

Proficiency Tests

DLA

food
cosmetics
consumer goods
www.dla-lvu.de

Auswertungs-Bericht

Laborvergleichsuntersuchung

DLA 05/2016

Allergene V:

Erdnuss und Mandel

in Backware (Butterkeks)

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

Allgemeine Informationen zur Eignungsprüfung (EP)
General Information on the proficiency test (PT)

<i>EP-Anbieter</i> <i>PT-Provider</i>	DLA - Dienstleistung Lebensmittel Analytik GbR Gesellschafter: Dr. Gerhard Wichmann und Dr. Matthias Besler Waldemar-Bonsels-Weg 170, 22926 Ahrensburg, Germany Tel. ++49(0)171-1954375 Fax. ++49(0)4102-9944976 eMail. proficiency-testing@dla-lvu.de
<i>EP-Nummer</i> <i>PT-Number</i>	DLA 05/2016
<i>EP-Koordinator</i> <i>PT-Coordinator</i>	Dr. Matthias Besler
<i>Status des EP-Bericht</i> <i>Status of PT-Report</i>	Abschlussbericht / Final report (30. Januar 2017) Gültig ist die jeweils letzte Version/Korrektur des Berichts. Sie ersetzt alle vorangegangenen Versionen. Only the latest version/correction of the report is valid. It replaces all preceding versions.
<i>EP-Bericht Freigabe</i> <i>PT-Report Authorization</i>	Dr. Matthias Besler (Technischer Leiter / Technical Manager) - <i>gezeichnet / signed M. Besler</i> Dr. Gerhard Wichmann (QM-Beauftragter / Quality Manager) - <i>gezeichnet / signed G. Wichmann</i> Datum / Date: 30. Januar 2017
<i>Unteraufträge</i> <i>Subcontractors</i>	Die Prüfung der Gehalte, Homogenität und Stabilität von EP-Parametern wird von DLA im Unterauftrag vergeben. The analysis of the content, homogeneity and stability of PT-parameters are subcontracted by DLA.

Erratum:

Seite 6 mittlere Überschrift muss lauten „Homogenität der abgefüllten dotierten Probe B“
Page 6 middle headline must be „Homogeneity of bottled spiked sample B“
(corrected by M.Besler 02/02/2017)

Inhalt

1. Einleitung.....	4
2. Durchführung.....	4
2.1 Untersuchungsmaterial.....	4
2.1.1 Homogenität.....	6
2.2 Probenversand und Informationen zur Untersuchung.....	9
2.3 Ergebnisübermittlung.....	9
3. Auswertung.....	10
3.1 Konsenswert der Teilnehmer (zugewiesener Wert).....	10
3.2 Robuste Standardabweichung.....	11
3.3 Ausschluss von Ergebnissen und Ausreißer.....	11
Ausschluss von Ergebnissen	11
3.4 Zielstandardabweichung (für die Eignungsbeurteilung).....	12
3.4.1 Allgemeines Modell nach Horwitz.....	12
3.4.2 Auswertung eines Versuchs zur Präzision	12
3.4.3 Werte aus Erkenntnissen	15
3.5 z-Score.....	16
3.6 z'-Score.....	17
3.7 Quotient S^*/opt	17
3.8 Standardunsicherheit des zugewiesenen Werts.....	17
3.9 Graphische Darstellung der Bezugswerte.....	18
3.10 Wiederfindungsraten: Dotierung.....	18
4. Ergebnisse.....	19
4.1 Vergleichsuntersuchung Erdnuss.....	21
4.1.1 ELISA-Ergebnisse: Erdnuss.....	21
4.1.2 PCR-Ergebnisse: Erdnuss.....	27
4.2 Vergleichsuntersuchung Mandel.....	30
4.2.1 ELISA-Ergebnisse: Mandel.....	30
4.2.2 PCR-Ergebnisse: Mandel.....	36
5. Dokumentation.....	39
5.1 Angaben der Teilnehmer.....	39
5.1.1 ELISA: Erdnuss.....	39
5.1.2 ELISA: Mandel.....	41
5.1.3 PCR: Erdnuss.....	43
5.1.4 PCR: Mandel.....	44
5.2 Homogenität.....	45
5.2.1 Mischungshomogenität vor der Abfüllung.....	45
6. Verzeichnis der Teilnehmer in alphabetischer Reihenfolge.....	46
7. Verzeichnis relevanter Literatur.....	47

1. Einleitung

Die Teilnahme an Laborvergleichsuntersuchungen (LVU) bzw. Eignungsprüfungen (PT) ist ein unverzichtbares Element 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 Laboren 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 handelsübliche Butterkekse. Die Grundzusammensetzung war für beide Proben A und B gleich (s. Tabelle 1). Nach Zerkleinern, Sieben und Homogenisieren der Grundmischung wurde der dotierten Probe B als weitere Zutat ein mit dem Dotierungsmaterial gebackener Keks (190°C, 20 min) zugesetzt, das die allergenen Zutaten Erdnuss und Mandel enthält.

Dabei wurde folgendermaßen vorgegangen: Nach Zerkleinerung und Homogenisierung wurde der die allergenen Zutaten enthaltende gebackene Keks zu einem Aliquot der Grundmatrix gegeben und die Mischung homogenisiert. Anschließend wurde portionsweise erneut Grundmatrix in 5 weiteren Schritten zugegeben und jeweils maschinell homogenisiert bis die Gesamtmenge erreicht war. Die Grundmatrix wurde nach Vorzerkleinerung mittels Zentrifugalmühle gesiebt (mesh 1,5 mm).

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
Butterkekse Zutaten: Weizenmehl, Zucker, Butter, Glucose- sirup, Backtriebmittel: Ammoniumhydrogencarbo- nat und Natriumhydrogencarbonat, Salz, Vol- leipulver, Säureregulator: Natriumcarbonat Nährwertangaben pro 100 g: Eiweiß 7,5 g, Kohlenhydrate 75 g, Fett 12 g	100 g/100g	96,3 g/100g
Kekse (gebacken 190°C, 20 min) Zutaten: Zucker, Weizenmehl, Butter, Eier, Salz	-	3,6 g/100g
Dotierungsmaterialprobe	-	0,12 g/100g

Tabelle 2: Zugesezte Mengen allergener Zutaten

Zutaten	Dotierungsmaterialprobe	Probe B
Kartoffelmehl	88,00%	0,12%
<i>Erdnussmus</i> Zutaten: Erdnüsse, heißluft geröstet (99,2%), Salz - als Erdnuss* - davon 30% Gesamtprotein***	8450 mg/kg (= 0,85 %) 8370 mg/kg 2510 mg/kg	10 mg/kg 2,9 mg/kg
<i>Mandelmus, weiß</i> Zutaten: Süße Mandeln - als Mandel* - davon 20% Gesamtprotein**	12900 mg/kg (= 1,29 %) 12900 mg/kg 2580 mg/kg	15 mg/kg 3,0 mg/kg
<i>weitere Zutaten:</i> <i>andere Nüsse, Leguminosen und Fructose</i>	< 10,0 %	< 0,02 %

*Allergen-Gehalte als „Lebensmittel“ wie in Spalte Zutaten angegeben gemäß gravimetrischer Mischung

** Proteingehalte gemäß Laboranalyse des Rohstoffs (Gesamtstickstoff nach Kjeldahl)

*** Proteingehalte gemäß Deklaration

Hinweis: Die metrologische Rückführung von Temperatur, Masse und Volumen bei der Herstellung der LVU-Proben wird mittels DAkkS-kalibrierter Referenzmaterialien gewährleistet.

2.1.1 Homogenität

Die **Mischungshomogenität vor der Abfüllung** wurde in 10-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 μm -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-Probe B und Dotierungsmaterialprobe hat eine Wahrscheinlichkeit von 90% bzw. 30% 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 0,8 bzw. 1,5 erhalten. Die Ergebnisse der Microtracer-Analyse sind in der Dokumentation angegeben.

Homogenität der abgefüllten dotierten Probe B

Durchführung der Homogenitätstests

Die Homogenitätstests wurden in Kooperation mit den Labors der angegebenen Testkit-Anbieter durchgeführt. Von DLA wurden zufällig 10 Muster der abgefüllten dotierten Probe ausgewählt und davon jeweils 2 Teilproben in zuvor zufällig-coodierte Extraktionsbehälter eingewogen und anschließend den Labors zur Analyse zugeschickt. Die Einwaagen wurden mit einer Abweichung von $\pm 10\%$ von der Soll-einwaage der Testkit-Anleitung vorgenommen und den Labors nicht mitgeteilt. Nach Übersendung der Analysenergebnisse durch die Labors wurden die gültigen Ergebnisse anhand der exakten Einwaagen von DLA berechnet und die statistische Berechnung gemäß ISO 13528:2009 Anhang B vorgenommen.

Bewertung der Homogenität

Die Homogenität wird mit einer Standardabweichung zwischen den Proben von $S_s \leq 15\%$ („Heterogenitätsstandardabweichung“) als hinreichend gesichert angesehen. Dieses Kriterium wird für die untersuchte Probe B in allen ELISA-Tests sowohl für Erdnuss (Immunolab, AgraQuant Plus und Veratox) als auch für Mandel (Immunolab, AgraQuant Plus und Veratox) erfüllt (s. Seiten 7 und 8). Die Anforderung an Wiederholstandardabweichungen von ELISA- und PCR-Verfahren ist üblicherweise $\leq 25\%$ [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 anhand von z'-Scores (s. 3.6 und 3.8) [3].

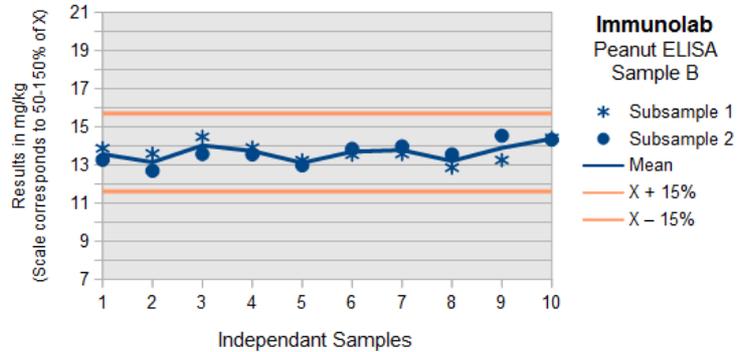
ELISA-Tests: Erdnuss / Peanut

Immunolab Peanut ELISA

Sample weights: 1,0 g (0,9 – 1,1 g)
 Number of replicates: 2
 Overall result: Peanut 13,7 ± 0,38 mg/kg

Sample B	Subsample 1 mg/kg	Subsample 2 mg/kg	Mean mg/kg
1	13,87	13,27	13,57
2	13,60	12,70	13,15
3	14,47	13,57	14,02
4	13,91	13,55	13,73
5	13,25	12,98	13,11
6	13,54	13,84	13,69
7	13,58	13,98	13,78
8	12,86	13,56	13,21
9	13,26	14,53	13,89
10	14,42	14,33	14,37

General average X 13,65
 SD of sample means Sx 0,41 3,0%
 SD within-samples Sw 0,48 3,5%
 SD between-samples Ss 0,38 2,8%

