

Proficiency Tests

**DLA**

food  
cosmetics  
consumer goods  
[www.dla-lvu.de](http://www.dla-lvu.de)

## **Auswertungs-Bericht**

Laborvergleichsuntersuchung

**DLA 07/2016**

**Allergene VII:**

**Crustaceae und Cashew**

**in Instantsuppenpulver**

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

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

Koordinator der LVU:  
Dr. Matthias Besler

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

<i>EP-Anbieter</i> <i>PT-Provider</i>	<b>DLA - Dienstleistung Lebensmittel Analytik GbR</b> 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 07/2016
<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. März 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. März 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 Crustaceae.....	21
4.1.1 ELISA-Ergebnisse: Crustaceae (Shrimps, getrocknet).....	21
4.1.2 PCR-Ergebnisse: Crustaceae (Shrimps, getrocknet).....	26
4.2 Vergleichsuntersuchung Cashew.....	28
4.2.1 ELISA-Ergebnisse: Cashew.....	28
4.2.2 PCR-Ergebnisse: Cashew.....	33
4.2.3 Andere Methoden: Cashew .....	34
5. Dokumentation.....	35
5.1 Angaben der Teilnehmer.....	35
5.1.1 ELISA: Crustaceae.....	35
5.1.2 ELISA: Cashew.....	37
5.1.3 PCR: Crustaceae .....	38
5.1.4 PCR: Cashew.....	39
5.1.5 Andere Methoden: Cashew.....	39
5.2 Homogenität.....	40
5.2.1 Mischungshomogenität vor der Abfüllung.....	40
6. Verzeichnis der Teilnehmer in alphabetischer Reihenfolge.....	41
7. Verzeichnis relevanter Literatur.....	42

## 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 ein handelsübliches Instantsuppenpulver "Zwiebelsuppe". Die Grundzusammensetzung war für beide Proben A und B gleich (s. Tabelle 1). Nach Zerkleinern, Sieben und Homogenisieren der Grundmischung wurde die dotierte Probe B folgendermaßen hergestellt:

Das Dotierungsmaterial, das die allergenen Zutaten Crustaceae und Cashew enthält, wurde zu einem Aliquot der Grundmatrix gegeben und die Mischung homogenisiert. Anschließend wurde portionsweise erneut Grundmatrix in 3 weiteren Schritten zugegeben und jeweils maschinell homogenisiert bis die Gesamtmenge erreicht war.

Die Rohwaren der Allergenvormischung wurden zuvor gesiebt (mesh 400 µm) bzw. mittels Zentrifugalmühle gesiebt (mesh 500 µm).

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

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

Tabelle 1: Zusammensetzung der DLA-Proben

Zutaten	Probe A	Probe B
Zwiebelsuppe (Pulver) Zutaten: Zwiebeln (45%), Stärke, Salz, Röstzwiebeln (7%), pflanzliche Fette, Hefeextrakt, Würze, Zucker, Verdickungsmittel: Guarkernmehl, Maltodextrin, Knoblauch, Gewürze, Aroma, Karamellzucker Nährwertangaben pro 100 g: Eiweiß 11 g, Kohlenhydrate 43 g, Fett 8,0 g, Salz 16 g	67,2 g/100 g	66,9 g/100 g
Kartoffelmehl Zutaten: Kartoffelmehl Nährwertangaben pro 100 g: Eiweiß <0,1 g, Kohlenhydrate 80 g, Fett <0,1 g	21,1 g/100 g	21,0 g/100 g
Maltodextrin Zutaten: Maltodextrin	11,8 g/100 g	11,7 g/100 g
Dotierungsmaterialprobe	-	0,480 g/100 g

Tabelle 2: Zugesezte Mengen allergener Zutaten

Zutaten	Dotierungsmaterialprobe	Probe B
Kartoffelmehl	89,3 %	0,42 %
<i>Cashewmus</i> Zutaten: Cashewkerne - als Cashew* - davon 18% Gesamtprotein**	11200 mg/kg (1,12 %) 2020 mg/kg	54 mg/kg 9,7 mg/kg
<i>Garnelen (Litopenaeus vannamei):</i> - als Garnelen, getrocknet* - davon 63% Gesamtprotein**	9440 mg/kg (0,944 %) 5950 mg/kg	45 mg/kg 28 mg/kg
<i>weitere Zutaten:</i> <i>Maltodextrin, Natriumchlorid,</i> <i>Natriumsulfat und Siliciumdioxid</i>	< 7,50 %	< 0,04 %

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

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

**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  $\mu\text{m}$ -Größe zur Probe gegeben und die Partikelzahl wird nach der Homogenisierung in entnommenen Aliquoten bestimmt. Die Bewertung der Mischungshomogenität erfolgt auf Grundlage der Poissonverteilung anhand des chi-Quadrat-Tests. Eine Wahrscheinlichkeit von  $\geq 5\%$  ist gleichzusetzen mit einer guten homogenen Mischung und von  $\geq 25\%$  mit einer exzellenten Mischung [14, 15]. Die Microtracer-Analyse der vorliegenden LVU-Probe B und Dotierungsmaterialprobe hat eine Wahrscheinlichkeit von 99% bzw. 80% ergeben. Die Partikel-Ergebnisse wurden zusätzlich in Konzentrationen umgerechnet, statistisch als Normalverteilung ausgewertet und mit der Standardabweichung nach Horwitz verglichen. Es wurden HorRat-Werte von 0,7 bzw. 1,1 erhalten. Die Ergebnisse der Microtracer-Analyse sind in der Dokumentation angegeben.

### **Homogenität der abgefüllten dotierten Probe B**

#### Durchführung der Homogenitätstests

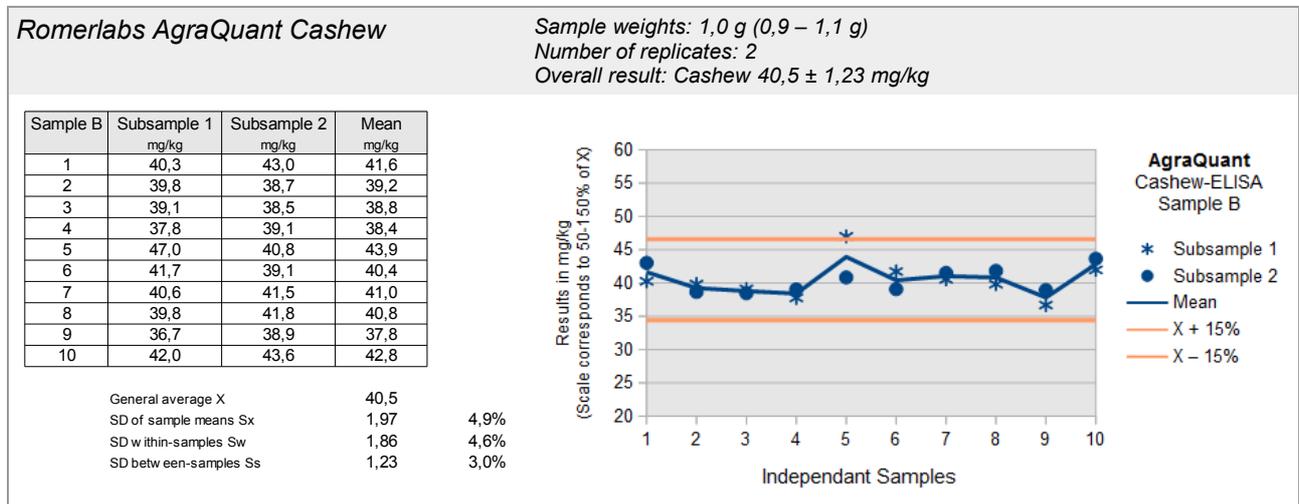
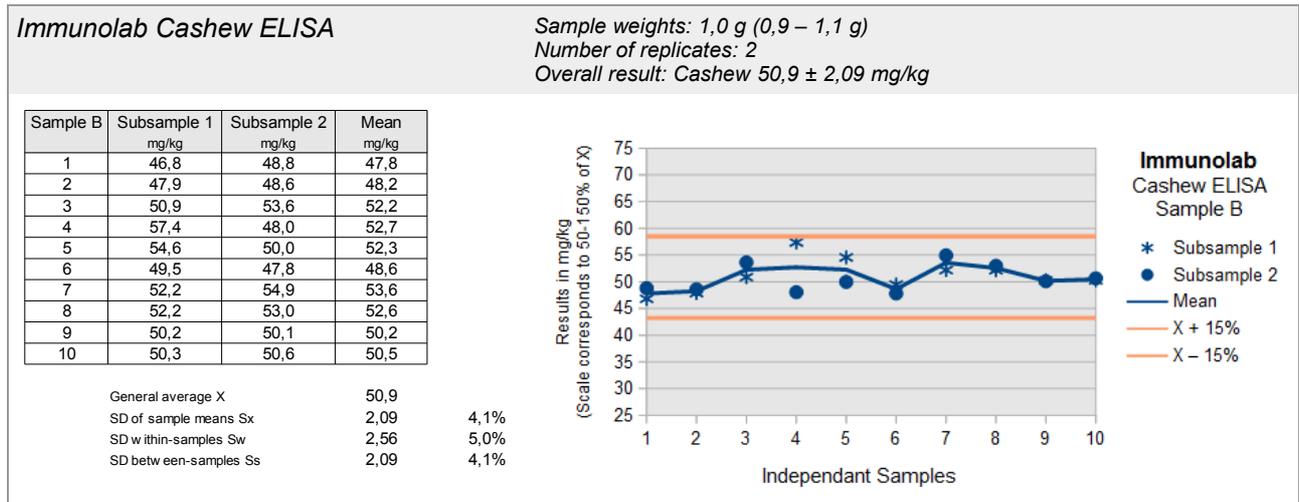
Die Homogenitätstests wurden in Kooperation mit den Labors der angegebenen Testkit-Anbieter durchgeführt. Von DLA wurden zufällig 10 Muster der abgefüllten dotierten Probe ausgewählt und davon jeweils 2 Teilproben in zuvor zufällig-codierte Extraktionsbehälter eingewogen und anschließend den Labors zur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

