

DLA
Dienstleistung
Lebensmittel
Analytik GbR

Auswertungs-Bericht
Laborvergleichsuntersuchung

09/2016

Allergene IX:
Casein und Eiklarprotein
in Wein

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.....	5
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.....	13
3.6 Quotient S^*/σ	14
3.7 Standardunsicherheit des zugewiesenen Werts.....	14
3.8 Graphische Darstellung der Bezugswerte.....	14
3.9 Wiederfindungsraten: Dotierung.....	14
4. Ergebnisse.....	15
4.1 Vergleichsuntersuchung Casein.....	17
4.1.1 ELISA-Ergebnisse: Casein.....	17
4.2 Vergleichsuntersuchung Eiklarproteine.....	23
4.1.1 ELISA-Ergebnisse: Eiklarproteine, gesamt.....	23
4.1.2 ELISA-Ergebnisse: Lysozym.....	29
5. Dokumentation.....	30
5.1 ELISA: Casein.....	30
5.2 ELISA: Eiklarprotein inklusive Lysozym.....	32
6. Verzeichnis der teilnehmenden Institute in alphabetischer Reihenfolge.....	34
7. Verzeichnis relevanter Literatur.....	35

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 handelsüblichen Weißwein "Riesling" (Mosel, Deutscher Qualitätswein). Die Grundzusammensetzung war für beide Proben A und B gleich (s. Tabelle 1). Der pH-Wert des Weins wurde zur Stabilisierung der Allergene auf pH 7-8 eingestellt. Probe B wurde das Dotierungsmaterial mit den allergenen Zutaten Magermilchpulver und Eiklarpulver (Weinbehandlungsmittel) zugesetzt.

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. 200 mL in PE-Flaschen mit Schraubdeckel abgefüllt.

Tabelle 1: Zusammensetzung der DLA-Proben

Zutaten	Probe A	Probe B
Weißwein Riesling Kennzeichnung: Riesling feinherb, Deutscher Qualitätswein, Mosel, enthält Sulfite, 10,0 % vol Vorbehandlung: pH-Einstellung mit Natrium- carbonat-Lösung auf pH 7-8	100 g/100g	99,6 g/100g
Dotierungsmaterialprobe	-	0,449 g/100g

Tabelle 2: Zugesezte Mengen allergener Zutaten

Zutaten	Dotierungsmaterialprobe	Probe B
Glucose	81,1 %	0,364 %
Fructose	8,11 %	0,036 %
<i>Milch:</i> Zutaten: Magermilch (pasteuri- siert, sprühgetrocknet) - als Magermilchpulver - davon Gesamtprotein* - davon Casein*	82500 mg/kg (= 8,25 %) 27200 mg/kg 21800 mg/kg	370 mg/kg 122 mg/kg 98 mg/kg
<i>Eiklar-Pulver (Weinbehand- lungsmittel)</i> Zutaten: Hühnereiklar (pasteuri- siert, sprühgetrocknet) - davon Eiklarprotein* - davon Lysozym*	24800 mg/kg (= 2,48 %) 19840 mg/kg 694 mg/kg	111 mg/kg 89 mg/kg 3,1 mg/kg

* Proteingehalt gemäß Kennzeichnung/Spezifikation/Literatur berechnet

2.1.1 Homogenität

Die Homogenität der dotierten Probe B und der Dotierungsmaterialprobe wurde anhand des Eiklarproteingehalts mittels ELISA-Tests geprüft (s. Abb. 1) und mit einer Standardabweichung zwischen den Proben von < 15% für das verwendete Verfahren als hinreichend gesichert angesehen [14, 15, 18, 19]. 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].

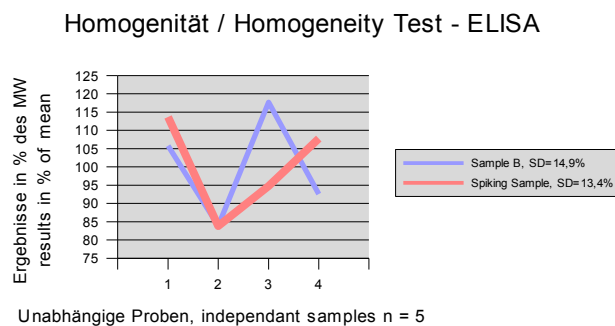


Abb. 1: Homogenitätsprüfung der DLA-Probe B und Dotierungsmaterialprobe
Darstellung der Ergebnisse relativ in Prozent des arithmetischen Mittelwerts

2.2 Probenversand und Informationen zur Untersuchung

An jedes teilnehmende Institut wurden in der 8. Kalenderwoche 2016 je eine Portion der Untersuchungsmaterialien A und B sowie eine Dotierungsmaterialprobe verschickt. Die Untersuchungsverfahren wurden freigestellt. Die Untersuchungen waren durchzuführen bis spätestens 8. April 2016.

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

Wichtiger Hinweis: Der pH-Wert der Weinproben A und B wurde mit einer Natriumcarbonat-Lösung auf pH 7-8 eingestellt, um die Allergene in Lösung/Suspension zu stabilisieren. Vor der Analyse empfehlen wir, die Weinproben vorsichtig umzuschwenken.

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 Casein bzw. Eiklarprotein.

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.

Alle 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 [21, 22, 23, 24]. 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 Ergebnisse wurden qualitativ anhand des Prozentsatzes positiver bzw. negativer Ergebnisse bewertet. Sofern ≥ 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 werden.

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-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]:

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

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

Tabelle 2: Relative Wiederholstandardabweichungen (RSD_r) und relative Vergleichsstandardabweichungen (RSD_R) gemäß Auswertungen von Versuchen zur Präzision [26, 27, 29]

