die Partikel-Ergebnisse wurden zusätzlich in Konzentrationen umgerechnet, statistisch als Normalverteilung ausgewertet und mit der Standardabweichung nach Horwitz verglichen. Es wurden HorRat-Werte von 1,0 bzw. 1,3 erhalten. Die Ergebnisse der Microtracer-Analyse sind in der Dokumentation angegeben.

Die **Homogenität der abgefüllten DLA-Proben** (Dotierungsmaterialprobe und dotierte Probe B) wurde anhand des Glutengehalts mittels ELISA-Tests geprüft (s. Abb. 1) und mit einer Standardabweichung zwischen den Proben von  $< 15\%$  für das verwendete Verfahren als hinreichend gesichert angesehen [16, 17, 20, 21]. Falls die Kriterien für eine ausreichende Homogenität des Probenmaterials bezüglich eines Parameters nicht erfüllt sind, werden die Auswirkungen auf die Zielstandardabweichung geprüft. Ggf. erfolgt die Bewertung der Ergebnisse der Teilnehmer unter Berücksichtigung der Standardunsicherheit des zugewiesenen Wertes (s. 3.8 und 3.11) [3].



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

## 2.2 Probenversand und Informationen zur Untersuchung

An jedes teilnehmende Institut wurden in der 9. Kalenderwoche 2016 je eine Portion der Untersuchungsmaterialien A und B sowie eine Dotierungsmaterialprobe verschickt. Die Untersuchungsverfahren wurden freigestellt. Die Untersuchungen waren durchzuführen bis spätestens 15. April 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 beta-Lactoglobulin, Casein und Gluten.

Im Zuge der Auswertung wurde 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 in Absprache mit DLA verspätet 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 [23, 24, 25, 26]. 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)

Für die Auswertung wurde als zugewiesener Wert ( $X_{pt}$ ) der **robuste Mittelwert** der eingesandten Ergebnisse verwendet („Konsenswert der Teilnehmer“). Die Berechnung erfolgt nach Algorithmus A gemäß Anhang C der ISO 13528 [3].

Voraussetzung ist, dass die Mehrzahl der Ergebnisse der teilnehmenden Laboratorien einer Normalverteilung unterliegen bzw. unimodal und symmetrisch verteilt sind. Hierzu erfolgt eine Prüfung der Verteilung u.a. anhand der Kern-Dichte-Schätzung [3, 12].

Falls Hinweise für Quellen von höherer Variabilität, wie z.B. eine bimodale Verteilung der Ergebnisse, vorliegen, werden Ursachen dafür gesucht. In Frage kommt häufig die Verwendung unterschiedlicher Untersuchungsmethoden. Ist dies der Fall, werden nach Möglichkeit getrennte Auswertungen mit eigenen zugewiesenen Werten ( $X_{pti}$ ) vorgenommen.

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

- i) **Robuster Mittelwert aller Ergebnisse** -  $X_{pt_{ALL}}$
- ii) **Robuster Mittelwert von Einzelmethoden** -  $X_{pt_{METHOD\ i}}$   
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 [3].

### 3.2 Robuste Standardabweichung

Zum Vergleich mit der Zielstandardabweichung  $\sigma_{pt}$  (Standardabweichung für die Eignungsbeurteilung) wird die robuste Standardabweichung ( $S^*$ ) verwendet. Die Berechnung erfolgt nach Algorithmus A gemäß Anhang C der ISO 13528 [3].

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 [2]. Alle Ergebnisse sollen mit mindestens 2 signifikanten Dezimalstellen angegeben werden. Die Angabe von 3 Dezimalstellen ist i.d.R. ausreichend.

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 [3, 12].

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 [3]. 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 [3].



### 3.4 Zielstandardabweichung (für die Eignungsbeurteilung)

Die Zielstandardabweichung des zugewiesenen Wertes  $\sigma_{pt}$  (= Standardabweichung für die Eignungsbeurteilung) kann nach unten dargestellten, unterschiedlichen Verfahren bestimmt.

In der vorliegenden LVU wurde die Zielstandardabweichung nach 3.4.3 Werte aus Erkenntnissen ermittelt.

#### 3.4.1 Allgemeines Modell nach Horwitz

Anhand der in zahlreichen LVUs für unterschiedliche Parameter und Analysemethoden erhaltenen statistischen Kenndaten hat Horwitz ein allgemeines Modell für die Schätzung der Vergleichsstandardabweichung  $\sigma_R$  abgeleitet [6]. Später wurde das Modell von Thompson für bestimmte Konzentrationsbereiche modifiziert [10]. Die Vergleichsstandardabweichung  $\sigma_R$  kann als relative Zielstandardabweichung  $\sigma_{pt}$  in % des zugewiesenen Wertes verwendet werden und nach untenstehenden Gleichungen berechnet werden [3]. Dabei wird für die Konzentration  $c$  der zugewiesene Wert  $X_{pt}$  eingesetzt.

Gleichungen	Konzentrationsbereiche	entspricht
$\sigma_R = 0,22c$	$c < 1,2 \times 10^{-7}$	$< 120 \mu\text{g/kg}$
$\sigma_R = 0,02c^{0,8495}$	$1,2 \times 10^{-7} \leq c \leq 0,138$	$\geq 120 \mu\text{g/kg}$
$\sigma_R = 0,01c^{0,5}$	$c > 0,138$	$> 13,8 \text{ g/100g}$

mit  $c$  = Massenanteil des Analyten (als relative Größe, z.B.  $1 \text{ mg/kg} = 1 \text{ ppm} = 10^{-6} \text{ kg/kg}$ )

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

#### 3.4.2 Auswertung eines Versuchs zur Präzision

Aus der Vergleichsstandardabweichung  $\sigma_R$  und der Wiederholstandardabweichung  $\sigma_x$  eines Versuchs zur Präzision einer Methode (Ringversuch oder LVU) kann unter Berücksichtigung der Anzahl der Wiederholmessungen  $m$  der Teilnehmer in der vorliegenden Vergleichsuntersuchung die Zielstandardabweichung  $\sigma_{pt}$  abgeleitet werden [3]:

$$\sigma_{pt} = \sqrt{\sigma_R^2 - \sigma_x^2 (m-1/m)}$$

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

Nachstehend sind die relativen Vergleichsstandardabweichungen aus Ringversuchen einiger ELISA-Methoden nach ASU §64 angegeben [27, 28, 29]:

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%.

Šturm et al. haben je einen Ringversuch zur Validierung eines kommerziellen ELISA-Test-Kits zur Bestimmung von  $\beta$ -Lactoglobulin und zur Bestimmung von Casein durchgeführt [30, 31].

Es wurden 20 Lebensmittelproben mit  $\beta$ -Lactoglobulin im Bereich von 0 - 33 mg/kg von 6 Laboratorien untersucht. Die Wiederfindungsraten lagen bei 91 - 118%. Die relativen Wiederholstandardabweichungen lagen bei 5,8 - 13% und die relativen Vergleichsstandardabweichungen bei 26 - 49% [30]. Casein wurde von 8 Laboratorien in 10 Lebensmittelproben im Bereich von 0 - 30 mg/kg und in 3 Lebensmitteln mit >30 mg/kg bestimmt. Die Wiederfindungsraten lagen bei 67 - 81%. Die relativen Wiederholstandardabweichungen lagen bei 11 - 52% und für eine Probe bei 99% und die relativen Vergleichsstandardabweichungen bei 13 - 61% und für zwei Proben bei 96% bzw. 111% [31].

Laut der Autoren lieferten beide ELISA-Test-Kits akzeptable Validierungsergebnisse für die Routinekontrollen von Lebensmitteln [30, 31].

Die Working Group on Prolamin Analysis and Toxicity (WGPAT) hat Ringversuche zur Validierung von zwei kommerziellen ELISA-Test-Kits zur Gluten-Bestimmung mittels monoklonalem R5 Antikörper durchgeführt [22]. Es wurden 12 Lebensmittelproben mit Gliadinegehalten im Bereich von 0 - 168 mg/kg von 20 Laboratorien untersucht. Die Wiederfindungsraten lagen zwischen 65 und 110%, die relativen Wiederholstandardabweichungen lagen bei 13 - 25% (1. Methode) bzw. 11 - 22% (2. Methode) und die relativen Vergleichsstandardabweichungen bei 23 - 47% (1. Methode) bzw. 25 - 33% (2. Methode). Laut den Autoren erfüllten beide ELISA-Test-Kits damit die Validierungskriterien für ELISA Methoden [22].

Das IRMM (Institute for Reference Materials and Measurements) hat in einem Ringversuch die Eignung fünf verschiedener ELISA-Test-Kits zur Bestimmung von Erdnuss getestet [25]. 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 [3].

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 [20], von der Arbeitsgruppe 12 „Lebensmittelallergene“ des Technischen Komitees CEN/TC 275 [17-19], von einer internationalen "Food Allergen Working Group" unter der Leitung der AOAC Presidential Task Force on Food Allergens [21] und vom Codex Alimentarius Committee (CAC/GL 74-2010) [16] erarbeitet worden.

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

Tabelle 3: ELISA-Validierungskriterien

Literatur [16-22]	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 [16]	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  $\sigma_{pt}$  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 Labore. Er besagt um welches Vielfache der Zielstandardabweichung ( $\sigma_{pt}$ ) das Ergebnis ( $x_i$ ) des betreffenden Teilnehmers vom zugewiesenen Wert ( $x_{pt}$ ) abweicht [3].

Die Berechnung erfolgt nach:

$$z_i = \frac{(x_i - x_{pt})}{\sigma_{pt}}$$

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<sub>ALL</sub>** (bezogen auf alle Ergebnisse)
- ii) **z-Score** - **Z<sub>METHOD i</sub>** (bezogen auf Einzelmethoden)

#### 3.5.1 Warn- und Eingriffssignale

Gemäß der ISO 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 [3]. 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 [3].