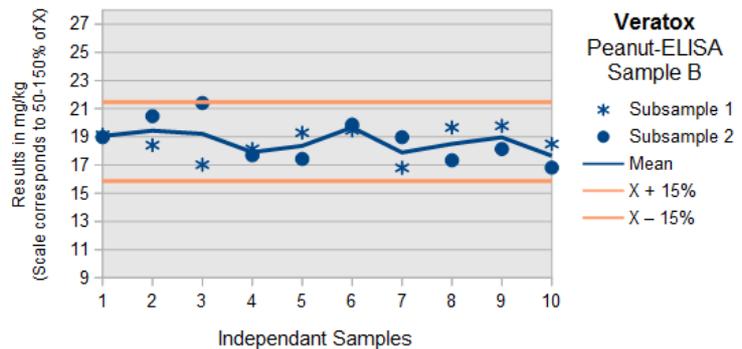


Neogen Veratox ELISA Peanut

Sample weights: 5,0 g (4,5 – 5,5 g)
 Number of replicates: 2
 Overall result: Peanut 18,7 ± 1,4 mg/kg

Sample B	Subsample 1 mg/kg	Subsample 2 mg/kg	Mean mg/kg
1	19,14	18,97	19,06
2	18,41	20,47	19,44
3	17,02	21,40	19,21
4	18,14	17,69	17,92
5	19,30	17,43	18,36
6	19,46	19,87	19,66
7	16,80	18,97	17,89
8	19,67	17,34	18,50
9	19,79	18,14	18,96
10	18,50	16,82	17,66

General average X 18,67
 SD of sample means Sx 0,70 3,8%
 SD within-samples Sw 1,46 7,8%
 SD between-samples Ss 1,38 7,4%

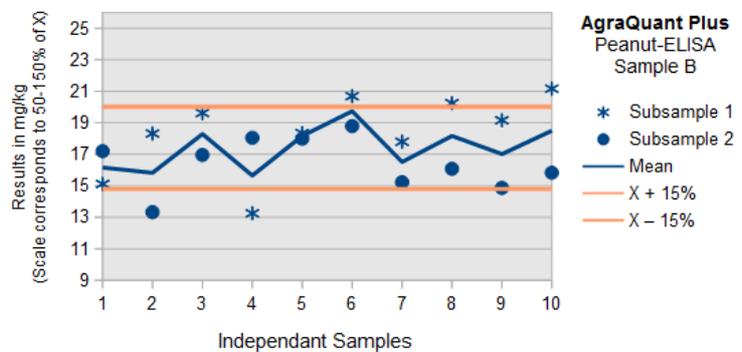


Romerlabs AgraQuant Plus Peanut

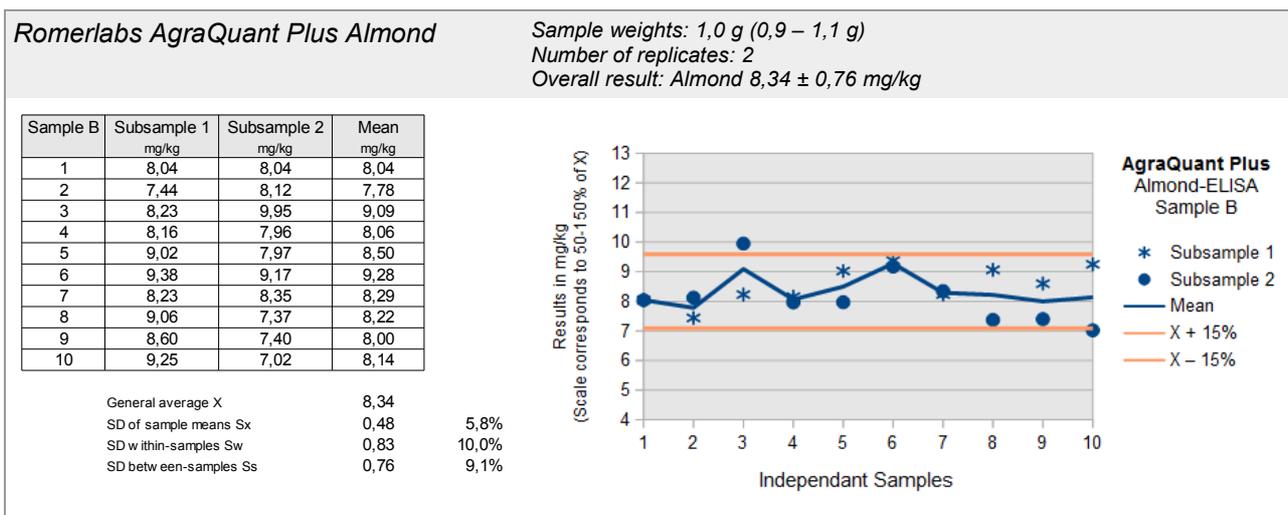
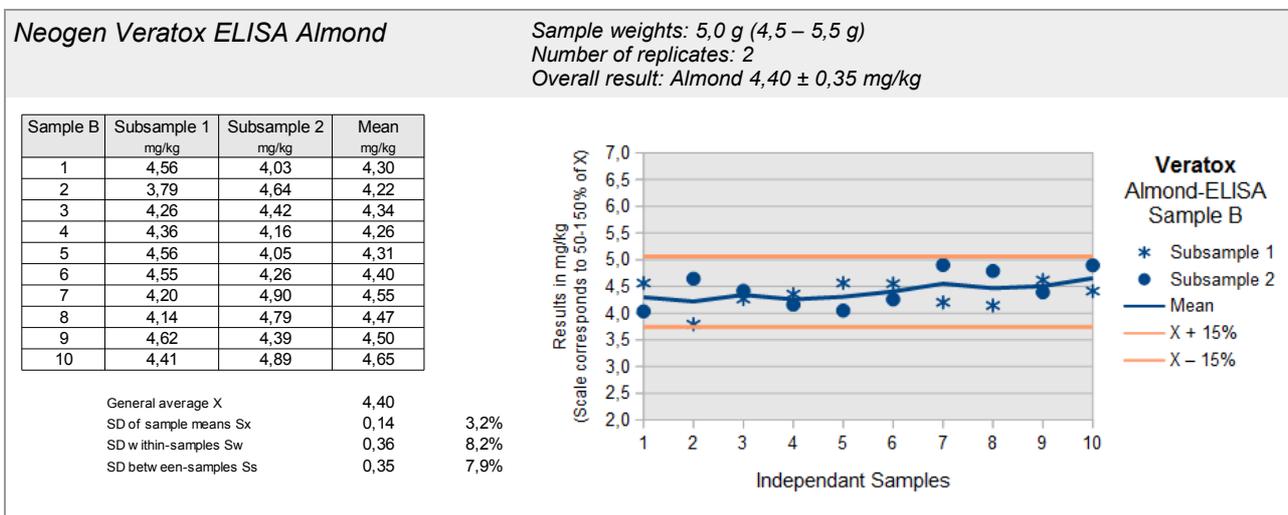
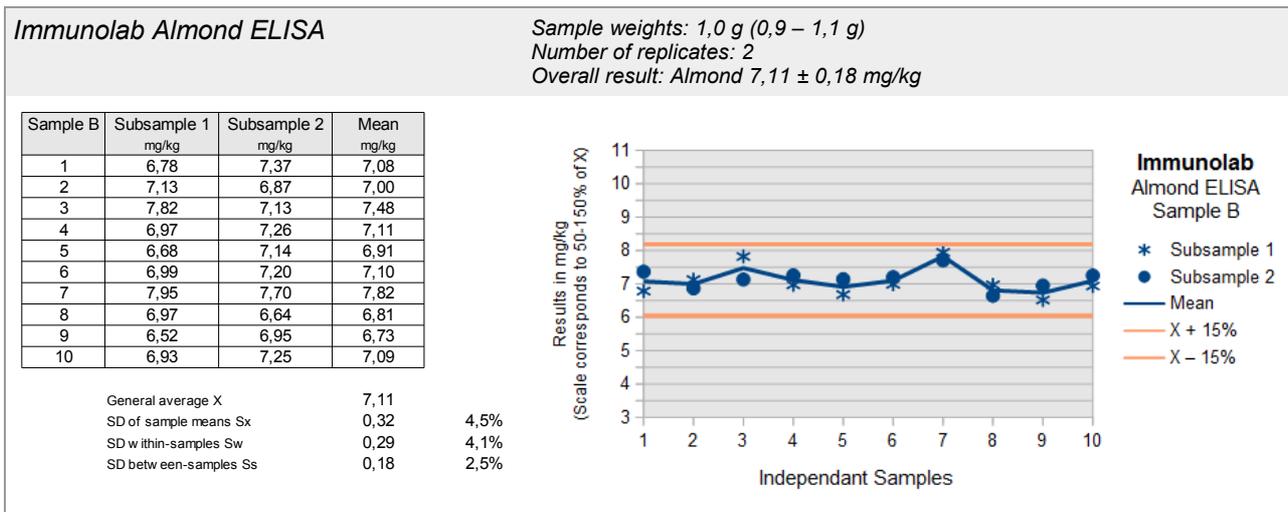
Sample weights: 1,0 g (0,9 – 1,1 g)
 Number of replicates: 2
 Overall result: Peanut 17,4 ± 2,4 mg/kg

Sample B	Subsample 1 mg/kg	Subsample 2 mg/kg	Mean mg/kg
1	15,12	17,20	16,16
2	18,32	13,33	15,83
3	19,62	16,96	18,29
4	13,26	18,05	15,65
5	18,35	17,99	18,17
6	20,69	18,79	19,74
7	17,80	15,23	16,51
8	20,25	16,08	18,17
9	19,16	14,87	17,02
10	21,17	15,83	18,50

General average X 17,40
 SD of sample means Sx 1,36 7,8%
 SD within-samples Sw 2,59 14,9%
 SD between-samples Ss 2,40 13,8%



ELISA-Tests: Mandel / Almond



2.2 Probenversand und Informationen zur Untersuchung

An jeden Teilnehmer wurden in der 35. Kalenderwoche 2016 je eine Portion der Untersuchungsmaterialien A und B sowie eine Dotierungsmaterialprobe verschickt. Die Untersuchungsverfahren wurden freigestellt. Die Untersuchungen waren durchzuführen bis spätestens 14. Oktober 2016.

Mit dem Proben-Anschreiben wurden den Teilnehmern u.a. nachstehende Informationen mitgeteilt:

Bei den beiden Mustern handelt es sich um zwei unterschiedliche Proben (Probe A und Probe B) mit möglichen Gehalten an den allergenen Lebensmitteln Erdnuss und/oder Mandel im mg/kg-Bereich. Die Matrix ist ein Kleingebäck (Butterkekse).

Zusätzlich wird eine „Dotierungsmaterialprobe“ zur Verfügung gestellt, die die allergenen Bestandteile mit einem Gehalt von 1-10% in Kartoffelmehl als Trägermaterial enthält. Die Dotierungsprobe wurde zur Dotierung der Positivprobe verwendet und soll wie eine weitere Probe untersucht werden. Die Materialien wurden auf Homogenität getestet.

Generell empfehlen wir vor der Analyse, insbesondere bei kleinen Analyseneinwaagen, eine repräsentative Probenmenge entsprechend guter Laborpraxis zu homogenisieren.

Zum Nachweis oder zur Bestimmung der genannten Analyten können alle geeigneten Methoden eingesetzt werden (z.B. PCR und ELISA).

2.3 Ergebnisübermittlung

Die Ergebnisabgabe erfolgte einheitlich mittels an die teilnehmenden Labore übergebenen Übermittlungstabellen (per eMail).