Parameter	Matrix	Mittelwerte	RSD_r	RSD_R	Methode / Literatur
Caseinat	Weißweine	0,057 – 0,78 mg/L	-	35,1 – 90,0 %	ELISA [26]
Caseinat	Weißweine	1,4 – 3,0 mg/L	-	20,3 – 29,4 %	ELISA [26]
Caseinat	Weißweine	6,3 – 6,8 mg/L	-	12,1 – 21,4 %	ELISA [26]
Eiklarproteine	Rotweine	1,0 – 1,4 mg/L	23,0 – 27,6 %	30,6 – 32,9 %	ELISA [27]
Eiklarproteine	Rotweine	3,5 – 4,2 mg/L	14,7 – 19,3 %	26,2 – 31,1 %	ELISA [27]
Eiklarproteine	Rotweine	5,9 – 6,9 mg/L	12,5 – 16,5 %	20,1 – 25,7 %	ELISA [27]
Casein	Rotweine	1,02 mg/L	11,7 %	19,4 %	ELISA [29]
Casein	Rotweine	5,6 – 8,5 mg/L	14,7 – 24,0 %	24,8 – 35,6 %	ELISA [29]
Casein	Weißweine	0,12 – 0,80 mg/L	9,1 – 35,0 %	13,7 – 53,8 %	ELISA [29]
Casein	Weißweine	4,1 – 5,5 mg/L	10,8 – 13,6 %	16,7 – 18,3 %	ELISA [29]
Eiklarproteine	Rotweine	0,26 mg/L	55,5 %	67,5 %	ELISA [29]
Eiklarproteine	Rotweine	1,1 – 7,6 mg/L	10,3 – 12,3 %	13,2 – 21,3 %	ELISA [29]
Eiklarproteine	Weißweine	0,59 mg/L	37,4 %	52,1 %	ELISA [29]
Eiklarproteine	Weißweine	3,6 – 6,5 mg/L	11,1 – 17,3 %	17,2 – 22,1 %	ELISA [29]

Die in Tabelle 2 aufgeführten Präzisionsdaten wurden in Ringversuchen mittels teils modifizierten ELISA-Testkit-Methoden anhand von gespikten Weinproben erhalten [26, 27, 29]. In Abhängigkeit des Allergen-Gehalts wurden im Bereich > 1 mg/L relative Vergleichsstandardabweichungen von ca. 12 – 36 % und im Bereich < 1 mg/L von ca. 14 – 90 % erhalten.

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 [18], von der Arbeitsgruppe 12 „Lebensmittelallergene“ des Technischen Komitees CEN/TC 275 [15-17], von einer internationalen "Food Allergen Working Group" unter der Leitung der AOAC Presidential Task Force on Food Allergens [19] und vom Codex Alimentarius Committee (CAC/GL 74-2010) [14] erarbeitet worden.

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

Tabelle 3: ELISA-Validierungskriterien

Literatur [14-20]	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 [14]	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 herangezogen und auf alle unter 3.1 angegebenen Bezugswerte angewandt.

Gesetzliche Regelungen und Höchstwert-Empfehlungen

Die Kennzeichnung von Allergenen ist in der Lebensmittel-Informations-VO (EU 1169/2011) geregelt. Speziell für Wein ist die Art und Weise der Kennzeichnung der Verwendung von allergenhaltigen Schönungsmitteln bei

der Weinherstellung in der Durchführungsverordnung (EU 579/2012) vorgeschrieben [25-28]. Neben Schwefeldioxid sind Weinbehandlungsmittel auf Basis von Milch und Ei auf dem Etikett anzugeben, sofern sie im Wein nachweisbar sind. Aufgrund von Ringversuchsdaten wurden von der Internationalen Organisation für Rebe und Wein (OIV) als Nachweisgrenze $\leq 0,25$ mg/L und als Bestimmungsgrenze $\leq 0,5$ mg/L als Kriterien für die Quantifizierung von Casein aus Milch sowie Albumin und/oder Lysozym aus Ei in Wein festgelegt [28].

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]. 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 ≥ 10 Ergebnisse vorliegen [3].

3.6 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].

3.7 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.

3.8 Graphische Darstellung der Bezugswerte

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

3.9 Wiederfindungsraten: Dotierung

Für die Ergebnisse von Dotierungsmaterialprobe und dotierter Probe werden Wiederfindungsraten in Bezug auf die zugesetzten Allergene (Zusatzniveau) berechnet. Die Bezugswerte ergeben sich aus den unter 2.1 Untersuchungsmaterial in Tabelle 1 angegebenen Gehalten. Als Akzeptanzbereich AB für die Bewertung der Teilnehmerergebnisse wird der von der AOAC vorgeschlagene Bereich von 50 - 150% für die Wiederfindungsraten von Allergen-ELISAs herangezogen [19]. 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 Milchprotein (gesamt) angegeben wurden, sind in Casein umgerechnet worden. Sofern angegeben wurden die Vorgaben des betreffenden Testkit-Herstellers berücksichtigt. Es wurde ein Casein-Gehalt von 80% in Gesamtmilchprotein zugrunde gelegt.

ELISA-Ergebnisse, die als Volleipulver bzw. Ovalbumin angegeben wurden, sind in Eiklarproteine umgerechnet worden. Sofern angegeben wurden die Vorgaben des betreffenden Testkit-Herstellers berücksichtigt. Es wurde ein Anteil von 26% Eiklarprotein in Volleipulver zugrunde gelegt. Für Ovalbumin wurde gemäß Testkit-Anleitung (Immunolab) von 75% Kreuzreaktivität zu Eiklarprotein ausgegangen.

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 ≥ 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 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 Casein

4.1.1 ELISA-Ergebnisse: Casein

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	< 0.1	positiv		2/2 (100%)	AQ	
5	negativ	< 0,1	positiv	78	2/2 (100%)	AQ	
7	negativ	<0.2	positiv	>6	2/2 (100%)	AQ	
13	negativ	<0,2	positiv	73	2/2 (100%)	AQ	
8	negativ	<0,5	positiv	24	2/2 (100%)	IL	
15	negativ	<0.1	positiv	36	2/2 (100%)	IL	
3	negativ		positiv	1,84	2/2 (100%)	RS1	
4	negativ		positiv	2,1	2/2 (100%)	RS1	
6	negativ	<0,5	positiv	3,2	2/2 (100%)	RS1	
9	negativ	<0.5	positiv	1,59	2/2 (100%)	RS1	
10	negativ		positiv	1,7	2/2 (100%)	RS1	
11	negativ	<0.24	positiv	2,2	2/2 (100%)	RS1	
12	negativ	n.n.	positiv	26,1	2/2 (100%)	RS2	Ergebnis umgerechnet *

* Umrechnung s. S. 14

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

Methoden:

AQ = AgraQuant Casein, RomerLabs
 IL = Immunolab Casein

RS1 = Ridascreen Fast Casein, R-Biopharm
 RS2 = Ridascreen Fast Milch, R-Biopharm

Anmerkung:

Es wurden zum Nachweis von Casein 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	Casein [mg/kg]	z-Score X _{pt} ALL	z-Score X _{pt} RS1	Methode	Hinweis
1				AQ	
5	78			AQ	
7	>6			AQ	
13	73			AQ	
8	24			IL	
15	36			IL	
3	1,84		-0,4	RS1	
4	2,1		0,1	RS1	
6	3,2		2,3	RS1	
9	1,59		-0,9	RS1	
10	1,7		-0,6	RS1	
11	2,2		0,3	RS1	
12	26,1			RS2	Ergebnis umgerechnet *

* Umrechnung s. S. 12

Methoden:

AQ = AgraQuant Casein, RomerLabs
 IL = Immunolab Casein

RS1 = Ridascreen Fast Casein, R-Biopharm
 RS2 = Ridascreen Fast Milch, R-Biopharm

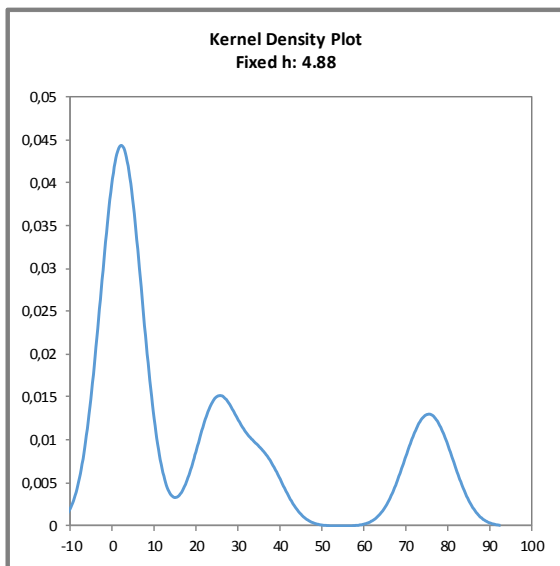


Abb. 2: Kerndichte-Schätzung aller ELISA-Ergebnisse Casein (mit $h = \sigma_{pt}$ von X_{ptALL})

Anmerkung:

Die Kerndichte-Schätzung zeigt eine trimodale Verteilung, die sich den verwendeten Methoden zuordnen lässt: 1. Methode RS1, 2. Methoden IL und RS2 und 3. Methode AQ (s. Abb. 2).

Kenndaten: Quantitative Auswertung Casein**Probe B**

Kenndaten	Alle Ergebnisse [mg/kg]	Methode RS1 [mg/kg]
Zugewiesener Wert (X_{pt})	$X_{pt_{ALL}}$	$X_{pt_{METHOD RS1}}$
Anzahl der Messergebnisse	11	6
Anzahl der Ausreißer	-	0
Median	3,20	1,97
Robuster Mittelwert (X_{pt})	19,5	2,03
Robuste Standardabweichung (S^*)	25,6	0,476
<i>Zielkenndaten:</i>		
Zielstandardabweichung σ_{pt}		0,507
untere Grenze des Zielbereichs		1,01
obere Grenze des Zielbereichs		3,04
Quotient S^*/σ_{pt}		0,94
Standardunsicherheit $U(X_{pt})$		0,243
Quotient $U(X_{pt})/\sigma_{pt}$		0,48
Ergebnisse im Zielbereich		5
Prozent im Zielbereich		83%

Methode:

RS1 = 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 Auswertungen der Ergebnisse von Methode RS1 zeigte eine geringe Variabilität der Ergebnisse. Der Quotient S^*/σ_{pt} lag deutlich unter 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 RS1 lag bei ca. 2% des Zusatzniveaus von Casein zu Probe B, und somit unterhalb der relevanten Anforderungen für die eingesetzte Methode (s. 3.4.3 und "Wiederfindungsraten für Casein" S.21).

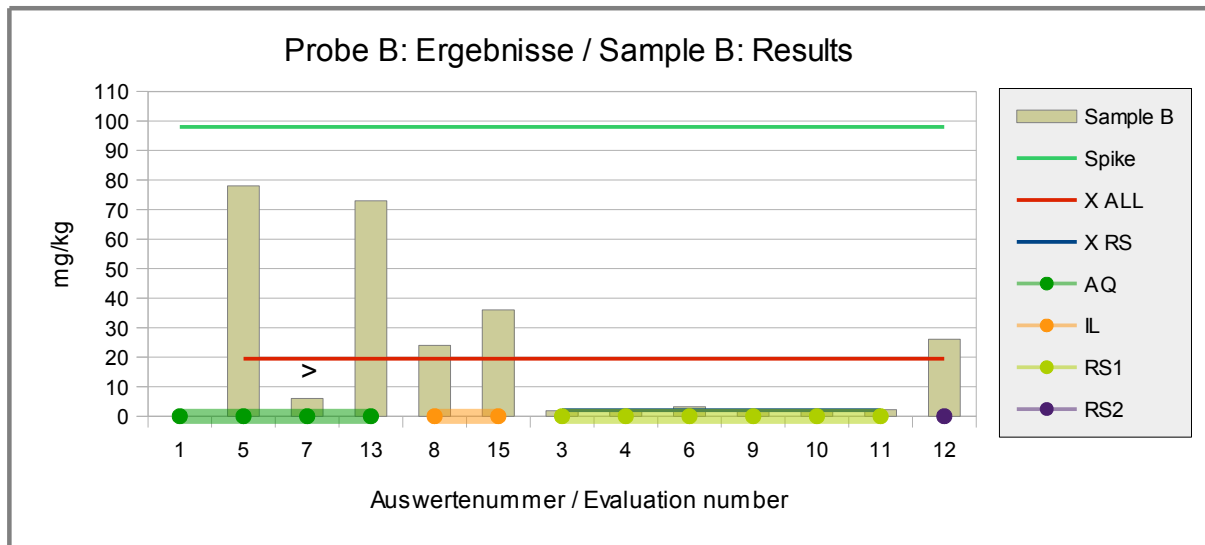


Abb. 3a: ELISA-Ergebnisse Casein
 grüne Linie = Zusatzniveau
 rote Linie = Bezugswert robuster Mittelwert aller Ergebnisse
 blaue Linie = Bezugswert robuster Mittelwert Ergebnisse Methode RS1
 runde Symbole = Zuordnung der Methoden (s. Legende)

