

Proficiency Tests

DLA

food
cosmetics
consumer goods
www.dla-lvu.de

Auswertungs-Bericht
Laborvergleichsuntersuchung

DLA 06/2016

Allergene VI:

Haselnuss und Milch

in „milchfreier“ Schokolade

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 06/2016
<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 (20. Februar 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: 20. Februar 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.

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 Haselnuss.....	21
4.1.1 ELISA-Ergebnisse: Haselnuss.....	21
4.1.2 PCR-Ergebnisse: Haselnuss.....	27
4.2 Vergleichsuntersuchung Milch.....	30
4.2.1 ELISA-Ergebnisse: Milchprotein.....	30
4.2.2 ELISA-Ergebnisse: Casein.....	36
4.2.3 ELISA-Ergebnisse: β -Lactoglobulin	41
4.2.4 PCR-Ergebnisse: Milch.....	42
5. Dokumentation.....	43
5.1 Angaben der Teilnehmer.....	43
5.1.1 ELISA: Haselnuss	43
5.1.2 ELISA: Milchprotein	44
5.1.3 ELISA: Casein.....	46
5.1.4 ELISA: β -Lactoglobulin.....	47
5.1.5 PCR: Haselnuss	48
5.1.6 PCR: Milch.....	49
5.2 Homogenität.....	50
5.2.1 Mischungshomogenität vor der Abfüllung.....	50
6. Verzeichnis der Teilnehmer in alphabetischer Reihenfolge.....	51
7. Verzeichnis relevanter Literatur.....	52

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 Bitterschokolade. Die Grundzusammensetzung war für beide Proben A und B gleich (s. Tabelle 1). Nach Mischen und Homogenisierung der Grundmatrix unter Rühren bei 60°C wurde zur Herstellung der dotierten Probe A einem Aliquot der Grundmatrix das Dotierungsmaterial mit den allergenen Zutaten Haselnuss und Milch zugegeben. Die Homogenisierung erfolgte ebenfalls bei 60°C unter Rühren. Anschließend wurde portionsweise erneut Grundmatrix in 4 weiteren Schritten zugegeben und jeweils maschinell und per Hand homogenisiert bis die Gesamtmenge erreicht war.

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

Die Proben wurden nach dem Homogenisieren zu Portionen von ca. 25 g in PE-Schalen gefüllt und in metallisierte PET-Folienbeutel eingeschweißt.

Tabelle 1: Zusammensetzung der DLA-Proben

Zutaten	Probe A	Probe B
Bitter-Schokolade (Kakao: 85% mindestens) Zutaten: Kakaomasse, Kakaobutter, Zucker, fettarmer Kakao, Emulgator: Sojalecithin, Vanille-Extrakt Nährwertangaben pro 100 g: Eiweiß 11 g, Kohlenhydrate 20 g, Fett 50 g Allergen-Hinweis: kann Spuren von Erdnüssen, Mandeln, Nüssen und Milch enthalten.	99,8 g/100 g	100 g/100 g
Dotierungsmaterialprobe	0,205 g/100 g	-

Tabelle 2: Zugesezte Mengen allergener Zutaten

Zutaten	Dotierungsmaterialprobe	Probe A
Kartoffelmehl	93 %	0,19%
<i>Haselnussmus</i> Zutaten: Haselnüsse als Haselnuss* davon 16% Gesamtprotein**	11800 mg/kg (= 1,18 %) 11800 mg/kg 1890 mg/kg	24,1 mg/kg 3,9 mg/kg
Milch: - als Magermilchpulver* - davon 37% Gesamtprotein** - davon Casein***	19600 mg/kg (1,96 %) 7220 mg/kg 5780 mg/kg	40,2 mg/kg 14,8 mg/kg 11,8 mg/kg
weitere Zutaten: Sojamehl und Weizenmehl	< 3,50 %	< 0,03 %

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

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

*** Proteingehalte gemäß Literaturangaben berechnet (ca. 80% Caseine in Gesamt-Milchprotein) [31]

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 8-fach Bestimmung mittels **Microtracer-Analyse** untersucht. Es handelt sich um eine normierte Methode, die Bestandteil des internationalen GMP-Zertifizierungssystems für Futtermittel ist [14]. Vor der Mischung werden mit Farbstoff beschichtete Eisenpartikel in 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-Proben hat eine Wahrscheinlichkeit von 43% für die Dotierungsmaterialprobe ergeben. Die Partikel-Ergebnisse wurden zusätzlich in Konzentrationen umgerechnet, statistisch als Normalverteilung ausgewertet und mit der Standardabweichung nach Horwitz verglichen. Es wurde ein Hor-Rat-Wert von 1,0 erhalten. Die Ergebnisse der Microtracer-Analyse sind in der Dokumentation angegeben. Die dotierte Probe A konnte aufgrund der Matrix Schokolade nicht mit dem System geprüft werden.

Homogenität der abgefüllten dotierten Probe A

Durchführung der Homogenitätstests

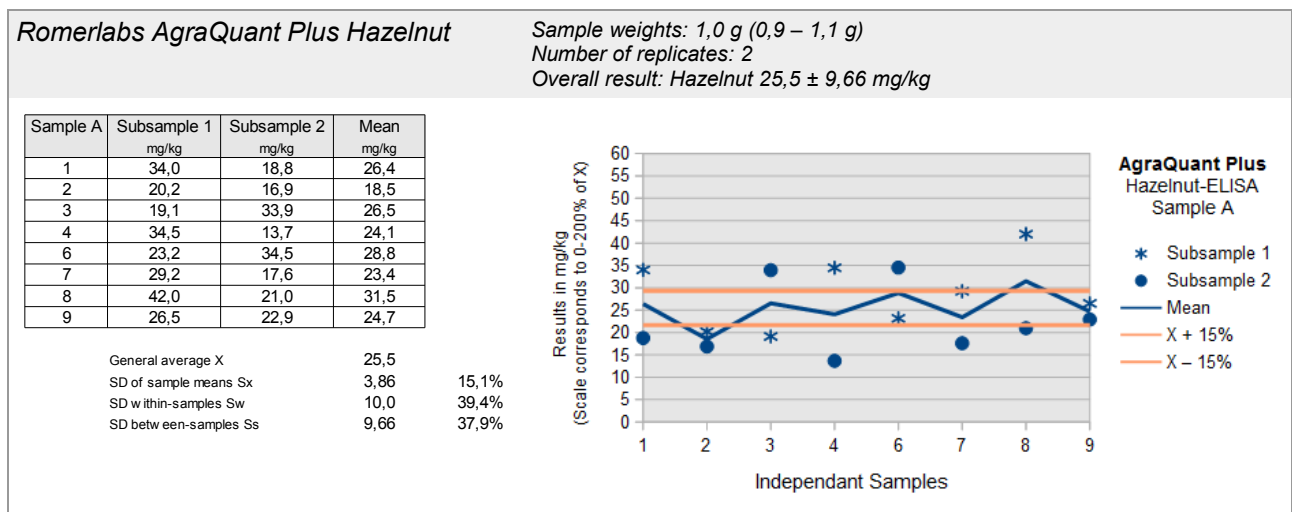
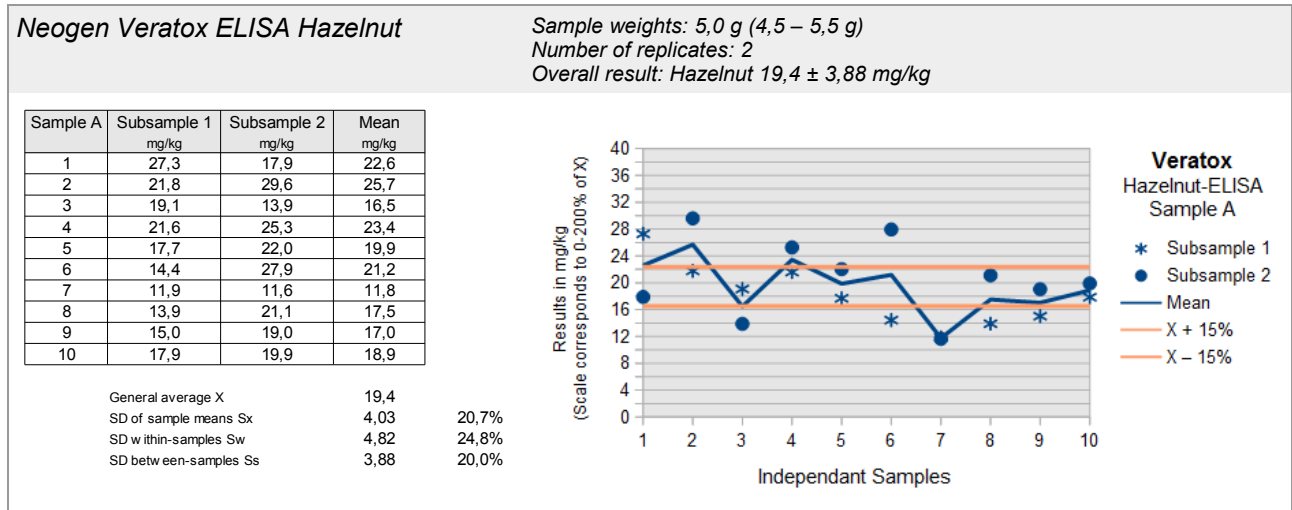
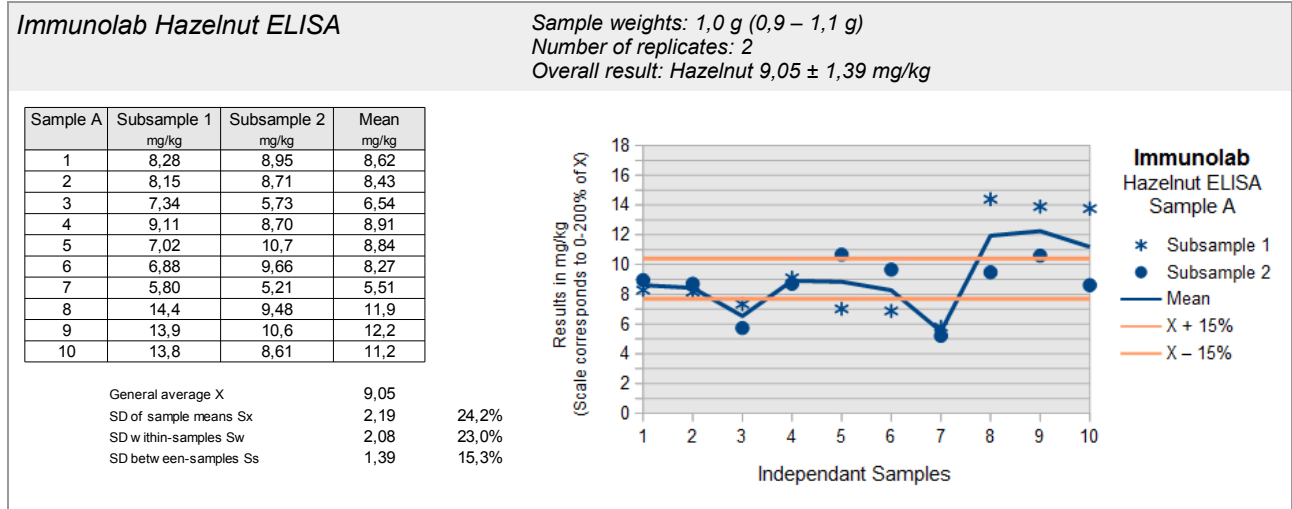
Die Homogenitätstests wurden in Kooperation mit den Labors der angegebenen Testkit-Anbieter durchgeführt. Von DLA wurden zufällig 10 Muster der abgefüllten dotierten Probe ausgewählt und davon jeweils 2 Teilproben in zuvor zufällig-coodierte Extraktionsbehälter eingewogen und anschließend den Labors 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