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 nur Gültigkeit sofern  $\geq 10$  Ergebnisse vorliegen [3].

### 3.6 z'-Score

Der z'-Score kann u.a. zur Beurteilung der Ergebnisse der teilnehmenden Labore herangezogen werden, wenn die Standardunsicherheit des zugewiesenen Wertes berücksichtigt werden muss (s. 3.8). Der z'-Score drückt das Verhältnis der Abweichung des Ergebnisses ( $x_i$ ) des betreffenden Teilnehmers vom zugewiesenen Wert zur Wurzel aus der Quadratsumme von Zielstandardabweichung ( $\sigma_{pt}$ ) und Standardunsicherheit ( $U_{(x_{pt})}$ ) aus [3].

Die Berechnung erfolgt nach:

$$z'_i = \frac{x_i - x_{pt}}{\sqrt{\sigma_{pt}^2 + u_{(x_{pt})}^2}}$$

Sofern eine Bewertung der Ergebnisse mittels z'-Score erfolgt, haben wir im Folgenden den Ausdruck im Nenner als Zielstandardabweichung  $\sigma_{pt}'$  definiert.

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

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

Zu Warn- und Eingriffssignalen siehe 3.5.1.

### 3.7 Quotient $S^*/\sigma_{pt}$

In Anlehnung an den HorRat-Wert kann die Bewertung einer Laborvergleichsuntersuchung als aussagekräftig gelten, wenn der Quotient von robuster Standardabweichung  $S^*$  und Zielstandardabweichung  $\sigma_{pt}$  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 [3].

### 3.8 Standardunsicherheit des zugewiesenen Werts

Jeder zugewiesene 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 des zugewiesenen Wertes ( $U_{(x_{pt})}$ ) wird für die vorliegende LVU wie folgt berechnet [3]:

$$u_{(x_{pt})} = 1,25 \times \frac{s^*}{\sqrt{p}}$$

Ist  $U_{(x_{pt})} \leq 0,3 \sigma_{pt}$  muss die Standardunsicherheit des zugewiesenen Wertes nicht berücksichtigt werden [3]. Ein deutliches Überschreiten des Wertes von 0,3 ist ein Hinweis darauf, dass die Zielstandardabweichung ggf. zu

gering für die Standardunsicherheit des zugewiesenen Wertes gewählt wurde. Der Quotient  $U(x_{pt})/\sigma_{pt}$  ist in den Kenndaten angegeben.

### 3.9 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.

### 3.10 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 [21]. 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 Gliadin angegeben wurden, sind in Gluten umgerechnet worden. Dabei wurde die Gliadin-Angabe mit dem Faktor 2 multipliziert.

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 $X_{pt_{ALL}}$	z-Score $X_{pt_{M i}}$	Methode	Hinweis
	pos/neg	[mg/kg]				

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]
Zugewiesener Wert ( $X_{pt}$ )	$X_{pt_{ALL}}$	$X_{pt_{METHOD i}}$
Anzahl der Messergebnisse		
Anzahl der Ausreißer		
Median		
Robuster Mittelwert ( $X_{pt}$ )		
Robuste Standardabweichung ( $S^*$ )		
Zielkenndaten:		
Zielstandardabweichung $\sigma_{pt}$		
untere Grenze des Zielbereichs ( $X_{pt} - 2\sigma_{pt}$ )		
obere Grenze des Zielbereichs ( $X_{pt} + 2\sigma_{pt}$ )		
Quotient $S^*/\sigma_{pt}$		
Standardunsicherheit $U(X_{pt})$		
Quotient $U(X_{pt})/\sigma_{pt}$		
Ergebnisse im Zielbereich		
Prozent 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 Milch

### 4.1.1 ELISA-Ergebnisse: $\beta$ -Lactoglobulin

#### 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		
9	negativ	<5	positiv	63	2/2 (100%)	BK	
6	negativ	<0,1	positiv	22	2/2 (100%)	ES	
13	negativ	<0,2	positiv	14,1	2/2 (100%)	ES	
16	negativ	<0,1	positiv	19	2/2 (100%)	ES	
17	negativ	<0,05	positiv	>1	2/2 (100%)	ES	
14	negativ	< 0,01	positiv	20	2/2 (100%)	IL	
1	negativ	<0.5	positiv	5,91	2/2 (100%)	RS	
2	negativ	< 0.5	positiv	4,3	2/2 (100%)	RS	
3	negativ		positiv	6,9	2/2 (100%)	RS	
4	negativ	<0,5	positiv	31	2/2 (100%)	RS	Ausreißer Xpt RS
7	negativ		positiv	8,6	2/2 (100%)	RS	
8	negativ	<1	positiv	1,8	2/2 (100%)	RS	
15	negativ	<5	positiv	8,3	2/2 (100%)	RS	

	Probe A	Probe B
Anzahl positiv	0	13
Anzahl negativ	13	0
Prozent positiv	0	100
Prozent negativ	100	0
Konsenswert	negativ	positiv

#### Methoden:

BK = BioKits, Neogen  
ES = ELISA Systems

IL = Immunolab  
RS = Ridascreen®, R-Biopharm

#### Anmerkung:

Es wurden zum Nachweis von  $\beta$ -Lactoglobulin mittels ELISA zu 100% negative Ergebnisse für Probe A und zu 100% positive Ergebnisse für Probe B erhalten.

Die Konsenswerte stehen in qualitativer Übereinstimmung mit der Dotierung von Probe B.

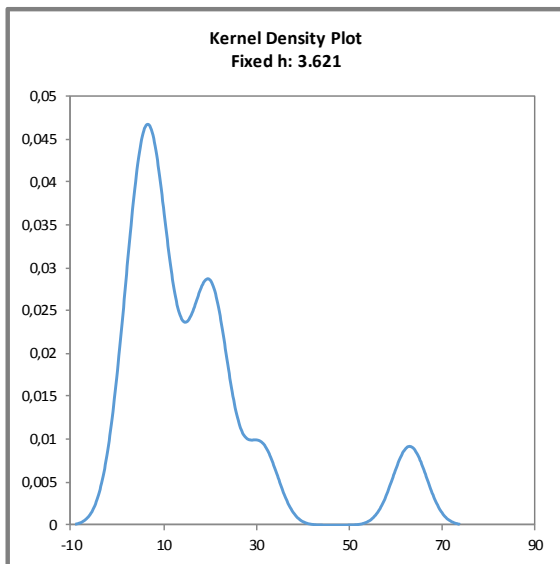
**Quantitative Auswertung der Ergebnisse: Probe B**

Auswertenummer	$\beta$ -Lactoglobulin [mg/kg]	z-Score $X_{pt_{ALL}}$	z-Score $X_{pt_{RS}}$	Methode	Hinweis
9	63			BK	
6	22			ES	
13	14,1			ES	
16	19			ES	
17	>1			ES	
14	20			IL	
1	5,91		-0,6	RS	
2	4,3		-1,5	RS	
3	6,9		0,0	RS	
4	31		13,8	RS	Ausreißer $X_{pt_{RS}}$
7	8,6		0,9	RS	
8	1,8		-3,0	RS	
15	8,3		0,8	RS	

**Methoden:**

BK = BioKits, Neogen  
 ES = ELISA Systems

IL = Immunolab  
 RS = Ridascreen®, R-Biopharm



**Abb. 2:** Kerndichte-Schätzung aller ELISA-Ergebnisse  $\beta$ -Lactoglobulin (mit  $h = \sigma_{pt}$  von  $X_{pt_{ALL}}$ )

Anmerkung:

Die Kerndichte-Schätzung zeigt eine mehrmodale Verteilung, die sich den verwendeten Methoden zuordnen lässt: 1. Methode RS, 2. Methoden ES und IL und 3. Methode BK. Die Schulter bei 31 mg/kg geht auf einen Ausreißer der Methode RS zurück (s. Abb. 2).

Kenndaten: Quantitative Auswertung  $\beta$ -Lactoglobulin

**Probe B**

<b>Kenndaten</b>	<b>Alle Ergebnisse</b> [mg/kg]	<b>Methode RS</b> [mg/kg]
Zugewiesener Wert ( $X_{pt}$ )	$X_{ptALL}$	$X_{ptMETHOD RS}$
Anzahl der Messergebnisse	13	7
Anzahl der Ausreißer	-	1
Median	11,4	6,90
Robuster Mittelwert ( $X_{pt}$ )	14,5	6,98
Robuste Standardabweichung ( $S^*$ )	11,6	4,05
<i>Zielkenndaten:</i>		
Zielstandardabweichung $\sigma_{pt}$		1,75
untere Grenze des Zielbereichs		3,49
obere Grenze des Zielbereichs		10,5
Quotient $S^*/\sigma_{pt}$		2,3
Standardunsicherheit $U(X_{pt})$		1,91
Quotient $U(X_{pt})/\sigma_{pt}$		1,1
Ergebnisse im Zielbereich		6
Prozent im Zielbereich		86%