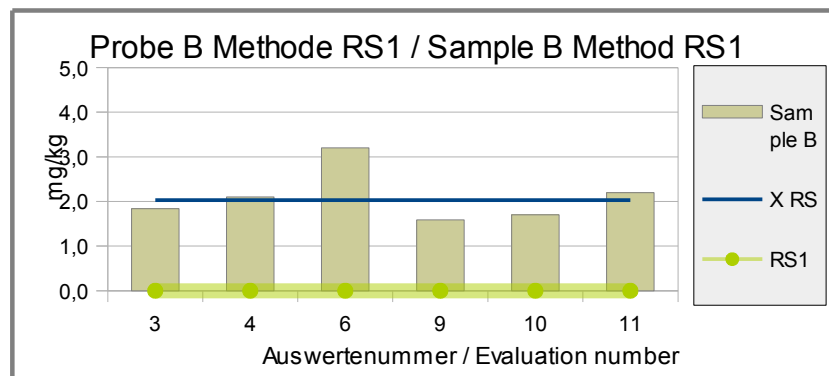


Abb. 3b: ELISA-Ergebnisse Casein - Ausschnitt Methode RS1
 blaue Linie = Bezugswert robuster Mittelwert Ergebnisse Methode RS1
 runde Symbole = Zuordnung der Methoden (s. Legende)

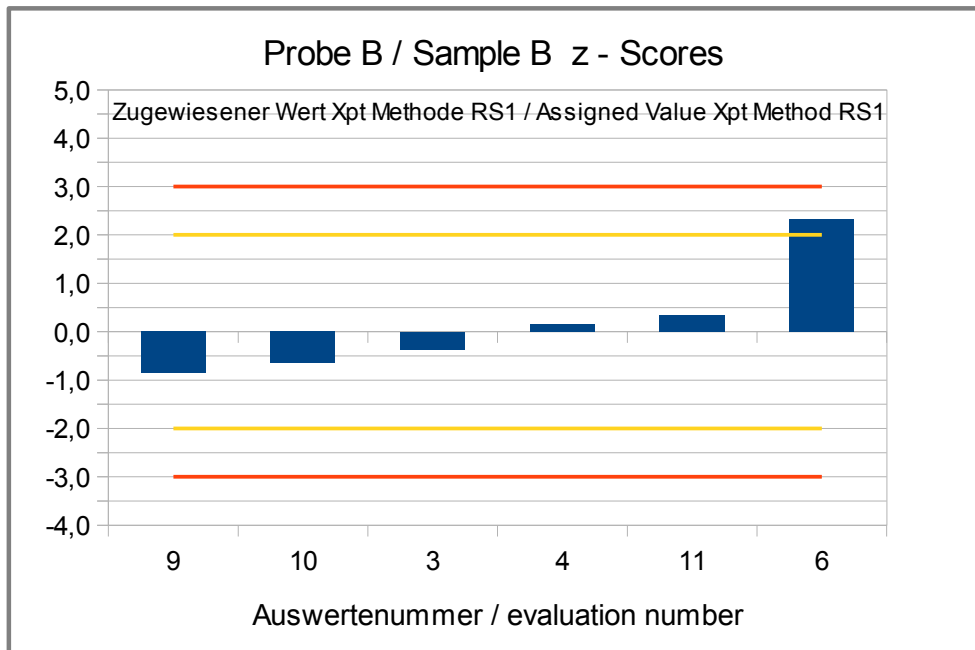


Abb. 4: z-Scores (ELISA-Ergebnisse als Casein)
 Bezugswert robuster Mittelwert Ergebnisse Methode RS1
 (R-Biopharm, Ridascreen Fast)

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

Auswertenummer	Dotierungsmaterial	Wiederfindungsrate	Probe B	Wiederfindungsrate	Methode	Hinweis
	[mg/kg]	[%]	[mg/kg]	[%]		
1					AQ	
5	48900	224	78	80	AQ	
7	28500	131	>6		AQ	
13	42000	193	73	74	AQ	
8	363454	1667	24	24	IL	
15	15500	71	36	37	IL	
3	11714	54	1,84	1,9	RS1	
4			2,1	2,1	RS1	
6			3,2	3,3	RS1	
9	20815	95	1,59	1,6	RS1	
10	41690	191	1,7	1,7	RS1	
11			2,2	2,2	RS1	
12	19500	89	26,1	27	RS2	Ergebnis umgerechnet *

* Umrechnung s. S. 12

AB*	50-150 %	AB*	50-150 %
Anzahl im AB	5	Anzahl im AB	2
Prozent im AB	56	Prozent im AB	18

* Akzeptanzbereich der AOAC für Allergen-ELISAs

Wiederfindungsrate
100% Bezugsgröße:
Casein, s. Seite 4

Methoden:

AQ = AgraQuant Casein, RomerLabs
IL = Immunolab Casein

RS1 = Ridascreen Fast Casein, R-Biopharm
RS2 = Ridascreen Fast Milch, R-Biopharm

Anmerkung:

56% 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 Weinprobe B lagen 2 Wiederfindungsraten (Methode AQ) in diesem Akzeptanzbereich.

4.2 Vergleichsuntersuchung Eiklarproteine

4.1.1 ELISA-Ergebnisse: Eiklarproteine, gesamt

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	negativ	<0.4	positiv	>8	2/2 (100%)	BC	
5	negativ	< 0,05	positiv	101	2/2 (100%)	IL1	
8	negativ	<0,5	positiv	63	2/2 (100%)	IL1	
15a	negativ	< 0.2	positiv	50	2/2 (100%)	IL1	
15b	negativ	< 0.017	positiv	40	2/2 (100%)	IL2	Ergebnis umgerechnet *
1	negativ	< 0.065	positiv	49,1	2/2 (100%)	RS	Ergebnis umgerechnet *
3	negativ		positiv	39,74	2/2 (100%)	RS	Ergebnis umgerechnet *
4	negativ		positiv	46,4	2/2 (100%)	RS	Ergebnis umgerechnet *
6	negativ	<0,13	positiv	46,1	2/2 (100%)	RS	Ergebnis umgerechnet *
9	negativ	<0.13	positiv	42,31	2/2 (100%)	RS	
10	negativ		positiv	60,8	2/2 (100%)	RS	
11	negativ	<0.1	positiv	>10	2/2 (100%)	RS	
12	negativ	n.n.	positiv	66,8	2/2 (100%)	RS	Ergebnis umgerechnet *
13	negativ	<0,13	positiv	65	2/2 (100%)	RS	Ergebnis umgerechnet *
14	negativ	-	positiv	88,4	2/2 (100%)	RS	Ergebnis umgerechnet *
2	negativ		positiv	113,66	2/2 (100%)	TC	

* Umrechnung s. S. 14

	Probe A	Probe B
Anzahl positiv	0	16
Anzahl negativ	16	0
Prozent positiv	0	100
Prozent negativ	100	0
Konsenswert	negativ	positiv