#### Bewertung der Homogenität

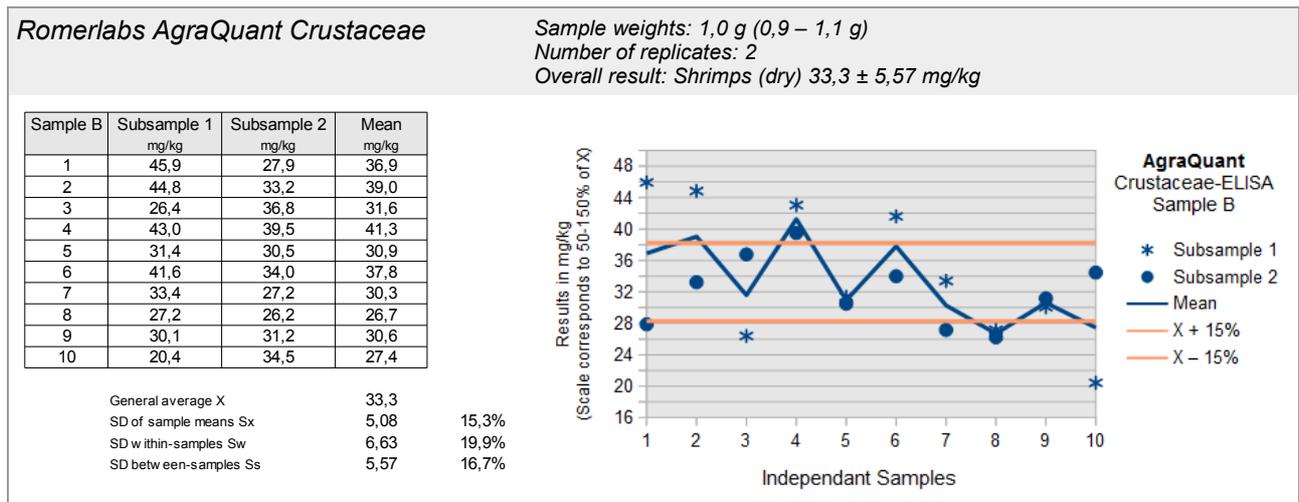
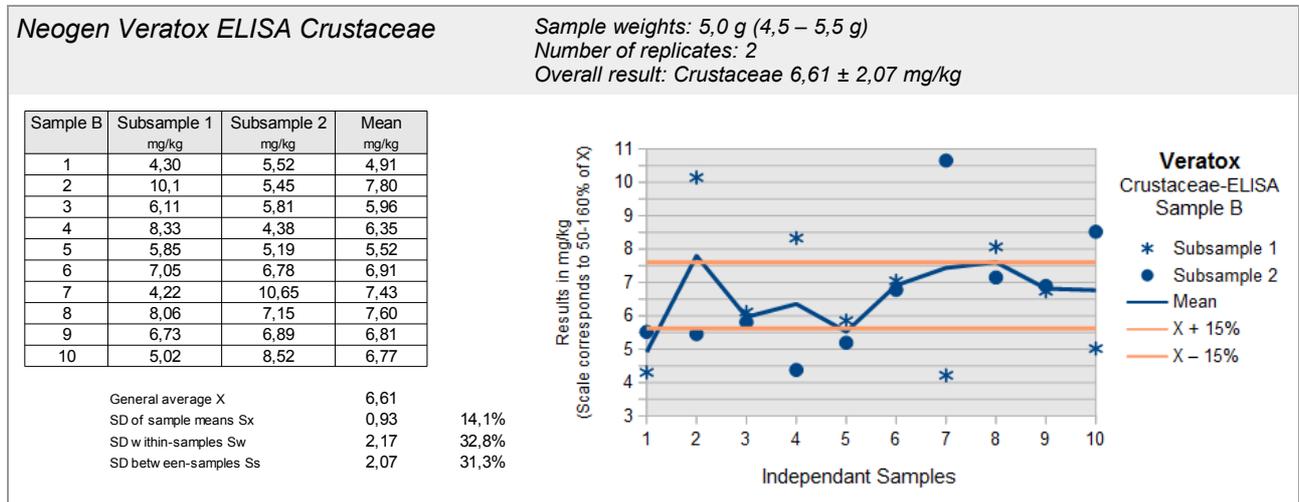
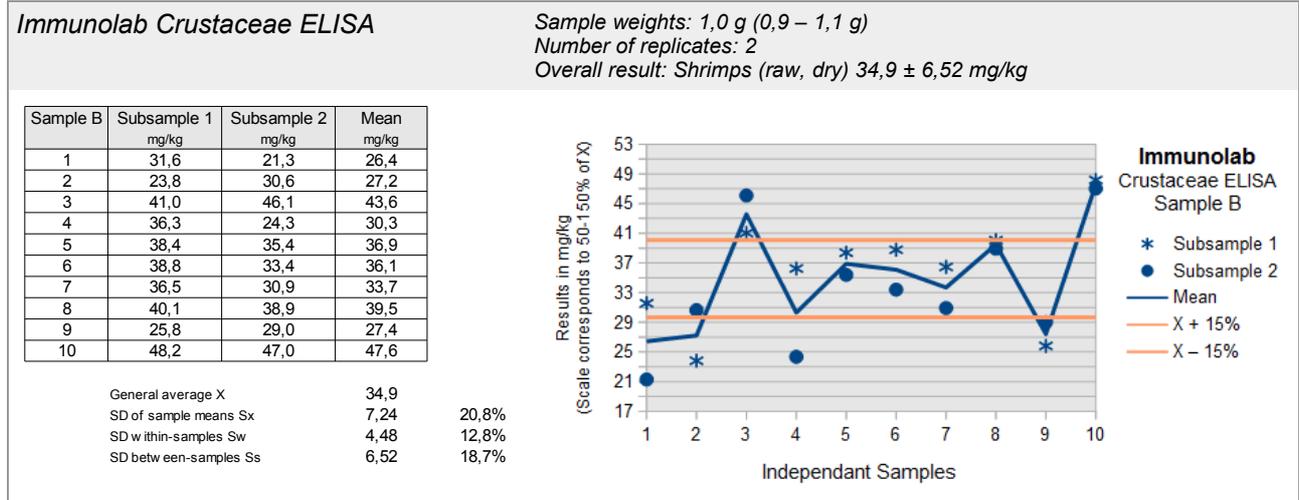
Die Homogenität wird mit einer Standardabweichung zwischen den Proben von  $S_s \leq 15\%$  („Heterogenitätsstandardabweichung“) als hinreichend gesichert angesehen. Dieses Kriterium wird für die untersuchte Probe B in allen ELISA-Tests für Cashew (Immunolab und AgraQuant) erfüllt (s. Seite 7). Bezüglich der ELISA-Tests für Crustaceae (Immunolab, AgraQuant Plus und Veratox) wurde dieses Kriterium nicht erfüllt. Für Crustaceae liegen die Heterogenitätsstandardabweichungen im Bereich von 15-20% bzw. bei  $>25\%$  (s. Seite 8). Die Anforderung an Wiederholstandardabweichungen von ELISA- und PCR-Verfahren ist üblicherweise  $\leq 25\%$  [16, 17, 20, 21].

Falls die Kriterien für eine ausreichende Homogenität des Probenmaterials bezüglich eines Parameters nicht erfüllt sind, werden die Auswirkungen auf die Zielstandardabweichung geprüft. Ggf. erfolgt die Bewertung der Ergebnisse der Teilnehmer unter Berücksichtigung der Standardunsicherheit des zugewiesenen Wertes anhand von z'-Scores (s. 3.6 und 3.8) [3].

**ELISA-Tests: Homogenität Cashew / Homogeneity Cashew**



**ELISA-Tests: Homogenität Crustacea / Homogeneity Crustacea**



## 2.2 Probenversand und Informationen zur Untersuchung

An jeden Teilnehmer wurden in der 46. Kalenderwoche 2016 je eine Portion der Untersuchungsmaterialien A und B sowie eine Dotierungsmaterialprobe verschickt. Die Untersuchungsverfahren wurden freigestellt. Die Untersuchungen waren durchzuführen bis spätestens 30. 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 Zwiebelsuppenpulver, Probe A und Probe B, mit möglichen Gehalten an den allergenen Zutaten Crustaceae und/oder Cashew 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 14 Teilnehmer haben fristgerecht Ergebnisse abgegeben.

### 3. Auswertung

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

### 3.2 Robuste Standardabweichung

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

Folgende robuste Standardabweichungen werden herangezogen:

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

### 3.3 Ausschluss von Ergebnissen und Ausreißer

Ergebnisse können vorab von der statistischen Auswertung ausgeschlossen werden, wenn offensichtliche grobe Fehler, wie z. B. falsche Einheiten, Dezimalstellen oder Angaben für einen falschen Prüfgegenstand vorliegen [2]. 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  $\sigma_{pt}$  (= Standardabweichung für die Eignungsbeurteilung) kann nach unten dargestellten, unterschiedlichen Verfahren bestimmt.