**Methode:**

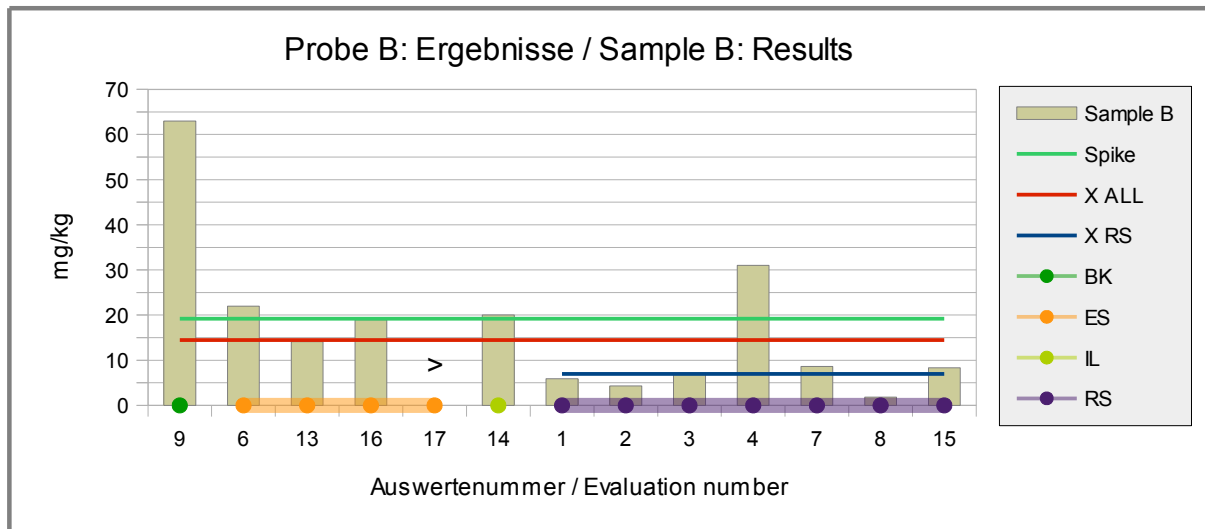
RS = R-Biopharm, Ridascreen Fast®

Anmerkungen zu den Kenndaten und Vergleich der Bezugswerte:

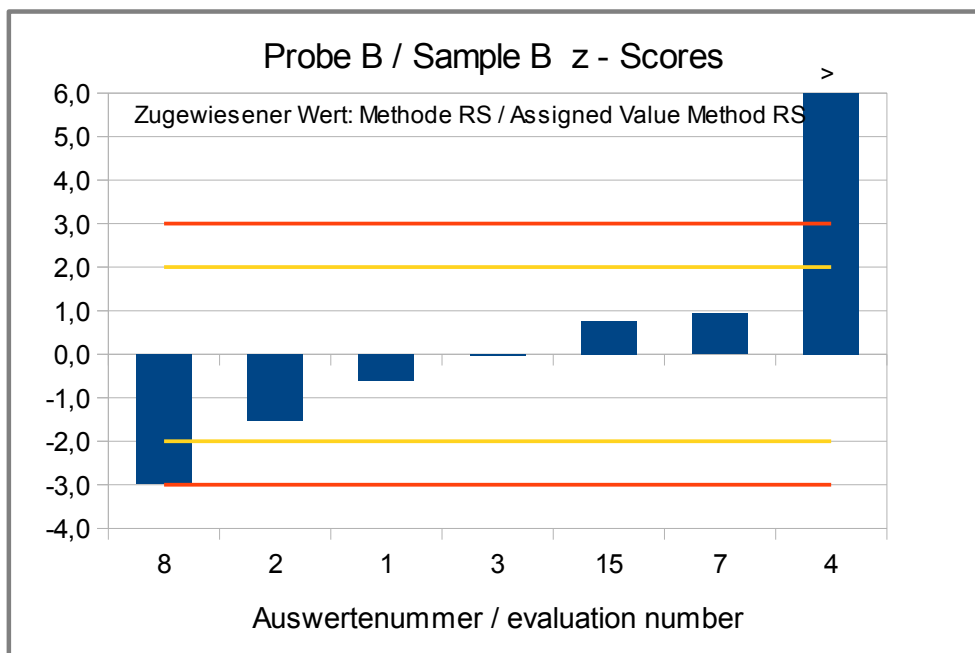
Die Ergebnisse aller Methoden zeigten eine Test-Methoden abhängige multimodale Verteilung (s. Abb. 2). Eine Methoden-übergreifende Auswertung wurde daher nicht vorgenommen.

Die Auswertung der Ergebnisse von Methode RS zeigte eine leicht erhöhte Variabilität der Ergebnisse. Der Quotient  $S^*/\sigma_{pt}$  lag etwas über 2,0. Die robuste Standardabweichung liegt im Bereich von etablierten Werten für die Vergleichsstandardabweichung der eingesetzten Bestimmungsmethode (vgl. 3.4.2 Auswertung eines Versuchs zur Präzision und 3.4.3 Werte aus Erkenntnissen). Die Vergleichbarkeit der Ergebnisse ist gegeben.

Der robuste Mittelwert der Auswertung der Methode RS lag bei ca. 36% des Zusatzniveaus von  $\beta$ -Lactoglobulin zu Probe B, und somit unterhalb der relevanten Anforderungen für die eingesetzte Methode (s. 3.4.3 und "Wiederfindungsraten für  $\beta$ -Lactoglobulin" S.21).



**Abb. 3:** ELISA-Ergebnisse  $\beta$ -Lactoglobulin  
 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  $\beta$ -Lactoglobulin)  
 Bezugswert robuster Mittelwert Ergebnisse Methode RS  
 (R-Biopharm, Ridascreen Fast)

**Wiederfindungsraten für  $\beta$ -Lactoglobulin:  
Dotierungsmaterialprobe und Probe B**

Auswertenummer	Dotierungsmaterial	Wiederfindungsrate	Probe B	Wiederfindungsrate	Methode	Hinweis
	[mg/kg]	[%]	[mg/kg]	[%]		
9	1150	200	63	328	BK	
6	330	57	22	115	ES	
13	NA		14,1	73	ES	
16	410	71	19	99	ES	
17			>1		ES	
14	396	69	20	104	IL	
1	315	55	5,91	31	RS	
2			4,3	22	RS	
3	>13.5		6,9	36	RS	
4	1400	244	31	161	RS	Ausreißer Xpt rs
7	280	49	8,6	45	RS	
8			1,8	9	RS	
15	472	82	8,3	43	RS	

AB*	50-150 %	AB*	50-150 %
Anzahl im AB	5	Anzahl im AB	4
Prozent im AB	63	Prozent im AB	33

Wiederfindungsrate  
100% Bezugsgröße:  
beta-Lactoglobulin, s. Seite 4

\* Akzeptanzbereich der AOAC für Allergen-ELISAs

**Methoden:**

BK = BioKits, Neogen  
ES = ELISA Systems

IL = Immunolab  
RS = Ridascreen®, R-Biopharm

Anmerkung:

63% 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 Kinderbrei-Probe B lagen 33% der Wiederfindungsraten in diesem Akzeptanzbereich.

**4.1.2 ELISA-Ergebnisse: Casein**

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

Auswertenummer	Probe A pos/neg	Probe A [mg/kg]	Probe B pos/neg	Probe B [mg/kg]	Qualitative Bewertung Übereinstimmungen mit Konsenswerten	Methode	Hinweis
17	negativ	<1	positiv	>30	2/2 (100%)	4L	
2	negativ	< 0.2	positiv		2/2 (100%)	AQ	
9	positiv	0,55	positiv	313	1/2 (50%)	AQ	
12	negativ	<1	positiv	435,9	2/2 (100%)	AQ	
16	negativ	<0,2	positiv	450	2/2 (100%)	AQ	
10	negativ	< 2,5	positiv	475	2/2 (100%)	BK	
13	negativ	<0,6	positiv	64,6	2/2 (100%)	ES	
14	negativ	< 0,1	positiv	250	2/2 (100%)	IL	
1	negativ	<2.5	positiv	100,58	2/2 (100%)	RS	
3	negativ		positiv	55,7	2/2 (100%)	RS	
4	negativ	<2,5	positiv	36	2/2 (100%)	RS	
6	negativ	<2,5	positiv	155	2/2 (100%)	RS	
7	negativ		positiv	176,3	2/2 (100%)	RS	
8	negativ	<0,5	positiv	269,7	2/2 (100%)	RS	
11	negativ		positiv	254	2/2 (100%)	RS	
15	negativ	<5	positiv	353,6	2/2 (100%)	RS	

	Probe A	Probe B
Anzahl positiv	1	16
Anzahl negativ	15	0
Prozent positiv	6	100
Prozent negativ	94	0
Konsenswert	negativ	positiv

**Methoden:**

4L = 4LabDiagnostics

AQ = AgraQuant, RomerLabs

BK = BioKits, Neogen

ES = ELISA Systems

IL = Immunolab

RS = Ridascreen®, R-Biopharm

Anmerkung:

Es wurden zum Nachweis von Casein mittels ELISA zu 94% negative Ergebnisse für Probe A und zu 100% positive Ergebnisse für Probe B erhalten. Das positive Ergebnis für Probe A liegt im Bereich der Nachweis- und Bestimmungsgrenzen der betreffenden Methode.

Die Konsenswerte stehen in qualitativer Übereinstimmung mit der Dotierung von Probe B.