Methoden:

BC = BioCheck

IL1 = Immunolab Eiklarprotein

IL2 = Immunolab Ovalbumin

RS = Ridascreen®, R-Biopharm

TC = Tecna

Anmerkung:

Es wurden zum Nachweis von Eiklarproteinen 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	Eiklarproteine [mg/kg]	z-Score $X_{pt_{ALL}}$	z-Score $X_{pt_{RS}}$	Methode	Hinweis
7	>8			BC	
5	101	2,7		IL1	
8	63	0,2		IL1	
15a	50	-0,7		IL1	
15b	40	-1,3		IL2	Ergebnis umgerechnet *
1	49,1	-0,7	-0,4	RS	Ergebnis umgerechnet *
3	39,74	-1,4	-1,1	RS	Ergebnis umgerechnet *
4	46,4	-0,9	-0,6	RS	Ergebnis umgerechnet *
6	46,1	-0,9	-0,6	RS	Ergebnis umgerechnet *
9	42,31	-1,2	-0,9	RS	
10	60,8	0,0	0,4	RS	
11	>10			RS	
12	66,8	0,4	0,9	RS	Ergebnis umgerechnet *
13	65	0,3	0,7	RS	Ergebnis umgerechnet *
14	88,4	1,9	2,5	RS	Ergebnis umgerechnet *
2	113,66	3,5		TC	

* Umrechnung s. S. 12

Methoden:

BC = BioCheck

IL1 = Immunolab Eiklarprotein

IL2 = Immunolab Ovalbumin

RS = Ridascreen®, R-Biopharm

TC = Tecna

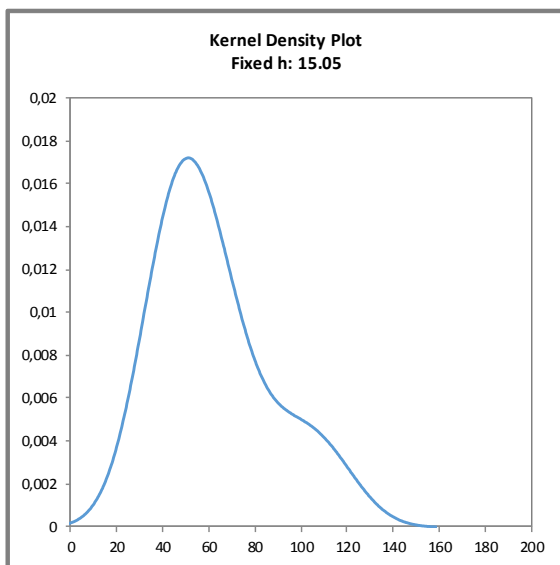


Abb. 5: Kerndichte-Schätzung aller ELISA-Ergebnisse Eiklarprotein (mit $h = \sigma_{pt}$ von $X_{pt_{ALL}}$)

Anmerkung:

Die Kerndichte-Schätzung zeigt annähernd eine Normalverteilung der Ergebnisse mit einer Schulter bei ca. 100-115 mg/kg (s. Abb. 5).

Kenndaten: Quantitative Auswertung Eiklarprotein**Probe B**

Kenndaten	Alle Ergebnisse [mg/kg]	Methode RS [mg/kg]
Zugewiesener Wert (X_{pt})	$X_{pt,ALL}$	$X_{pt,METHOD RS}$
Anzahl der Messergebnisse	14	9
Anzahl der Ausreißer	0	0
Median	55,4	49,1
Robuster Mittelwert (X_{pt})	60,2	54,8
Robuste Standardabweichung (S^*)	21,7	14,6
<i>Zielkenndaten:</i>		
Zielstandardabweichung σ_{pt}	15,1	13,7
untere Grenze des Zielbereichs	30,1	27,4
obere Grenze des Zielbereichs	90,3	82,1
Quotient S^*/σ_{pt}	1,4	1,1
Standardunsicherheit $U(X_{pt})$	7,24	6,07
Quotient $U(X_{pt})/\sigma_{pt}$	0,48	0,44
Ergebnisse im Zielbereich	12	8
Prozent im Zielbereich	86%	89%

Methode:

RS = R-Biopharm, Ridascreen®

Anmerkungen zu den Kenndaten und Vergleich der Bezugswerte:

Die Auswertungen der Ergebnisse aller Methoden und von Methode RS zeigten eine normale bis geringe Variabilität der Ergebnisse. Der Quotient S^*/σ_{pt} lag jeweils deutlich unter 2,0. Die robusten Standardabweichungen liegen 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 IL und TC jeweils nur wenige Ergebnisse vorlagen.

Die robusten Mittelwerte der Auswertungen lagen mit 68% und 62% vom Zusatzniveau von Eiklarprotein zu Probe B, innerhalb der relevanten Anforderungen für die eingesetzten Methoden (s. 3.4.3 und "Wiederfindungsraten für Eiklarprotein" S.27).

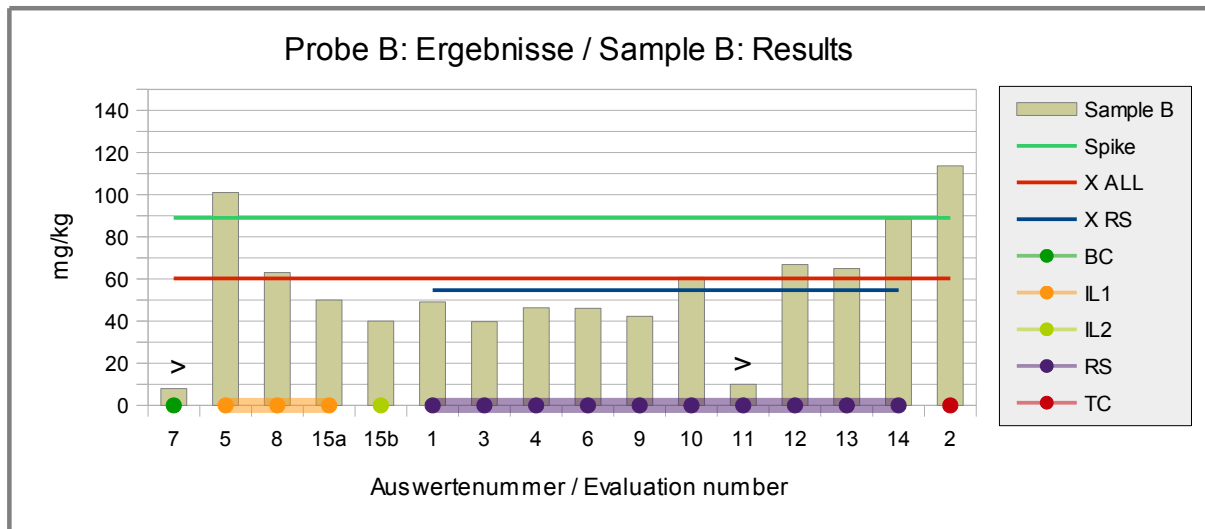


Abb. 6: ELISA-Ergebnisse Eiklarprotein
 grüne Linie = Zusatzniveau
 rote Linie = Bezugswert robuster Mittelwert aller Ergebnisse
 blaue Linie = Bezugswert robuster Mittelwert Ergebnisse Methode RS
 runde Symbole = Zuordnung der Methoden (s. Legende)