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

#### 3.4.1 Allgemeines Modell nach Horwitz

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

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

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

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

#### 3.4.2 Auswertung eines Versuchs zur Präzision

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

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

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

**Tabelle 3a:** ELISA-Methoden - Relative Wiederholstandardabweichungen ( $RSD_r$ ) und relative Vergleichsstandardabweichungen ( $RSD_R$ ) gemäß ausgewählter Auswertungen von Versuchen zur Präzision und die resultierende Zielstandardabweichung  $\sigma_{pt}$  [28-29]

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  $\sigma_{pt}$  [30-32]

Parameter	Matrix	Mittelwerte [mg/kg]	Wiederfindung	rob $RSD_r$	$RSD_r$	$RSD_R$	$\sigma_{pt}$	Methode / Literatur
Mandel	Reiskekse	105,2	105 %	-	19,3%	27,5%	23,9%	rt-PCR ASU 18.00-20
		18,0	90 %		44,0%	49,1%	38,0%	
		10,5	105 %		32,0%	38,8%	31,5%	
Mandel	Weizenkekse Soßenpulver	114,3	94,6 %	-	22,1%	41,8%	38,8%	rt-PCR ASU 18.00-20
		88,1	88,1 %		43,9%	43,1%	- %	
Mandel	Reiskekse	109	109 %	-	17,6%	32,8%	30,3%	rt-PCR ASU 18.00-22
		21,3	107 %		35,8%	45,0%	37,2%	
		12,3	121 %		32,0%	47,8%	42,1%	
Mandel	Weizenkekse Soßenpulver	120,7	98,2 %	-	15,7%	32,5%	30,5%	rt-PCR ASU 18.00-22
		112	94,1 %		36,2%	42,8%	34,3%	
Sesam	Reiskekse	94,6	95 %	-	22,5%	27,5%	22,4%	rt-PCR ASU 18.00-19
		15,7	79 %		26,0%	39,5%	35,0%	
		9,8	98 %		20,9%	33,5%	30,0%	
Sesam	Weizenkekse Soßenpulver	96,9	79 %	-	21,8%	33,0%	29,2%	rt-PCR ASU 18.00-19
		59,8	60 %		22,2%	43,2%	40,2%	
Sesam	Reiskekse	88,9	89 %	-	18,2%	30,5%	27,7%	rt-PCR ASU 18.00-22
		17,8	89 %		34,2%	37,8%	29,1%	
		9,8	98 %		26,2%	37,0%	32,0%	
Sesam	Weizenkekse Soßenpulver	115	93 %	-	16,7%	41,1%	39,4%	rt-PCR ASU 18.00-22
		58,5	59 %		30,8%	44,4%	38,7%	

### 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% <sup>(a)</sup>	19,5 - 57,2% <sup>(a)</sup>
CAC 2010	70 - 120%	≤ 25%	≤ 35%

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

Tabelle 5: PCR-Validierungskriterien

Literatur [16]	Wiederfindungsrate	Wiederholstandard- abweichung	Vergleichsstandard- abweichung
CAC 2010	± 25% <sup>(a)</sup>	≤ 25%	≤ 35%

(a) = Trueness / Richtigkeit

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

Diese Zielstandardabweichung wurde zur statistischen Bewertung der Ergebnisse mittels z-Score 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 ( $\sigma_{pt}$ ) das Ergebnis ( $x_i$ ) des betreffenden Teilnehmers vom zugewiesenen Wert ( $x_{pt}$ ) abweicht [3].

Die Berechnung erfolgt nach:

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

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

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

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

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

#### 3.5.1 Warn- und Eingriffssignale

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

DLA stellt in den z-Score-Abbildungen die Grenzen für die Warn- und Eingriffssignale als gelbe bzw. rote Linien dar. Die jeweiligen Werte haben gemäß ISO 13528 nur Gültigkeit sofern  $\geq 10$  Ergebnisse vorliegen [3].

### 3.6 z'-Score

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

Die Berechnung erfolgt nach:

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

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

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

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

Zu Warn- und Eingriffssignalen siehe 3.5.1.

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

In Anlehnung an den HorRat-Wert kann die Bewertung einer Laborvergleichsuntersuchung als aussagekräftig gelten, wenn der Quotient von robuster Standardabweichung  $S^*$  und Zielstandardabweichung  $\sigma_{pt}$  nicht über 2 liegt. Ein über 2 liegender Wert bedeutet, dass die Präzision nicht zufriedenstellend ist, d.h., dass die Präzision aus analytischen Gründen zu variabel ist oder die festgestellte Variation höher ist als für die angewandte Methode geschätzt wurde. Somit ist eine Vergleichbarkeit der Messergebnisse nicht gewährleistet [3].

### 3.8 Standardunsicherheit des zugewiesenen Werts

Jeder zugewiesene Wert ist mit einer Standardunsicherheit behaftet, die von der Analysenmethode, Unterschieden der eingesetzten Analysenmethoden, dem Probenmaterial und der Anzahl der Teilnehmer (P) einer LVU beeinflusst wird. Die Standardunsicherheit des zugewiesenen Wertes ( $U_{(x_{pt})}$ ) wird für die vorliegende LVU wie folgt berechnet [3]:

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

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

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

### 3.9 Graphische Darstellung der Bezugswerte

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

### 3.10 Wiederfindungsraten: Dotierung

Für die Ergebnisse von Dotierungsmaterialprobe und dotierter Probe werden Wiederfindungsraten in Bezug auf die zugesetzten Allergene (Zusatzniveau) berechnet. Die Bezugswerte ergeben sich aus den unter 2.1 Untersuchungsmaterial in Tabelle 1 angegebenen Gehalten. Als Akzeptanzbereich AB für die Bewertung der Teilnehmerergebnisse wird der von der AOAC vorgeschlagene Bereich von 50 - 150% für die Wiederfindungsraten von Allergen-ELISAs herangezogen [21]. Für quantitative PCR-Bestimmungen wird ebenfalls dieser Akzeptanzbereich herangezogen.

## 4. Ergebnisse

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

Die 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 Wiederfindungsraten 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.

Die ELISA-Ergebnisse für Crustaceae (Nassgewicht), Crustaceae-Protein sowie Tropomyosin wurden zur Auswertung in Crustaceae/Shrimp Trockengewicht umgerechnet. Aufgrund der unterschiedlichen Testkit-Spezifikationen und Teilnehmerangaben erfolgte die Umrechnung je nach Testkit wie folgt:

Immunolab (IL): Die übermittelten Ergebnisse waren als Crustaceae/Shrimp Trockengewicht angegeben, sodass keine Umrechnung notwendig war.

AgraQuant (AO): Ergebnisse die als Crustaceae-Protein angegeben wurden, wurden in Crustaceae Trockengewicht umgerechnet (Faktor 70, Angabe aus Testkit). Ergebnisse die als Tropomyosin angegeben wurden, wurden vorab in den Protein-Gehalt umgerechnet, wobei ein Gehalt von 20% Tropomyosin im Gesamtprotein zugrunde gelegt wurde (Angabe aus Testkit).

Ridascreen Fast (RS-F): Ergebnisse, die als Crustaceae (Nassgewicht) angegeben waren, wurden zunächst in Crustaceae-Protein umgerechnet (20% Protein in Crustaceae, Angabe aus Testkit). Anschließend erfolgte die Berechnung des Trockengewichts aus dem Crustaceae-Proteingehalt (Faktor 1,6), wobei der experimentell bestimmte Proteingehalt der Garnelen (Shrimps) in der Trockenmasse von 63% (s. Seite 5) zugrunde gelegt wurde.

Die ELISA-Ergebnisse, die als Cashew-Protein angegeben wurden, sind mit dem experimentell bestimmten Proteingehalt (18%) der Rohstoffe auf das Gesamtlebensmittel (Cashew) umgerechnet worden (s. Seite 5).

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

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

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

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

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

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

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

## 4.1 Vergleichsuntersuchung Crustaceae

### 4.1.1 ELISA-Ergebnisse: Crustaceae (Shrimps, getrocknet)

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

Auswertenummer	Probe A		Probe B		Qualitative Bewertung	Methode	Hinweis
	pos/neg	[mg/kg]	pos/neg	[mg/kg]			
1	negativ	<1,4	positiv	32,2	2/2 (100%)	AQ	Ergebnis umgerechnet °
7	negativ		positiv	23,8	2/2 (100%)	AQ	Ergebnis umgerechnet °
9	negativ	<1,4	positiv	36,4	2/2 (100%)	AQ	Ergebnis umgerechnet °
8	negativ	<1,4	positiv	32,9	2/2 (100%)	IL	
11	negativ	< 1	positiv	41,0	2/2 (100%)	IL	
2	negativ	<0,64	positiv	6,72	2/2 (100%)	RS-F	Mittelwert von DLA berechnet, Ergebnis umgerechnet °
3	negativ	<6,4	positiv	6,95	2/2 (100%)	RS-F	Ergebnis umgerechnet °
5	negativ		positiv	40,0	2/2 (100%)	RS-F	Ergebnis umgerechnet °
6	negativ	<6,4	positiv	8,84	2/2 (100%)	RS-F	Ergebnis umgerechnet °
10	negativ		positiv		2/2 (100%)	RS-F	Ergebnis umgerechnet °
12	negativ	< 0,64	positiv	32,0	2/2 (100%)	RS-F	Ergebnis umgerechnet °
13	negativ	< LOD	positiv	3,78	2/2 (100%)	RS-F	Mittelwert von DLA berechnet, Ergebnis umgerechnet °

° Umrechnung S. 19

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

#### Methoden:

AQ = AgraQuant, RomerLabs

IL = Immunolab

RS-F= Ridascreen® Fast, R-Biopharm

#### Anmerkung:

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

**Quantitative Auswertung der Ergebnisse: Probe B**

Auswertenummer	Probe B	z-Score $X_{pt,ALL}$	Methode	Hinweis
	[mg/kg]			
1	32,2	-0,1	AQ	Ergebnis umgerechnet °
7	23,8	-1,1	AQ	Ergebnis umgerechnet °
9	36,4	0,4	AQ	Ergebnis umgerechnet °
8	32,9	0,0	IL	
11	41,0	0,9	IL	
2	6,72		RS-F	Mittelwert von DLA berechnet, Ergebnis umgerechnet °
3	6,95		RS-F	Ergebnis umgerechnet °
5	40,0		RS-F	Ergebnis umgerechnet °
6	8,84		RS-F	Ergebnis umgerechnet °
10			RS-F	
12	32,0		RS-F	Ergebnis umgerechnet °
13	3,78		RS-F	Mittelwert von DLA berechnet, Ergebnis umgerechnet °

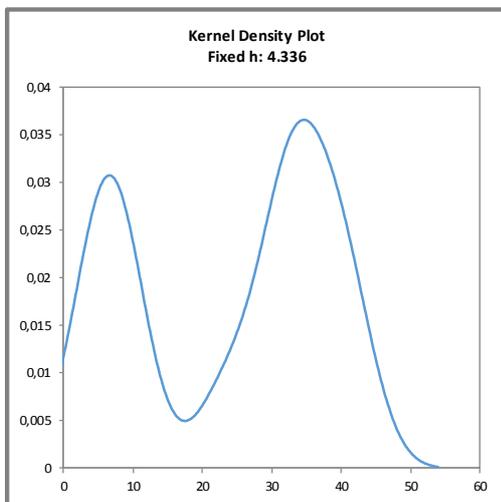
° Umrechnung S. 19

**Methoden:**

AQ = AgraQuant, RomerLabs

IL = Immunolab

RS-F= Ridascreen® Fast, R-Biopharm

**Abb. / Fig. 1:**Kerndichte-Schätzung aller ELISA-Ergebnisse (mit  $h = 0,5 \times \sigma_{pt}$  von  $X_{pt,ALL}$ )Kernel density plot of all ELISA results (with  $h = 0,5 \times \sigma_{pt}$  of  $X_{pt,ALL}$ )**Anmerkung:**Die Kerndichte-Schätzung zeigt zwei Maxima bei  $< 10$  mg/kg (Ergebnisse Methode RS-F) und bei  $> 30$  mg/kg (AQ, IL und teilweise RS-F Ergebnisse).