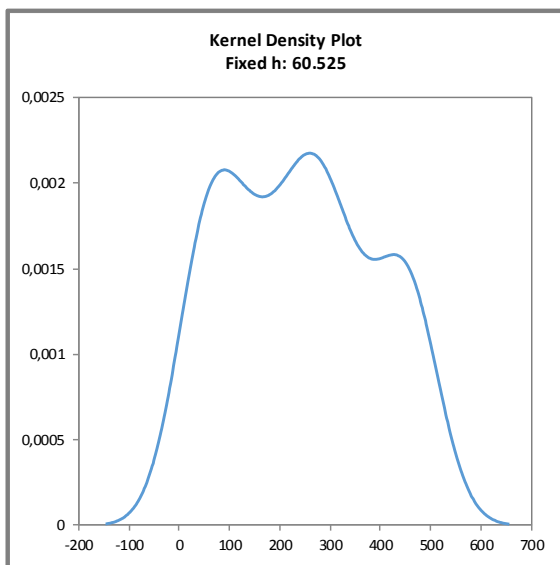
**Quantitative Auswertung der Ergebnisse: Probe B**

Auswertenummer	Casein [mg/kg]	z-Score X <sub>pt</sub> <sub>ALL</sub>	z-Score X <sub>pt</sub> <sub>RS</sub>	Methode	Hinweis
17	>30			4L	
2				AQ	
9	313			AQ	
12	435,9			AQ	
16	450			AQ	
10	475			BK	
13	64,6			ES	
14	250			IL	
1	100,58		-1,7	RS	
3	55,7		-2,7	RS	
4	36		-3,2	RS	
6	155		-0,5	RS	
7	176,3		0,0	RS	
8	269,7		2,2	RS	
11	254		1,8	RS	
15	353,6		4,1	RS	

**Methoden:**

4L = 4LabDiagnostics  
 AQ = AgraQuant, RomerLabs  
 BK = BioKits, Neogen

ES = ELISA Systems  
 IL = Immunolab  
 RS = Ridascreen®, R-Biopharm



**Abb. 5:** Kerndichte-Schätzung aller ELISA-Ergebnisse Casein (mit  $h = \sigma_{pt}$  von  $X_{pt_{ALL}}$ )

**Anmerkung:**

Die Kerndichte-Schätzung zeigt eine breite Verteilung mit mehreren Modalitäten, die sich nicht eindeutig zuordnen lassen: Die Methode AQ zeigt höhere Ergebnisse, während die Ergebnisse von Methode RS über einen weiteren Bereich verteilt liegen. Von den Methoden BK, ES und IL liegt jeweils nur ein quantitatives Ergebnis vor (s. Abb. 5).

Kenndaten: Quantitative Auswertung Casein**Probe B**

<b>Kenndaten</b>	<b>Alle Ergebnisse</b> [mg/kg]	<b>Methode RS</b> [mg/kg]
Zugewiesener Wert ( $X_{pt}$ )	$X_{ptALL}$	$X_{ptMETHOD RS}$
Anzahl der Messergebnisse	14	8
Anzahl der Ausreißer	-	0
Median	252	166
Robuster Mittelwert ( $X_{pt}$ )	242	175
Robuste Standardabweichung ( $S^*$ )	171	126
<i>Zielkenndaten:</i>		
Zielstandardabweichung $\sigma_{pt}'$		70,9
untere Grenze des Zielbereichs		33,4
obere Grenze des Zielbereichs		317
Quotient $S^*/\sigma_{pt}'$		1,8
Standardunsicherheit $U(X_{pt})$		55,7
Quotient $U(X_{pt})/\sigma_{pt}'$		0,79
Ergebnisse im Zielbereich		7
Prozent im Zielbereich		88%

**Methode:**

RS = R-Biopharm, Ridascreen Fast®

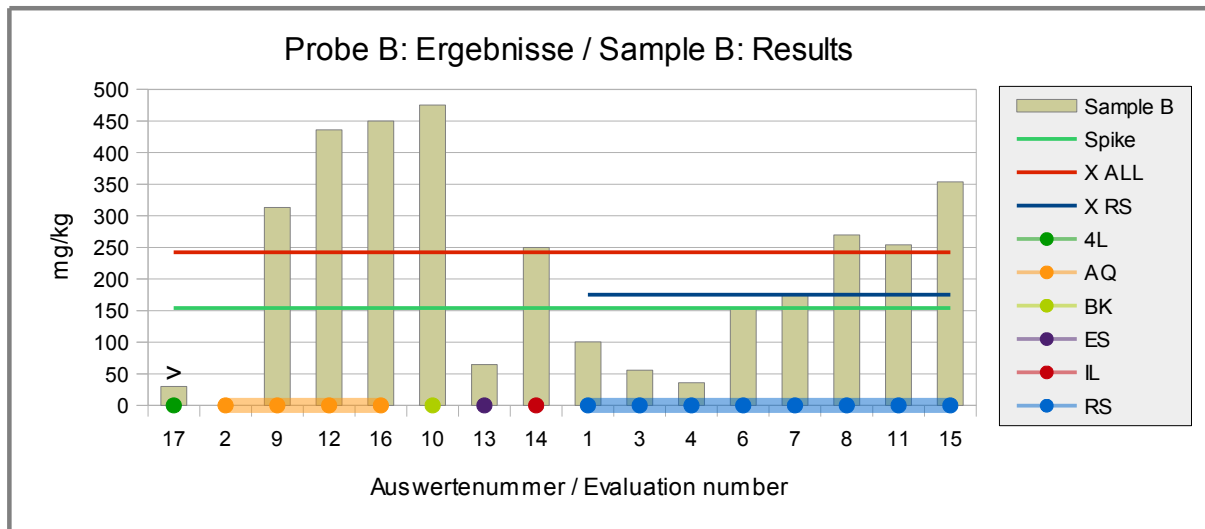
Anmerkungen zu den Kenndaten und Vergleich der Bezugswerte:

Die Ergebnisse aller Methoden zeigten eine nicht eindeutig Methoden zu zuordnende breite mehrmodale Verteilung (s. Abb. 5). Eine Methoden-übergreifende Auswertung wurde daher nicht vorgenommen.

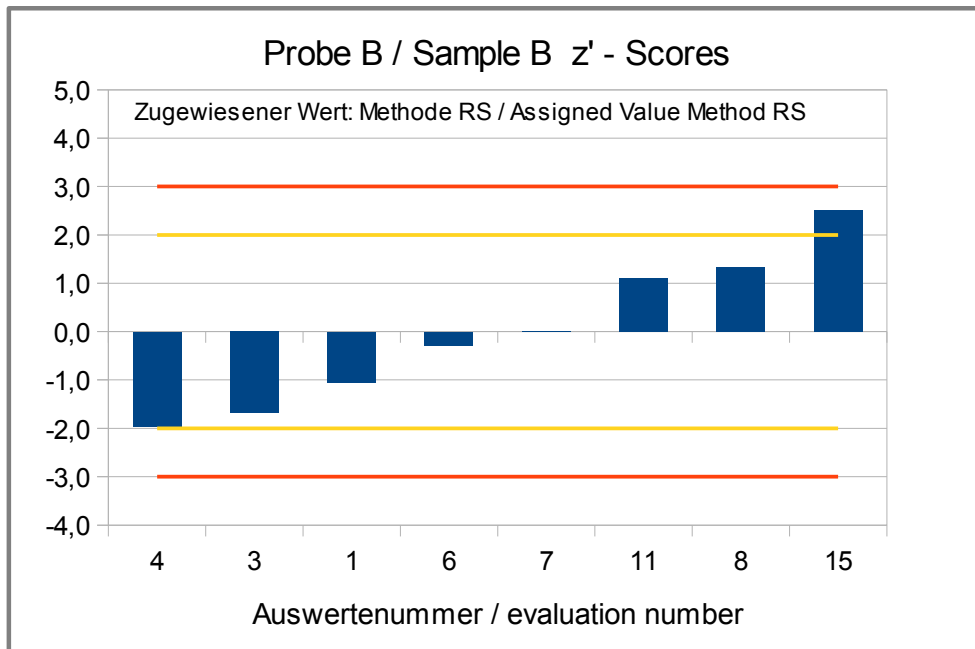
Die Auswertung der Ergebnisse von Methode RS zeigte eine erhöhte Variabilität der Ergebnisse. Die robuste Standardabweichung liegt oberhalb des Bereichs von etablierten Werten für die Vergleichsstandardabweichung der eingesetzten Bestimmungsmethode (vgl. 3.4.2 Auswertung eines Versuchs zur Präzision und 3.4.3 Werte aus Erkenntnissen). Der Quotient  $S^*/\sigma_{pt}$  lag deutlich über 2,0, sodass mittels z'-Score unter Berücksichtigung der Standardunsicherheit ausgewertet wurde. Der resultierende Quotient  $S^*/\sigma_{pt}'$  lag unter 2,0 (vgl. 3.6 bis 3.8).

Der robuste Mittelwert der Auswertung der Methode RS lag bei ca. 114% des Zusatzniveaus von Casein zu Probe B, und somit innerhalb der relevanten Anforderungen für die eingesetzte Methode (s. 3.4.3 und "Wiederfindungsraten für Casein" S.26).





**Abb. 6:** ELISA-Ergebnisse Casein  
 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. 7:** z'-Scores (ELISA-Ergebnisse als Casein)  
 Bezugswert robuster Mittelwert Ergebnisse Methode RS  
 (R-Biopharm, Ridascreen Fast)

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

Auswertenummer	Dotierungsmaterial	Wiederfindungsrate	Probe B	Wiederfindungsrate	Methode	Hinweis
	[mg/kg]	[%]	[mg/kg]	[%]		
17			>30		4L	
2					AQ	
9	8873	193	313	203	AQ	
12	>3750		435,9	283	AQ	
16	13000	283	450	292	AQ	
10	19000	414	475	308	BK	
13	NA		64,6	42	ES	
14	5900	<b>129</b>	250	162	IL	
1	4194	<b>91</b>	100,58	<b>65</b>	RS	
3	>67.5		55,7	36	RS	
4	4300	<b>94</b>	36	23	RS	
6	8500	185	155	<b>101</b>	RS	
7	8324	181	176,3	<b>114</b>	RS	
8			269,7	175	RS	
11	6460	<b>141</b>	254	165	RS	
15	8462,5	184	353,6	230	RS	

AB*	50-150 %	AB*	50-150 %
Anzahl im AB	<b>4</b>	Anzahl im AB	<b>3</b>
Prozent im AB	<b>40</b>	Prozent im AB	<b>21</b>

Wiederfindungsrate  
100% Bezugsgröße:  
Casein, s. Seite 4

\* Akzeptanzbereich der AOAC für Allergen-ELISAs

**Methoden:**

BK = BioKits, Neogen  
ES = ELISA Systems

IL = Immunolab  
RS = Ridascreen®, R-Biopharm

Anmerkung:

40% (4) 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 Kinderbrei-Probe B lagen 21% (3) der Wiederfindungsraten in diesem Akzeptanzbereich.