Zur Auswertung kamen einerseits die Ergebnisse als positiv/negativ Angaben und andererseits angegebene Gehalte an allergenen Zutaten in mg/kg z.B. als allergenes Lebensmittel oder Protein.

Im Zuge der Auswertung wird ggf. 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, Bestimmungsgrenzen, 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.

Von 21 Teilnehmern haben 20 Teilnehmer ihre Ergebnisse fristgerecht abgegeben. 1 Teilnehmer hat keine 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 σ_{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 σ_{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 σ_R abgeleitet [6]. Später wurde das Modell von Thompson für bestimmte Konzentrationsbereiche modifiziert [10]. Die Vergleichsstandardabweichung σ_R kann als relative Zielstandardabweichung σ_{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- und PCR-Verfahren mit Messwerten im mg/kg Bereich nur in Ausnahmefällen erreicht.

3.4.2 Auswertung eines Versuchs zur Präzision

Aus der Vergleichsstandardabweichung σ_R und der Wiederholstandardabweichung σ_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 σ_{pt} abgeleitet werden [3]:

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

Die in Tabelle 3a (ELISA) und Tabelle 3b (PCR) angegebenen relativen Wiederholstandardabweichungen (RSD_x) und relativen Vergleichsstandardabweichungen (RSD_R) wurden in Ringversuchen mittels der angegebenen Methoden ermittelt. Die resultierenden Zielstandardabweichungen σ_{pt} wurden für eine Anzahl von $m = 2$ Wiederholmessungen berechnet. Bei einer Anzahl von $m = 1$ ist die Vergleichsstandardabweichung σ_R gleich der Zielstandardabweichung σ_{pt} .

Tabelle 3a: ELISA-Methoden - Relative Wiederholstandardabweichungen (RSD_r) und relative Vergleichsstandardabweichungen (RSD_R) gemäß ausgewählter Auswertungen von Versuchen zur Präzision und die resultierende Zielstandardabweichung σ_{pt} [27-28]

Parameter	Matrix	Mittelwerte [mg/kg]	Wiederfindung	rob RSD_r	RSD_r	RSD_R	opt	Methode / Literatur
Erdnuss	Vollmilchschokolade	173,7	87 %	-	8,8%	31%	30,4%	ELISA Herst. A ASU 00.00-69
		33,8	85 %	-	5,2%	20%	19,7%	
		5,9	59 %	-	7,8%	31%	30,5%	
Erdnuss	Vollmilchschokolade	215,7	108 %	-	5,9%	32%	31,7%	ELISA Herst. B ASU 00.00-69
		40,1	100 %	-	7,2%	14%	13,0%	
		10,1	101 %	-	7,3%	16%	15,1%	
Erdnuss	Feinherbschokolade	148,2	74 %	-	6,0%	22%	21,6%	ELISA Herst. A ASU 00.00-69
		30,9	77 %	-	13%	25%	23,2%	
		5,7	57 %	-	6,1%	33%	32,7%	
Haselnuss	Feinherbschokolade	16,3	81 %	-	4,7%	12%	11,5%	ELISA Herst. A ASU 44.00-7
		7,56	76 %	-	8,9%	15%	13,6%	
		3,73	75 %	-	13%	24%	22,2%	
		1,62	81 %	-	15%	33%	31,2%	
Haselnuss	Feinherbschokolade	21,3	106 %	-	7,1%	14%	13,1%	ELISA Herst. B ASU 44.00-7
		10,7	107 %	-	11%	19%	17,3%	
		4,69	94 %	-	11%	17%	15,1%	
		2,37	119 %	-	9,3%	17%	16,4%	

Aus den Präzisionsdaten der ASU §64 Methoden ergeben sich abhängig von Matrix bzw. Prozessierung und Konzentrationsbereich relative Zielstandardabweichungen im Bereich von 11 - 32% für die ELISA-Methoden und 15 - 43% für die PCR-Methoden (s. Tab. 3a und 3b).

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%.

Tabelle 3b: PCR-Methoden - Relative Wiederholstandardabweichungen (RSD_r) und relative Vergleichsstandardabweichungen (RSD_R) gemäß ausgewählter Auswertungen von Versuchen zur Präzision und die resultierende Zielstandardabweichung σ_{pt} [29-30]

Parameter	Matrix	Mittelwerte [mg/kg]	Wiederfindung	rob RSD_r	RSD_r	RSD_R	σ_{pt}	Methode / Literatur
Mandel	Reiskekse	105,2 18,0 10,5	105 % 90 % 105 %	-	19,3% 44,0% 32,0%	27,5% 49,1% 38,8%	23,9% 38,0% 31,5%	rt-PCR ASU 18.00-20
Mandel	Weizenkekse Soßenpulver	114,3 88,1	94,6 % 88,1 %	-	22,1% 43,9%	41,8% 43,1%	38,8% - %	rt-PCR ASU 18.00-20
Mandel	Reiskekse	109 21,3 12,3	109 % 107 % 121 %	-	17,6% 35,8% 32,0%	32,8% 45,0% 47,8%	30,3% 37,2% 42,1%	rt-PCR ASU 18.00-22
Mandel	Weizenkekse Soßenpulver	120,7 112	98,2 % 94,1 %	-	15,7% 36,2%	32,5% 42,8%	30,5% 34,3%	rt-PCR ASU 18.00-22

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% ^(a)	19,5 - 57,2% ^(a)
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% ^(a)	≤ 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 σ_{pt} einen Wert von 25% fest.

Diese Zielstandardabweichung wurde zur statistischen Bewertung der Ergebnisse mittels z-Score bzw. falls erforderlich 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 (σ_{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_{ALL}** (bezogen auf alle Ergebnisse)
- ii) **z-Score** - **Z_{METHOD i}** (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]. Gleichmaßen 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 ≥ 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 (σ_{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 σ_{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^*/σ_{pt}

In Anlehnung an den HorRat-Wert kann die Bewertung einer Laborvergleichsuntersuchung als aussagekräftig gelten, wenn der Quotient von robuster Standardabweichung S^* und Zielstandardabweichung σ_{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 Auswertung erfolgte getrennt nach ELISA und PCR-Methoden. Die Ergebnisse wurden in den entsprechenden Kapiteln nach durchgeführten Methoden (Testkits) zusammengefasst und die Auswertenummern innerhalb der Gruppen aufsteigend sortiert.

Die folgenden Ergebnisseiten sind für die allergenen Bestandteile jeweils gleich aufgebaut. Es werden zunächst die Ergebnisse aller ELISA- bzw. PCR-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 im Abschnitt Wiederfindungsrate behandelt.

Im Ergebnisteil werden alle quantitativen Teilnehmerergebnisse auf 3 Dezimalstellen formatiert dargestellt. Im Dokumentationsteil sind die Ergebnisse so angegeben wie sie von den Teilnehmern übermittelt wurden.

Um die **Vergleichbarkeit von quantitativen Ergebnissen** zu gewährleisten, werden Teilnehmerergebnisse mit unterschiedlichen Angaben (z.B. als Protein oder allergenes Lebensmittel) soweit möglich von DLA harmonisiert. In der vorliegenden LVU wurden alle ELISA-Ergebnisse einheitlich als Erdnuss bzw. Mandel angegeben, sodass keine Umrechnungen vorgenommen wurden.

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_{ptALL}	z-Score $X_{ptM i}$	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_{ptALL}	$X_{ptMETHOD i}$
Anzahl der Messergebnisse		
Anzahl der Ausreißer		
Median		
Robuster Mittelwert (X_{pt})		
Robuste Standardabweichung (S^*)		
Zielkenndaten:		
Zielstandardabweichung σ_{pt}		
untere Grenze des Zielbereichs ($X_{pt} - 2\sigma_{pt}$)		
obere Grenze des Zielbereichs ($X_{pt} + 2\sigma_{pt}$)		
Quotient S^*/σ_{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 Erdnuss

4.1.1 ELISA-Ergebnisse: Erdnuss

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		
17	negativ	<1	positiv	10,4	2/2 (100%)	BC	Mittelwerte von DLA berechnet
3	negativ	<1	positiv	9,20	2/2 (100%)	BK	
20a	negativ	<1,0	positiv	11,0	2/2 (100%)	BK	
19	negativ	< 0,5	positiv	13,0	2/2 (100%)	IL	
9	negativ	< 0,3	positiv	17,0	2/2 (100%)	NL-E	
20b	negativ	<2,5	positiv	23,0	2/2 (100%)	RS	
1	-		positiv	17,8	1/2 (50%)	RS-F	
2	negativ	<2,5	positiv	16,3	2/2 (100%)	RS-F	
8	negativ	<2,5	positiv	12,7	2/2 (100%)	RS-F	
11	negativ		positiv		2/2 (100%)	RS-F	
12	negativ	<0,13	positiv	14,2	2/2 (100%)	RS-F	
13	negativ	< 2,5	positiv	13,8	2/2 (100%)	RS-F	
14	negativ	< LOD	positiv	14,2	2/2 (100%)	RS-F	Mittelwerte von DLA berechnet
15	negativ	< 2,5	positiv	15,4	2/2 (100%)	RS-F	
16	negativ		positiv	14,8	2/2 (100%)	RS-F	
18	negativ		positiv	12,1	2/2 (100%)	RS-F	Mittelwerte von DLA berechnet
7	negativ		positiv	11,9	2/2 (100%)	VT	
20c	negativ	<2,5	positiv	9,00	2/2 (100%)	VT	

	Probe A	Probe B
Anzahl positiv	0	18
Anzahl negativ	17	0
Prozent positiv	0	100
Prozent negativ	100	0
Konsenswert	negativ	positiv

Methoden:

BC = BioCheck ELISA
 BK = BioKits, Neogen
 IL = Immunolab
 NL = nutriLinia® Allergen-ELISA
 RS = Ridascreen®, R-Biopharm
 RS-F= Ridascreen® Fast, R-Biopharm
 VT = Veratox, Neogen

Anmerkung:

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

Quantitative Auswertung der Ergebnisse: Probe B

Auswertenummer	Erdnuss [mg/kg]	z-Score Xpt _{ALL}	z-Score Xpt _{RS-F}	Methode	Hinweis
17	10,4	-0,9		BC	Mittelw erte von DLA berechnet
3	9,20	-1,3		BK	
20a	11,0	-0,8		BK	
19	13,0	-0,2		IL	
9	17,0	1,0		NL-E	
20b	23,0	2,8		RS	
1	17,8	1,2	0,9	RS-F	
2	16,3	0,8	0,5	RS-F	
8	12,7	-0,3	-0,5	RS-F	
11				RS-F	
12	14,2	0,2	-0,1	RS-F	
13	13,8	0,1	-0,2	RS-F	
14	14,2	0,2	-0,1	RS-F	Mittelw erte von DLA berechnet
15	15,4	0,5	0,2	RS-F	
16	14,8	0,4	0,1	RS-F	
18	12,1	-0,4	-0,7	RS-F	Mittelw erte von DLA berechnet
7	11,9	-0,5		VT	
20c	9,00	-1,4		VT	

Methoden:

BC = BioCheck ELISA

BK = BioKits, Neogen

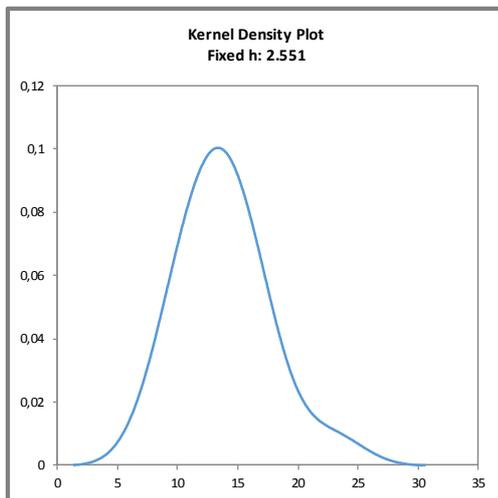
IL = Immunolab

NL = nutrilinia® Allergen-ELISA

RS = Ridascreen®, R-Biopharm

RS-F= Ridascreen® Fast, R-Biopharm

VT = Veratox, Neogen

**Abb. / Fig. 1:**

Kerndichte-Schätzung aller ELISA-Ergebnisse (mit $h = 0,75 \times \sigma_{pt}$ von X_{ptALL})

Kernel density plot of all ELISA results (with $h = 0,75 \times \sigma_{pt}$ of X_{ptALL})

Anmerkung:

Die Kerndichte-Schätzung zeigt annähernd eine Normalverteilung der Ergebnisse mit einer leichten Schulter bei 23 mg/kg (Methode RS).