Kenndaten: Quantitative Auswertung Crustaceae**Probe B**

<b>Kenndaten</b>	<b>Alle Ergebnisse*</b> [mg/kg]
Zugewiesener Wert ( $X_{pt}$ )	$X_{pt\_ALL}$
Anzahl der Messergebnisse	5
Anzahl der Ausreißer	0
Mittelwert	33,3
Median	32,9
<b>Robuster Mittelwert (<math>X_{pt}</math>)</b>	<b>33,3</b>
<b>Robuste Standardabweichung (<math>S^*</math>)</b>	<b>7,18</b>
<i>Zielkenndaten:</i>	
<b>Zielstandardabweichung <math>\sigma_{pt}</math></b>	<b>8,32</b>
<b>Untere Grenze des Zielbereichs</b>	<b>16,6</b>
<b>Obere Grenze des Zielbereichs</b>	<b>49,9</b>
Quotient $S^*/\sigma_{pt}$	0,86
Standardunsicherheit $U(X_{pt})$	4,02
Quotient $U(X_{pt})/\sigma_{pt}$	0,48
Ergebnisse im Zielbereich	5
Prozent im Zielbereich	100

\* Ergebnisse ohne Methode RS-F (s. Anmerkungen)

**Methoden:**

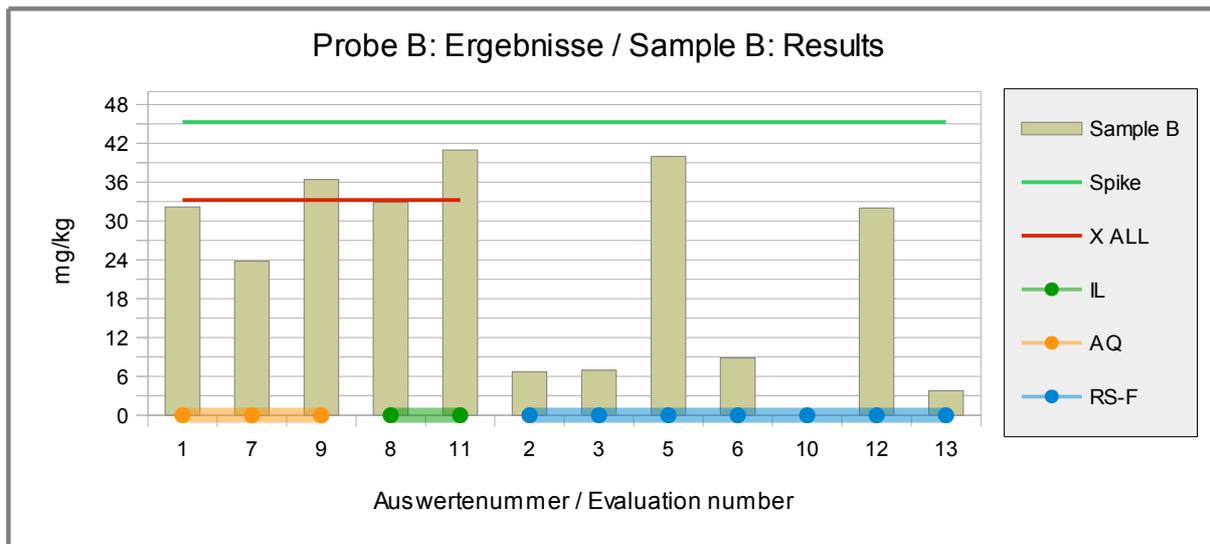
RS-F = R-Biopharm, Ridascreen® Fast

Anmerkungen zu den Kenndaten und Vergleich der Bezugswerte:

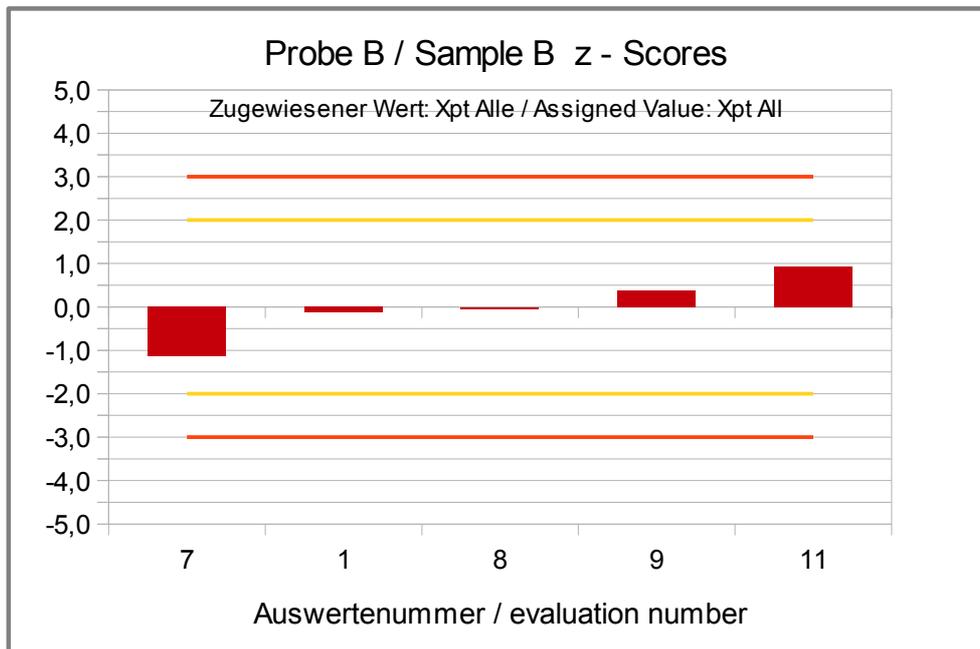
Die Kerndichte-Schätzung zeigt eine bimodale Verteilung der Ergebnisse (s. Abb.1), dessen Nebenpeak bei  $< 10$  mg/kg auf 3 Ergebnisse der Methode RS-F zurückzuführen ist. Die weitere Auswertung erfolgte daher ohne die Ergebnisse der Methode RS-F, für die insgesamt uneinheitliche Ergebnisse vorlagen.

Die Auswertung der Ergebnisse aller Methoden (ohne Methode RS-F) zeigte eine normale Variabilität der Ergebnisse. Der Quotient  $S^*/\sigma_{pt}$  lag unter 1,0. Die robuste Standardabweichung liegt im Bereich von etablierten Werten für die Vergleichsstandardabweichung der eingesetzten Bestimmungsmethoden (vgl. 3.4.2 Auswertung eines Versuchs zur Präzision und 3.4.3 Werte aus Erkenntnissen). Die Vergleichbarkeit der Ergebnisse ist gegeben. Diese Aussage ist für die methodenübergreifende Auswertung nur eingeschränkt gültig, da nur wenige Ergebnisse vorlagen.

Der robuste Mittelwert der Auswertung lag mit 74% vom Zusatzniveau von Crustaceae zu Probe B, innerhalb der relevanten Anforderungen für die eingesetzten Methoden (s. 3.4.3).



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



**Abb./Fig. 3:** z-Scores (ELISA-Ergebnisse als Crustaceae) Zugewiesener Wert: robuster Mittelwert aller Ergebnisse (ohne Methode RS-F)

**Wiederfindungsraten für Crustaceae (Shrimps, getrocknet):  
Dotierungsmaterialprobe und Probe B**

Auswertenummer	Dotierungsmaterial	Wiederfindungsrate*	Probe B	Wiederfindungsrate*	Methode	Hinweis
	[mg/kg]	[%]	[mg/kg]	[%]		
1	7980	<b>85</b>	32,2	<b>71</b>	AQ	Ergebnis umgerechnet °
7	9840	<b>104</b>	23,8	<b>53</b>	AQ	Ergebnis umgerechnet °
9			36,4	<b>80</b>	AQ	Ergebnis umgerechnet °
8	10500	<b>111</b>	32,9	<b>73</b>	IL	
11	9660	<b>102</b>	41,0	<b>91</b>	IL	
2	7520	<b>80</b>	6,72	15	RS-F	Mittelwert von DLA berechnet, Ergebnis umgerechnet °
3	5690	<b>60</b>	6,95	15	RS-F	Ergebnis umgerechnet °
5	49900	528	40,0	<b>88</b>	RS-F	Ergebnis umgerechnet °
6			8,84	20	RS-F	Ergebnis umgerechnet °
10					RS-F	
12	80,0	1	32,0	<b>71</b>	RS-F	Ergebnis umgerechnet °
13	1560	17	3,78	8	RS-F	Mittelwert von DLA berechnet, Ergebnis umgerechnet °

° Umrechnung S. 19

AB**	50-150 %	AB**	50-150 %
Anzahl im AB	<b>6</b>	Anzahl im AB	<b>7</b>
Prozent im AB	<b>67</b>	Prozent im AB	<b>64</b>

**Methoden:**

AQ = AgraQuant, RomerLabs

IL = Immunolab

RS-F= Ridascreen® Fast, R-Biopharm

\* Wiederfindungsrate 100% Bezugsgröße: Crustaceae, s. Seite 5

\*\* Akzeptanzbereich der AOAC für Allergen-ELISAs

Anmerkung:

67% (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 B lagen 64% (7) der Wiederfindungsraten in diesem Akzeptanzbereich.

4.1.2 PCR-Ergebnisse: Crustaceae (Shrimps, getrocknet)

Qualitative Auswertung der Ergebnisse: Proben A und B

Auswertenummer	Probe A	Probe A	Probe B	Probe B	Qualitative Bewertung	Methode	Hinweis
	pos/neg	[mg/kg]	pos/neg	[mg/kg]	Übereinstimmungen mit Konsenswerten		
2	negativ	<0,4	positiv	>0,4	2/2 (100%)	SFA-ID	
3	negativ	<10	positiv	51,1	2/2 (100%)	SFA-ID	
4	negativ		positiv		2/2 (100%)	SFA-ID	
14	positiv	> 0,4	positiv	> 0,4	1/2 (50%)	SFA-ID	

	Probe A	Probe B
Anzahl positiv	1	4
Anzahl negativ	3	0
Prozent positiv	25	100
Prozent negativ	75	0
Konsenswert	negativ	positiv

Methoden:

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

Anmerkung:

Die Konsenswerte stehen in qualitativer Übereinstimmung mit der Dotierung von Probe B. Ein positives Ergebnis für Probe A wurde mit der Methode SFA-ID erhalten.