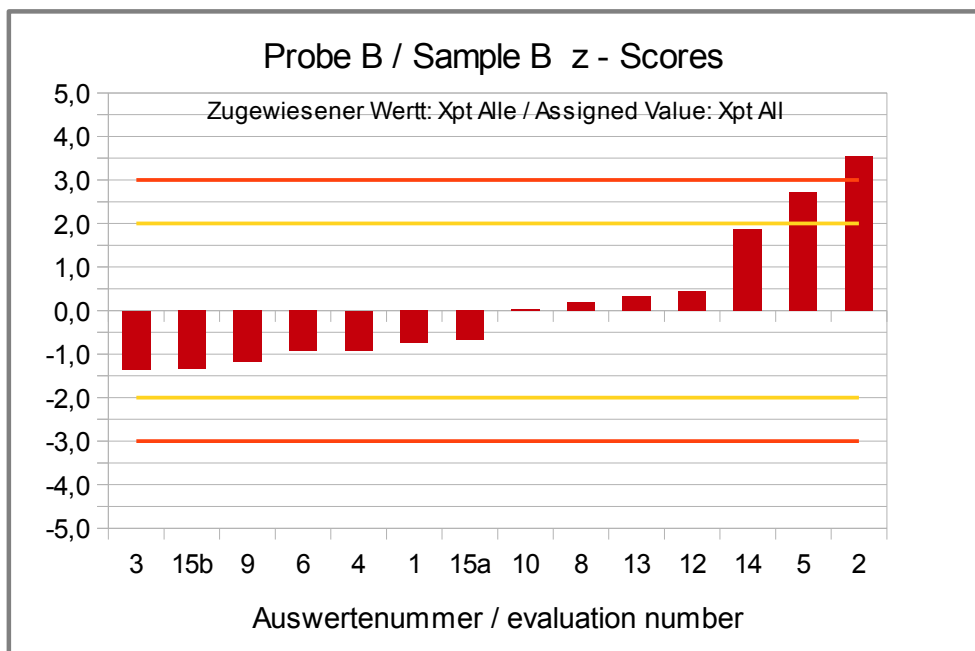


Abb. 7: z-Scores (ELISA-Ergebnisse als Eiklarprotein)
 Zugewiesener Wert: robuster Mittelwert aller Ergebnisse

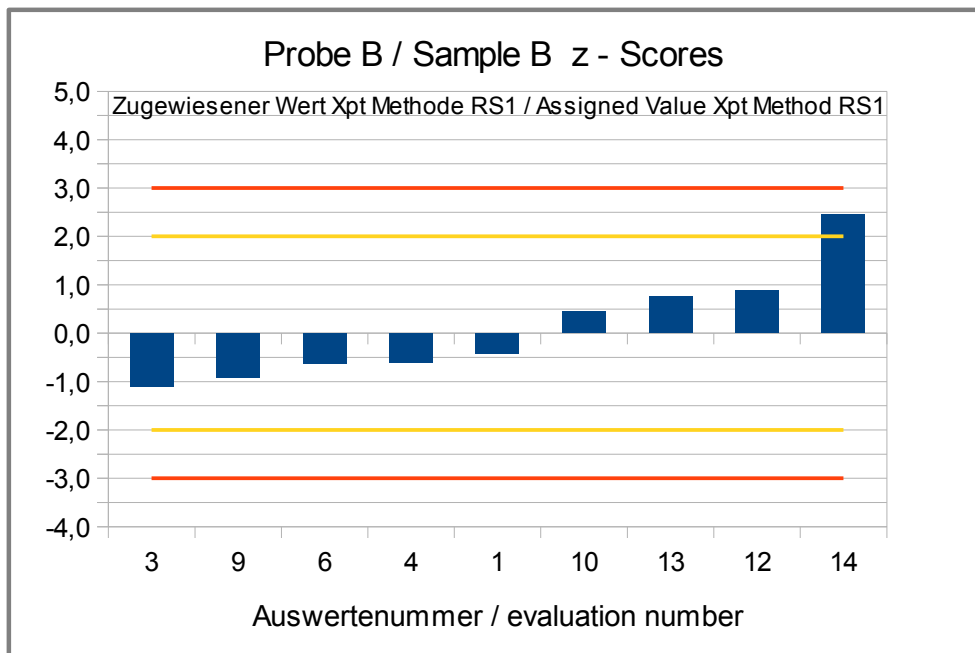


Abb. 8: z-Scores (ELISA-Ergebnisse als Eiklarprotein)
 Bezugswert robuster Mittelwert Ergebnisse Methode RS
 (R-Biopharm, Ridascreen)

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

Auswertenummer	Dotierungsmaterial	Wiederfindungsrate	Probe B	Wiederfindungsrate	Methode	Hinweis
	[mg/kg]	[%]	[mg/kg]	[%]		
7	8500	43	>8		BC	
5	21600	109	101	113	IL1	
8	378476	1908	63	71	IL1	
15a	16700	84	50	56	IL1	
15b	11500	58	40	45	IL2	Ergebnis umgerechnet *
1			49,1	55	RS	Ergebnis umgerechnet *
3	20255	102	39,74	45	RS	Ergebnis umgerechnet *
4			46,4	52	RS	Ergebnis umgerechnet *
6			46,1	52	RS	Ergebnis umgerechnet *
9	9820	49	42,31	48	RS	
10	16660	84	60,8	68	RS	
11			>10		RS	
12	12250	62	66,8	75	RS	Ergebnis umgerechnet *
13	13500	68	65	73	RS	Ergebnis umgerechnet *
14	14000	71	88,4	99	RS	Ergebnis umgerechnet *
2	14600	74	113,66	128	TC	

* Umrechnung s. S. 12

AB*	50-150 %	AB*	50-150 %
Anzahl im AB	9	Anzahl im AB	11
Prozent im AB	75	Prozent im AB	79

* Akzeptanzbereich der AOAC für Allergen-ELISAs

Wiederfindungsrate
100% Bezugsgröße:
Eiklarproteine, s. Seite 4

Methoden:

BC = BioCheck

IL1 = Immunolab Eiklarprotein

IL2 = Immunolab Ovalbumin

RS = Ridascreen®, R-Biopharm

TC = Tecna

Anmerkung:

75% 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 Weinprobe B lagen 79% der Wiederfindungsraten in diesem Akzeptanzbereich.