Kenndaten: Quantitative Auswertung Erdnuss

Probe B

Kenndaten	Alle Ergebnisse [mg/kg]	Methode RS-F [mg/kg]
Zugewiesener Wert (X_{pt})	X_{pt_ALL}	$X_{pt_METHOD\ RS-F}$
Anzahl der Messergebnisse	17	9
Anzahl der Ausreißer	0	0
Mittelwert	13,9	14,6
Median	13,8	14,2
Robuster Mittelwert (X_{pt})	13,6	14,6
Robuste Standardabweichung (S^*)	3,22	1,88
<i>Zielkenndaten:</i>		
Zielstandardabweichung σ_{pt}	3,40	3,64
Untere Grenze des Zielbereichs	6,80	7,28
Obere Grenze des Zielbereichs	20,4	21,8
Quotient S^*/σ_{pt}	0,95	0,52
Standardunsicherheit $U(X_{pt})$	0,976	0,784
Quotient $U(X_{pt})/\sigma_{pt}$	0,29	0,22
Ergebnisse im Zielbereich	16	9
Prozent im Zielbereich	94	100

Methoden:

RS-F = R-Biopharm, Ridascreen®FAST

Anmerkungen zu den Kenndaten und Vergleich der Bezugswerte:

Die Auswertungen der Ergebnisse aller Methoden und von Methode RS-F zeigten eine geringe Variabilität der Ergebnisse. Der Quotient S^*/σ_{pt} lag jeweils unter 1,0. 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 einige Methoden nur wenige Ergebnisse vorlagen.

Die robusten Mittelwerte der Auswertungen lagen mit 136% bzw. 146% vom Zusatzniveau von Erdnuss zu Probe B, innerhalb der relevanten Anforderungen für die eingesetzten Methoden (s. 3.4.3 und "Wiederfindungsraten für Erdnuss" S.26).

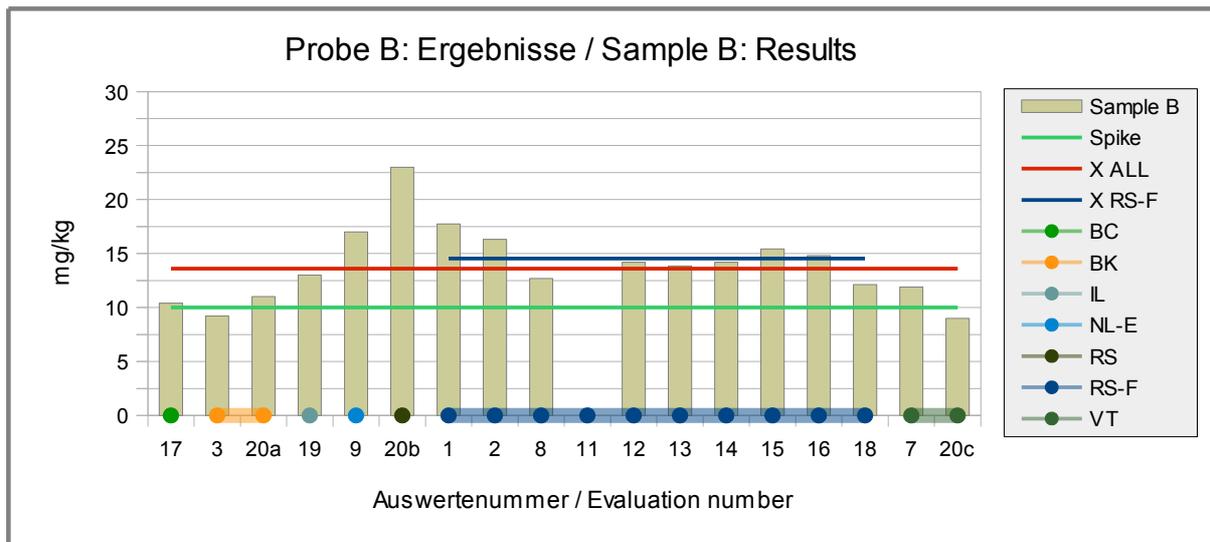


Abb./Fig. 2: ELISA-Ergebnisse Erdnuss
 grüne Linie = Zusatzniveau (Spike)
 rote Linie = robuster Mittelwert aller Ergebnisse
 blaue Linie = robuster Mittelwert Ergebnisse Methode RS-F
 runde Symbole = Zuordnung der Methoden (s. Legende)

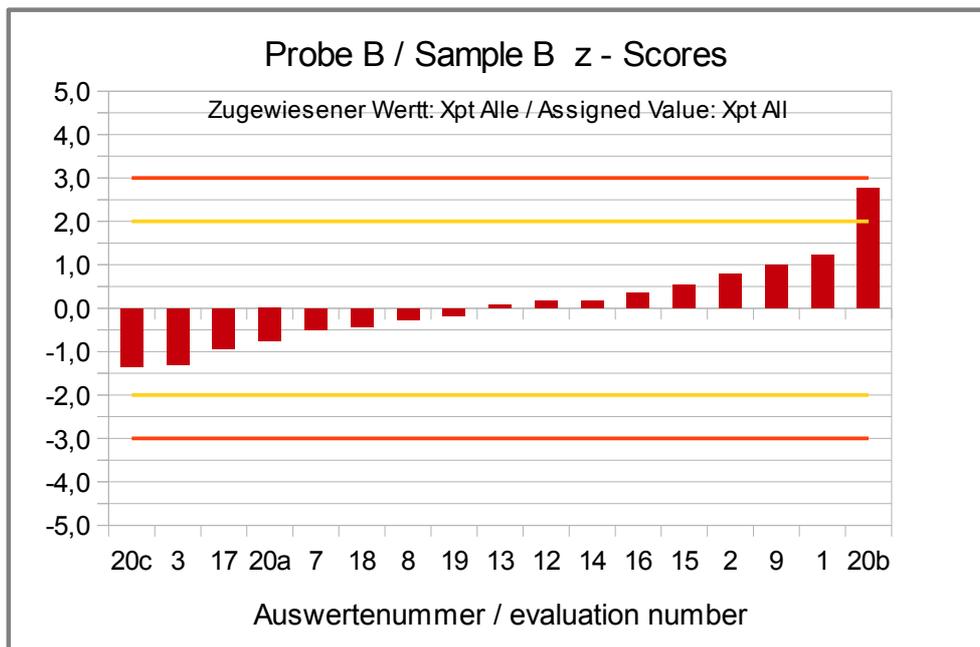


Abb./Fig. 3: z-Scores (ELISA-Ergebnisse als Erdnuss) Zugewiesener Wert: robuster Mittelwert aller Ergebnisse

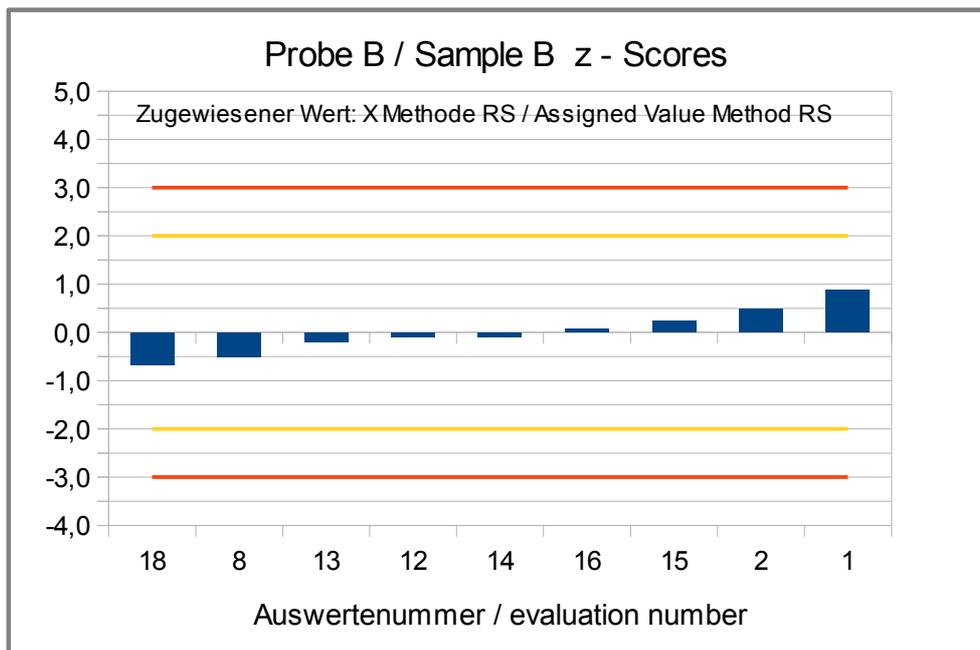


Abb./Fig. 4:

z-Scores (ELISA-Ergebnisse als Erdnuss) Bezugswert robuster Mittelwert Ergebnisse Methode RS-F (R-Biopharm, Ridascreen FAST)

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

Auswertenummer	Dotierungsmaterial	Wiederfindungsrate*	Probe B	Wiederfindungsrate*	Methode	Hinweis
	[mg/kg]	[%]	[mg/kg]	[%]		
17	23600	282	10,4	104	BC	Mittelwerte von DLA berechnet
3	15000	179	9,20	92	BK	
20a	>20'000		11,0	110	BK	
19	25000	299	13,0	130	IL	
9	41000	490	17,0	170	NL-E	
20b	19700	235	23,0	230	RS	
1	28600	342	17,8	178	RS-F	
2	27700	331	16,3	163	RS-F	
8	22700	271	12,7	127	RS-F	
11					RS-F	
12	34700	415	14,2	142	RS-F	
13			13,8	138	RS-F	
14	29800	356	14,2	142	RS-F	Mittelwerte von DLA berechnet
15	28400	339	15,4	154	RS-F	
16			14,8	148	RS-F	
18	30400	363	12,1	121	RS-F	Mittelwerte von DLA berechnet
7	na		11,9	119	VT	
20c			9,00	90	VT	

AB**	50-150 %	AB**	50-150 %
Anzahl im AB	0	Anzahl im AB	12
Prozent im AB	0	Prozent im AB	71

* Wiederfindungsrate 100% Bezugsgröße: Erdnuss, s. Seite 4

** Akzeptanzbereich der AOAC für Allergen-ELISAs

Methoden:

BC = BioCheck ELISA

BK = BioKits, Neogen

IL = Immunolab

NL = nutrilinia® Allergen-ELISA

RS = Ridascree® R-Biopharm

RS-F= Ridascree® Fast, R-Biopharm

VT = Veratox, Neogen

Anmerkung:

Die Wiederfindungsraten der Teilnehmer lagen für die Dotierungsmaterialprobe mittels ELISA im Bereich von 179-490% (Mittelwert 325%). Auch in den Vorjahres-LVUs lagen die Wiederfindungsraten für Erdnuss (aus Erdnussmus) in den Dotierungsmaterialproben ähnlich hoch (DLA 06/2015 Mittelwert 385% und DLA 05/2014 Mittelwert 232%).