Quantitative Auswertung der Ergebnisse: Probe B

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

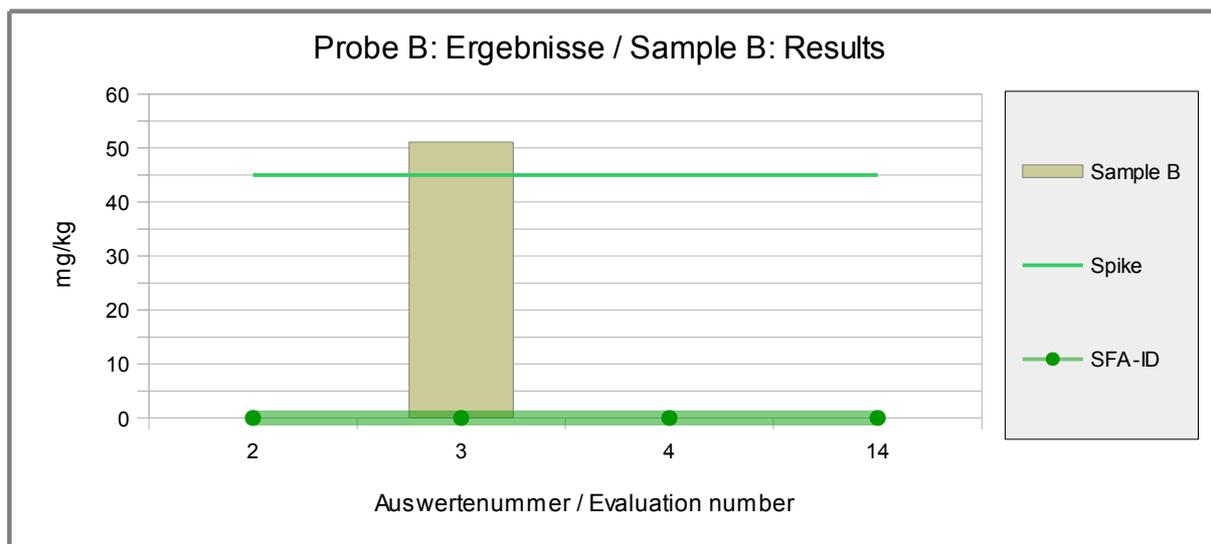


Abb./Fig. 4: PCR-Ergebnisse Crustaceae  
 grüne Linie = Zusatzniveau (Spike)  
 runde Symbole = Zuordnung der Methoden (s. Legende)

**Wiederfindungsraten für Crustaceae (Shrimps, getrocknet):  
Dotierungsmaterialprobe und Probe B**

Auswertenummer	Dotierungsmaterial	Wiederfindungsrate*	Probe B	Wiederfindungsrate*	Methode	Hinweis
	[mg/kg]	[%]	[mg/kg]	[%]		
2	>0,4		>0,4		SFA-ID	
3	3860	41	51,1	114	SFA-ID	
4					SFA-ID	
14	> 0,4		> 0,4		SFA-ID	

AB**	50-150 %	AB**	50-150 %
Anzahl im AB	0	Anzahl im AB	1
Prozent im AB	0	Prozent im AB	100

**Methoden:**

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

\* Wiederfindungsrate 100% Bezugsgröße: Crustaceae, s. Seite 5

\*\* Akzeptanzbereich der AOAC für Allergen-ELISAs

Anmerkung:

Ein Teilnehmer hat Crustaceae mittels PCR quantifiziert. Bei der mit dem Dotierungsmaterial hergestellten Lebensmittelmatrix-Probe B lag die Wiederfindungsrate im Bereich der AOAC-Anforderung von 50-150%.

## 4.2 Vergleichsuntersuchung Cashew

### 4.2.1 ELISA-Ergebnisse: Cashew

#### 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		positiv	83,6	2/2 (100%)	AQ	
8	negativ	< 2	positiv	90,0	2/2 (100%)	AQ	
3	negativ	< 2	positiv	55,4	2/2 (100%)	BC	
1	negativ	< 5	positiv	150	2/2 (100%)	ET	Ergebnis umgerechnet °
9	negativ	< 5	positiv	126	2/2 (100%)	ET	Ergebnis umgerechnet °
2	negativ	< 0,2	positiv	87,0	2/2 (100%)	IL	Mittelwert von DLA berechnet
11	negativ	< 1	positiv	53,0	2/2 (100%)	IL	
13	negativ	< LOD	positiv	86,1	2/2 (100%)	RS-F	Mittelwert von DLA berechnet

° Umrechnung S. 19

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

#### Methoden:

AQ = AgraQuant, RomerLabs

BC = BioCheck ELISA

ET = Elution Technologies ELISA Kit

IL = Immunolab

RS-F= Ridascreen® Fast, R-Biopharm

#### Anmerkung:

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

**Quantitative Auswertung der Ergebnisse: Probe B**

Auswertenummer	Cashew	z-Score $X_{pt,ALL}$	Methode	Hinweis
	[mg/kg]			
7	83,6	-0,3	AQ	
8	90,0	0,0	AQ	
3	55,4	-1,6	BC	
1	150	2,6	ET	Ergebnis umgerechnet °
9	126	1,6	ET	Ergebnis umgerechnet °
2	87,0	-0,2	IL	Mittelwert von DLA berechnet
11	53,0	-1,7	IL	
13	86,1	-0,2	RS-F	Mittelwert von DLA berechnet

° Umrechnung S. 19

**Methoden:**

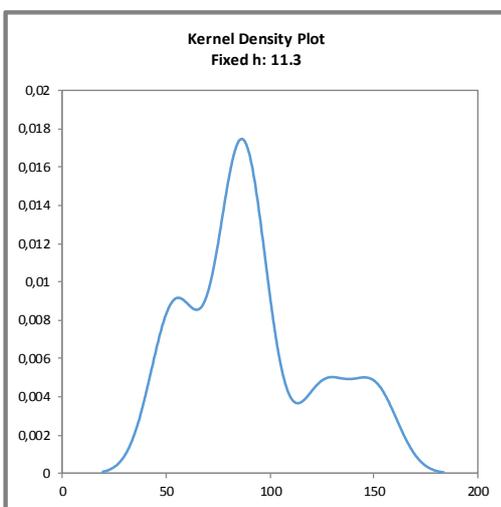
AQ = AgraQuant, RomerLabs

BC = BioCheck ELISA

ET = Elution Technologies ELISA Kit

IL = Immunolab

RS-F= Ridascreen® Fast, R-Biopharm

**Abb. / Fig. 5:**Kerndichte-Schätzung aller ELISA-Ergebnisse (mit  $h = 0,5 \times \sigma_{pt}$  von  $X_{pt,ALL}$ )Kernel density plot of all ELISA results (with  $h = 0,5 \times \sigma_{pt}$  of  $X_{pt,ALL}$ )**Anmerkung:**

Die Kerndichte-Schätzung zeigt mittig annähernd eine Normalverteilung der Ergebnisse mit einer Schulter bei <60 mg/kg und einem breiten Nebenpeak bei >120 mg/kg (Methode ET).

Kenndaten: Quantitative Auswertung Cashew

**Probe B**

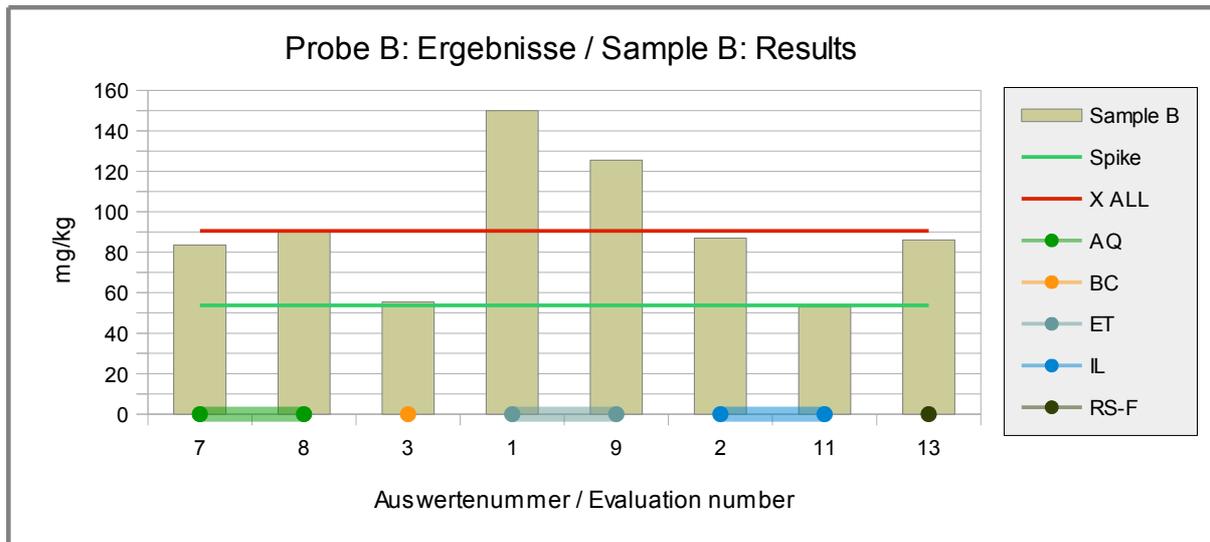
<b>Kenndaten</b>	<b>Alle Ergebnisse</b> [mg/kg]
Zugewiesener Wert ( $X_{pt}$ )	$X_{pt}_{ALL}$
Anzahl der Messergebnisse	8
Anzahl der Ausreißer	0
Mittelwert	91,3
Median	86,5
<b>Robuster Mittelwert (<math>X_{pt}</math>)</b>	<b>90,5</b>
<b>Robuste Standardabweichung (<math>S^*</math>)</b>	<b>35,1</b>
<i>Zielkenndaten:</i>	
<b>Zielstandardabweichung <math>\sigma_{pt}</math></b>	<b>22,6</b>
<b>Untere Grenze des Zielbereichs</b>	<b>45,2</b>
<b>Obere Grenze des Zielbereichs</b>	<b>136</b>
Quotient $S^*/\sigma_{pt}$	1,6
Standardunsicherheit $U(X_{pt})$	15,5
Quotient $U(X_{pt})/\sigma_{pt}$	0,69
Ergebnisse im Zielbereich	7
Prozent im Zielbereich	88