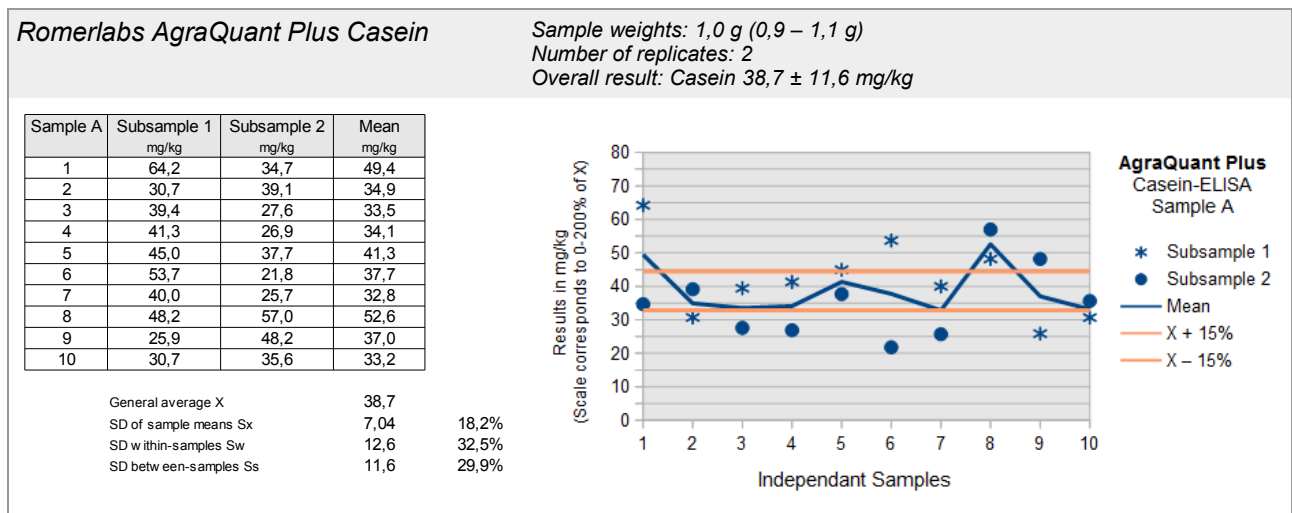
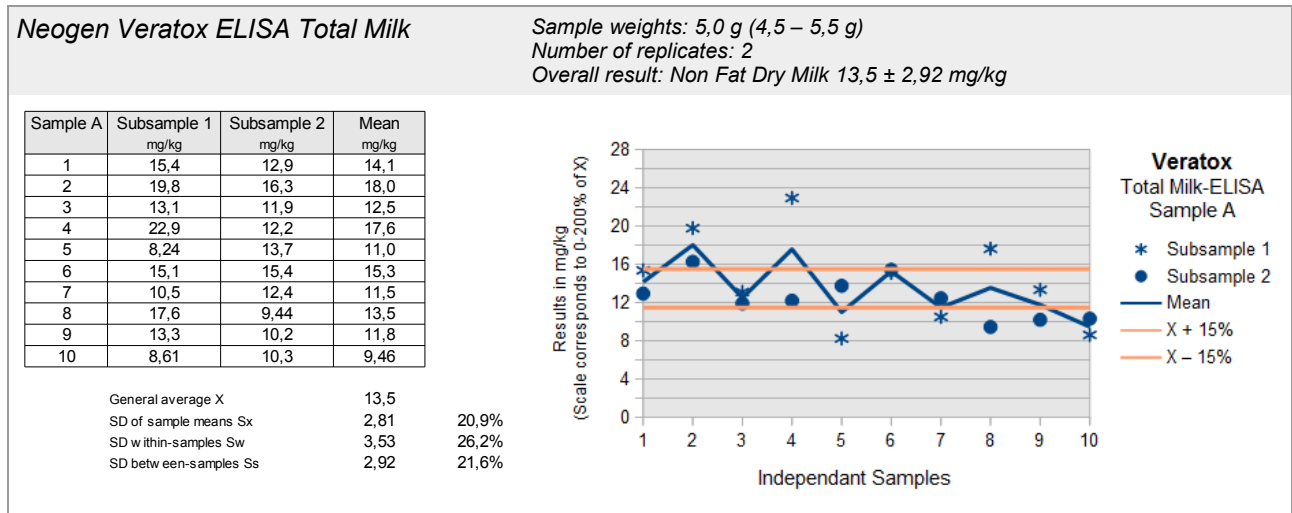
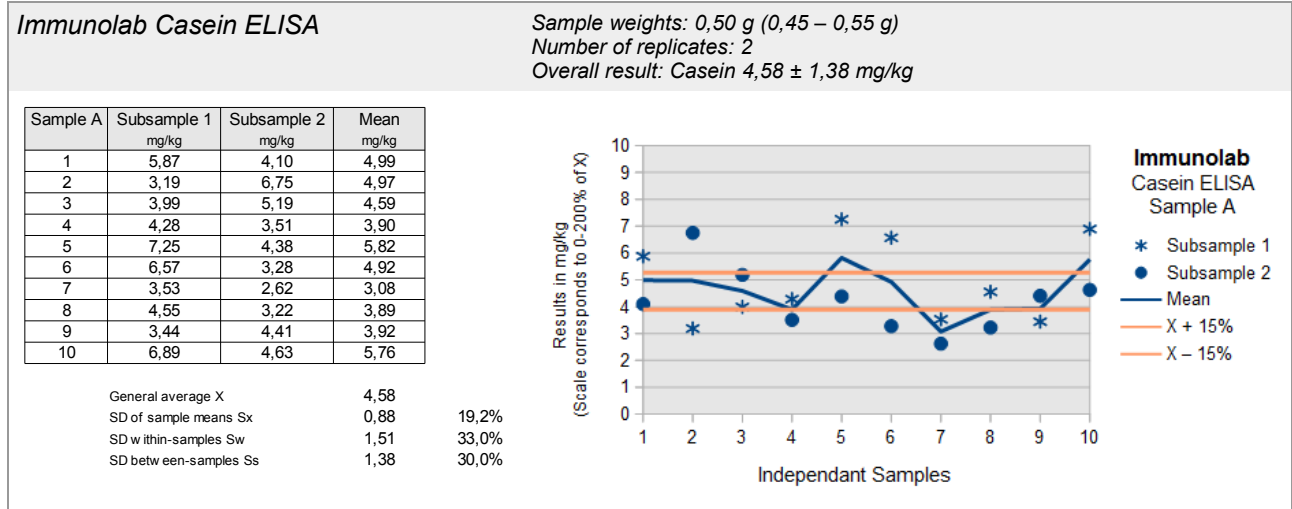
Die Homogenität wird mit einer Standardabweichung zwischen den Proben von $Ss \leq 15\%$ („Heterogenitätsstandardabweichung“) als hinreichend gesichert angesehen. Dieses Kriterium wird für die untersuchte Probe A in allen ELISA-Tests sowohl für Haselnuss (Immunolab, AgraQuant Plus und Veratox) als auch für Milch bzw. Casein (Immunolab, AgraQuant Plus und Veratox) nicht erfüllt (s. Seiten 7 und 8). Für Haselnuss liegen die Heterogenitätsstandardabweichungen im Bereich von 15-20% bzw. bei $>25\%$, und für Milch im Bereich von 20-30%. 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. Die Bewertung der ELISA-Ergebnisse der Teilnehmer erfolgte für Haselnuss und Milchprotein daher nach Erweiterung der Zielstandardabweichung unter Berücksichtigung der Standardunsicherheit des zugewiesenen Wertes anhand von z' -Scores (s. 3.6 und 3.8) [3].

ELISA-Tests: Homogenität Haselnuss / Homogeneity Hazelnut



ELISA-Tests: Homogenität Milch / Homogeneity Milk



2.2 Probenversand und Informationen zur Untersuchung

An jeden Teilnehmer wurden in der 42. Kalenderwoche 2016 je eine Portion der Untersuchungsmaterialien A und B sowie eine Dotierungsmaterialprobe verschickt. Die Untersuchungsverfahren wurden freigestellt. Die Untersuchungen waren durchzuführen bis spätestens 2. Dezember 2016.

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

Bei den beiden Mustern handelt es sich um zwei unterschiedliche Proben Bitter-Schokolade Probe A und Probe B, mit möglichen Gehalten an den allergenen Lebensmitteln Haselnuss und/oder Milch im mg/kg-Bereich. 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.

Alle 17 Teilnehmer haben fristgerecht Ergebnisse abgegeben.