Bei der mit dem Dotierungsmaterial hergestellten gebackenen Lebensmittelmatrix-Probe B lagen 71% der Wiederfindungsraten im Bereich der AOAC-Anforderung von 50-150%. Für die Matrix Gebäck wurden wiederum ähnlich gute Wiederfindungsraten in der vorangegangenen LVU DLA 05/2014 erhalten.

4.1.2 PCR-Ergebnisse: Erdnuss**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		2/2 (100%)	ASU	
2	negativ	<1	positiv	32,8	2/2 (100%)	SFA-ID	
16	negativ		positiv		2/2 (100%)	SFA-ID	
4a	negativ	-	positiv	-	2/2 (100%)	SFA-ID	
4b	negativ	< 1	positiv	< 4	2/2 (100%)	SFA-Q	
5	negativ		positiv		2/2 (100%)	div	
6	negativ		positiv		2/2 (100%)	div	
9	negativ		positiv		2/2 (100%)	div	

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

Methoden:

ASU = ASU §64 Methode/method

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

SFA-Q = Sure Food Allergen Quant, R-Biopharm / Congen

div = keine genaue Angabe / andere Methode

Anmerkung:

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

Quantitative Auswertung der Ergebnisse: Probe BAnmerkung:

Eine quantitative Auswertung wurde aufgrund der geringen Anzahl von Ergebnissen nicht vorgenommen.

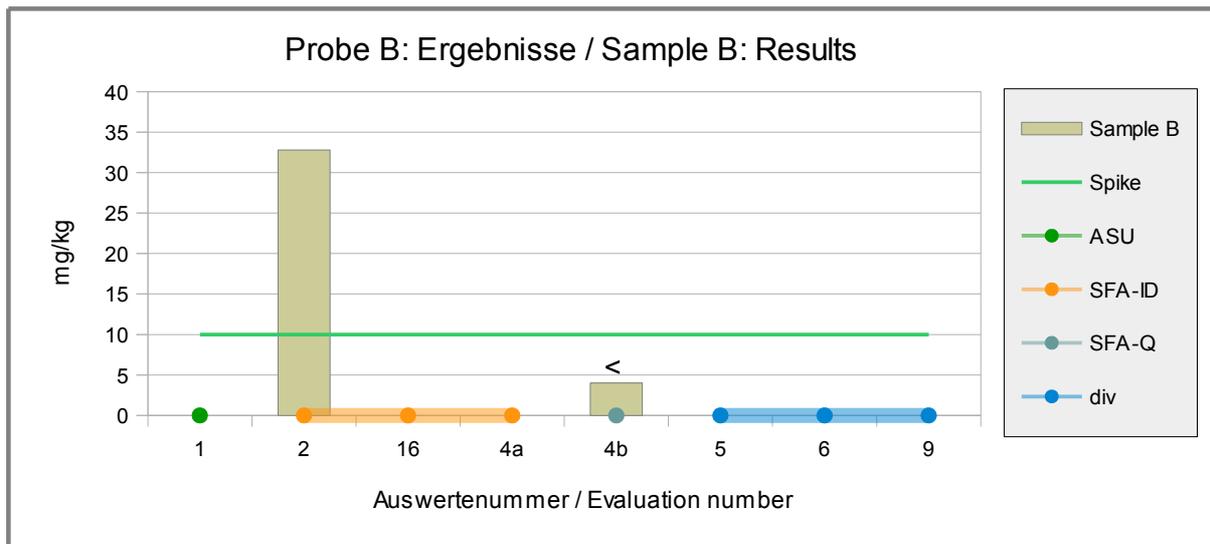


Abb./Fig. 5: PCR-Ergebnisse Erdnuss
 grüne Linie = Zusatzniveau (Spike)
 runde Symbole = Zuordnung der Methoden (s. Legende)

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

Auswertenummer	Dotierungsmaterial	Wiederfindungsrate*	Probe B	Wiederfindungsrate*	Methode	Hinweis
	[mg/kg]	[%]	[mg/kg]	[%]		
1					ASU	
2	52900	632	32,8	328	SFA-ID	
16					SFA-ID	
4a	-		-		SFA-ID	
4b	5150	61	< 4		SFA-Q	
5	83,5	1,0			div	Mittelwert von DLA berechnet
6					div	
9					div	

AB**	50-150 %	AB**	50-150 %
Anzahl im AB	1	Anzahl im AB	0
Prozent im AB	33	Prozent im AB	0

Methoden:

ASU = ASU §64 Methode/method

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

SFA-Q = Sure Food Allergen Quant, R-Biopharm / Congen

div = keine genaue Angabe / andere Methode

* Wiederfindungsrate 100% Bezugsgröße: Erdnuss, s. Seite 4

** Akzeptanzbereich der AOAC für Allergen-ELISAs

Anmerkung:

Einer von drei Teilnehmern hat in der Dotierungsmaterialprobe mittels PCR eine Wiederfindungsrate im Bereich der AOAC-Anforderung von 50-150% erhalten. Bei der mit dem Dotierungsmaterial hergestellten gebackenen Lebensmittelmatrix-Probe B lag die Wiederfindungsrate des einen quantitativen Ergebnisses nicht im Akzeptanzbereich.

4.2 Vergleichsuntersuchung Mandel

4.2.1 ELISA-Ergebnisse: Mandel

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		
17	negativ	<0,5	positiv	6,10	2/2 (100%)	BC	Mittelwerte von DLA berechnet
19	negativ	< 0,2	positiv	6,00	2/2 (100%)	IL	
9	negativ	< 0,2	positiv	4,00	2/2 (100%)	NL-E	
1	-		positiv	6,13	1/2 (50%)	RS-F	
2	negativ	<2,5	positiv	6,08	2/2 (100%)	RS-F	
3	negativ	<2,5	positiv	8,10	2/2 (100%)	RS-F	
8	negativ	<2,5	positiv	5,40	2/2 (100%)	RS-F	
10	negativ	<2,5	positiv	4,50	2/2 (100%)	RS-F	
11	negativ		positiv		2/2 (100%)	RS-F	
12	negativ	<1,2	positiv	6,54	2/2 (100%)	RS-F	
13	negativ	< 2,5	positiv	5,32	2/2 (100%)	RS-F	
14	negativ	< LOD	positiv	4,51	2/2 (100%)	RS-F	Mittelwerte von DLA berechnet
15	negativ	< 2,5	positiv	5,30	2/2 (100%)	RS-F	
16	negativ		positiv	3,60	2/2 (100%)	RS-F	
18	negativ		positiv	5,77	2/2 (100%)	RS-F	Mittelwerte von DLA berechnet
20a	negativ	<2,5	positiv	6,50	2/2 (100%)	RS-F	
7	negativ		positiv	5,90	2/2 (100%)	VT	
20b	negativ	<2,5	positiv	4,00	2/2 (100%)	VT	

	Probe A	Probe B
Anzahl positiv	0	18
Anzahl negativ	17	0
Prozent positiv	0	100
Prozent negativ	100	0
Konsenswert	negativ	positiv

Methoden:

BC = BioCheck ELISA
 IL = Immunolab
 NL-E = nutriLinia®E Allergen-ELISA
 RS-F= Ridascreen® Fast, R-Biopharm
 VT = Veratox, Neogen

Anmerkung:

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

Quantitative Auswertung der Ergebnisse: Probe B

Auswertenummer	Mandel [mg/kg]	z-Score X _{pt} ALL	z-Score X _{pt} RS-F	Methode	Hinweis
17	6,10	0,5		BC	Mittelw erte von DLA berechnet
19	6,00	0,4		IL	
9	4,00	-1,1		NL-E	
1	6,13	0,5	0,4	RS-F	
2	6,08	0,4	0,3	RS-F	
3	8,10	1,9	1,8	RS-F	
8	5,40	-0,1	-0,1	RS-F	
10	4,50	-0,7	-0,8	RS-F	
11				RS-F	
12	6,54	0,8	0,7	RS-F	
13	5,32	-0,1	-0,2	RS-F	
14	4,51	-0,7	-0,8	RS-F	Mittelw erte von DLA berechnet
15	5,30	-0,1	-0,2	RS-F	
16	3,60	-1,4	-1,4	RS-F	
18	5,77	0,2	0,1	RS-F	Mittelw erte von DLA berechnet
20a	6,50	0,8	0,6	RS-F	
7	5,90	0,3		VT	
20b	4,00	-1,1		VT	

Methoden:

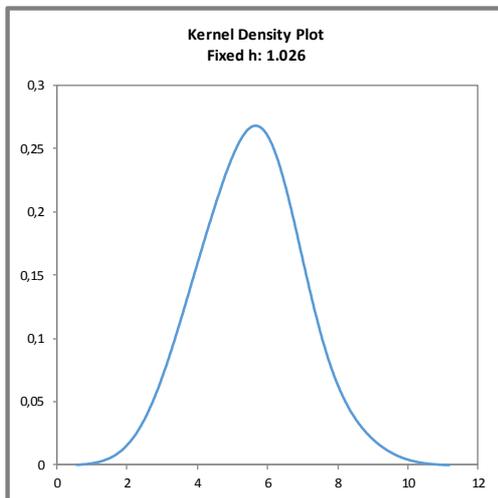
BC = BioCheck ELISA

IL = Immunolab

NL-E = nutriLinia®E Allergen-ELISA

RS-F= Ridascreen® Fast, R-Biopharm

VT = Veratox, Neogen

**Abb. / Fig. 6:**

Kerndichte-Schätzung aller ELISA-Ergebnisse (mit $h = 0,75 \times \sigma_{pt}$ von X_{ptALL})

Kernel density plot of all ELISA results (with $h = 0,75 \times \sigma_{pt}$ of X_{ptALL})

Anmerkung:

Die Kerndichte-Schätzung zeigt annähernd eine Normalverteilung der Ergebnisse.