Anmerkungen zu den Kenndaten und Vergleich der Bezugswerte:

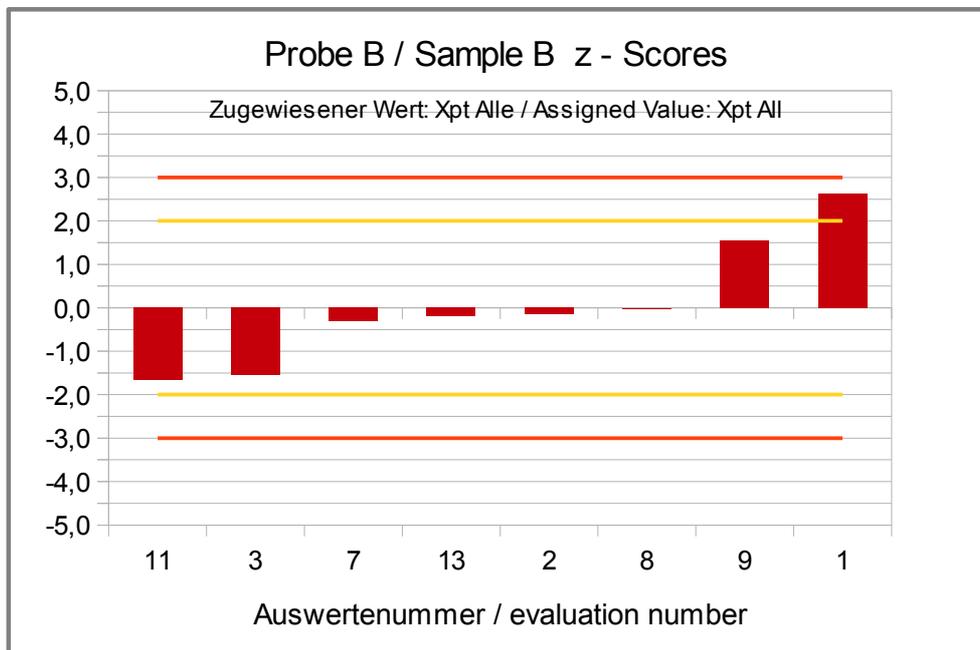
Die Vergleichbarkeit der Ergebnisse ist aufgrund der Kenndaten formal gegeben. Diese Aussage ist für die methodenübergreifende Auswertung allerdings nur eingeschränkt gültig, da für einige Methoden nur wenige Ergebnisse vorlagen und die Kerndichte-Schätzung auf methodenabhängige Unterschiede hinweist (z.B. höhere Ergebnisse Methode ET).

Insgesamt zeigte die Auswertung der Ergebnisse aller Methoden eine normale Variabilität der Ergebnisse. Der Quotient  $S^*/\sigma_{pt}$  lag unter 2,0. Die robuste Standardabweichung liegt im Bereich von etablierten Werten für die Vergleichsstandardabweichung der eingesetzten Bestimmungsmethoden (vgl. 3.4.2 Auswertung eines Versuchs zur Präzision und 3.4.3 Werte aus Erkenntnissen).

Der robuste Mittelwert der Auswertung lag mit 180% vom Zusatzniveau von Cashew zu Probe B, oberhalb der relevanten Anforderungen für die eingesetzten Methoden (s. 3.4.3 und "Wiederfindungsraten" S.14).



**Abb./Fig. 6:** ELISA-Ergebnisse Cashew  
 grüne Linie = Zusatzniveau (Spike)  
 rote Linie = robuster Mittelwert aller Ergebnisse  
 runde Symbole = Zuordnung der Methoden (s. Legende)



**Abb./Fig. 7:** z-Scores (ELISA-Ergebnisse als Cashew) Zugewiesener Wert: robuster Mittelwert aller Ergebnisse

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

Auswertenummer	Dotierungsmaterial	Wiederfindungsrate*	Probe B	Wiederfindungsrate*	Methode	Hinweis
	[mg/kg]	[%]	[mg/kg]	[%]		
7	18700	167	83,6	155	AQ	
8	17000	152	90,0	167	AQ	
3	16900	151	55,4	<b>103</b>	BC	
1	30600	273	150	279	ET	Ergebnis umgerechnet °
9			126	233	ET	Ergebnis umgerechnet °
2	28000	250	87,0	162	IL	Mittelwert von DLA berechnet
11	11200	<b>100</b>	53,0	<b>99</b>	IL	
13	21100	188	86,1	160	RS-F	Mittelwert von DLA berechnet

° Umrechnung S. 19

AB**	50-150 %	AB**	50-150 %
Anzahl im AB	<b>1</b>	Anzahl im AB	<b>2</b>
Prozent im AB	<b>14</b>	Prozent im AB	<b>25</b>

\* Wiederfindungsrate 100% Bezugsgröße: Cashew, s. Seite 5

\*\* Akzeptanzbereich der AOAC für Allergen-ELISAs

**Methoden:**

AQ = AgraQuant, RomerLabs

BC = BioCheck ELISA

ET = Elution Technologies ELISA Kit

IL = Immunolab

RS-F= Ridascreen® Fast, R-Biopharm

Anmerkung:

Ein Teilnehmer hat in der Dotierungsmaterialprobe mittels ELISA eine Wiederfindungsrate im Bereich der AOAC-Anforderung von 50-150% erhalten. Bei der mit dem Dotierungsmaterial hergestellten Lebensmittelmatrix-Probe B lagen zwei Wiederfindungsraten (25%) in diesem Akzeptanzbereich. Alle anderen Ergebnisse lagen im Bereich von 151-279% oberhalb von 150%.

**4.2.2 PCR-Ergebnisse: Cashew****Qualitative Auswertung der Ergebnisse: Proben A und B**

Auswertenummer	Probe A	Probe A	Probe B	Probe B	Qualitative Bewertung	Methode	Hinweis
	pos/neg	[mg/kg]	pos/neg	[mg/kg]	Übereinstimmungen mit Konsenswerten		
2	negativ	<0,4	positiv	>0,4	2/2 (100%)	SFA-ID	
14	negativ	< 0,4	positiv	> 0,4	2/2 (100%)	SFA-ID	
4	negativ		positiv		2/2 (100%)	div	
8	negativ		positiv		2/2 (100%)	div	

	Probe A	Probe B
Anzahl positiv	0	4
Anzahl negativ	4	0
Prozent positiv	0	100
Prozent negativ	100	0
Konsenswert	negativ	positiv

**Methoden:**

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

div = keine genaue Angabe / andere Methode

Anmerkung:

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

**Quantitative Auswertung der Ergebnisse: Probe B**Anmerkung:

Eine quantitative Auswertung konnte nicht vorgenommen werden, da keine quantitativen Ergebnisse vorlagen.

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

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

## 4.2.3 Andere Methoden: Cashew

## 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		
12	negativ		positiv		2/2 (100%)	div	Lateral Flow

**Methoden:**

div = keine genaue Angabe / andere Methode

Anmerkung:

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

## 5. Dokumentation

### 5.1 Angaben der Teilnehmer

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

#### 5.1.1 ELISA: Crustaceae

Meth. Abk.	Auswertenummer	Datum der Analyse	Ergebnis Probe A		Ergebnis Probe B		Ergebnis Dotierungsprobe		Quantitatives Ergebnis als	Methode
			qualitativ	mg/kg	qualitativ	mg/kg	qualitativ	mg/kg		
AQ	1	29.12.16	negativ	<0.1	positiv	2,3	positiv	570	Crustacea-Protein	Test-Kit + Anbieter
AQ	7	19.12.16	negativ		positiv	0,34	positiv	140,55	Tropomyosin	AgraQuant ELISA Crustaceae (COKAL2248), RomerLabs
AQ	9	06.12.16	negativ	<0.1	positiv	2,6	na	na	Crustacea-Protein	AgraQuant ELISA Crustaceae (COKAL2248), RomerLabs
IL	8	24.11.	negativ	<0,02 (<1,4)	positiv	0,47 (32,9)	positiv	150 (10500)	Tropomyosin aus Krustentieren (Crustaceae)	Immunolab Crustaceans ELISA (CRU-E01)
IL	11	22.11.16	negativ	< 1	positiv	41	positiv	9660	Crustaceae (Shrimp)	Immunolab Crustaceans ELISA (CRU-E01)
RS-F	2	29.12.16	negativ	<2	positiv	>20	positiv	21000	Crustaceae	Ridascreen Fast Crustacean (R7302), r-Biopharm
RS-F	2	29.12.16	negativ	<2	positiv	21	positiv	26000	Crustaceae	Ridascreen Fast Crustacean (R7302), r-Biopharm
RS-F	3	02.12.16	negativ	<20	positiv	21,72	positiv	17769	Crustaceae	Ridascreen Fast Crustacean (R7302), r-Biopharm
RS-F	5	22.12.16	negativ		positiv	25	positiv	31170	Crustacea-Protein	Ridascreen Fast Crustacean (R7312), r-Biopharm
RS-F	6	22.11.16	negativ	<20	positiv	27,61			Crustaceae	ridascreenfast crustacean R7312
RS-F	10	01.12.16	negativ		positiv		positiv		Crustacea-Protein	Ridascreen Fast Crustacean (R7302), r-Biopharm
RS-F	12	23.11.16	negativ	< 2	positiv	100	positiv	250	Crustaceae	Ridascreen Fast Crustacean (R7302), r-Biopharm
RS-F	13	21.11.16	-	< LOD	-	2,71	-	998,69	Protein	r-Biopharm AG Fast Crustacean R7312
RS-F	13	21.11.16	-	< LOD	-	2,04	-	1200,79	Protein	r-Biopharm AG Fast Crustacean R7312