## 4.2 Vergleichsuntersuchung Gluten

### 4.2.1 ELISA-Ergebnisse: Gluten

#### 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		
7	positiv	19,2	positiv	78,8	1/2 (50%)	AQ	
14	negativ	< 1	positiv	100	2/2 (100%)	IL	Ergebnis umgerechnet *
1	negativ	<5	positiv	43,77	2/2 (100%)	RS	
2	negativ	< 5	positiv	45,2	2/2 (100%)	RS	
3	negativ		positiv	40,8	2/2 (100%)	RS	
4	negativ	<5	positiv	33	2/2 (100%)	RS	
6	negativ	<7	positiv	35	2/2 (100%)	RS	
8	negativ	<5	positiv	69	2/2 (100%)	RS	
9	negativ	<5	positiv	17	2/2 (100%)	RS	
12	negativ	<5	positiv	26,22	2/2 (100%)	RS	
13	negativ	<5	positiv	38,1	2/2 (100%)	RS	
15	negativ	<0,25	positiv	44,1	2/2 (100%)	RS	
16	negativ	<5	positiv	41	2/2 (100%)	RS	
17	negativ	<3	positiv	21,9	2/2 (100%)	RS	
10	negativ	< 5	positiv	61,4	2/2 (100%)	VT	
16	negativ	<10	positiv	67	2/2 (100%)	VT	

\* Umrechnung S. 15

	Probe A		Probe B	
Anzahl positiv	1		16	
Anzahl negativ	15		0	
Prozent positiv	6		100	
Prozent negativ	94		0	
Konsenswert	negativ		positiv	

Wiederfindungsrate  
100% Bezugsgröße:  
Gluten, s. Seite 4

#### Methoden:

AQ = AgraQuant, RomerLabs  
IL = Immunolab

RS = Ridascreen®, R-Biopharm  
VT = Veratox, Neogen

#### Anmerkung:

Es wurden zum Nachweis von Gluten mittels ELISA zu 94% negative Ergebnisse für Probe A und zu 100% positive Ergebnisse für Probe B erhalten. Ein positives Ergebnis für Probe A wurde mit der Methode AQ (AgraQuant G12) erhalten. Laut Testkit-Hersteller detektiert der Kit (im Gegensatz zu den anderen Methoden) auch Prolamine aus Hafer. Die zwei PCR Ergebnisse der Methode Sure Food Gluten, die laut Testkit-Hersteller ebenfalls Hafer detektiert, sind uneinheitlich bezüglich Probe A. Es kann jedoch nicht ausgeschlossen werden, dass Spuren von Hafer in der Probe vorlagen.

Die Konsenswerte stehen in qualitativer Übereinstimmung mit der Dotierung von Probe B.

**Quantitative Auswertung der Ergebnisse: Probe B**

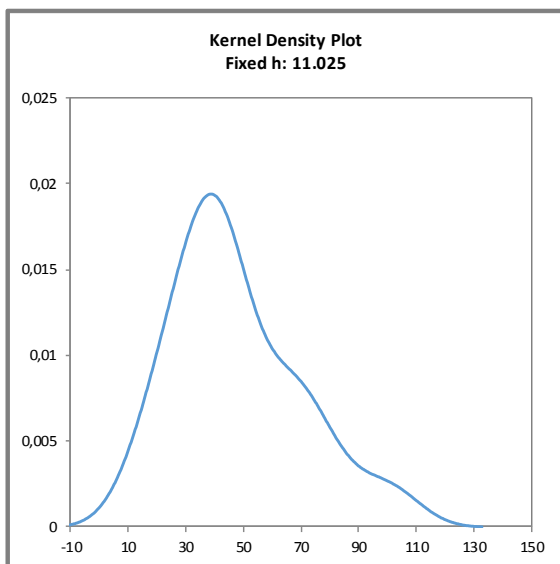
Auswertenummer	Gluten [mg/kg]	z-Score X <sub>pt</sub> ALL	z-Score X <sub>pt</sub> RS	Methode	Hinweis
7	78,8	2,8		AQ	
14	100	4,6		IL	Ergebnis umgerechnet *
1	43,77	-0,2	0,7	RS	
2	45,2	-0,1	0,9	RS	
3	40,8	-0,5	0,4	RS	
4	33	-1,2	-0,4	RS	
6	35	-1,0	-0,2	RS	
8	69	2,0	3,5	RS	
9	17	-2,5	-2,2	RS	
12	26,22	-1,7	-1,2	RS	
13	38,1	-0,7	0,1	RS	
15	44,1	-0,2	0,8	RS	
16	41	-0,5	0,4	RS	
17	21,9	-2,1	-1,6	RS	
10	61,4	1,3		VT	
16	67	1,8		VT	

\* Umrechnung S. 15

**Methoden:**

AQ = AgraQuant, RomerLabs  
 IL = Immunolab

RS = Ridascreen®, R-Biopharm  
 VT = Veratox, Neogen



**Abb. 8:** Kerndichte-Schätzung aller ELISA-Ergebnisse Gluten (mit  $h = \sigma_{pt}$  von  $X_{ptALL}$ )

Anmerkung:

Die Kerndichte-Schätzung zeigt eine Normalverteilung der Ergebnisse mit zwei leichten Schultern bei 60-80 mg/kg (Methoden AQ u. VT) und 100 mg/kg (Methode IL) (s. Abb. 8).

Kenndaten: Quantitative Auswertung Gluten**Probe B**

<b>Kenndaten</b>	<b>Alle Ergebnisse</b> [mg/kg]	<b>Methode RS</b> [mg/kg]
Zugewiesener Wert ( $X_{pt}$ )	$X_{ptALL}$	$X_{ptMETHOD RS}$
Anzahl der Messergebnisse	16	12
Anzahl der Ausreißer	0	0
Median	42,4	39,5
Robuster Mittelwert ( $X_{pt}$ )	46,3	36,9
Robuste Standardabweichung ( $S^*$ )	21,9	11,7
<i>Zielkenndaten:</i>		
Zielstandardabweichung $\sigma_{pt}$	11,6	9,23
untere Grenze des Zielbereichs	23,2	18,5
obere Grenze des Zielbereichs	69,5	55,4
Quotient $S^*/\sigma_{pt}$	1,9	1,3
Standardunsicherheit $U(X_{pt})$	6,86	4,24
Quotient $U(X_{pt})/\sigma_{pt}$	0,59	0,46
Ergebnisse im Zielbereich	11	11
Prozent im Zielbereich	69%	92%