Kenndaten: Quantitative Auswertung Mandel**Probe B**

Kenndaten	Alle Ergebnisse [mg/kg]	Methode RS-F [mg/kg]
Zugewiesener Wert (X_{pt})	X_{pt_ALL}	$X_{pt_METHOD\ RS-F}$
Anzahl der Messergebnisse	17	12
Anzahl der Ausreißer	0	0
Mittelwert	5,52	5,65
Median	5,77	5,59
Robuster Mittelwert (X_{pt})	5,47	5,61
Robuste Standardabweichung (S^*)	1,13	1,09
<i>Zielkenndaten:</i>		
Zielstandardabweichung σ_{pt}	1,37	1,40
Untere Grenze des Zielbereichs	2,74	2,80
Obere Grenze des Zielbereichs	8,21	8,41
<i>Quotient S^*/σ_{pt}</i>	<i>0,83</i>	<i>0,78</i>
<i>Standardunsicherheit $U(X_{pt})$</i>	<i>0,344</i>	<i>0,394</i>
<i>Quotient $U(X_{pt})/\sigma_{pt}$</i>	<i>0,25</i>	<i>0,28</i>
<i>Ergebnisse im Zielbereich</i>	<i>17</i>	<i>12</i>
<i>Prozent im Zielbereich</i>	<i>100</i>	<i>100</i>

Methoden:

RS-F = R-Biopharm, Ridascreen@FAST

Anmerkungen zu den Kenndaten und Vergleich der Bezugswerte:

Die Auswertungen der Ergebnisse aller Methoden und von Methode RS-F zeigten eine geringe Variabilität der Ergebnisse. Der Quotient S^*/σ_{pt} lag jeweils unter 1,0. 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 einige Methoden nur wenige Ergebnisse vorlagen.

Die robusten Mittelwerte der Auswertungen lagen mit 36% bzw. 37% vom Zusatzniveau von Mandel zu Probe B, unterhalb der relevanten Anforderungen für die eingesetzten Methoden (s. 3.4.3 und "Wiederfindungsraten für Mandel" S.35).

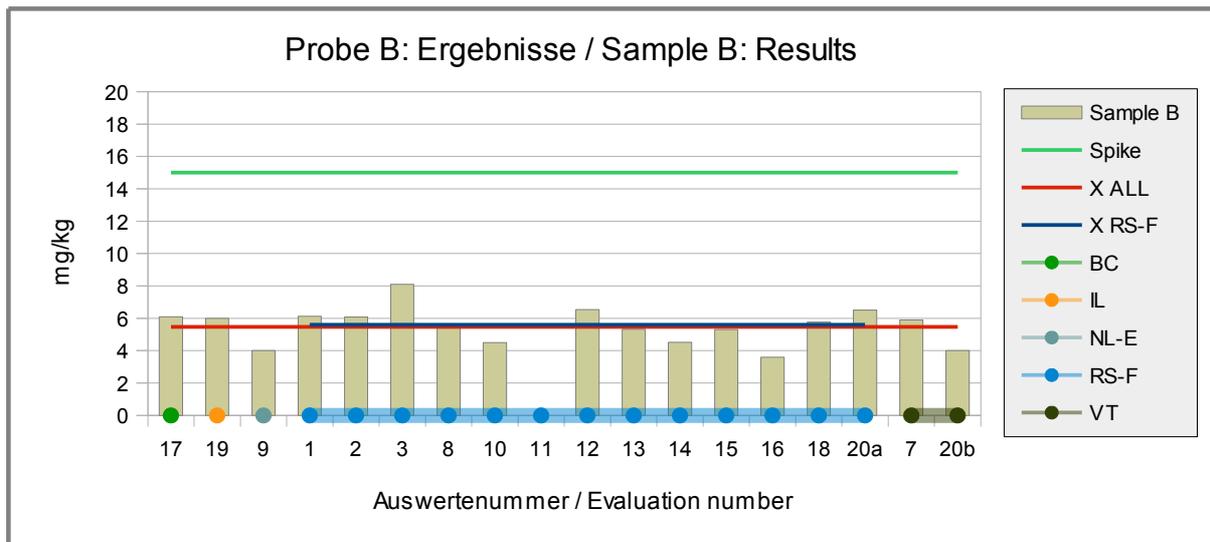


Abb./Fig. 7: ELISA-Ergebnisse Mandel
 grüne Linie = Zusatzniveau (Spike)
 rote Linie = robuster Mittelwert aller Ergebnisse
 blaue Linie = robuster Mittelwert Ergebnisse Methode RS-F
 runde Symbole = Zuordnung der Methoden (s. Legende)

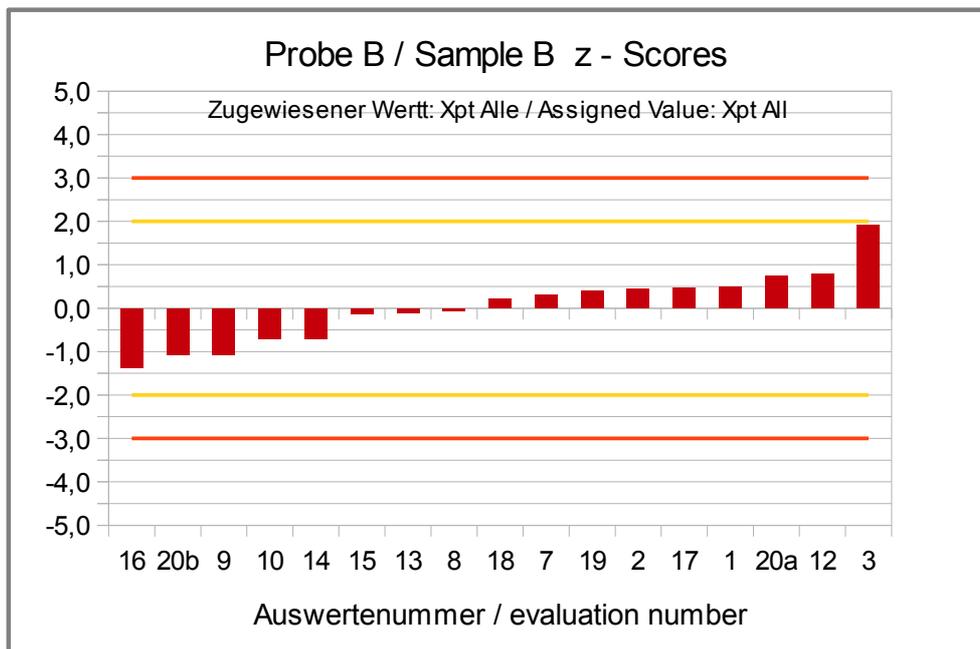


Abb./Fig. 8:
 z-Scores (ELISA-Ergebnisse als Mandel) Zugewiesener Wert: robuster Mittelwert aller Ergebnisse

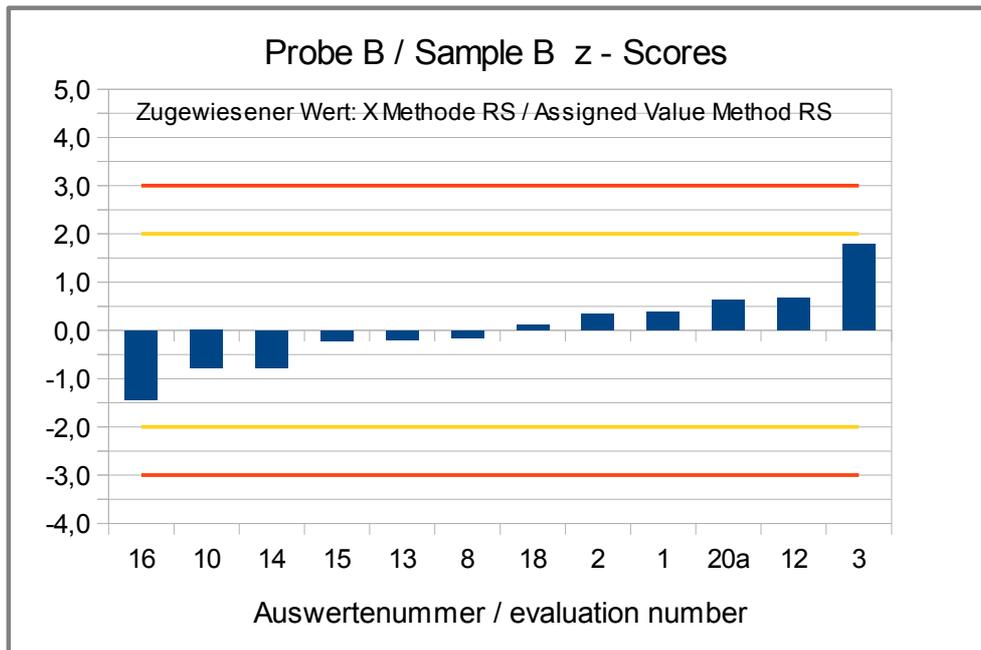


Abb./Fig. 9:

z-Scores (ELISA-Ergebnisse als Mandel) Bezugswert robuster Mittelwert Ergebnisse Methode RS-F (R-Biopharm, Ridascreen FAST)

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

Auswertenummer	Dotierungsmaterial	Wiederfindungsrate*	Probe B	Wiederfindungsrate*	Methode	Hinweis
	[mg/kg]	[%]	[mg/kg]	[%]		
17	11900	92	6,10	41	BC	Mittelwerte von DLA berechnet
19	10000	78	6,00	40	IL	
9	10000	78	4,00	27	NL-E	
1			6,13	41	RS-F	
2	9550	74	6,08	41	RS-F	
3	13000	101	8,10	54	RS-F	
8	8920	69	5,40	36	RS-F	
10	8630	67	4,50	30	RS-F	
11					RS-F	
12	10700	83	6,54	44	RS-F	
13			5,32	35	RS-F	
14	9480	73	4,51	30	RS-F	Mittelwerte von DLA berechnet
15	11800	91	5,30	35	RS-F	
16			3,60	24	RS-F	
18	9970	77	5,77	38	RS-F	Mittelwerte von DLA berechnet
20a			6,50	43	RS-F	
7	na		5,90	39	VT	
20b			4,00	27	VT	

AB**	50-150 %	AB**	50-150 %
Anzahl im AB	11	Anzahl im AB	1
Prozent im AB	100	Prozent im AB	6

* Wiederfindungsrate 100% Bezugsgröße: Mandel, s. Seite 4

** Akzeptanzbereich der AOAC für Allergen-ELISAs

Methoden:

BC = BioCheck ELISA

IL = Immunolab

NL-E = nutrilinia®E Allergen-ELISA

RS-F= Ridascreen® Fast, R-Biopharm

VT = Veratox, Neogen

Anmerkung:

100% (11) 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 gebackenen Lebensmittelmatrix-Probe B lag eine Wiederfindungsrate in diesem Akzeptanzbereich. Alle anderen Ergebnisse lagen im Bereich von 27-44%.

4.2.2 PCR-Ergebnisse: Mandel**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		2/2 (100%)	ASU	
2	negativ	<1	positiv	3,30	2/2 (100%)	SFA-ID	
4	negativ	-	negativ	-	1/2 (50%)	SFA-ID	
16	negativ		positiv		2/2 (100%)	SFA-ID	
5	negativ		positiv		2/2 (100%)	div	Mittelwert von DLA berechnet
6	negativ		positiv		2/2 (100%)	div	
9	negativ		positiv		2/2 (100%)	div	

	Probe A	Probe B
Anzahl positiv	0	6
Anzahl negativ	7	1
Prozent positiv	0	86
Prozent negativ	100	14
Konsenswert	negativ	positiv

Methoden:

ASU = ASU §64 Methode/method

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

div = keine genaue Angabe / andere Methode

Anmerkung:

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

Quantitative Auswertung der Ergebnisse: Probe BAnmerkung:

Eine quantitative Auswertung wurde aufgrund der geringen Anzahl von Ergebnissen nicht vorgenommen.