Fortsetzung ELISA Crustaceae:

Meth. Abk.	Auswertenummer	Spezifität	Hinweise zur Methode (Extraktion und Bestimmung)	Sonstige Hinweise
		Antikörper	z.B. Extraktionslösung / Zeit / Temperatur	
AQ	1		Methode wurde unter Berücksichtigung der Test-Kit Anweisungen durchgeführt	
AQ	7			Der Crustaceae Nachweis ermittelt den Gehalt an Tropomyosin, ein Protein, dass in allen üblichen Crustaceae-Spezies vorkommt. Der Tropomyosin Gehalt beträgt dabei üblicherweise ca. 20% vom Gesamtproteingehalt in gekochten Crustaceae-Proben
AQ	9	Tropomyosin		
IL	8	Krustentier-Tropomyosin	lt. Herstellerangaben (Ergebnis angegeben als Crustaceae = Tropomyosin x 70 für Shrimps roh)	
IL	11	Tropomyosin	Ergebnisse Tropomyosin: < 14 ppb; 580 ppb; 138748 ppb	
RS-F	2			
RS-F	2			
RS-F	3	Gemäß der Kit-Anleitung	Unter Berücksichtigung der Test-Kit Anweisungen	
RS-F	5			
RS-F	6	Tropomyosin	1g Probe wurden in 20 mL Extraktionspuffer für 10 min bei 60°C extrahiert	
RS-F	10			
RS-F	12	Crustacea-Protein	Allergen Extraktionspuffer r-biopharm/10 min/60°C	
RS-F	13	spezifisch gegen Crustaceanprotein (Tropomyosin)	Allergenextraktionspuffer 10 Minuten 60°C	
RS-F	13	spezifisch gegen Crustaceanprotein (Tropomyosin)	Allergenextraktionspuffer 10 Minuten 60°C	

**5.1.2 ELISA: Cashew**

Meth. Abk.	Auswertenummer	Datum der Analyse	Ergebnis Probe A		Ergebnis Probe B		Ergebnis Dotierungsprobe		Quantitatives Ergebnis als	Methode
			qualitativ	mg/kg	qualitativ	mg/kg	qualitativ	mg/kg		
AQ	7	22.12.16	negativ		positiv	83,6	positiv	18686	Cashew	Test-Kit + Anbieter AgraQuant ELISA Cashew (COKAL3148), RomerLabs
AQ	8	1.12.	negativ	<2	positiv	90,0	positiv	17000	Cashew	AgraQuant ELISA Cashew (COKAL3148), RomerLabs
BC	3	12.12.16	negativ	<2	positiv	55,4	positiv	16898	Cashew	Biocheck Cashew
ET	1	23.12.16	negativ	<0.9	positiv	27,0	positiv	5500	Cashew-Protein	Elution Technologies Cashew Protein Kit (E-75CSH)
ET	9	06.12.16	negativ	<0.9	positiv	22,6	na	na	Cashew-Protein	Elution Technologies Cashew Protein Kit (E-75CSH)
IL	2	29.12.16	negativ	<0,2	positiv	81,0	positiv	28000	Cashew	Immunolab Cashew ELISA (CAW-E01)
IL	2	29.12.16	negativ	<0,2	positiv	93,0	positiv	19000	Cashew	Immunolab Cashew ELISA (CAW-E01)
IL	11	22.11.16	negativ	< 1	positiv	53,0	positiv	11200	Cashew	Immunolab Cashew ELISA (CAW-E01)
RS-F	13	21.11.16	-	< LOD	-	87,5	-	21107	Cashew	r-Biopharm AG Fast Cashew R6872
RS-F	13	21.11.16	-	< LOD	-	84,6	-	20705	Cashew	r-Biopharm AG Fast Cashew R6872

Meth. Abk.	Auswertenummer	Spezifität	Hinweise zur Methode (Extraktion und Bestimmung)		Sonstige Hinweise
			Antikörper	z.B. Extraktionslösung / Zeit / Temperatur	
AQ	7				
AQ	8	Cashew-Protein	lt. Herstellerangaben		
BC	3	Gemäß der Kit-Anleitung	Unter Berücksichtigung der Test-Kit Anweisungen		Biocheck Cashew
ET	1		Methode wurde unter Berücksichtigung der Test-Kit Anweisungen durchgeführt		
ET	9				
IL	2				
IL	2				
IL	11				
RS-F	13	spezifisch gegen Cashewprotein	Allergenextraktionspuffer 10 Minuten 60°C		
RS-F	13	spezifisch gegen Cashewprotein	Allergenextraktionspuffer 10 Minuten 60°C		

5.1.3 PCR: Crustaceae

Meth. Abk.	Auswertenummer	Datum der Analyse	Ergebnis Probe A		Ergebnis Probe B		Ergebnis Dotierungsprobe		Quantitatives Ergebnis als	Methode
			qualitativ	mg/kg	qualitativ	mg/kg	qualitativ	mg/kg		
SFA-ID	2	29.12.16	negativ	<0,4	positiv	>0,4	positiv	>0,4	Crustaceae-DNA	Sure Food Allergen ID, Congen / r-Biopharm
SFA-ID	2	29.12.16	negativ	<0,4	positiv	>0,4	positiv	>0,4	Crustaceae-DNA	Sure Food Allergen ID, Congen / r-Biopharm
SFA-ID	3	08.12.16	negativ	<10	positiv	51,14	positiv	3863	Crustaceae	Sure Food Allergen ID, Congen / r-Biopharm
SFA-ID	4	23.11.16	negativ		positiv		positiv		Crustaceae-DNA	Sure Food Allergen ID, Congen / r-Biopharm
SFA-ID	4	05.12.17	negativ		positiv		positiv		Crustaceae-DNA	Sure Food Allergen ID, Congen / r-Biopharm
SFA-ID	14	17.11.16	positiv	> 0,4	positiv	> 0,4	positiv	> 0,4	Crustaceae	Sure Food Allergen ID, Congen / r-Biopharm

Meth. Abk.	Auswertenummer	Spezifität	Hinweise zur Methode (Extraktion und Bestimmung)		Sonstige Hinweise
			Target-Sequenz / -DNA	z.B. Extraktion / Enzyme / Clean-Up / Real Time PCR / Gelelektrophorese / Cyclen	
SFA-ID	2				
SFA-ID	2				
SFA-ID	3	Gemäß der Kit-Anleitung	Unter Berücksichtigung der Test-Kit Anweisungen		
SFA-ID	4	unbekannt	NucleoSpin Food (Macherey Nagel)/ Real Time PCR/ 35 Zyklen		
SFA-ID	4	unbekannt	NucleoSpin Food (Macherey Nagel)/ Real Time PCR/ 35 Zyklen		
SFA-ID	14	-	S3112 SureFood® ALLERGEN ID Crustaceans Nachweisgrenze 0,4 mg/kg Extraktion mit S1053 SureFood® PREP Advanced, Protokoll 1		-

**5.1.4 PCR: Cashew**

Meth. Abk.	Auswertenummer	Datum der Analyse	Ergebnis Probe A		Ergebnis Probe B		Ergebnis Dotierungsprobe		Quantitatives Ergebnis als	Methode
			qualitativ	mg/kg	qualitativ	mg/kg	qualitativ	mg/kg		
		Tag/Monat								Test-Kit + Anbieter
SFA-ID	2	29.12.16	negativ	<0,4	positiv	>0,4	positiv	>0,4	Cashew-DNA	Sure Food Allergen ID, Congen / r-Biopharm
SFA-ID	2	29.12.16	negativ	<0,4	positiv	>0,4	positiv	>0,4	Cashew-DNA	Sure Food Allergen ID, Congen / r-Biopharm
SFA-ID	14	17.11.16	negativ	< 0,4	positiv	> 0,4	positiv	> 0,4	Cashew	Sure Food Allergen ID, Congen / r-Biopharm
div.	4	09.12.17	negativ		positiv		positiv		Cashew-DNA	Hausmethode
div.	4	12.12.17	negativ		positiv		positiv		Cashew-DNA	Hausmethode
div.	8	22.11.	negativ		positiv		positiv		Cashew-DNA	Auswahl PCR-Methoden

Meth. Abk.	Auswertenummer	Spezifität	Hinweise zur Methode (Extraktion und Bestimmung)	Sonstige Hinweise
		Target-Sequenz / -DNA	z.B. Extraktion / Enzyme / Clean-Up / Real Time PCR / Gelelektrophorese / Cyclen	
SFA-ID	2			
SFA-ID	2			
SFA-ID	14	-	S3115 SureFood® ALLERGEN ID Cashew Nachweisgrenze 0,4 mg/kg Extraktion mit S1053 SureFood® PREP Advanced, Protokoll 1	-
div.	4	2s albumin	NucleoSpin Food (Macherey Nagel)/Real Time PCR/45 Zyklen	
div.	4	2s albumin	NucleoSpin Food (Macherey Nagel)/Real Time PCR/45 Zyklen	
div.	8		CTAB/Proteinase K/Promega Wizard DNA CleanUp/RealTimePCR/45	

**5.1.5 Andere Methoden: Cashew**

Meth. Abk.	Auswertenummer	Datum der Analyse	Ergebnis Probe A		Ergebnis Probe B		Ergebnis Dotierungsprobe		Quantitatives Ergebnis als	Methode
			qualitativ	mg/kg	qualitativ	mg/kg	qualitativ	mg/kg		
div.	12	23.11.16	negativ		positiv		positiv		Cashew	Lateral Flow Cashew Kern

Meth. Abk.	Auswertenummer	Spezifität	Hinweise zur Methode (Extraktion und Bestimmung)	Sonstige Hinweise
		Antikörper	z.B. Extraktion / Enzyme / Clean-Up / Real Time PCR / Gelelektrophorese / Cyclen	
div.	12	Cashew-Protein	Allergen Extraktionspuffer r-biopharm/10 min/60°C	

## 5.2 Homogenität

### 5.2.1 Mischungshomogenität vor der Abfüllung

#### Microtracer Homogenitätstest

##### DLA 07-2016 Dotierungsmaterialprobe

Gewicht Gesamtprobe	1,01	kg
Microtracer	FSS-rot lake	
Teilchengröße	75 – 300	µm
Gewicht pro Partikel	2,0	µg
Tracerzugabe	13,6	mg/kg