3. Auswertung

Verschiedene ELISA-Methoden zur quantitativen Bestimmung von Allergenen in Lebensmitteln können verschiedene Antikörper-Spezifitäten aufweisen, mit unterschiedlichem Referenzmaterial kalibriert worden sein und sich unterschiedlicher Extraktionsverfahren bedienen. Die verschiedenen ELISA-Methoden können daher zu einer unterschiedlichen Bewertung des Gehalts eines Analyten führen [23, 24, 25, 26]. Aus diesem Grund werden die Ergebnisse, wenn möglich in der Auswertung verschiedenen Bezugswerten gegenübergestellt.

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

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

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

3.1 Konsenswert der Teilnehmer (zugewiesener Wert)

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

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

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

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

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

Einzelergebnisse die außerhalb des angegebenen Messbereiches eines teilnehmenden Labors liegen (z.B. mit der Angabe > 25 mg/kg oder $< 2,5$ mg/kg)

oder die Angabe „0“ werden für die statistische Auswertung generell nicht berücksichtigt [3].

3.2 Robuste Standardabweichung

Zum Vergleich mit der Zielstandardabweichung 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]. Auch wenn ein Ergebnis z.B. mit einem Faktor >10 deutlich vom Mittelwert abweicht und einen Einfluss auf die robuste Statistik hat, kann ein Ergebnis von der statistischen Auswertung ausgeschlossen werden [3].

Alle Ergebnisse sollen mit mindestens 2 signifikanten Stellen (gültige Ziffern) angegeben werden. Die Angabe von 3 Stellen 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
$\sigma_R = 0,22c$	$c < 1,2 \times 10^{-7}$	$< 120 \mu\text{g}/\text{kg}$
$\sigma_R = 0,02c^{0,8495}$	$1,2 \times 10^{-7} \leq c \leq 0,138$	$\geq 120 \mu\text{g}/\text{kg}$
$\sigma_R = 0,01c^{0,5}$	$c > 0,138$	$> 13,8 \text{ g}/100\text{g}$

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

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 4 und 5 angegeben.

Tabelle 4: 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 5: 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 signifikante Stellen (gültige Ziffern) formatiert dargestellt. Im Dokumentationsteil sind die Ergebnisse so angegeben wie sie von den Teilnehmern übermittelt wurden.

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 Haselnussprotein angegeben wurden, sind in Haselnuss umgerechnet worden. Dabei wurde die Angabe von 10% Protein in Haselnuss des betreffenden Testkit-Anbieters zugrundegelegt (ELISA-Systems).

ELISA-Ergebnisse, die als Magermilchpulver angegeben wurden, sind in Milchprotein umgerechnet worden. Dabei wurde die Angabe von 35% Protein in Magermilchpulver des betreffenden Testkit-Anbieters zugrundegelegt (Veratox, Neogen).

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 Haselnuss

4.1.1 ELISA-Ergebnisse: Haselnuss

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		
10	positiv	20,8	negativ	< 5	2/2 (100%)	ES	
13	positiv	27,0	negativ	< 5	2/2 (100%)	ES	Ergebnis umgerechnet °
17	positiv	9,10	negativ	< 0,3	2/2 (100%)	IL	
1	positiv	45,2	negativ	<2,5	2/2 (100%)	RS-F	
4	positiv	19,1	negativ	< 2,5	2/2 (100%)	RS-F	
5	negativ	< 2,5	positiv	18,6	0/2 (0%)	RS-F	Ergebnis ausgeschlossen
8	positiv	16,5	negativ	<2,5	2/2 (100%)	RS-F	
9	positiv	10,5	negativ		2/2 (100%)	RS-F	Mittelwert von DLA berechnet
12	positiv	13,0	negativ	<2,5	2/2 (100%)	RS-F	
14	positiv	35,9	negativ	<2,5	2/2 (100%)	RS-F	Mittelwert von DLA berechnet
15	positiv	14,7	negativ	< 1,5	2/2 (100%)	RS-F	
16	-		-		-	div	

° Umrechnung S. 20

	Probe A	Probe B
Anzahl positiv	10	1
Anzahl negativ	1	10
Prozent positiv	91	9
Prozent negativ	9	91
Konsenswert	positiv	negativ

Methoden:

ES = ELISA-Systeme

IL = Immunolab

RS-F= Ridascreen® Fast, R-Biopharm

div = keine genaue Angabe / andere Methode

Anmerkung:

Die Konsenswerte stehen in qualitativer Übereinstimmung mit der Dotierung von Probe A. Ein negatives und ein positives Ergebnis (beide Auswertenummer 5) könnten auf eine Verwechslung von Probe A und Probe B zurück zu führen sein.

Quantitative Auswertung der Ergebnisse: Probe A

Auswertenummer	Haselnuss [mg/kg]	z'-Score X _{pt} ALL	z'-Score X _{pt} RS-F	Methode	Hinweis
10	20,8	0,1		ES	
13	27,0	1,0		ES	Ergebnis umgerechnet °
17	9,10	-1,7		IL	
1	45,2	3,7	2,8	RS-F	
4	19,1	-0,2	-0,3	RS-F	
5	< 2,5			RS-F	Ergebnis ausgeschlossen
8	16,5	-0,6	-0,6	RS-F	
9	10,5	-1,5	-1,3	RS-F	Mittelwert von DLA berechnet
12	13,0	-1,1	-1,0	RS-F	
14	35,9	2,3	1,7	RS-F	Mittelwert von DLA berechnet
15	14,7	-0,8	-0,8	RS-F	
16				div	

° Umrechnung S. 20

Methoden:

ES = ELISA-Systeme

IL = Immunolab

RS-F= Ridascreen® Fast, R-Biopharm

div = keine genaue Angabe / andere Methode

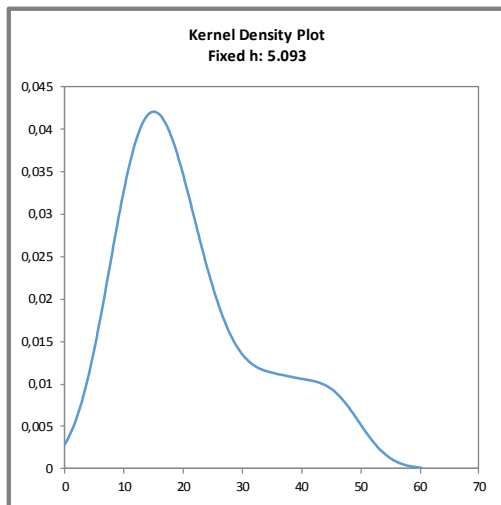


Abb. / Fig. 1:

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 Schulter bei > 35 mg/kg (Methode RS-F).

Kenndaten: Quantitative Auswertung Haselnuss**Probe A**

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	10	7
Anzahl der Ausreißer	0	0
Mittelwert	21,2	22,1
Median	17,8	16,5
Robuster Mittelwert (X_{pt})	20,4	21,6
Robuste Standardabweichung (S^*)	11,4	13,8
Zielkenndaten:		
Zielstandardabweichung σ_{pt}'	6,79	8,48
Untere Grenze des Zielbereichs	6,81	4,68
Obere Grenze des Zielbereichs	34,0	38,6
Quotient S^*/σ_{pt}'	1,70	1,60
Standardunsicherheit $U(X_{pt})$	4,49	6,53
Quotient $U(X_{pt})/\sigma_{pt}'$	0,66	0,80
Ergebnisse im Zielbereich	8	6
Prozent im Zielbereich	80	86

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 leicht erhöhte Variabilität der Ergebnisse mit Quotienten S^*/σ_{pt} von 2,2 und 2,6. Daher wurde unter Berücksichtigung der Standardunsicherheit mittels z'-Score ausgewertet. Die Quotienten S^*/σ_{pt}' lagen dann unter 2,0.

Die robuste Standardabweichung liegt im oberen 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 85% bzw. 90% vom Zusatzniveau von Haselnuss zu Probe A, innerhalb der relevanten Anforderungen für die eingesetzten Methoden (s. 3.4.3 und "Wiederfindungsraten für Haselnuss" S.27).

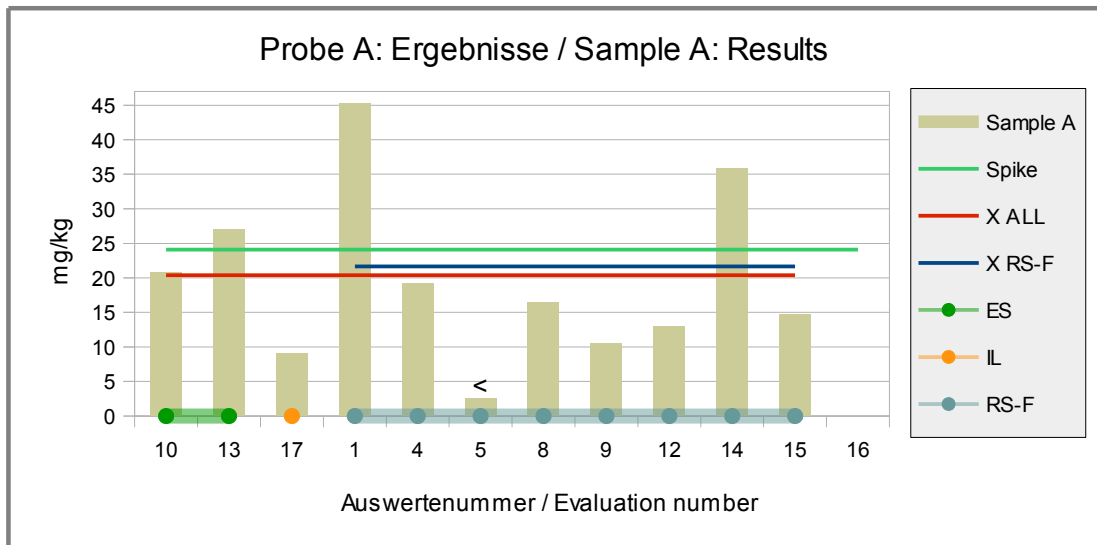


Abb./Fig. 2: ELISA-Ergebnisse Haselnuss
 grüne Linie = Zusatzniveau (Spike)
 rote Linie = robuster Mittelwert aller Ergebnisse
 blaue Linie = robuster Mittelwert Ergebnisse Methode RS-F
 runde Symbole = Zuordnung der Methoden (s. Legende)