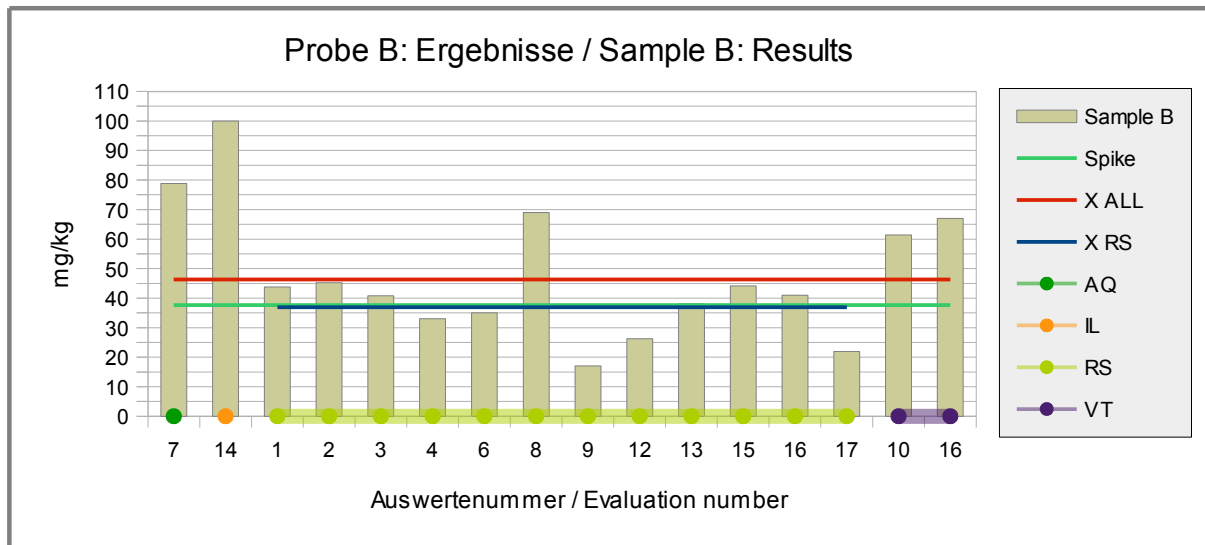
**Methode:**

RS = R-Biopharm, Ridascreen®

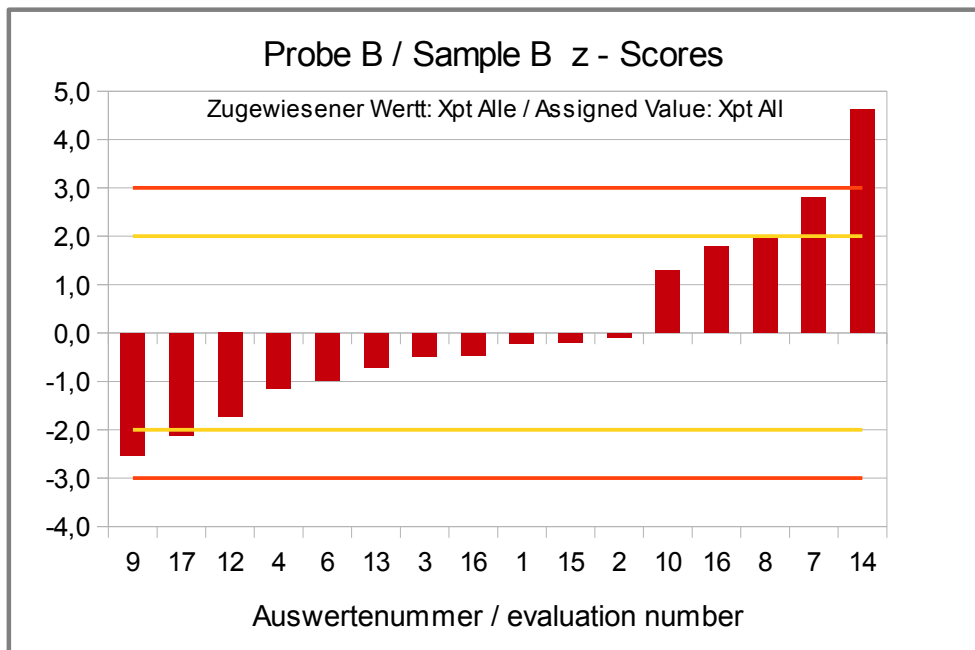
Anmerkungen zu den Kenndaten und Vergleich der Bezugswerte:

Die Auswertungen der Ergebnisse aller Methoden und von Methode RS1 zeigten eine normale bis geringe Variabilität der Ergebnisse. Der Quotient  $S^*/\sigma_{pt}$  lag jeweils 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. Diese Aussage ist für die methodenübergreifende Auswertung nur eingeschränkt gültig, da für die Methoden AQ, IL und VT jeweils nur wenige Ergebnisse vorlagen und diese sämtlich über dem robusten Mittelwert aller Ergebnisse lagen.

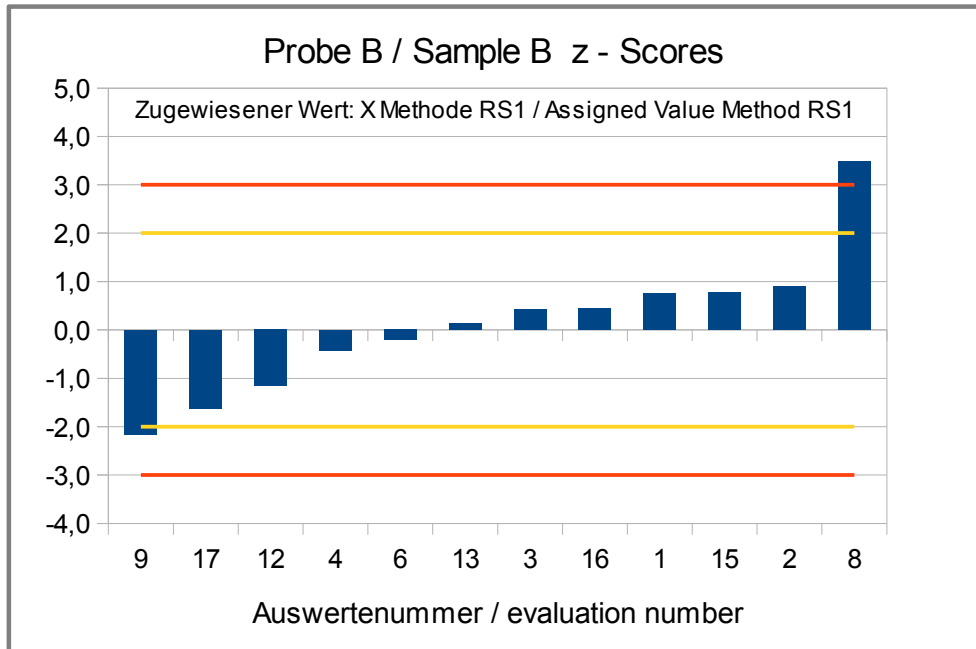
Die robusten Mittelwerte der Auswertungen lagen mit 123% bzw. 98% vom Zusatzniveau von Gluten zu Probe B, innerhalb der relevanten Anforderungen für die eingesetzten Methoden (s. 3.4.3 und "Wiederfindungsraten für Gluten" S.32).



**Abb. 9:** ELISA-Ergebnisse Gluten  
 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. 10:** z-Scores (ELISA-Ergebnisse als Gluten)  
 Zugewiesener Wert: robuster Mittelwert aller Ergebnisse



**Abb. 11:** z-Scores (ELISA-Ergebnisse als Gluten)  
 Bezugswert robuster Mittelwert Ergebnisse Methode RS  
 (R-Biopharm, Ridascreen)

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

Auswertenummer	Dotierungsmaterial	Wiederfindungsrate	Probe B	Wiederfindungsrate	Methode	Hinweis
	[mg/kg]	[%]	[mg/kg]	[%]		
7	1035	<b>63</b>	78,8	210	AQ	
14	2940	178	100	266	IL	Ergebnis umgerechnet *
1	934	<b>57</b>	43,77	<b>116</b>	RS	
2			45,2	<b>120</b>	RS	
3	>320		40,8	<b>109</b>	RS	
4	11021	668	33	<b>88</b>	RS	
6	785	48	35	<b>93</b>	RS	
8			69	184	RS	
9	375	23	17	45	RS	
12	735,34	45	26,22	<b>70</b>	RS	
13	NA		38,1	<b>101</b>	RS	
15	1501,3	<b>91</b>	44,1	<b>117</b>	RS	
16	750	45	41	<b>109</b>	RS	
17			21,9	<b>58</b>	RS	
10			61,4	163	VT	
16	-		67	178	VT	

\* Umrechnung S. 15

AB*	50-150 %	AB*	50-150 %
Anzahl im AB	<b>3</b>	Anzahl im AB	<b>10</b>
Prozent im AB	<b>33</b>	Prozent im AB	<b>63</b>

\* Akzeptanzbereich der AOAC für Allergen-ELISAs

Wiederfindungsrate  
100% Bezugsgröße:  
Gluten, s. Seite 4

**Methoden:**

AQ = AgraQuant, RomerLabs  
IL = Immunolab

RS = Ridascreen®, R-Biopharm  
VT = Veratox, Neogen

Anmerkung:

33% (3) 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 Kinderbrei-Probe B lagen 69% der Wiederfindungsraten in diesem Akzeptanzbereich.



**4.2.2 PCR-Ergebnisse: Glutenhaltige Getreide**

Auswertenummer	Probe A	Probe A	Probe B	Probe B	Qualitative Bewertung	Methode	Hinweis
	pos/neg	[mg/kg]	pos/neg	[mg/kg]	Übereinstimmungen mit Konsenswerten		
3	positiv		positiv		-	SFA	
17	negativ		positiv		-	SFA	
16	negativ		positiv		-	div	

**Methoden:**

SFA = Sure Food Allergen,  
R-Biopharm / Congen

div = keine genaue Angabe / andere Methode

**Anmerkung:**

Zum Nachweis von DNA glutenhaltiger Getreide mittels PCR wurden 3 positive Ergebnisse für Probe B erhalten. Dies steht in qualitativer Übereinstimmung mit der Dotierung von Probe B.

Für Probe A wurden ein positives und zwei negative Ergebnisse erhalten. Bei den ELISA-Ergebnissen wurde ebenfalls ein positives Ergebnis erhalten (vgl. S.27).

## 5. Dokumentation

### 5.1 Angaben der Teilnehmer

#### 5.1.1 ELISA: $\beta$ -Lactoglobulin

Primärdaten

Auswertenummer	Ergebnis Probe A		Ergebnis Probe B		Ergebnis Dotierungsprobe		Angabe quantitatives Ergebnis als	Meth. Abk.	Methode
	qualitativ	mg/kg	qualitativ	mg/kg	qualitativ	mg/kg			
9	negativ	<5	positiv	63	positiv	1150	beta-Lactoglobulin	BK	BioKits $\beta$ -Lactoglobulin Assay Kit, Neogen
6	negativ	<0,1	positiv	22	positiv	330	beta-Lactoglobulin	ES	ELISA-Systems $\beta$ -Lactoglobulin Residue Detection ELISA
13	negativ	<0,2	positiv	14,1	NA	NA	beta-Lactoglobulin	ES	ELISA-Systems $\beta$ -Lactoglobulin Residue Detection ELISA
16	negativ	<0,1	positiv	19	positiv	410	beta-Lactoglobulin	ES	ELISA-Systems $\beta$ -Lactoglobulin Residue Detection ELISA
17	negativ	<0,05	positiv	>1	-		Given as	ES	ELISA-Systems $\beta$ -Lactoglobulin Residue Detection ELISA
14	negativ	< 0,01	positiv	20	positiv	396	beta-Lactoglobulin	IL	Immunolab $\beta$ -Lactoglobulin ELISA
1	negativ	<0.5	positiv	5,91	positiv	315	beta-Lactoglobulin	RS	Ridascreen Fast $\beta$ -Lactoglobulin (R4902), r-Biopharm
2	negativ	< 0.5	positiv	4,3	-		beta-Lactoglobulin	RS	Ridascreen Fast $\beta$ -Lactoglobulin (R4902), r-Biopharm
3	negativ		positiv	6,9	positiv	>13.5	beta-Lactoglobulin	RS	Ridascreen Fast $\beta$ -Lactoglobulin (R4902), r-Biopharm
4	negativ	<0,5	positiv	31	positiv	1400	beta-Lactoglobulin	RS	Ridascreen Fast $\beta$ -Lactoglobulin (R4902), r-Biopharm
7	negativ		positiv	8,6	positiv	280	beta-Lactoglobulin	RS	Ridascreen Fast $\beta$ -Lactoglobulin (R4902), r-Biopharm
8	-	<1	-	1,8	-		beta-Lactoglobulin	RS	Ridascreen Fast $\beta$ -Lactoglobulin (R4902), r-Biopharm
15	-	<5	-	8,3	-	472	$\beta$ -Lactoglobulin	RS	r-biopharm, RIDASCREEN®FAST $\beta$ -Lactoglobulin (R4902)