4.1.2 ELISA-Ergebnisse: Lysozym

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		
15	negativ	< 0.013	positiv	0,7	-	IL	

Methoden:

IL = Immunolab

Anmerkung:

Zum Nachweis von Lysozym mittels ELISA hat nur ein Teilnehmer Ergebnisse abgegeben. Diese stehen in qualitativer Übereinstimmung mit der Dotierung von Probe B.

Wiederfindungsraten für Lysozym:

Dotierungsmaterialprobe und Probe B

Auswertenummer	Dotierungsmaterial	Wiederfindungsrate	Probe B	Wiederfindungsrate	Methode	Hinweis
	[mg/kg]	[%]	[mg/kg]	[%]		
15	160	23	0,7	23	IL	

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

Wiederfindungsrate
100% Bezugsgröße:
Lysozym, s. Seite 4

* Akzeptanzbereich der AOAC für Allergen-ELISAs

Anmerkung:

Die Wiederfindungsraten des Teilnehmers lagen sowohl für die Dotierungsmaterialprobe als auch für die mit dem Dotierungsmaterial hergestellte Weinprobe B bei 23%.

5. Dokumentation

Angaben der Teilnehmer

5.1 ELISA: Casein

Primärdaten

Auswertenummer	Ergebnis Probe A		Ergebnis Probe B		Ergebnis Dotierungsprobe		Angabe quantitatives Ergebnis als	Methode	Meth. Abk.
	qualitativ	mg/kg	qualitativ	mg/kg	qualitativ	mg/kg			
1	negativ	< 0.1	positiv		-		Casein	AgraQuant Casein (COKAL1200), RomerLabs	AQ
5	negativ	< 0,1	positiv	78	positiv	48900	Casein	AgraQuant Casein (COKAL1200), RomerLabs	AQ
7	-	<0.2	-	>6	-	28500	Casein	AgraQuant Egg (COKAL0848), RomerLabs	AQ
13	negativ	<0,2	positiv	73	positiv	42000	Casein	AgraQuant Casein (COKAL1200), RomerLabs	AQ
8	negativ	<0,5	positiv	24	qualitativ	363454	Casein	Immunolab Casein ELISA	IL
15	negativ	<0.1	positiv	36	positiv	15500	Casein	Immunolab Casein ELISA	IL
3	negativ		positiv	1,839	positiv	11714	Casein	Ridascreen Fast Casein (R4612), r-Biopharm	RS1
4	negativ		positiv	2,1	positiv		Casein	Ridascreen Fast Casein (R4612), r-Biopharm	RS1
6	-	<0,5	-	3,2	-		Casein	Ridascreen Fast Casein (R4612), r-Biopharm	RS1
9	negativ	<0.5	positiv	1,59	positiv	20815	Casein	Ridascreen Fast Casein (R4612), r-Biopharm	RS1
10	negativ		positiv	1,7	positiv	41690	Casein	Ridascreen Fast Casein (R4612), r-Biopharm	RS1
11	negativ	<0.24	positiv	2,2	-			Ridascreen Fast Casein (R4612), r-Biopharm	RS1
12	-	n.n.	-	32,6	-	24381	Milchproteine, gesamt	Ridascreen Fast Milch (R4652), r-Biopharm	RS2

Methoden:

AQ = AgraQuant Casein, RomerLabs
 IL = Immunolab Casein

RS1 = Ridascreen Fast Casein, R-Biopharm
 RS2 = Ridascreen Fast Milch, R-Biopharm

Weitere Angaben zu den Methoden

Auswertenummer	Meth. Abk.	Spezifität	Hinweise zur Methode (Extraktion und Bestimmung)	Sonstige Hinweise
		Antikörper	z.B. Extraktionslösung / Zeit / Temperatur	
1	AQ		Probenaufarbeitung nach Wein-Application Note	
5	AQ	Casein	Probe A 1:10 (v/v) mit Extraktionspuffer extrahiert; Dotierungsprobe ausschließlich mit Extraktionspuffer verdünnt und extrahiert; alles bei Raumtemperatur extrahiert	Bei Verdünnung der Dotierung mit alkoholischer Lösung bzw. Wasser und anschließender Extraktion mit Puffer deutlich niedrigere Werte erhalten
7	AQ	Casein	wässriger Puffer, erwärmt auf 60°C	Proteine präzipitieren aus der Lösung und führen zu inkonsistenten Ergebnissen
13	AQ			
8	IL	Anti-Casein		
15	IL			
3	RS1			
4	RS1		nach Arbeitsanleitung	
6	RS1		Extraktionspuffer verdünnt/ 10min/60°C	
9	RS1	Casein von Kuh-, Schaf-, Ziegen- und Büffelmilch	nach Arbeitsanleitung	
10	RS1			
11	RS1			
12	RS2			