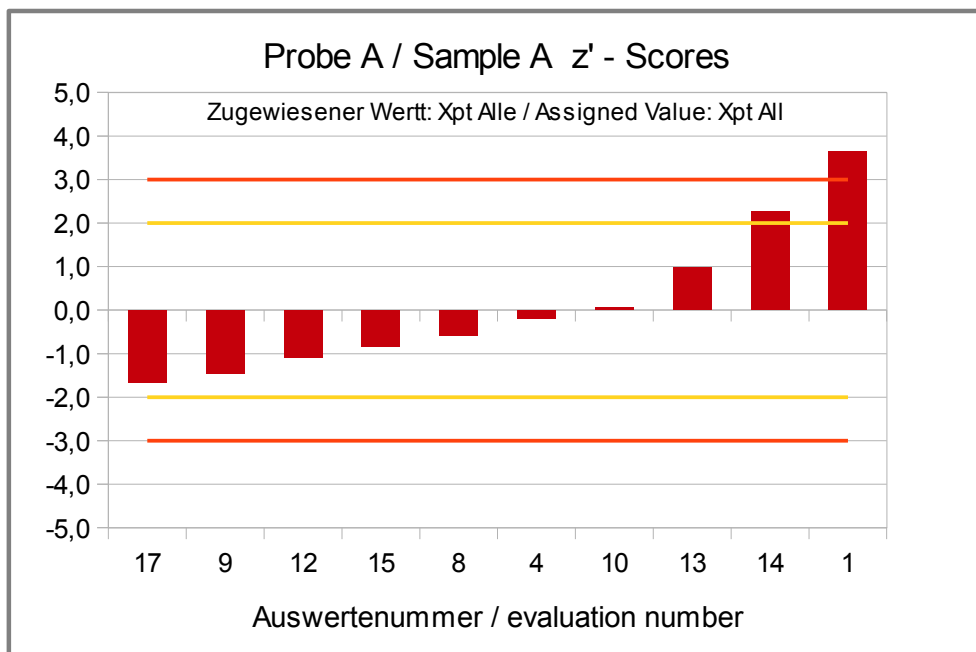


Abb./Fig. 3: z'-Scores (ELISA-Ergebnisse als Haselnuss) Zugewiesener Wert: robuster Mittelwert aller Ergebnisse

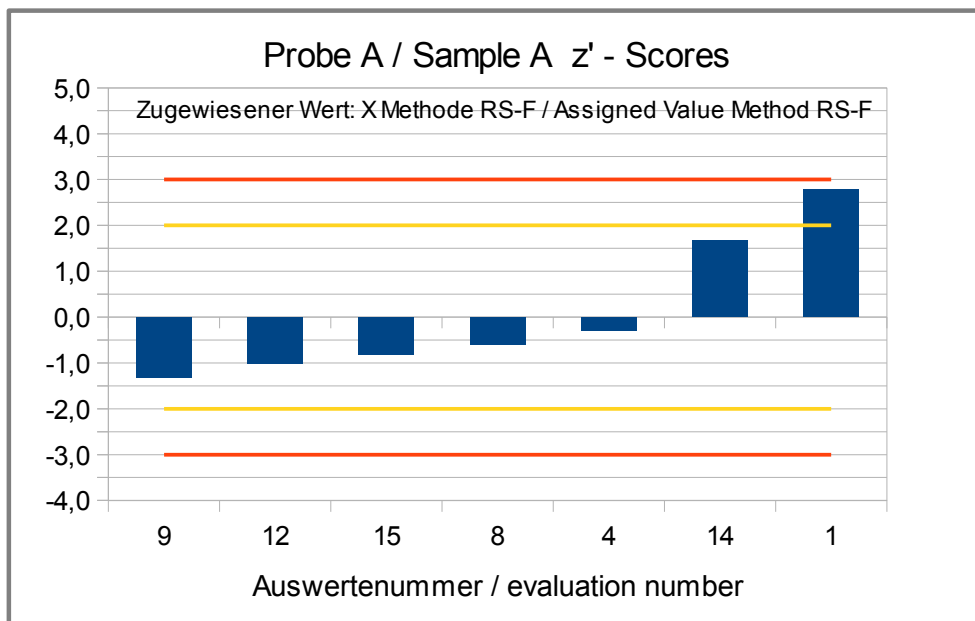


Abb./Fig. 4:

z'-Scores (ELISA-Ergebnisse Haselnuss) Bezugswert robuster Mittelwert Ergebnisse Methode RS-F (R-Biopharm, Ridascreen® Fast)

**Wiederfindungsraten für Haselnuss:
Dotierungsmaterialprobe und Probe A**

Auswertenummer	Dotierungsmaterial	Wiederfindungsrate*	Probe A	Wiederfindungsrate*	Methode	Hinweis
	[mg/kg]	[%]	[mg/kg]	[%]		
10	11200	95	20,8	86	ES	
13	18000	153	27,0	112	ES	Ergebnis umgerechnet °
17	8000	68	9,10	38	IL	
1	11700	100	45,2	188	RS-F	
4	12300	105	19,1	79	RS-F	
5	1420	12	< 2,5		RS-F	
8	10000	85	16,5	68	RS-F	
9	8630	73	10,5	44	RS-F	Mittelwert von DLA berechnet
12	9800	83	13,0	54	RS-F	
14	11190	95	35,9	149	RS-F	Mittelwert von DLA berechnet
15	12500	106	14,7	61	RS-F	
16	negativ				div	

° Umrechnung S. 19

AB**	50-150 %	AB**	50-150 %
Anzahl im AB	9	Anzahl im AB	7
Prozent im AB	82	Prozent im AB	70

Methoden:

ES = ELISA-Systeme
 IL = Immunolab
 RS-F= Ridascreen® Fast, R-Biopharm
 div = keine genaue Angabe / andere Methode

* Wiederfindungsrate 100% Bezugsgröße: Haselnuss, s. Seite 5

** Akzeptanzbereich der AOAC für Allergen-ELISAs

Anmerkung:

82% (9) 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 Lebensmittelmatrix-Probe A lagen 70% (7) der Wiederfindungsraten in diesem Akzeptanzbereich.

4.1.2 PCR-Ergebnisse: Haselnuss

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		
10	positiv		negativ		1/1 (100%)	ASU	
3	negativ		negativ		1/1 (100%)	MS	Spuren in Probe A
11	positiv	34,5	positiv	2	0/1 (0%)	SFA-Q	s. Anmerkung
2	negativ		negativ		1/1 (100%)	div	
6	negativ		negativ		1/1 (100%)	div	
16	positiv	24000	negativ		1/1 (100%)	div	

	Probe A	Probe B
Anzahl positiv	3	1
Anzahl negativ	3	5
Prozent positiv	50	17
Prozent negativ	50	83
Konsenswert	keiner	negativ

Methoden:

ASU = ASU §64 Methode/method

MS = Microsynth

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

div = keine genaue Angabe / andere Methode

Anmerkung:

Der negative Konsenswert für Probe B steht in qualitativer Übereinstimmung mit der Dotierung von Probe A. Für die dotierte Probe A wurden zu je 50% positive und negative Ergebnisse erhalten, sodass kein Konsenswert von $\geq 75\%$ festgestellt werden konnte.

Die Ergebnisse von Teilnehmer 11 stehen in qualitativer Übereinstimmung mit den ELISA-Ergebnissen für Probe A (positiv) und für Probe B nicht im Widerspruch (10 von 11 ELISA Ergebnissen < 5 mg/kg).

Quantitative Auswertung der Ergebnisse: Probe A

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

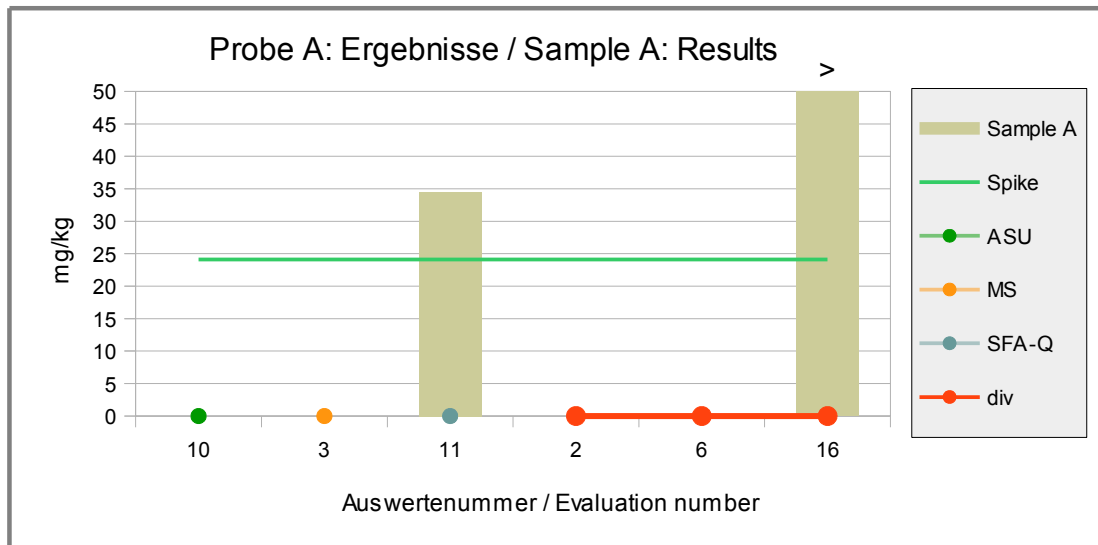


Abb./Fig. 5: PCR-Ergebnisse Haselnuss
 grüne Linie = Zusatzniveau (Spike)
 runde Symbole = Zuordnung der Methoden (s. Legende)

**Wiederfindungsraten für Haselnuss:
Dotierungsmaterialprobe und Probe A**

Auswertenummer	Dotierungsmaterial	Wiederfindungsrate*	Probe A	Wiederfindungsrate*	Methode	Hinweis
	[mg/kg]	[%]	[mg/kg]	[%]		
10					ASU	
3					MS	
11	2220	19	34,5	143	SFA-Q	
2					div	
6					div	
16			24000	99585	div	Verwechslung der Proben?