#### Methoden:

BK = BioKits, Neogen

ES = ELISA Systems

IL = Immunolab

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	
9	BK			
6	ES			
13	ES	$\beta$ -Lactoglobulin	Hersteller Extraktionslösung / 15 min / 60C	
16	ES			
17	ES			
14	IL			
1	RS	wie in der Beschreibung angegeben	nach Herstelleranleitung	Probe wurde fest bei Zugabe der ersten Extraktionslösung. Um eine flüssige Mischung zu erhalten, wurde die halbe zweite Extraktionslösung einen Schritt früher zugegeben und die zweite Hälfte im zweiten Schritt zugegeben.
2	RS			
3	RS			
4	RS			
7	RS			
8	RS	Monoklonale spezifisch gegen beta-Lactoglobulin	Extraktionslösung 2/10min/100°C + A-AEP/10min/60°C	
15	RS		nach Herstelleranleitung	

**5.1.2 ELISA: Casein***Primärdaten*

Auswertenummer	Ergebnis Probe A		Ergebnis Probe B		Ergebnis Dotierungsprobe		Angabe quantitatives Ergebnis als	Meth. Abk.	Methode
	qualitativ	mg/kg	qualitativ	mg/kg	qualitativ	mg/kg			
17	negativ	<1	positiv	>30	-		Ergebnis als	4L	Test-Kit + Anbieter
2	negativ	< 0.2	positiv		-		Casein	AQ	AgraQuant Casein (CO-KAL1200), RomerLabs
9	positiv	0,55	positiv	313	positiv	8873	Casein	AQ	AgraQuant Casein (CO-KAL1200), RomerLabs
12	negativ	<1	positiv	435,9	positiv	>3750	Casein	AQ	AgraQuant Casein (CO-KAL1200), RomerLabs
16	negativ	<0,2	positiv	450	positiv	13000	Casein	AQ	AgraQuant Casein (CO-KAL1200), RomerLabs
10	negativ	< 2,5 ppm	positiv	475 ppm	positiv	1,90%	Casein	BK	BioKits Casein Assay Kit, Neogen
13	negativ	<0,6	positiv	64,6	NA	NA	Casein	ES	ELISA-Systems Casein Residue Detection ELISA
14	negativ	< 0,1	positiv	250	positiv	5900	Casein	IL	Immunolab Casein ELISA
1	negativ	<2.5	positiv	100,58	positiv	4194	Casein	RS	Ridascreen Fast Casein (R4612), r-Biopharm
3	negativ		positiv	55,7	positiv	>67.5	Casein	RS	Ridascreen Fast Casein (R4612), r-Biopharm
4	negativ	<2,5	positiv	36	positiv	4300	Casein	RS	Ridascreen Fast Casein (R4612), r-Biopharm
6	negativ	<2,5	positiv	155	positiv	8500	Casein	RS	Ridascreen Fast Casein (R4612), r-Biopharm
7	negativ		positiv	176,3	positiv	8324	Casein	RS	Ridascreen Fast Casein (R4612), r-Biopharm
8	-	<0,5	-	269,7	-		Casein	RS	Ridascreen Fast Casein (R4612), r-Biopharm
11	negativ		-	254	-	6460	Casein	RS	Ridascreen Fast Casein (R4612), r-Biopharm
15	-	<5	-	353,6	-	8462,5	Casein	RS	r-biopharm, RIDASCREEN®FAST Casein (R4612)

**Methoden:**

4L = 4LabDiagnostics

AQ = AgraQuant, RomerLabs

BK = BioKits, Neogen

ES = ELISA Systems

IL = Immunolab

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	
17	4L			
2	AQ			
9	AQ			
12	AQ	Casein	Extraktionslösung / 15 min / 60°C	Spiking sample: 1:4000; sample A/B: 1:500;
16	AQ			
10	BK	Casein		Verwendung von Veratox Casein Allergen
13	ES	Casein	Extraktionslösung / 15 min / 60°C	
14	IL			
1	RS	wie in der Beschreibung angegeben	nach Herstelleranleitung	Probe wurde fest bei Zugabe der ersten Extraktionslösung. Um eine flüssige Mischung zu erhalten, wurde die halbe zweite Extraktionslösung einen Schritt früher zugegeben und die zweite Hälfte im zweiten Schritt zugegeben.
3	RS			
4	RS			
6	RS			
7	RS		Aufarbeitung für Kindernahrung (Aufarbeitung mit AEP), BG 0,5ppm	
8	RS	Casein	Allergen Extraktionspuffer verdünnt/10min/60°C	
11	RS	Casein		
15	RS		nach Herstelleranleitung	

**5.1.3 ELISA: Gluten***Primärdaten*

Auswertenummer	Ergebnis Probe A		Ergebnis Probe B		Ergebnis Dotierungsprobe		Angabe quantitatives Ergebnis als	Meth. Abk.	Methode
	qualitativ	mg/kg	qualitativ	mg/kg	qualitativ	mg/kg			
									Test-Kit + Anbieter
7	positiv	19,2	positiv	78,8	positiv	1035	Gluten	AQ	AgraQuant Gluten G12, RomerLabs
14	negativ	< 1	positiv	50	positiv	1470	Gliadin	IL	Immunolab Gliadin GLU-E02
1	negativ	<5	positiv	43,77	positiv	934	Gluten	RS	Ridascreen Gluten (R7001), r-Biopharm
2	negativ	< 5	positiv	45,2	positiv		Gluten	RS	Ridascreen Gluten (R7001), r-Biopharm
3	negativ		positiv	40,8	positiv	>320	Gluten	RS	Ridascreen Gluten (R7001), r-Biopharm
4	negativ	<5	positiv	33	positiv	11021	Gluten	RS	Ridascreen Gluten (R7001), r-Biopharm
6	negativ	<7	positiv	35	positiv	785	Gluten	RS	Ridascreen Gluten (R7001), r-Biopharm
8	-	<5	-	69	-		Gluten	RS	Ridascreen Gluten (R7001), r-Biopharm
9	negativ	<5	positiv	17	positiv	375	Gluten	RS	Ridascreen Gluten (R7001), r-Biopharm
12	negativ	<5	positiv	26,22	positiv	735,34	Gluten	RS	Ridascreen Gluten (R7001), r-Biopharm
13	negativ	<5	positiv	38,1	NA	NA	Gluten	RS	Ridascreen Gluten (R7001), r-Biopharm
15	-	<0,25	-	44,1	-	1501,3	Gluten	RS	r-biopharm, RIDASCREEN®FAST Gliadin (R7001)
16	negativ	<5	positiv	41	positiv	750	Gluten	RS	Ridascreen Gluten (R7001), r-Biopharm
17	negativ	<3	positiv	21,9	-		Ergebnis als	RS	Ridascreen Gluten (R7001), r-Biopharm
10	negativ	< 5 ppm	positiv	61,4 ppm	positiv		Gluten	VT	Veratox Gliadin R5, Neogen
16	negativ	<10	positiv	67	-	-	Gluten	VT	Veratox Gliadin, Neogen

**Methoden :**

AQ = AgraQuant, RomerLabs  
 IL = Immunolab

RS = Ridascreen®, R-Biopharm  
 VT = Veratox, Neogen

## Weitere Angaben zu den Methoden

Auswertenummer	Meth. Abk.	Spezifität	Hinweise zur Methode (Extraktion und Bestimmung)	Sonstige Hinweise
		Antikörper	z.B. Extraktionslösung / Zeit / Temperatur	
7	AQ			
14	IL			
1	RS	wie in der Beschreibung angegeben	nach Herstelleranleitung	Probe wurde fest bei Zugabe der ersten Extraktionslösung. Um eine flüssige Mischung zu erhalten, wurde die halbe zweite Extraktionslösung einen Schritt früher zugegeben und die zweite Hälfte im zweiten Schritt zugegeben.
2	RS		Cocktail-Lösung	
3	RS			
4	RS	R5		
6	RS			
8	RS	R5-Mendez	Cocktail-Lösung/40min/50°C+ Etanol 80% / 1 h / RT	
9	RS			
12	RS	Gliadin	Cocktail-Lösung Art. Nr. R7006 / 60 min / 25°C	Spiking sample: 1:4000; sample A/B: 1:500;
13	RS	Gluten (R5)	Cocktail solution / 40 min / 50C	
15	RS		nach Herstelleranleitung	
16	RS			
17	RS			
10	VT	Gliadin		
16	VT			

**5.1.4 PCR: Glutenthaltige Getreide**

*Primärdaten*

Auswertenummer	Ergebnis Probe A		Ergebnis Probe B		Ergebnis Dotierungsprobe		Angabe quantitatives Ergebnis als	Meth. Abk.	Methode
	qualitativ	mg/kg	qualitativ	mg/kg	qualitativ	mg/kg			
3	positiv		positiv		positiv		Gluten	SFA	Sure Food Allergen, Congen / r-Biopharm
17	negativ		positiv					SFA	Sure Food Allergen, Congen / r-Biopharm
16	negativ	-	positiv	-	positiv	-	Weizen-DNA, Roggen-DNA, Gersten DNA	div	interne Methode