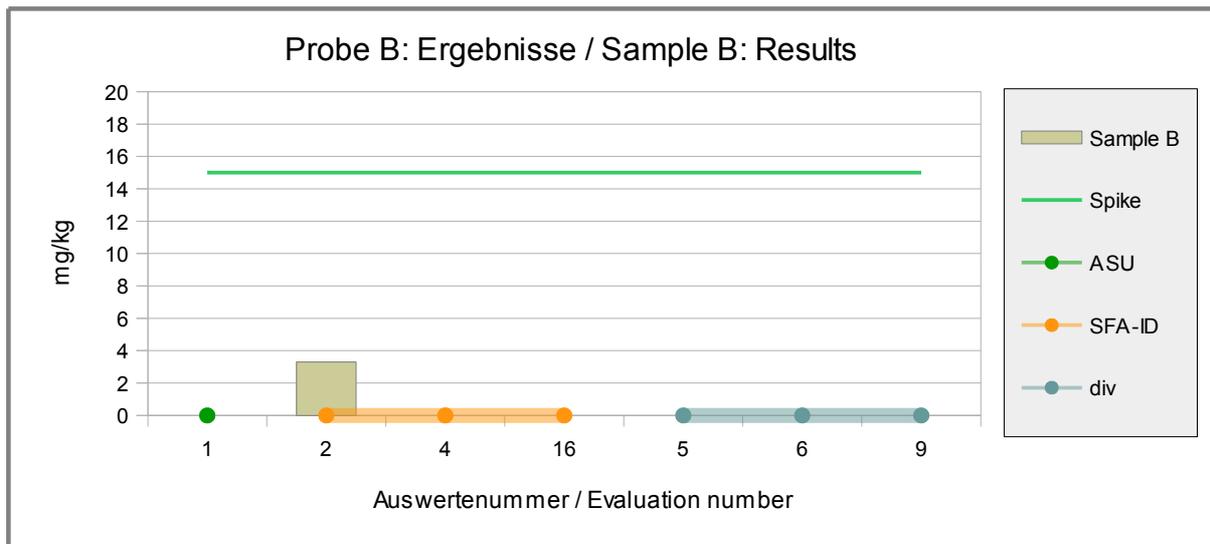


Abb./Fig. 10: PCR-Ergebnisse Mandel
grüne Linie = Zusatzniveau (Spike)
runde Symbole = Zuordnung der Methoden (s. Legende)

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

Auswertenummer	Dotierungsmaterial	Wiederfindungsrate*	Probe B	Wiederfindungsrate*	Methode	Hinweis
	[mg/kg]	[%]	[mg/kg]	[%]		
1					ASU	
2	5010	39	3,30	22	SFA-ID	
4	-		-		SFA-ID	
16					SFA-ID	
5	122	0,95			div	Mittelwert von DLA berechnet
6					div	
9					div	

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

Methoden:

ASU = ASU §64 Methode/method

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

div = keine genaue Angabe / andere Methode

* Wiederfindungsrate 100% Bezugsgröße: Mandel, s. Seite 4

** Akzeptanzbereich der AOAC für Allergen-ELISAs

Anmerkung:

Sowohl für die Dotierungsmaterialprobe als auch die mit dem Dotierungsmaterial hergestellte gebackene Lebensmittelmatrix-Probe B lagen die Wiederfindungsraten unterhalb des Bereichs der AOAC-Anforderung von 50-150%.

5. Dokumentation

5.1 Angaben der Teilnehmer

Hinweis: Angaben in englischer Sprache wurden von DLA nach bestem Wissen ins Deutsche übersetzt (ohne Gewähr der Richtigkeit).

5.1.1 ELISA: Erdnuss

Meth. Abk.	Auswertenummer	Datum der Analyse	Ergebnis Probe A		Ergebnis Probe B		Ergebnis Dotierungsprobe		Quantitatives Ergebnis als	Methode
			qualitativ	mg/kg	qualitativ	mg/kg	qualitativ	mg/kg		
BC	17	20.09.16	negativ	<1	positiv	10,2	positiv	20800	Erdnuss	Biocheck peanut Check
BC	17	20.09.16	negativ	<1	positiv	10,6	positiv	26400	Erdnuss	Biocheck peanut Check
BK	3	06.09.16	negativ	<1	positiv	9,2	positiv	15000	Erdnuss	BioKits Peanut Assay Kit, Neogen
BK	20a		negativ	<1.0	positiv	11	positiv	>20'000	Erdnuss	BioKits Peanut Assay Kit, Neogen
IL	19	05.09.16	negativ	< 0.5	positiv	13	positiv	25000	Erdnuss	Immunolab Peanut ELISA
NL-E	9		negativ	< 0,3	positiv	17	positiv	41000	Erdnuss	nutriLinia Peanut-E ELISA (NC-6014), Transia
RS	20b		negativ	<2.5	positiv	23	positiv	19700	Erdnuss	Ridascreen Peanut (R6201), r-Biopharm
RS-F	1	13.10.16	-		-	17,75	-	28606,17	Erdnuss	Ridascreen Fast Peanut (R6202), r-Biopharm
RS-F	2	05.10.16	negativ	<2.5	positiv	16,3	positiv	27744	Erdnuss	Ridascreen Fast Peanut (R6202), r-Biopharm
RS-F	8	MW	-	<2,5	-	12,7	-	22687	Erdnuss	Ridascreen Fast Peanut (R6202), r-Biopharm
RS-F	11	28.09.	negativ		positiv		positiv		Bitte auswählen!	Ridascreen Fast Peanut (R6202), r-Biopharm
RS-F	12		-	<0,13	-	14,19	-	34711	Erdnuss	Ridascreen Fast Peanut (R6202), r-Biopharm
RS-F	13	13.09.16	negativ	< 2,50	positiv	13,84	-		Erdnuss	Ridascreen Fast Peanut (R6202), r-Biopharm
RS-F	14	27.09.16	-	< LOD	-	14,91	-	30474	Erdnuss	Ridascreen Fast Peanut (R6202), r-Biopharm
RS-F	14	27.09.16	-	< LOD	-	13,49	-	29203	Erdnuss	Ridascreen Fast Peanut (R6202), r-Biopharm
RS-F	15	27.09.	negativ	< 2,5	positiv	15,43	positiv	28387,56	Erdnuss	Ridascreen Fast Peanut (R6202), r-Biopharm
RS-F	16		negativ		positiv	14,82	-		Bitte auswählen!	Ridascreen Fast Peanut (R6202), r-Biopharm
RS-F	18	08.09.16	negativ		positiv	11,19	positiv	29200	Erdnuss	Ridascreen Fast Peanut (R6202), r-Biopharm
RS-F	18	08.09.16	negativ		positiv	13,03	positiv	31500	Erdnuss	Ridascreen Fast Peanut (R6202), r-Biopharm
VT	7	14.09.16	negativ		positiv	11,9	na	na	Erdnuss	Veratox Peanut Allergen, Neogen
VT	20c		negativ	<2.5	positiv	9	positiv		Erdnuss	Veratox Peanut Allergen, Neogen

Fortsetzung ELISA Erdnuss:

Meth. Abk.	Auswertenummer	Spezifität	Hinweise zur Methode (Extraktion und Bestimmung)	Sonstige Hinweise
		Antikörper	z.B. Extraktionslösung / Zeit / Temperatur	
BC	17		60°C Extraktion	
BC	17		60°C Extraktion	
BK	3	Conarachin-A	lt. Herstellerangaben	
BK	20a			
IL	19			
NL-E	9		laut Manual	
RS	20b			
RS-F	1	Ara h1 und Ara h2	nach Testkitanleitung	
RS-F	2	siehe Testkit	nach Testkitanleitung	
RS-F	8	Ernussproteine	Probe B 1:2 verdünnt, Dotierungsprobe 1.:4000 verdünnt	
RS-F	11	siehe Testkit	entsprechend Testkit	
RS-F	12			Angabe von zwei Dezimalstellen bei der Dotierungsprobe nicht sinnvoll *
RS-F	13			
RS-F	14		1 g + 20 ml Extraktionspuffer aus dem Kit, 10 Minuten 60°C, zentrifugieren, je nach Konzentration verdünnen	
RS-F	14		1 g + 20 ml Extraktionspuffer aus dem Kit, 10 Minuten 60°C, zentrifugieren, je nach Konzentration verdünnen	
RS-F	15		nach Herstelleranleitung	
RS-F	16			
RS-F	18			
RS-F	18			
VT	7			
VT	20c			

* DLA gibt die Angabe von mind. 2 Dezimalstellen bezüglich der relevanten Stellen vor. Zum Beispiel: 2200 mg/kg anstatt 2235 mg/kg, und 2,2 mg/kg anstatt 2 mg/kg

5.1.2 ELISA: Mandel

Meth. Abk.	Auswertenummer	Datum der Analyse	Ergebnis Probe A		Ergebnis Probe B		Ergebnis Dotierungsprobe		Quantitatives Ergebnis als	Methode
			qualitativ	mg/kg	qualitativ	mg/kg	qualitativ	mg/kg		
BC	17	20.09.16	negativ	<0,5	positiv	5,9	positiv	13100	Mandel	Biocheck Almond Check
BC	17	20.09.16	negativ	<0,5	positiv	6,3	positiv	10600	Mandel	Biocheck Almond Check
IL	19	05.09.16	negativ	< 0,2	positiv	6	positiv	10000	Mandel	Immunolab Almond ELISA
NL-E	9		negativ	< 0,2	positiv	4	positiv	10000	Mandel	nutriLinia Almond-E ELISA (NC-6018), Transia
RS-F	1	12.10.16	-		-	6,13	-		Mandel	Ridascreen Fast Almond (R6901), r-Biopharm
RS-F	2	05.10.16	negativ	<2,5	positiv	6,08	positiv	9553	Mandel	Ridascreen Fast Almond (R6901), r-Biopharm
RS-F	3	08.09.16	negativ	<2,5	positiv	8,1	positiv	13000	Mandel	Ridascreen Fast Almond (R6901), r-Biopharm
RS-F	8	MW	-	<2,5	-	5,4	-	8919	Mandel	Ridascreen Fast Almond (R6901), r-Biopharm
RS-F	10	07.09.16	negativ	<2,5	positiv	4,5	positiv	8633	Mandel	Ridascreen Fast Almond (R6901), r-Biopharm
RS-F	11	05.10.	negativ		positiv		positiv		Bitte ausw ählen!	Ridascreen Fast Almond (R6901), r-Biopharm
RS-F	12		-	<1,2	-	6,54	-	10695	Mandel	Ridascreen Fast Almond (R6901), r-Biopharm
RS-F	13	23.09.16	negativ	< 2,50	positiv	5,32	-		Mandel	Ridascreen Fast Almond (R6901), r-Biopharm
RS-F	14	27.09.16	-	< LOD	-	4,42	-	9380	Mandel	Ridascreen Fast Almond (R6901), r-Biopharm
RS-F	14	27.09.16	-	< LOD	-	4,59	-	9583	Mandel	Ridascreen Fast Almond (R6901), r-Biopharm
RS-F	15	27.09.	negativ	< 2,5	positiv	5,3	positiv	11762,25	Mandel	Ridascreen Fast Almond (R6901), r-Biopharm
RS-F	16		negativ		positiv	3,6	-		Bitte ausw ählen!	Ridascreen Fast Almond (R6901), r-Biopharm
RS-F	18	09.09.16	negativ		positiv	4,75	positiv	10070	Mandel	Ridascreen Fast Almond (R6901), r-Biopharm
RS-F	18	12.09.16	negativ		positiv	6,79	positiv	9870	Mandel	Ridascreen Fast Almond (R6901), r-Biopharm
RS-F	20a		negativ	<2,5	positiv	6,5	positiv		Mandel	Ridascreen Fast Almond (R6901), r-Biopharm
VT	7	14.09.16	negativ		positiv	5,9	na	na	Mandel	Veratox Almond Allergen, Neogen
VT	20b		negativ	<2,5	positiv	4	positiv		Mandel	Veratox Almond Allergen, Neogen