° Umrechnung S. 19

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

Methoden:

ASU = ASU §64 Methode/method

MS = Microsynth

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

div = keine genaue Angabe / andere Methode

* Wiederfindungsrate 100% Bezugsgröße: Haselnuss, s. Seite 5

** Akzeptanzbereich der AOAC für Allergen-ELISAs

Anmerkung:

Die Wiederfindungsrate für die Dotierungsmaterialprobe des eingereichten PCR-Ergebnisses lag unterhalb des Bereichs der AOAC-Anforderung von 50-150%, während der Teilnehmer für die mit dem Dotierungsmaterial hergestellte Lebensmittelmatrix-Probe A eine Wiederfindungsrate innerhalb des Akzeptanzbereichs erhalten hat.

Das Ergebnis von Teilnehmer 16 erscheint nicht plausibel, eventuell liegt eine Probenverwechslung vor.

4.2 Vergleichsuntersuchung Milch

4.2.1 ELISA-Ergebnisse: Milchprotein

Qualitative Auswertung der Ergebnisse: Proben A und B

Auswertenummer	Probe A pos/neg	Probe A [mg/kg]	Probe B pos/neg	Probe B [mg/kg]	Qualitative Bewertung Übereinstimmungen mit Konsenswerten	Methode	Hinweis
2	positiv	6,50	negativ	<2,5	2/2 (100%)	RS-F	
3	positiv	15,6	negativ		2/2 (100%)	RS-F	
4	positiv	16,0	negativ	< 2,5	2/2 (100%)	RS-F	
5	positiv	9,20	negativ	< 2,5	2/2 (100%)	RS-F	
7	positiv	8,66	negativ	<2,5	2/2 (100%)	RS-F	
12	positiv	6,65	negativ	<2,5	2/2 (100%)	RS-F	
14	positiv	17,0	negativ	<2,5	2/2 (100%)	RS-F	Mittelwert von DLA berechnet
15	positiv	22,7	negativ	<0,70	2/2 (100%)	RS-F	
1	positiv	2,29	negativ	<0,88	2/2 (100%)	VT	Ergebnis umgerechnet °
6	positiv	13,4	negativ	0,62	2/2 (100%)	VT	Ergebnis umgerechnet °
8	positiv		negativ		2/2 (100%)	VT	
10	positiv	5,09	negativ	<1	2/2 (100%)	VT	
11	positiv	1,93	negativ	<0,35	2/2 (100%)	VT	Ergebnis umgerechnet °

° Umrechnung S. 19

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

Methoden:

RS-F= Ridascreen® Fast, R-Biopharm

VT = Veratox, Neogen

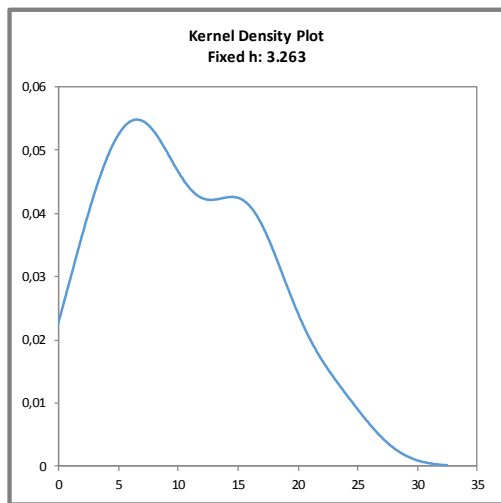
Anmerkung:

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

Quantitative Auswertung der Ergebnisse: Probe A

Auswertenummer	Milchprotein [mg/kg]	z'-Score X _{pt,ALL}	z'-Score X _{pt,RS-F}	Methode	Hinweis
2	6,50	-1,0	-1,4	RS-F	
3	15,6	1,5	0,6	RS-F	
4	16,0	1,6	0,7	RS-F	
5	9,20	-0,3	-0,8	RS-F	
7	8,66	-0,4	-0,9	RS-F	
12	6,65	-1,0	-1,4	RS-F	
14	17,0	1,9	1,0	RS-F	Mittelwert von DLA berechnet
15	22,7	3,5	2,3	RS-F	
1	2,29	-2,2		VT	Ergebnis umgerechnet °
6	13,4	0,9		VT	Ergebnis umgerechnet °
8				VT	
10	5,09	-1,4		VT	
11	1,93	-2,3		VT	Ergebnis umgerechnet °

° Umrechnung S. 20



Methoden:

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 $X_{pt,ALL}$)

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

Anmerkung:

Die Kerndichte-Schätzung zeigt eine breite Verteilung der Ergebnisse mit einem kleineren zweiten Gipfel bei etwa 15 - 20 mg/kg. Die Angaben der Teilnehmer zu den Methoden geben jedoch keine offensichtlichen Hinweise auf eine derartige Gruppierung der Ergebnisse.

Kenndaten: Quantitative Auswertung Milchprotein**Probe A**

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	12	8
Anzahl der Ausreißer	0	0
Mittelwert	10,4	12,8
Median	8,93	12,4
Robuster Mittelwert (X_{pt})	10,3	12,8
Robuste Standardabweichung (S^*)	6,98	6,66
<i>Zielkenndaten:</i>		
Zielstandardabweichung σ_{pt}'	3,59	4,35
Untere Grenze des Zielbereichs	3,07	4,10
Obere Grenze des Zielbereichs	17,4	21,5
Quotient S^*/σ_{pt}'	1,90	1,50
Standardunsicherheit $U(X_{pt})$	2,52	2,94
Quotient $U(X_{pt})/\sigma_{pt}'$	0,70	0,68
Ergebnisse im Zielbereich	9	7
Prozent im Zielbereich	75	88

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 leicht erhöhte Variabilität der Ergebnisse mit Quotienten S^*/σ_{pt} von 2,7 und 2,1. Daher wurde unter Berücksichtigung der Standardunsicherheit mittels z'-Score ausgewertet. Die Quotienten S^*/σ_{pt}' lagen dann unter 2,0.

Die robuste Standardabweichung liegt im oberen 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 Methode VT nur wenige Ergebnisse vorlagen.

Die robusten Mittelwerte der Auswertungen lagen mit 70% bzw. 86% vom Zusatzniveau von Milchprotein zu Probe A, innerhalb der relevanten Anforderungen für die eingesetzten Methoden (s. 3.4.3 und "Wiederfindungsraten für Milchprotein" S.36).

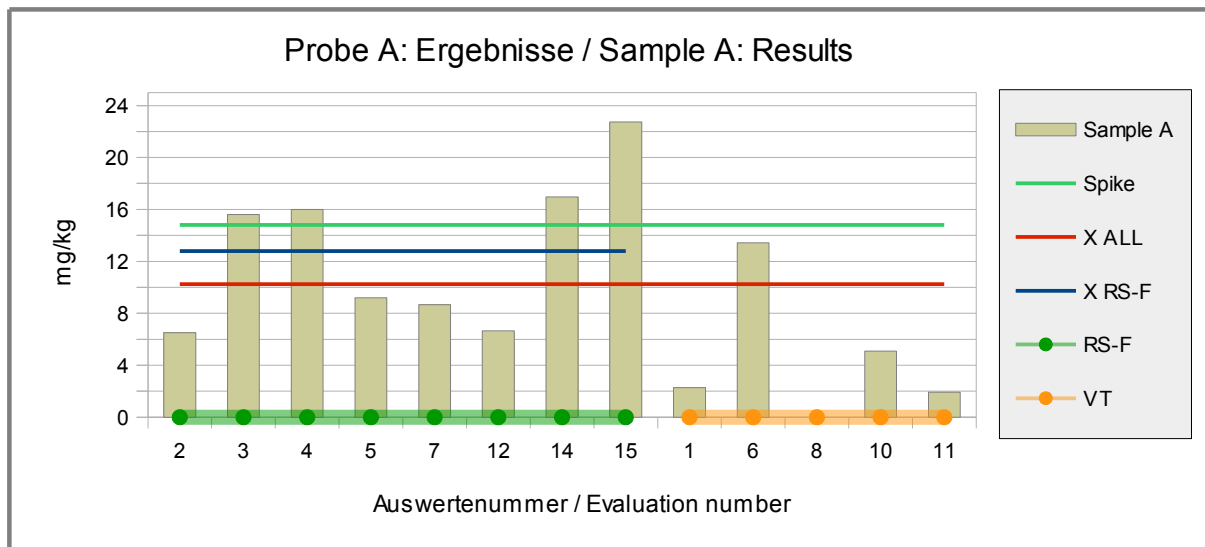


Abb./Fig. 7: ELISA-Ergebnisse Milchprotein
 grüne Linie = Zusatzniveau (Spike)
 rote Linie = robuster Mittelwert aller Ergebnisse
 blaue Linie = robuster Mittelwert Ergebnisse Methode RS-F
 runde Symbole = Zuordnung der Methoden (s. Legende)

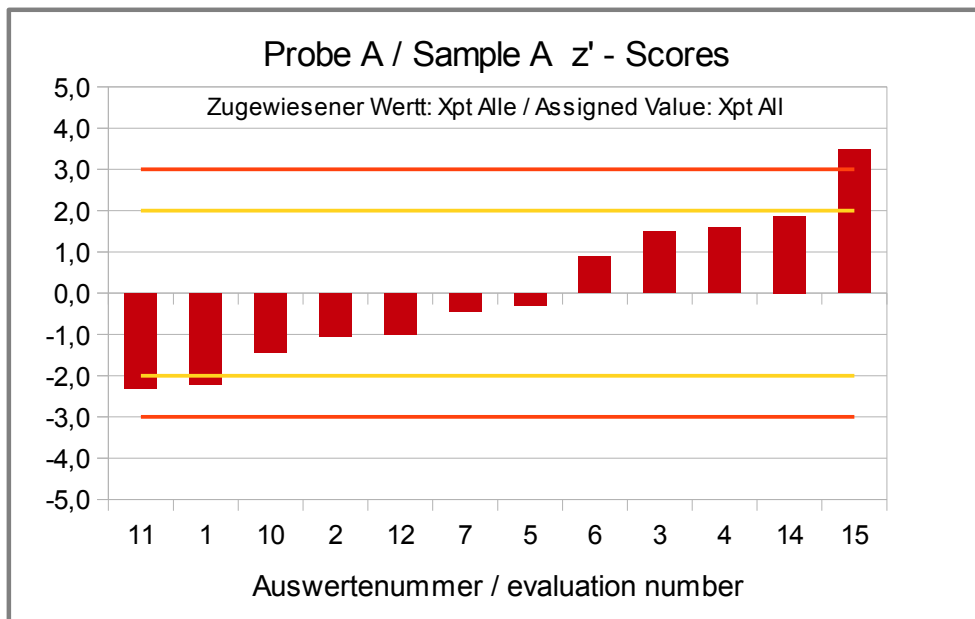


Abb./Fig. 8: z'-Scores (ELISA-Ergebnisse als Milchprotein) Zugewiesener Wert: robuster Mittelwert aller Ergebnisse