5.2 ELISA: Eiklarprotein inklusive Lysozym*Primärdaten*

Auswertenummer	Ergebnis Probe A		Ergebnis Probe B		Ergebnis Dotierungsprobe		Angabe quantitatives Ergebnis als	Methode	Meth. Abk.
	qualitativ	mg/kg	qualitativ	mg/kg	qualitativ	mg/kg	z.B. Lebensmittel / Protein	Test-Kit + Anbieter	
7	-	<0.4	-	>8	-	8500	Eiklarproteine, gesamt	EggCheck - BioCheck	BC
5	negativ	< 0,05	positiv	101	positiv	21600	Eiklarproteine, gesamt	Immunolab OVALBUMIN ELISA	IL1
8	negativ	<0,5	positiv	63	qualitativ	378476	Eiklarproteine, gesamt	Immunolab Eiklar ELISA	IL1
15a	negativ	< 0.2	positiv	50	positiv	16700	Eiklarproteine, gesamt	Immunolab Eiklar ELISA	IL1
15b	negativ	< 0.013	positiv	30	positiv	8600	Ovalbumin	Immunolab Ovalbumin ELISA	IL2
1	negativ	< 0.25	positiv	189	-		Volleipulver	Ridascreen Fast Ei (R4602), r-Biopharm	RS
3	negativ		positiv	152,83	positiv	77904	Volleipulver	Ridascreen Fast Ei (R4602), r-Biopharm	RS
4	negativ		positiv	178,5	positiv		Volleipulver	Ridascreen Fast Ei (R4602), r-Biopharm	RS
6	-	<0,5	-	177,3	-		Volleipulver	Ridascreen Fast Ei (R4602), r-Biopharm	RS
9	negativ	<0.13	positiv	42,31	positiv	9820	Eiklarproteine, gesamt	Ridascreen Fast Ei (R4602), r-Biopharm	RS
10	negativ		positiv	60,8	positiv	16660	Eiklarproteine, gesamt	Ridascreen Fast Ei (R4602), r-Biopharm	RS
11	negativ	<0.1	positiv	>10	-			Ridascreen Fast Ei (R6402), r-Biopharm	RS
12	-	n.n.	-	257	-	47110	Volleipulver	Ridascreen Fast Ei (R4602), r-Biopharm	RS
13	negativ	<0,5	positiv	250	positiv	52000	Volleipulver	Ridascreen Fast Ei (R6402), r-Biopharm	RS
14	negativ	-	positiv	340	positiv	54000	Volleipulver	Ridascreen Fast Ei (R6402), r-Biopharm	RS
2	negativ		positiv	113,66	positiv	14600	Eiklarproteine, gesamt	TECNA I'SCREEN EGG	TC
15	negativ	< 0.013	positiv	0.7	positiv	160	Lysozym	Immunolab Lysozym ELISA	IL3

Methoden :

BC = BioCheck

IL1 = Immunolab Eiklarprotein

IL2 = Immunolab Ovalbumin

IL3 = Immunolab Lysozym

RS = Ridascreen®, R-Biopharm

TC = Tecna

Weitere Angaben zu den Methoden

Auswertenummer	Meth. Abk.	Spezifität	Hinweise zur Methode (Extraktion und Bestimmung)	Sonstige Hinweise
		Antikörper	z.B. Extraktionslösung / Zeit / Temperatur	
7	BC	Eiklarproteine, gesamt	wässriger Puffer, erwärmt auf 60°C	Proteine präzipitieren aus der Lösung und führen zu inkonsistenten Ergebnissen
5	IL1	OVALBUMIN	Umrechnung Ovalbumin in Eiklarprotein (getrocknet) mit Faktor 1,85; Dotierungsprobe ausschließlich mit Extraktionspuffer verdünnt und extrahiert; alles bei Raumtemperatur extrahiert	Bei Verdünnung der Dotierung mit alkoholischer Lösung bzw. Wasser und anschließender Extraktion mit Puffer deutlich niedrigere Werte erhalten
8	IL1	Anti-Ovomucoid Antikörper		
15a	IL1			
15b	IL2			
1	RS		Probenaufarbeitung nach Wein-Application Note	
3	RS			
4	RS		nach Arbeitsanleitung	
6	RS		Extraktionspuffer verdünnt/ 10min/60°C	
9	RS	Ovalbumin und Ovomucoid	nach Testkit-Anleitung – Ergebnis umgerechnet als Eiklarproteine wie in Anleitung beschrieben	
10	RS		Angabe als Eiklarprotein Volleipulver wäre: Probe B: 231 mg/kg; DotMaterial: 63350 mg/kg	
11	RS			
12	RS			
13	RS			
14	RS	Eiklarproteine, gesamt	-	-
2	TC	Eiklarproteine, gesamt	10 ml Extraktionslösung/15' Zeit/60°C	Probe B und Dotierungsmaterialprobe mussten verdünnt werden, damit das Ergebnis im Kit-Range war.
15	IL3			

6. Verzeichnis der teilnehmenden Institute in alphabetischer Reihenfolge

Teilnehmer / Participant	Ort / Town	Land / Country
		GROSSBRITANIEN
		SCHWEIZ
		SPANIEN
		Deutschland
		Deutschland
		Deutschland
		FRANKREICH
		Deutschland
		Deutschland
		SCHWEIZ
		ITALIEN
		Deutschland
		Deutschland
		NIEDERLANDE
		GROSSBRITANIEN

[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. 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
15. 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
16. 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
17. 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
18. Ministry of Health and Welfare, JSM, Japan 2006
19. 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)
20. 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)
21. 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)
 22. 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
 23. 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
 24. 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

 25. Peñas et al. (2015) Allergenic Proteins in Enology: A Review on Technological Applications and Safety Aspects, Molecules 2015, 20, 13144-13164
 26. Restani et al. (2012) Validation by a Collaborative Interlaboratory Study of an ELISA Method for the Detection of Caseinate Used as a Fining Agent in Wine, Food Anal. Methods (2012) 5:480-486
 27. Restani et al. (2014) Collaborative Interlaboratory Studies for the Validation of ELISA Methods for the Detection of Allergenic Fining Agents Used in Wine According to the Criteria of OIV Resolution 427-2010 Modified by OIV-Comex 502-2012, Food Anal. Methods (2014) 7:706-712
 28. RESOLUTION OIV/OENO 427/2010 + 502-2012: CRITERIA FOR THE METHODS OF QUANTIFICATION OF POTENTIALLY ALLERGENIC RESIDUES OF FINING AGENT PROTEINS IN WINE, International Organisation of Vine and Wine 2010 / 2012
 29. Lacorn et al. (2014) Collaborative Tests of ELISA Methods for the Determination of Egg White Protein and Caseins Used as Fining Agents in Red and White Wines, Food Anal. Methods (2014) 7:417-429

DLA-09/2016-Allergene IX

Alle 15 Teilnehmer haben mindestens ein Ergebnis eingereicht. Die Auswertung erfolgte hinsichtlich der Parameter Casein und Eiklarproteine qualitativ und quantitativ, soweit möglich methodenübergreifend und für die einzelnen ELISA-Methoden. Zusätzlich wurden für jeden Teilnehmer Wiederfindungsraten für die Dotierungsmaterialprobe und die dotierte Probe ermittelt. Details zu den einzelnen Parametern sind dem Auswertebereich zu entnehmen.

8 Teilnehmer hatten ihren Sitz im Europäischen Ausland (Frankreich, Großbritannien, Italien, Niederlande, Schweiz, Spanien).