Fortsetzung ELISA Mandel:

Meth. Abk.	Auswertenummer	Spezifität	Hinweise zur Methode (Extraktion und Bestimmung)	Sonstige Hinweise
		Antikörper	z.B. Extraktionslösung / Zeit / Temperatur	
BC	17		60°C Extraktion	
BC	17		60°C Extraktion	
IL	19			
NL-E	9		laut Manual	
RS-F	1		nach Testkitanleitung	
RS-F	2	siehe Testkit	nach Testkitanleitung	
RS-F	3	Mandelproteine	lt. Herstellerangaben	
RS-F	8	Mandelpoteine	Dotierungsprobe 1.:2000 verdünnt	
RS-F	10			Ergebnis für Probe B ist ein Einzelwert, weil die zweite Bestimmung < 2,5 mg/kg lag, nahe der Bestimmungsgrenze
RS-F	11	siehe Testkit	entsprechend Testkit	
RS-F	12			Angabe von zwei Dezimalstellen bei der Dotierungsprobe nicht sinnvoll
RS-F	13			
RS-F	14		1 g + 20 ml Extraktionspuffer aus dem Kit, 10 Minuten 60°C, zentrifugieren, je nach Konzentration verdünnen	
RS-F	14		1 g + 20 ml Extraktionspuffer aus dem Kit, 10 Minuten 60°C, zentrifugieren, je nach Konzentration verdünnen	
RS-F	15		nach Herstelleranleitung	
RS-F	16			
RS-F	18			
RS-F	18			
RS-F	20a			
VT	7			
VT	20b			

5.1.3 PCR: Erdnuss

Meth. Abk.	Auswertenummer	Datum der Analyse	Ergebnis Probe A		Ergebnis Probe B		Ergebnis Dotierungsprobe		Quantitatives Ergebnis als	Methode
			qualitativ	mg/kg	qualitativ	mg/kg	qualitativ	mg/kg		
		Tag/Monat							Test-Kit + Anbieter	
ASU	1		negativ		positiv		-		Erdnuss-DNA	ASU §64 L 44.00-11 (PCR-Erdnuss)
SFA-ID	2	05.10.16	negativ	<1	positiv	32,79	positiv	52896	Erdnuss	Sure Food Allergen ID, Congen / r-Biopharm
SFA-ID	16		negativ		positiv		-		Bitte auswählen!	Sure Food Allergen ID, Congen / r-Biopharm
SFA-ID	4a	09.09.	negativ	-	positiv	-	positiv	-	Erdnuss	Sure Food Allergen ID, Congen / r-Biopharm
SFA-Q	4b	09.09.	negativ	< 1	positiv	< 4	positiv	5145	Erdnuss	Sure Food Allergen QUANT, Congen / r-Biopharm
div	5	12.10.16	negativ		positiv		-	84	Bitte auswählen!	pmPES
div	5	12.10.16	negativ		positiv		-	83	Bitte auswählen!	pmPES
div	6	11.10.16	negativ		negativ		positiv		Bitte auswählen!	Real-Time PCR (Hausverfahren)
div	9		negativ		positiv		positiv		Bitte auswählen!	Hausmethode

Meth. Abk.	Auswertenummer	Spezifität	Hinweise zur Methode (Extraktion und Bestimmung)	Sonstige Hinweise
		Target-Sequenz / -DNA	z.B. Extraktion / Enzyme / Clean-Up / Real Time PCR / Gelelektrophorese / Cyclen	
ASU	1		nach ASU-Methode	
SFA-ID	2	siehe Testkitanleitung	nach Testkitanleitung	
SFA-ID	16			
SFA-ID	4a	-	S3103 SureFood® ALLERGEN ID Peanut Nachweisgrenze, Extraktion mit S1053 SureFood® PREP Advanced, Protokoll	
SFA-Q	4b	-	S3203 SureFood® ALLERGEN QUANT Peanut Nachweisgrenze, Extraktion mit S1053 SureFood® PREP Advanced, Protokoll	
div	5		CTAB, Magnetic Beads	
div	5		CTAB, Magnetic Beads	
div	6			
div	9	Ara h 3	Real Time PCR, 45 Cyclen	

5.1.4 PCR: Mandel

Meth. Abk.	Auswertenummer	Datum der Analyse	Ergebnis Probe A		Ergebnis Probe B		Ergebnis Dotierungsprobe		Quantitatives Ergebnis als	Methode
			qualitativ	mg/kg	qualitativ	mg/kg	qualitativ	mg/kg		
		Tag/Monat								Test-Kit + Anbieter
ASU	1		negativ		positiv		-		Mandel-DNA	ASU §64 L 18.00-20 (P-CR-Mandel)
SFA-ID	2	24.09.16	negativ	<1	positiv	3,3	positiv	5006	Mandel	Sure Food Allergen ID, Congen / r-Biopharm
SFA-ID	4	14.09.	negativ	-	negativ	-	positiv	-	Mandel	Sure Food Allergen ID, Congen / r-Biopharm
SFA-ID	16		negativ		positiv		-		Bitte auswählen!	Sure Food Allergen ID, Congen / r-Biopharm
div	5	12.10.16	negativ		positiv		-	133	Bitte auswählen!	pmMad-Hex
div	5	12.10.16	negativ		positiv		-	111	Bitte auswählen!	pmMad-Hex
div	6	12.10.16	negativ		positiv		positiv		Bitte auswählen!	Real-Time PCR (Hausverfahren)
div	9		negativ		positiv		positiv		Bitte auswählen!	Hausmethode

Meth. Abk.	Auswertenummer	Spezifität	Hinweise zur Methode (Extraktion und Bestimmung)	Sonstige Hinweise
		Target-Sequenz / -DNA	z.B. Extraktion / Enzyme / Clean-Up / Real Time PCR / Gelelektrophorese / Cyclen	
ASU	1		nach ASU-Methode	
SFA-ID	2	siehe Testkitanleitung	nach Testkitanleitung	
SFA-ID	4	-	S3104 SureFood® ALLERGEN ID Almond Nachweisgrenze, Extraktion mit S1053 SureFood® PREP Advanced, Protokoll	
SFA-ID	16			
div	5		CTAB, Magnetic Beads	
div	5		CTAB, Magnetic Beads	
div	6			
div	9	nsLTP	Real Time PCR, 45 Cyclen	

5.2 Homogenität

5.2.1 Mischungshomogenität vor der Abfüllung

Microtracer Homogenitätstest

DLA 05-2016 Probe B

Gewicht Gesamtprobe	2,51	kg
Microtracer	FSS-rot lake	
Teilchengröße	75 – 300	µm
Gewicht pro Partikel	2,0	µg
Tracerzugabe	19,1	mg/kg

Analysenergebnisse:

Probe	Einwaage [g]	Partikel Anzahl	Partikel [mg/kg]
1	5,24	55	21,0
2	5,06	58	22,9
3	5,28	57	21,6
4	5,15	59	22,9
5	5,13	59	23,0
6	5,16	53	20,5
7	5,12	54	21,1
8	5,02	44	17,5

Poisson-Verteilung

Probenanzahl	8	
Freiheitsgrad	7	
Mittelwert	54,9	Partikel
Standardabweichung	4,68	Partikel
χ^2 (CHI-Quadrat)	2,79	
Wahrscheinlichkeit	90	%
Wiederfindungsrate	112	%

Normalverteilung

Probenanzahl	8	
Mittelwert	21,3	mg/kg
Standardabweichung	1,82	mg/kg
rel. Standardabweichung	8,53	%
Horwitz Standardabweichung	10,1	%
HorRat-Wert	0,84	
Wiederfindungsrate	112	%

Microtracer Homogenitätstest

DLA 05-2016 Dotierungsmaterialprobe

Gewicht Gesamtprobe	1,50	kg
Microtracer	FSS-rot lake	
Teilchengröße	75 – 300	µm
Gewicht pro Partikel	2,0	µg
Tracerzugabe	23,0	mg/kg

Analysenergebnisse:

Probe	Einwaage [g]	Partikel Anzahl	Partikel [mg/kg]
1	5,00	48	19,2
2	5,09	55	21,6
3	5,01	40	16,0
4	5,54	43	15,5
5	5,15	61	23,7
6	5,30	60	22,6
7	5,30	48	18,1
8	5,30	50	18,9

Poisson-Verteilung

Probenanzahl	8	
Freiheitsgrad	7	
Mittelwert	50,7	Partikel
Standardabweichung	7,79	Partikel
χ^2 (CHI-Quadrat)	8,38	
Wahrscheinlichkeit	30	%
Wiederfindungsrate	85	%

Normalverteilung

Probenanzahl	8	
Mittelwert	19,5	mg/kg
Standardabweichung	2,99	mg/kg
rel. Standardabweichung	15,4	%
Horwitz Standardabweichung	10,2	%
HorRat-Wert	1,5	
Wiederfindungsrate	85	%

6. Verzeichnis der Teilnehmer in alphabetischer Reihenfolge

Teilnehmer / Participant	Ort / Town	Land / Country
		GROSSBRITANIEN
		Deutschland
		SCHWEIZ
		KANADA
		ITALIEN
		Deutschland
		Deutschland
		SCHWEDEN
		Deutschland
		GROSSBRITANIEN
		Deutschland
		Deutschland
		Deutschland
		ÖSTERREICH
		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 purposes¹, 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 00.00-69 Bestimmung von Erdnuss-Kontaminationen in Lebensmitteln mittels ELISA im Mikrotiterplattensystem (2003)
 28. ASU §64 LFGB L 44.00-7 Bestimmung von Haselnuss-Kontaminationen in Schokolade und Schokoladenwaren mittels ELISA im Mikrotiterplattensystem (2006)
 29. ASU §64 LFGB L 18.00-20 Untersuchung von Lebensmitteln - Nachweis und Bestimmung von Mandel (*Prunus dulcis*) in Reis- und Weizenkeksen sowie in Soßenpulver mittels real-time PCR (2014)
 30. ASU §64 LFGB L 18.00-22 Untersuchung von Lebensmitteln - Simultaner Nachweis und Bestimmung von Lupine, Mandel, Paranuss und Sesam in Reis- und Weizenkeksen sowie Soßenpulver mittels real-time PCR (2014)

DLA 05/2016 - Allergene V

20 von 21 Teilnehmern haben Ergebnisse eingereicht. Die Auswertung erfolgte hinsichtlich der Parameter Erdnuss und Mandel getrennt nach den Methoden ELISA und PCR. Die ELISA-Ergebnisse für Erdnuss und Mandel wurden quantitativ ausgewertet. Die PCR-Ergebnisse wurden qualitativ bewertet. Details zu den einzelnen Parametern inklusive separater Auswertung nach Testkit-Herstellern sind dem Auswertebereicht zu entnehmen.

6 Teilnehmer hatten ihren Sitz im Europäischen Ausland (Großbritannien, Italien, Österreich, Schweden, Schweiz) und ein Teilnehmer im außereuropäischen Ausland (Kanada).