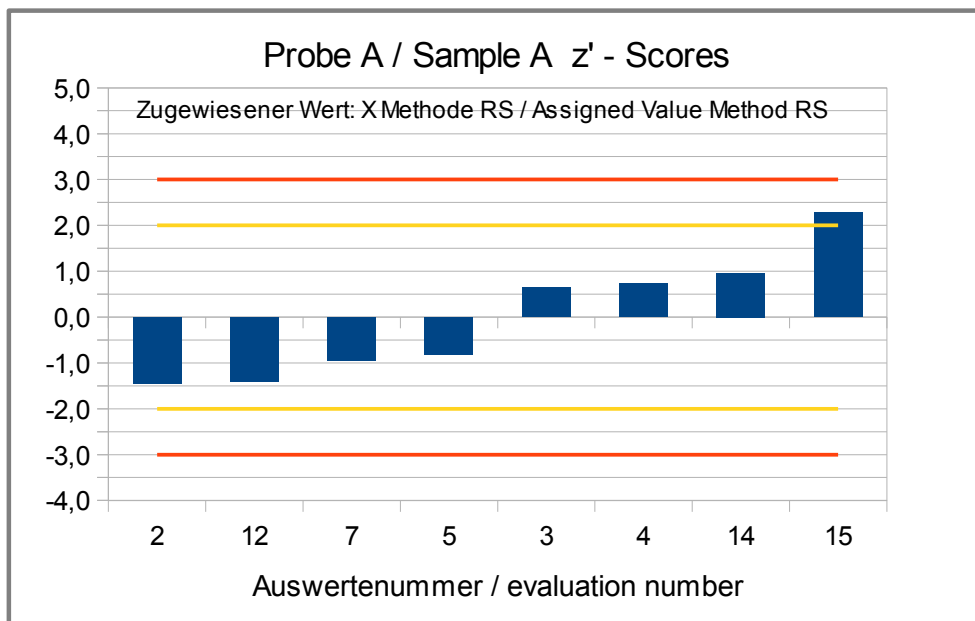


Abb./Fig. 9:

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

**Wiederfindungsraten für Milchprotein:
Dotierungsmaterialprobe und Probe A**

Auswertenummer	Dotierungsmaterial	Wiederfindungsrate*	Probe A	Wiederfindungsrate*	Methode	Hinweis
	[mg/kg]	[%]	[mg/kg]	[%]		
2	>67,5		6,50	44	RS-F	
3	5150	71	15,6	105	RS-F	
4	6100	84	16,0	108	RS-F	
5	6260	87	9,20	62	RS-F	
7	3030	42	8,66	59	RS-F	
12	3970	55	6,65	45	RS-F	
14	3840	53	17,0	115	RS-F	Mittelwert von DLA berechnet
15	4270	59	22,7	154	RS-F	
1	>8,75		2,29	15	VT	Ergebnis umgerechnet °
6	218	3	13,4	91	VT	Ergebnis umgerechnet °
8					VT	
10	-		5,09	34	VT	
11	>5250		1,93	13	VT	Ergebnis umgerechnet °

° Umrechnung S. 19

AB**	50-150 %	AB**	50-150 %
Anzahl im AB	6	Anzahl im AB	6
Prozent im AB	75	Prozent im AB	50

Methoden:

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

* Wiederfindungsrate 100% Bezugsgröße: Milchprotein, s. Seite 5

** Akzeptanzbereich der AOAC für Allergen-ELISAs

Anmerkung:

75% (6) 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 Lebensmittelmatrix-Probe A lagen 50% (6) der Wiederfindungsraten in diesem Akzeptanzbereich.

4.2.2 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		
13	positiv	4,40	negativ	<0,2	2/2 (100%)	AQ	
4a	positiv	2,69	negativ	< 0,2	2/2 (100%)	IL	
17	positiv	6,00	negativ	< 0,04	2/2 (100%)	IL	
4b	positiv	6,06	negativ	< 0,5	2/2 (100%)	RS-F	4b und 4c unterschiedliche Extraktion
4c	positiv	15,4	negativ	< 2,5	2/2 (100%)	RS-F	Ergebnis ausgeschlossen
9	positiv	5,90	negativ		2/2 (100%)	RS-F	Mittelwert von DLA berechnet

	Probe A		Probe B	
Anzahl positiv	6		0	
Anzahl negativ	0		6	
Prozent positiv	100		0	
Prozent negativ	0		100	
Konsenswert	positiv		negativ	

Methoden:

AQ = AgraQuant, RomerLabs

IL = Immunolab

RS-F= Ridascreen® Fast, R-Biopharm

Anmerkung:

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

Quantitative Auswertung der Ergebnisse: Probe A

Auswertenummer	Casein [mg/kg]	z-Score X_{pt_ALL}	Methode	Hinweis
13	4,40	-0,5	AQ	
4a	2,69	-1,9	IL	
17	6,00	0,7	IL	
4b	6,06	0,8	RS-F	4b und 4c unterschiedliche Extraktion
4c	15,4	8,1	RS-F	Ergebnis ausgeschlossen
9	5,90	0,6	RS-F	Mittelwert von DLA berechnet

Methoden:

AQ = AgraQuant, RomerLabs

IL = Immunolab

RS-F= Ridascreen® Fast, R-Biopharm

Anmerkung:

Eine Kerndichte-Schätzung wurde aufgrund der Anzahl von < 8 Ergebnissen nicht vorgenommen.

Kenndaten: Quantitative Auswertung Casein**Probe A**

Kenndaten	Alle Ergebnisse [mg/kg]
Zugewiesener Wert (X_{pt})	X_{pt_ALL}
Anzahl der Messergebnisse	5
Anzahl der Ausreißer	0
Mittelwert	5,01
Median	5,90
Robuster Mittelwert (X_{pt})	5,08
Robuste Standardabweichung (S^*)	1,51
<i>Zielkenndaten:</i>	
Zielstandardabweichung σ_{pt}	1,27
Untere Grenze des Zielbereichs	2,54
Obere Grenze des Zielbereichs	7,62
Quotient S^*/σ_{pt}	1,20
Standardunsicherheit $U(X_{pt})$	0,85
Quotient $U(X_{pt})/\sigma_{pt}$	0,67
Ergebnisse im Zielbereich	5
Prozent im Zielbereich	100

Anmerkungen zu den Kenndaten und Vergleich der Bezugswerte:

Die Auswertung der Ergebnisse aller Methoden zeigte eine normale bis geringe Variabilität der Ergebnisse. Der Quotient S^*/σ_{pt} lag unter 2,0. Die robuste Standardabweichung liegt im oberen 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 nur eingeschränkt gültig, da nur wenige Ergebnisse vorlagen.

Der robuste Mittelwert der Auswertungen lag mit 43% vom Zusatzniveau von Casein zu Probe A, etwas unterhalb der relevanten Anforderungen für die eingesetzten Methoden (s. 3.4.3 und "Wiederfindungsraten für Casein" S.41).

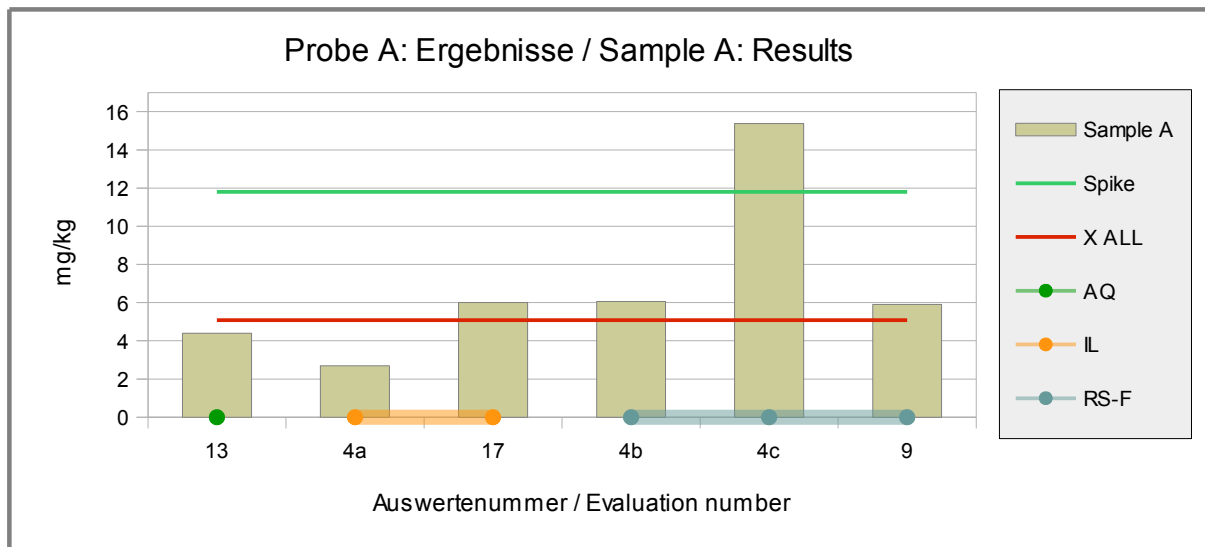


Abb./Fig. 10: ELISA-Ergebnisse Casein
 grüne Linie = Zusatzniveau (Spike)
 rote Linie = robuster Mittelwert aller Ergebnisse
 runde Symbole = Zuordnung der Methoden (s. Legende)