**Methoden :**

SFA = Sure Food Allergen,  
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	
3	SFA			
17	SFA			
16	div		CTAB / Protease K / Chloroform + Promega Wizard/ Endpunkt PCR/ 4% Agarosegel / 45 Zyklen	



**5.2 Homogenität**

**5.2.1 Mischungshomogenität vor der Abfüllung**

**Microtracer Homogenitätstest**

**Dotierungsmaterialprobe**

Gewicht Gesamtprobe	1,21	kg
Microtracer	FSS-rot lake	
Teilchengröße	75 – 300	µm
Gewicht pro Partikel	2,0	µg
Tracerzugabe	35,8	mg/kg

**Analysenergebnisse:**

Probe	Einwaage [g]	Partikel Anzahl	Partikel [mg/kg]
1	6,41	123	38,4
2	5,33	101	37,9
3	5,99	92	30,7
4	6,16	97	31,5
5	5,96	92	30,9
6	5,55	106	38,2
7	5,77	102	35,4
8	5,80	108	37,2

**Poisson-Verteilung**

Probenanzahl	8
Freiheitsgrad	7
Mittelwert	102,8 Partikel
Standardabweichung	10,1 Partikel
$\chi^2$ (CHI-Quadrat)	6,95
<b>Wahrscheinlichkeit</b>	<b>43</b> %
Wiederfindungsrate	98 %

**Normalverteilung**

Probenanzahl	8
Mittelwert	35,0 mg/kg
Standardabweichung	3,44 mg/kg
rel. Standardabweichung	9,82 %
Horwitz Standardabweichung	9,37 %
<b>HorRat-Wert</b>	<b>1,0</b>
Wiederfindungsrate	98 %

**Microtracer Homogenitätstest**

**DLA 03-2016 Probe B**

Gewicht Gesamtprobe	2,07	kg
Microtracer	FSS-rot lake	
Teilchengröße	75 – 300	µm
Gewicht pro Partikel	2,0	µg
Tracerzugabe	19,6	mg/kg

**Analysenergebnisse:**

Probe	Einwaage [g]	Partikel Anzahl	Partikel [mg/kg]
1	6,6	67	20,5
2	5,9	55	18,7
3	5,7	45	15,8
4	6,8	49	14,5
5	6,1	53	17,4
6	6,8	55	16,1
7	6,2	59	19,1
8	5,5	39	14,2

**Poisson-Verteilung**

Probenanzahl	8
Freiheitsgrad	7
Mittelwert	52,7 Partikel
Standardabweichung	6,97 Partikel
$\chi^2$ (CHI-Quadrat)	6,46
<b>Wahrscheinlichkeit</b>	<b>49</b> %
Wiederfindungsrate	87 %

**Normalverteilung**

Probenanzahl	8
Mittelwert	17,0 mg/kg
Standardabweichung	2,25 mg/kg
rel. Standardabweichung	13,2 %
Horwitz Standardabweichung	10,4 %
<b>HorRat-Wert</b>	<b>1,3</b>
Wiederfindungsrate	87 %

## 6. Verzeichnis der teilnehmenden Institute in alphabetischer Reihenfolge

Teilnehmer / Participant	Ort / Town	Land / Country
		SPANIEN
		FRANKREICH
		KANADA
		ITALIEN
		Deutschland
		Deutschland
		Deutschland
		Deutschland
		SCHWEDEN
		Deutschland
		SPANIEN
		BELGIEN
		GROSSBRITANIEN
		Deutschland
		GROSSBRITANIEN
		Deutschland
		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 17025:2005; Allgemeine Anforderungen an die Kompetenz von Prüf- und Kalibrierlaboratorien / General requirements for the competence of testing and calibration laboratories
2. DIN EN ISO/IEC 17043:2010; Konformitätsbewertung - Allgemeine Anforderungen an Eignungsprüfungen / Conformity assessment - General requirements for proficiency testing
3. ISO 13528:2015 & DIN ISO 13528:2009; Statistische Verfahren für Eignungsprüfungen durch Ringversuche / Statistical methods for use in proficiency testing by interlaboratory comparisons
4. ASU §64 LFGB: Planung und statistische Auswertung von Ringversuchen zur Methodvalidierung / DIN ISO 5725 series part 1, 2 and 6 Accuracy (trueness and precision) of measurement methods and results
5. Verordnung / Regulation 882/2004/EU; Verordnung über über amtliche Kontrollen zur Überprüfung der Einhaltung des Lebensmittel- und Futtermittelrechts sowie der Bestimmungen über Tiergesundheit und Tierschutz / Regulation on official controls performed to ensure the verification of compliance with feed and food law, animal health and animal welfare rules
6. Evaluation of analytical methods used for regulation of food and drugs; W. Horwitz; Analytical Chemistry, 54, 67-76 (1982)
7. The International Harmonised Protocol for the Proficiency Testing of Analytical Laboratories ; J.AOAC Int., 76(4), 926 - 940 (1993)
8. A Horwitz-like funktion describes precision in proficiency test; M. Thompson, P.J. Lowthian; Analyst, 120, 271-272 (1995)
9. Protocol for the design, conduct and interpretation of method performance studies; W. Horwitz; Pure & Applied Chemistry, 67, 331-343 (1995)
10. 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)
11. The International Harmonised Protocol for the Proficiency Testing of Analytical Chemistry Laboratories; Pure Appl Chem, 78, 145 - 196 (2006)
12. 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
13. EURACHEM/CITAC Leitfaden, Ermittlung der Messunsicherheit bei analytischen Messungen (2003); Quantifying Uncertainty in Analytical Measurement (1999)
14. GMP+ Feed Certification scheme, Module: Feed Safety Assurance, chapter 5.7 Checking procedure for the process accuracy of compound feed with micro tracers in GMP+ BA2 Control of residues, Version: 1st of January 2015 GMP+ International B.V.
15. MTSE SOP No. 010.01 (2014): Quantitative measurement of mixing uniformity and carry-over in powder mixtures with the rotary detector technique, MTSE Micro Tracers Services Europe GmbH
16. Codex Alimentarius Commission (2010) - Guidelines on performance criteria and validation of methods for detection, identification and quantification of specific DNA sequences and specific proteins in foods, CAC/GL 74-2010
17. DIN EN ISO 15633-1:2009; Nachweis von Lebensmittelallergenen mit immunologischen Verfahren - Teil 1: Allgemeine Betrachtungen / Foodstuffs - Detection of food allergens by immunological methods - Part 1: General considerations
18. DIN EN ISO 15634-1:2009; Nachweis von Lebensmittelallergenen mit molekularbiologischen Verfahren - Teil 1: Allgemeine Betrachtungen / Foodstuffs - Detection of food allergens by molecular biological methods - Part 1: General considerations
19. DIN EN ISO 15842:2010 Lebensmittel - Nachweis von Lebensmittelallergenen - Allgemeine Betrachtungen und Validierung von Verfahren / Foodstuffs - Detection of food allergens - General considerations and validation of

- methods
20. Ministry of Health and Welfare, JSM, Japan 2006
  21. 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)
  22. 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)
  23. 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)
  24. EFSA (2014) Scientific Opinion on the evaluation of allergenic foods and food ingredients for labelling purposes<sup>1</sup>, EFSA Panel on Dietetic Products, Nutrition and Allergies (NDA), European Food Safety Authority (EFSA), Parma, Italy, EFSA Journal 2014;12(11):3894
  25. 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
  26. Jayasena et al. (2015) Comparison of six commercial ELISA kits for their specificity and sensitivity in detecting different major peanut allergens. J Agric Food Chem. 2015 Feb 18;63(6):1849-55
  27. ASU §64 LFGB L 06.00-56 Bestimmung von Sojaprotein in Fleisch und Fleischerzeugnissen Enzymimmunologisches Verfahren (2007)
  28. ASU §64 LFGB L 00.00-69 Bestimmung von Erdnuss-Kontaminationen in Lebensmitteln mittels ELISA im Mikrotiterplattensystem (2003)
  29. ASU §64 LFGB L 44.00-7 Bestimmung von Haselnuss-Kontaminationen in Schokolade und Schokoladenwaren mittels ELISA im Mikrotiterplattensystem (2006)
  30. Šturm et al.; Enzyme-Linked Immunosorbent Assay Kit for Beta-Lactoglobulin Determination: Interlaboratory Study, JAOAC 92:1519-25 (2009)
  31. Šturm et al.; ELISA Kit for Casein Determination: Interlaboratory Study, JAOAC 93:676-682 (2010)

### DLA-03/2016-Allergene III

Alle 17 Teilnehmer haben mindestens ein Ergebnis eingereicht. Die Auswertung erfolgte hinsichtlich der Parameter  $\beta$ -Lactoglobulin, Casein und Gluten für ELISA-Methoden. Zusätzlich wurden Wiederfindungsraten für die Dotierungsmaterialprobe und die dotierte Probe ermittelt. Details zu den einzelnen Parametern inklusive separater Auswertung nach Test-kit-Herstellern sind dem Auswertebereicht zu entnehmen. Für glutenhaltige Getreide wurden wenige PCR-Ergebnisse übermittelt.

8 Teilnehmer hatten ihren Sitz im Europäischen Ausland (Belgien, Frankreich, Großbritannien, Italien, Schweden, Schweiz, Spanien). Ein Teilnehmer hatte seinen Sitz im Außer-Europäischen Ausland (Kanada).