#### Analysenergebnisse:

Probe	Einwaage [g]	Partikel Anzahl	Partikel [mg/kg]
1	5,14	45	17,5
2	5,10	49	19,2
3	5,10	43	16,9
4	5,08	37	14,6
5	5,05	45	17,8
6	5,22	38	14,6
7	5,12	36	14,1
8	5,07	44	17,4

#### Poisson-Verteilung

Probenanzahl	8	
Freiheitsgrad	7	
Mittelwert	42,1	Partikel
Standardabweichung	4,78	Partikel
$\chi^2$ (CHI-Quadrat)	3,79	
<b>Wahrscheinlichkeit</b>	<b>80</b>	%
Wiederfindungsrate	121	%

#### Normalverteilung

Probenanzahl	8	
Mittelwert	16,5	mg/kg
Standardabweichung	1,87	mg/kg
rel. Standardabweichung	11,3	%
Horwitz Standardabweichung	10,5	%
<b>HorRat-Wert</b>	<b>1,1</b>	
Wiederfindungsrate	121	%

#### Microtracer Homogenitätstest

##### DLA 07-2016 Probe B

Gewicht Gesamtprobe	3,17	kg
Microtracer	FSS-rot lake	
Teilchengröße	75 – 300	µm
Gewicht pro Partikel	2,0	µg
Tracerzugabe	11,6	mg/kg

#### Analysenergebnisse:

Probe	Einwaage [g]	Partikel Anzahl	Partikel [mg/kg]
1	5,02	24	9,6
2	5,06	26	10,3
3	5,16	29	11,2
4	5,00	26	10,4
5	5,15	29	11,3
6	5,03	28	11,1
7	5,15	24	9,3
8	5,24	25	9,5

#### Poisson-Verteilung

Probenanzahl	8	
Freiheitsgrad	7	
Mittelwert	26,4	Partikel
Standardabweichung	2,06	Partikel
$\chi^2$ (CHI-Quadrat)	1,13	
<b>Wahrscheinlichkeit</b>	<b>99</b>	%
Wiederfindungsrate	89	%

#### Normalverteilung

Probenanzahl	8	
Mittelwert	10,3	mg/kg
Standardabweichung	0,81	mg/kg
rel. Standardabweichung	7,82	%
Horwitz Standardabweichung	11,3	%
<b>HorRat-Wert</b>	<b>0,69</b>	
Wiederfindungsrate	89	%

## 6. Verzeichnis der Teilnehmer in alphabetischer Reihenfolge

Teilnehmer / Participant	Ort / Town	Land / Country
		SPANIEN
		SPANIEN
		KANADA
		KANADA
		Deutschland
		Deutschland
		ITALIEN
		Deutschland
		Deutschland
		ITALIEN
		GROßBRITANNIEN
		FRANKREICH
		Deutschland
		GROßBRITANNIEN

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

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

## 7. Verzeichnis relevanter Literatur

1. DIN EN ISO/IEC 17025:2005; Allgemeine Anforderungen an die Kompetenz von Prüf- und Kalibrierlaboratorien / General requirements for the competence of testing and calibration laboratories
2. DIN EN ISO/IEC 17043:2010; Konformitätsbewertung - Allgemeine Anforderungen an Eignungsprüfungen / Conformity assessment - General requirements for proficiency testing
3. ISO 13528:2015 & DIN ISO 13528:2009; Statistische Verfahren für Eignungsprüfungen durch Ringversuche / Statistical methods for use in proficiency testing by interlaboratory comparisons
4. ASU §64 LFGB: Planung und statistische Auswertung von Ringversuchen zur Methodvalidierung / DIN ISO 5725 series part 1, 2 and 6 Accuracy (trueness and precision) of measurement methods and results
5. Verordnung / Regulation 882/2004/EU; Verordnung über über amtliche Kontrollen zur Überprüfung der Einhaltung des Lebensmittel- und Futtermittelrechts sowie der Bestimmungen über Tiergesundheit und Tierschutz / Regulation on official controls performed to ensure the verification of compliance with feed and food law, animal health and animal welfare rules
6. Evaluation of analytical methods used for regulation of food and drugs; W. Horwitz; Analytical Chemistry, 54, 67-76 (1982)
7. The International Harmonised Protocol for the Proficiency Testing of Analytical Laboratories ; J.AOAC Int., 76(4), 926 - 940 (1993)
8. A Horwitz-like funktion describes precision in proficiency test; M. Thompson, P.J. Lowthian; Analyst, 120, 271-272 (1995)
9. Protocol for the design, conduct and interpretation of method performance studies; W. Horwitz; Pure & Applied Chemistry, 67, 331-343 (1995)
10. Recent trends in inter-laboratory precision at ppb and sub-ppb concentrations in relation to fitness for purpose criteria in proficiency testing; M. Thompson; Analyst, 125, 385-386 (2000)
11. The International Harmonised Protocol for the Proficiency Testing of Analytical Chemistry Laboratories; Pure Appl Chem, 78, 145 - 196 (2006)
12. AMC Kernel Density - Representing data distributions with kernel density estimates, amc technical brief, Editor M Thompson, Analytical Methods Committee, AMCTB No 4, Revised March 2006 and Excel Add-in Kernel.xla 1.0e by Royal Society of Chemistry
13. EURACHEM/CITAC Leitfaden, Ermittlung der Messunsicherheit bei analytischen Messungen (2003); Quantifying Uncertainty in Analytical Measurement (1999)
14. GMP+ Feed Certification scheme, Module: Feed Safety Assurance, chapter 5.7 Checking procedure for the process accuracy of compound feed with micro tracers in GMP+ BA2 Control of residues, Version: 1st of January 2015 GMP+ International B.V.
15. MTSE SOP No. 010.01 (2014): Quantitative measurement of mixing uniformity and carry-over in powder mixtures with the rotary detector technique, MTSE Micro Tracers Services Europe GmbH
16. Codex Alimentarius Commission (2010) - Guidelines on performance criteria and validation of methods for detection, identification and quantification of specific DNA sequences and specific proteins in foods, CAC/GL 74-2010
17. DIN EN ISO 15633-1:2009; Nachweis von Lebensmittelallergenen mit immunologischen Verfahren - Teil 1: Allgemeine Betrachtungen / Foodstuffs - Detection of food allergens by immunological methods - Part 1: General considerations
18. DIN EN ISO 15634-1:2009; Nachweis von Lebensmittelallergenen mit molekularbiologischen Verfahren - Teil 1: Allgemeine Betrachtungen / Foodstuffs - Detection of food allergens by molecular biological methods - Part 1: General considerations
19. DIN EN ISO 15842:2010 Lebensmittel - Nachweis von Lebensmittelallergenen - Allgemeine Betrachtungen und Validierung von Verfahren / Foodstuffs - Detection of food allergens - General considerations and validation of

- methods
20. Ministry of Health and Welfare, JSM, Japan 2006
  21. Working Group Food Allergens, Abbott et al., Validation Procedures for Quantitative Food Allergen ELISA Methods: Community Guidance and Best Practices JAOAC Int. 93:442-50 (2010)
  22. Working Group on Prolamin Analysis and Toxicity (WGPAT): Méndez et al. Report of a collaborative trial to investigate the performance of the R5 enzyme linked immunoassay to determine gliadin in gluten-free food. Eur J Gastroenterol Hepatol. 17:1053-63 (2005)
  23. DLA Publikation: Performance of ELISA and PCR methods for the determination of allergens in food: an evaluation of six years of proficiency testing for soy (*Glycine max* L.) and wheat gluten (*Triticum aestivum* L.); Scharf et al.; J Agric Food Chem. 61(43):10261-72 (2013)
  24. EFSA (2014) Scientific Opinion on the evaluation of allergenic foods and food ingredients for labelling purposes<sup>1</sup>, EFSA Panel on Dietetic Products, Nutrition and Allergies (NDA), European Food Safety Authority (EFSA), Parma, Italy, EFSA Journal 2014;12(11):3894
  25. IRMM, Poms et al.; Inter-laboratory validation study of five different commercial ELISA test kits for determination of peanut residues in cookie and dark chocolate; European Commission, Joint Research Centre, Belgium; GE/R/FSQ/D08/05/2004
  26. Jayasena et al. (2015) Comparison of six commercial ELISA kits for their specificity and sensitivity in detecting different major peanut allergens. J Agric Food Chem. 2015 Feb 18;63(6):1849-55
  27. ASU §64 LFGB L 06.00-56 Bestimmung von Sojaprotein in Fleisch und Fleischerzeugnissen Enzymimmunologisches Verfahren (2007)
  28. ASU §64 LFGB L 00.00-69 Bestimmung von Erdnuss-Kontaminationen in Lebensmitteln mittels ELISA im Mikrotiterplattensystem (2003)
  29. ASU §64 LFGB L 44.00-7 Bestimmung von Haselnuss-Kontaminationen in Schokolade und Schokoladenwaren mittels ELISA im Mikrotiterplattensystem (2006)
  30. ASU §64 LFGB L 18.00-19 Untersuchung von Lebensmitteln - Nachweis und Bestimmung von Sesam (*Sesamum indicum*) in Reis- und Weizenkeksen sowie in Soßenpulver mittels real-time PCR (2014)
  31. 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)
  32. ASU §64 LFGB L 18.00-22 Untersuchung von Lebensmitteln - Simultaner Nachweis und Bestimmung von Lupine, Mandel, Paranuss und Sesam in Reis- und Weizenkeksen sowie Soßenpulver mittels real-time PCR (2014)

**DLA 07/2016 - Allergene VII**

Alle 14 Teilnehmer haben fristgerecht Ergebnisse eingereicht. Die Auswertung erfolgte hinsichtlich der Parameter Cashew und Crustaceae getrennt nach den Methoden ELISA und PCR. Die ELISA-Ergebnisse wurden für beide Parameter quantitativ ausgewertet. Die PCR-Ergebnisse wurden qualitativ bewertet.

Es lagen 88 und 100% der berücksichtigten Ergebnisse der Teilnehmer im Zielbereich. Details zu den einzelnen Parametern sind dem Auswertebereich zu entnehmen.

7 Teilnehmer hatten ihren Sitz im Europäischen Ausland (Frankreich, Großbritannien, Italien, Spanien) und ein Teilnehmer in Kanada.