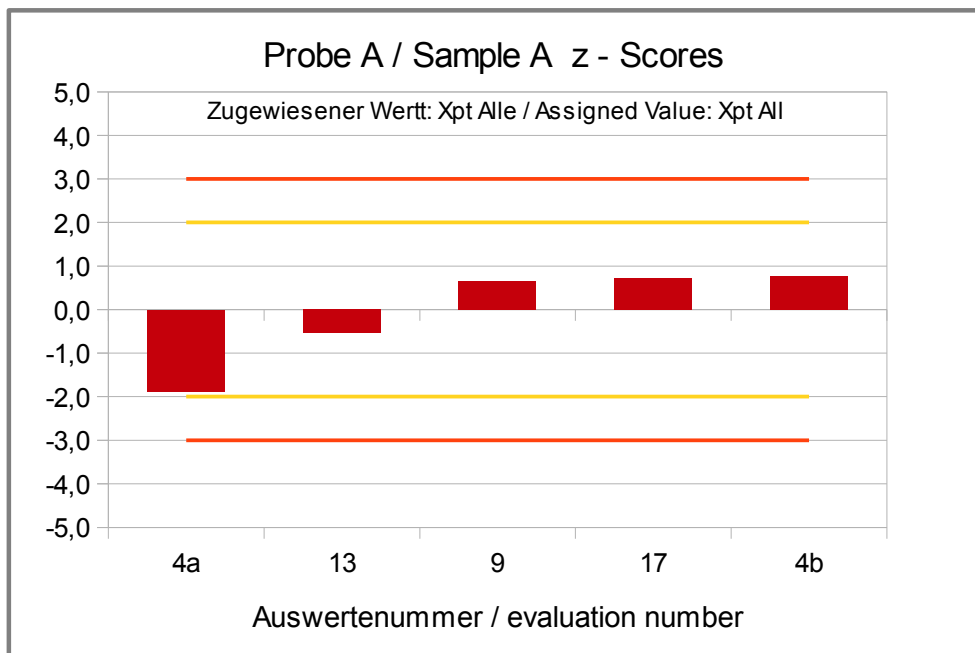


Abb./Fig. 11: z-Scores (ELISA-Ergebnisse als Casein) Zugewiesener Wert: robuster Mittelwert aller Ergebnisse

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

Auswertenummer	Dotierungsmaterial	Wiederfindungsrate*	Probe A	Wiederfindungsrate*	Methode	Hinweis
	[mg/kg]	[%]	[mg/kg]	[%]		
13	5700	99	4,40	37	AQ	
4a	13200	228	2,69	23	IL	
17	5000	87	6,00	51	IL	
4b	53800	931	6,06	51	RS-F	4b und 4c unterschiedliche Extraktion
4c	7890	137	15,4	130	RS-F	
9	4490	78	5,90	50	RS-F	Mittelwert von DLA berechnet

AB**	50-150 %	AB**	50-150 %
Anzahl im AB	4	Anzahl im AB	4
Prozent im AB	67	Prozent im AB	67

Methoden:

AQ = AgraQuant, RomerLabs

IL = Immunolab

RS-F= Ridascreen® Fast, R-Biopharm

* Wiederfindungsrate 100% Bezugsgröße: Casein, s. Seite 5

** Akzeptanzbereich der AOAC für Allergen-ELISAs

Anmerkung:

67% (4) der Teilnehmer haben in der Dotierungsmaterialprobe mittels ELISA eine Wiederfindungsrate im Bereich der AOAC-Anforderung von 50-150% erhalten. Bei der mit dem Dotierungsmaterial hergestellten Lebensmittelmatrix-Probe A lagen ebenfalls 67% (4) Wiederfindungsraten in diesem Akzeptanzbereich.

4.2.3 ELISA-Ergebnisse: β -Lactoglobulin**Qualitative Auswertung der Ergebnisse: Proben A und B**

Auswertenummer	Probe A	Probe A	Probe B	Probe B	Qualitative Bewertung	Methode	Hinweis
	pos/neg	[mg/kg]	pos/neg	[mg/kg]	Übereinstimmungen mit Konsenswerten		
13	positiv	0,39	negativ	<0,1	-	ES	
16	negativ		negativ		-	div	

	Probe A	Probe B	
Anzahl positiv	1	0	
Anzahl negativ	1	2	
Prozent positiv	50	0	
Prozent negativ	50	100	
Konsenswert	-	-	

Methoden:

ES = ELISA-Systeme

div = keine genaue Angabe / andere Methode

Anmerkung:

Das Ergebnis von Teilnehmer 13 steht in qualitativer Übereinstimmung mit der Dotierung von Probe A.

Die Ergebnisse zur Dotierungsmaterialprobe sind in der Dokumentation angegeben.

Quantitative Auswertung der Ergebnisse: Probe AAnmerkung:

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

4.2.4 PCR-Ergebnisse: Milch

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		
16	negativ		negativ		-	div	

	Probe A		Probe B	
Anzahl positiv	0		0	
Anzahl negativ	1		1	
Prozent positiv	0		0	
Prozent negativ	100		100	
Konsenswert	-		-	

Methoden:

div = keine genaue Angabe / andere Methode

Anmerkung:

Das Ergebnis für Probe A steht nicht in qualitativer Übereinstimmung mit der Dotierung von Probe A.

Quantitative Auswertung der Ergebnisse: Probe A

Anmerkung:

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

Wiederfindungsraten für Milch: Dotierungsmaterialprobe und Probe A

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

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: Haselnuss

Testkit Abk	Auswertenummer	Datum der Analyse	Ergebnis Probe A		Ergebnis Probe B		Ergebnis Dotierungsprobe		Angabe quantitatives Ergebnis als	Methode
			qualitativ	mg/kg	qualitativ	mg/kg	qualitativ	mg/kg		
ES	10		-	20,80	-	< 5	-	11200	Lebensmittel (Haselnuss)	ELISA-Systems, Hazelnut Residue Assay (ESHRD-48)
ES	13		positiv	2,7	negativ	<0,5	positiv	1800	Haselnussprotein	ELISA-Systems, Hazelnut Residue Assay (ESHRD-48)
IL	17		positiv	9,1	negativ	< 0,3	positiv	8000	Haselnuss	Immunolab Hazelnut ELISA (HAZ-E01)
RS-F	1		positiv	45,2	negativ	<2,5	positiv	11724,8	Haselnuss	Ridascreen Fast Hazelnut (R6802), r-Biopharm
RS-F	4		positiv	19,14	negativ	< 2,5	positiv	12303,54	Haselnuss	RIDASCREEN Fast Hazelnut (R6802), r-Biopharm
RS-F	5		negativ	< 2,5	positiv	18,6	positiv	1418,6	Haselnuss	Ridascreen Fast Hazelnut (R6802), r-Biopharm
RS-F	8		-	16,5	-	<2,5	-	10000	Haselnuss	Ridascreen Fast Hazelnut (R6802), r-Biopharm
RS-F	9		-	9	negativ		-	8630	Haselnuss	Ridascreen Fast Hazelnut (R6802), r-Biopharm
RS-F	9		-	12	negativ		-	8640	Haselnuss	Ridascreen Fast Hazelnut (R6802), r-Biopharm
RS-F	12	15.11.16	positiv	12,96	negativ	<2,5	positiv	9795,15	Hazelnut	Ridascreen Fast Hazelnut (R6802), r-Biopharm
RS-F	14		positiv	35,4	negativ	<2,5	positiv	11190	Haselnuss	Ridascreen Fast Hazelnut (R6802), r-Biopharm
RS-F	14		positiv	36,3	negativ	<2,5	-		Haselnuss	Ridascreen Fast Hazelnut (R6802), r-Biopharm
RS-F	15		-	14,66	negativ	< 1,50	-	12489	Haselnuss	Ridascreen Fast Hazelnut (R6802), r-Biopharm
div	16		-		-		neg		Bitte auswählen!	Auswahl Haselnuss-Kits:
div	16		-		-		neg		Bitte auswählen!	Auswahl Haselnuss-Kits:

Testkit Abk	Auswertenummer	Spezifität	Hinweise zur Methode (Extraktion und Bestimmung)		Sonstige Hinweise
			Antikörper	z.B. Extraktionslösung / Zeit / Temperatur	
ES	10	anti- Haselnuss	nach Testanleitung		
ES	13	Haselnussprotein	nach Herstellerangaben		
IL	17		Verwendung von Immunolab Extraktionsadditiv für Polyphenol-haltige Proben		
RS-F	1				
RS-F	4		nach Herstelleranleitung		
RS-F	5		nach Anleitung		
RS-F	8	Haselnussprotein	lt. Durchführungsanleitung Testkit		Proben scheinen nicht homogen, da stark schwankende Ergebnisse; Dotierungsprobe klumpig; Konzentrationsbereiche der Dotierungsprobe werden in der Routine nicht gemessen, da sehr große
RS-F	9				
RS-F	9				
RS-F	12	siehe Testkit-Anleitung	nach Testkit-Anleitung		
RS-F	14	Haselnussprotein			
RS-F	14	Haselnussprotein			
RS-F	15	Haselnuss			
div	16				
div	16				

5.1.2 ELISA: Milchprotein

Testkit Abk	Auswertenummer	Datum der Analyse	Ergebnis Probe A		Ergebnis Probe B		Ergebnis Dotierungsprobe		Angabe quantitatives Ergebnis als	Methode
			qualitativ	mg/kg	qualitativ	mg/kg	qualitativ	mg/kg		
RS-F	2	27.10.16	positiv	6,5	negativ	<2,5	positiv	>67,5	Milchproteine, gesamt	Ridascreen Fast Milk (R4652), r-Biopharm
RS-F	3		positiv	15,6	negativ		positiv	5147	Milchproteine, gesamt	Ridascreen Fast Milk (R4652), r-Biopharm
RS-F	4		positiv	15,99	negativ	< 2,5	positiv	6100,32	Milchprotein	RIDASCREEN Fast Milk (R4652), r-Biopharm
RS-F	5		positiv	9,2	negativ	< 2,5	positiv	6255,3	Milchprotein	RIDASCREEN FAST Milk (R4652), r-biopharm
RS-F	7		positiv	8,66	negativ	<2,5	positiv	3031,17	Milchproteine, gesamt	Ridascreen Fast Milk (R4652), r-Biopharm
RS-F	12	10.11.16	positiv	6,65	negativ	<2,5	positiv	3973,58	Milchproteine, gesamt	Ridascreen Fast Milk (R4652), r-Biopharm
RS-F	14		positiv	16,31	negativ	<2,5	positiv	3840	Milchproteine, gesamt	Ridascreen Fast Milk (R4652), r-Biopharm
RS-F	14		positiv	17,63	negativ	<2,5	-		Milchproteine, gesamt	Ridascreen Fast Milk (R4652), r-Biopharm
RS-F	15		-	22,73	negativ	< 0,70	-	4269	Milchproteine, gesamt	Ridascreen Fast Milk (R4652), r-Biopharm
VT	1		positiv	6,53	negativ	<2,5	positiv	>25	Magermilchpulver	Veratox Total Milk Allergen, Neogen
VT	6		positiv	38,35	negativ	1,77	positiv	622,6	Magermilchpulver	Veratox Total Milk Allergen, Neogen
VT	8		positiv		negativ		positiv		Bitte auswählen!	Veratox Total Milk Allergen, Neogen
VT	10		-	5,09	-	< 1	positiv	-	Milchproteine, gesamt	Veratox Total Milk Allergen, Neogen
VT	11		positiv	5,5	negativ	< 1	positiv	> 15000	Magermilchpulver	Veratox Total Milk Allergen, Neogen

Fortsetzung ELISA: Milchprotein

Testkit Abk	Auswertenummer	Spezifität	Hinweise zur Methode (Extraktion und Bestimmung)	Sonstige Hinweise
		Antikörper	z.B. Extraktionslösung / Zeit / Temperatur	
RS-F	2		nach Testkit-Anleitung	Lot: 13386
RS-F	3		laut Kitanleitung; Extraktion auch mit Alternativprotokoll für stark quellende Matrices (R-Biopharm) durchgeführt	Wert der Dotierprobe aus drei 1:100 Verdünnungen berechnet; Probe A: MW aus Dreifachbestimmung
RS-F	4		nach Herstelleranleitung: mit Extraktor 2+Extraktionspuffer+Additiv, 10min bei 100°C und 10min bei 60°C	
RS-F	5		nach Anleitung	
RS-F	7	Milchproteine, gesamt	Testdurchführung nach Anleitung 15-07-09	
RS-F	12	siehe Testkit-Anleitung	nach Testanleitung	
RS-F	14	Milchproteine, gesamt		
RS-F	14	Milchproteine, gesamt		
RS-F	15	Milchproteine, gesamt		
VT	1	Milchproteine, gesamt		
VT	6	Magermilchpulver		
VT	8	Magermilchpulver	lt. Durchführungsanleitung Testkit	Proben scheinen nicht homogen, da stark schwankende Ergebnisse; Dotierungsprobe klumpig; Konzentrationsbereiche der Dotierungsprobe werden in der Routine nicht gemessen, da sehr große Verdünnungsfaktoren
VT	10	polyklonaler (Kaninchen) Fängerantikörper	nach Testanleitung	
VT	11		-	Nachweisgrenze 1 mg/kg

5.1.3 ELISA: Casein

Testkit Abk	Auswertenummer	Datum der Analyse	Ergebnis Probe A		Ergebnis Probe B		Ergebnis Dotierungsprobe		Angabe quantitatives Ergebnis als	Methode
			qualitativ	mg/kg	qualitativ	mg/kg	qualitativ	mg/kg		
AQ	13		positiv	4,4	negativ	<0,2	positiv	5700	Casein	Test-Kit + Anbieter
IL	4a		positiv	2,69	negativ	< 0,2	positiv	13159,59	Casein	AgraQuant Casein (COKAL1200), RomerLabs
IL	17		positiv	6	negativ	< 0,04	positiv	5000	Casein	Immunolab Casein ELISA
RS-F	4b		positiv	6,06	negativ	< 0,5	positiv	5375,85	Casein	RIDASCREEN Fast Casein (R4652), r-Biopharm
RS-F	4c		positiv	15,38	negativ	< 2,5	positiv	7887,56	Casein	RIDASCREEN Fast Casein (R4652), r-Biopharm
RS-F	9		-	5,4	negativ		-	4300	Casein	Ridascreen Fast Casein (R4612), r-Biopharm
RS-F	9		-	6,4	negativ		-	4675	Casein	Ridascreen Fast Casein (R4612), r-Biopharm

Testkit Abk	Auswertenummer	Spezifität	Hinweise zur Methode (Extraktion und Bestimmung)	Sonstige Hinweise
		Antikörper	z.B. Extraktionslösung / Zeit / Temperatur	
AQ	13	Casein	nach Herstellerangaben	
IL	4a		nach Herstelleranleitung	
IL	17		Verwendung von Immunolab Extraktionsadditiv für Polyphenol-haltige Proben	
RS-F	4b		nach Herstelleranleitung: mit Extraktionspuffer (ohne Extraktor 2)	
RS-F	4c		nach Herstelleranleitung: mit Extraktor 2+Extraktionspuffer+Additiv, 10min bei 100°C und 10min bei 60°C	
RS-F	9			
RS-F	9			

5.1.4 ELISA: β -Lactoglobulin

Testkit Abk	Auswertenummer	Datum der Analyse	Ergebnis Probe A		Ergebnis Probe B		Ergebnis Dotierungsprobe		Angabe quantitatives Ergebnis als	Methode
			qualitativ	mg/kg	qualitativ	mg/kg	qualitativ	mg/kg		
ES	13	β Lactoglobulin	positiv	0,39	negativ	<0,1	positiv	260	beta-Lactoglobulin	Test-Kit + Anbieter ELISA-Systeme β -Lactoglobulin Residue Detection ELISA
div	16		neg		neg		positiv		Hausmethode	Auswahl Milch-Kits:

Testkit Abk	Auswertenummer	Spezifität	Hinweise zur Methode (Extraktion und Bestimmung)	Sonstige Hinweise
		Antikörper	z.B. Extraktionslösung / Zeit / Temperatur	
ES	13	beta-Lactoglobulin	nach Herstellerangaben	
div	16			

5.1.5 PCR: Haselnuss

Testkit Abk	Auswertenummer	Datum der Analyse	Ergebnis Probe A		Ergebnis Probe B		Ergebnis Dotierungsprobe		Angabe quantitatives Ergebnis als	Methode
			positiv / negativ	mg/kg	positiv / negativ	mg/kg	positiv / negativ	mg/kg		
			positiv / negativ	mg/kg	positiv / negativ	mg/kg	positiv / negativ	mg/kg	z.B. Lebensmittel / Protein	Test-Kit + Anbieter
ASU	10		positiv		negativ		positiv		Haselnuss-DNA	ASU §64 L 44.00-8 (PCR Haselnuss)
MS	3		negativ		negativ		positiv		Haselnuss-DNA	Microsynth
SFA-Q	11		positiv	34,5	positiv	2	positiv	2221	Haselnuss	Sure Food Allergen QUANT, Congen / r-Biopharm
div	2	28.11.16	negativ		negativ		positiv		Haselnuss-DNA	Koppel y col., 2010
div	2	29.11.16	negativ		negativ		positiv		Haselnuss-DNA	Koppel y col., 2010
div	6		-		-		positiv		Bitte auswählen!	Hausmethode
div	16		positiv	24000	neg		neg		Hausmethode	Hausmethode

Testkit 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	10	152 bp Gen corA 1	Dneasy [®] mericon Food Kit/ Proteinase K/ Real Time PCR/ 45 Zyklen	
MS	3		Macherey Nagel Nucleo Spin Food mit Optimierungen: erhöhte Einw aage, Umpufferung (Waschschritt mit Lysis Buffer) RNase-Schritt, Chloroform-Schritt, 2xCQW; RealTime PCR mit 45 Zyklen, Dekontaminationsschritt mit UNG; eigenes Thermoprofil; Inhibitionskontrolle	Haselnuss-Spuren in Probe A, aber weit unter NWG
SFA-Q	11	-	S3202 SureFood® ALLERGEN QUANT Hazelnut Nachweisgrenze 0,4 mg/kg, Bestimmungsgrenze 1 mg/kg Extraktion mit S1053 SureFood® PREP Advanced	-
div	2	Cor	Macherey-Nagel/Real Time PCR/45 cycles	
div	2	Cor	Macherey-Nagel/Real Time PCR/45 cycles	
div	6		Real Time PCR / 45 Cyclen	
div	16		Wizard Real time PCR	

5.1.6 PCR: Milch

Testkit Abk	Auswertenummer	Datum der Analyse	Ergebnis Probe A		Ergebnis Probe B		Ergebnis Dotierungsprobe		Angabe quantitatives Ergebnis als	Methode
			positiv / negativ	mg/kg	positiv / negativ	mg/kg	positiv / negativ	mg/kg		
div	16		neg		neg		positiv		Hausmethode	Hausmethode

Testkit 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	
div	16		Wizard Real time PCR	

5.2 Homogenität

5.2.1 Mischungshomogenität vor der Abfüllung

Microtracer Homogenitätstest

Dotierungsmaterialprobe

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

Analysenergebnisse:

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

Poisson-Verteilung

Probenanzahl	8	
Freiheitsgrad	7	
Mittelwert	102,8	Partikel
Standardabweichung	10,1	Partikel
χ^2 (CHI-Quadrat)	6,95	
Wahrscheinlichkeit	43	%
Wiederfindungsrate	98	%

Normalverteilung

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

6. Verzeichnis der Teilnehmer in alphabetischer Reihenfolge

Teilnehmer / Participant	Ort / Town	Land / Country
		Deutschland
		SPANIEN
		Deutschland
		Deutschland
		Deutschland
		Deutschland
		Deutschland
		Deutschland
		Deutschland
		Deutschland
		Deutschland
		Deutschland
		SCHWEIZ
		ÖSTERREICH
		GROSSBRITANIEN
		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)
 31. Allergen Data Collection - Update (2002): Cow's Milk (*Bos domesticus*), Besler M., Eigenmann P., Schwartz R., Internet Symposium on Food Allergens 4(1): 19-106, <http://www.food-allergens.de>

DLA 06/2016 - Allergene VI

Alle 17 Teilnehmer haben mindestens ein Ergebnis eingereicht. Die Auswertung erfolgte hinsichtlich der Parameter Haselnuss und Milch (Milchprotein, Casein) für ELISA- (qualitativ und quantitativ) und PCR-Methoden (Haselnuss, qualitativ). Zusätzlich wurden für jeden Teilnehmer Wiederfindungsraten für die Dotierungsmaterialprobe und die dotierte Probe ermittelt. Details zu den einzelnen Parametern inklusive separater Auswertung nach Testkit-Herstellern sind dem Auswertebereicht zu entnehmen. 4 Teilnehmer hatten ihren Sitz im Europäischen Ausland (Großbritannien, Österreich, Schweiz, Spanien).