

Proficiency Tests

DLA

food
cosmetics
consumer goods
www.dla-lvu.de

Auswertungs-Bericht

Laborvergleichsuntersuchung

DLA 01/2017

Allergene I:

Milch (Casein) und Soja

in Wurstbrät

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 01/2017
<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 (15. Mai 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: 15. Mai 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.
<i>Vertraulichkeit</i> <i>Confidentiality</i>	Die Teilnehmerergebnisse sind im EP-Bericht in anonymisierter Form mit Auswertenummern benannt. Daten einzelner Teilnehmer werden ausschließlich nach vorheriger Zustimmung des Teilnehmers an Dritte weitergegeben. Participant result are named anonymously with evaluation numbers in the PT report. Data of individual participants will be passed on to third parties only with prior consent of the participant.

Inhalt

1. Einleitung.....	4
2. Durchführung.....	4
2.1 Untersuchungsmaterial.....	4
2.1.1 Homogenität.....	6
2.1.2 Stabilität.....	7
2.2 Probenversand und Informationen zur Untersuchung.....	8
2.3 Ergebnisübermittlung.....	8
3. Auswertung.....	9
3.1 Konsenswert der Teilnehmer (zugewiesener Wert).....	9
3.2 Robuste Standardabweichung.....	10
3.3 Ausschluss von Ergebnissen und Ausreißer.....	10
Ausschluss von Ergebnissen	10
3.4 Zielstandardabweichung (für die Eignungsbeurteilung).....	11
3.4.1 Allgemeines Modell nach Horwitz.....	11
3.4.2 Auswertung eines Versuchs zur Präzision	11
3.4.3 Werte aus Erkenntnissen	14
3.5 z-Score.....	15
3.6 z'-Score.....	16
3.7 Quotient S^*/opt	16
3.8 Standardunsicherheit des zugewiesenen Werts.....	16
3.9 Graphische Darstellung der Bezugswerte.....	17
3.10 Wiederfindungsraten: Dotierung.....	17
4. Ergebnisse.....	18
4.1 Vergleichsuntersuchung Milch.....	20
4.1.1 ELISA-Ergebnisse: Milch (als Milchprotein).....	20
4.1.2 ELISA-Ergebnisse: Casein.....	30
4.2 Vergleichsuntersuchung Soja.....	40
4.2.1 ELISA-Ergebnisse: Soja (als Sojaprotein).....	40
4.2.2 PCR-Ergebnisse: Soja (als Sojabohne / Sojamehl).....	50
5. Dokumentation.....	54
5.1 Angaben der Teilnehmer.....	54
5.1.1 ELISA: Milch.....	54
5.1.2 ELISA: Casein.....	55
5.1.3 ELISA: Soja.....	57
5.1.4 PCR: Soja.....	58
5.2 Homogenität.....	59
5.2.1 Mischungshomogenität vor der Abfüllung.....	59
5.3 Informationen zur Eignungsprüfung (EP).....	60
6. Verzeichnis der Teilnehmer in alphabetischer Reihenfolge.....	61
7. Verzeichnis relevanter Literatur.....	62

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 verschiedene LVU-Proben mit gleicher Lebensmittelmatrix für den Nachweis und die quantitative Bestimmung der Allergene im mg/kg-Bereich und eine Dotierungsniveauprobe mit einfacher Matrix zur Verfügung gestellt. Einer der beiden LVU-Proben (dotierte Probe) sowie der Dotierungsniveauprobe wurden die betreffenden allergenen Zutaten in ähnlichem Konzentrationsbereich zugesetzt. Die Untersuchungsergebnisse der Dotierungsniveauprobe 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 der Lebensmittelmatrixproben handelt es sich um Wurstbrät. Die Grundzusammensetzung war für beide Proben A und B gleich (s. Tabelle 1). Die Zutaten wurden in einem 9L-Kutter im Gesamtbrätverfahren hergestellt. Nach Zerkleinern und Homogenisieren der Grundmischung wurde die dotierte Probe B folgendermaßen hergestellt:

Das Dotierungsmaterial, das die allergenen Zutaten Milch und Soja enthält, wurde mit Kartoffelpulver vorgemischt, zu der Grundmatrix gegeben und die Mischung homogenisiert. Vor der Verwendung wurde die Allergenvormischung mittels Zentrifugalmühle (mesh 500 µm) gesiebt.

Die Proben A und B wurden nach dem Homogenisieren zu Portionen von ca. 25 g in Kunststoff-Beutel abgefüllt, vakuumiert und eingeschweißt. Anschließend wurden die Proben für 1 h auf 100°C erhitzt.

Die Dotierungsniveauprobe wurde mit den allergenen Zutaten Milch und Soja unter mehrstufiger Zugabe von Kartoffelpulver und Homogenisierung hergestellt. Anschließend wurde die gesamte Menge mittels Zentrifugalmühle (mesh 500 µm) gesiebt und zu Portionen von ca. 10 g in metallisierte PET-Folienbeutel abgefüllt.

Die Zusammensetzung der LVU-Proben und der Dotierungsniveauprobe ist Tabelle 1 zu entnehmen.

Tabelle 1: Zusammensetzung der DLA-Proben

Zutaten	Probe A	Probe B	Dotierungs- niveauprobe
Wurstbrät Zutaten: Hackfleisch (Rind/Schwein) 75%, Wasser 13% / Eis 12%, Salz 0,34%, Natriumcitrat 0,38%	100 g/100g	96,0 g/100 g	-
Kartoffelpulver Zutaten: Kartoffeln, E471, E304, E223, E100	-	3,96 g/100 g	99,8 g/100 g
Farbstoff E120	-	0,010 g/100 g	-
Milch: - als Magermilchpulver* - davon 37% Gesamtprotein** - davon Casein***	-	113 mg/kg 41,6 mg/kg 33,3 mg/kg	103 mg/kg 37,9 mg/kg 30,3 mg/kg
Soja: - als Sojamehl* - davon 37% Gesamtprotein**	-	226 mg/kg 83,4 mg/kg	101 mg/kg 37,3 mg/kg
weitere Zutaten: Maltodextrin, Natriumsulfat und Siliciumdioxid	-	< 0,4 g/100 g	< 0,2 g/100 g

*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) [32]

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].

Da nur pulverförmige oder flüssige Proben mit der Microtracer-Analyse untersucht werden können, wurde nur die Dotierungsniveauprobe untersucht. Die Microtracer-Analyse hat eine Wahrscheinlichkeit von 20% ergeben. Die Partikel-Ergebnisse wurden zusätzlich in Konzentrationen umgerechnet, statistisch als Normalverteilung ausgewertet und mit der Standardabweichung nach Horwitz verglichen. Es wurde ein HorRat-Wert von 1,3 erhalten. Die Ergebnisse der Microtracer-Analyse sind in der Dokumentation angegeben.

Homogenität der abgefüllten dotierte Probe B

Durchführung der Homogenitätstests

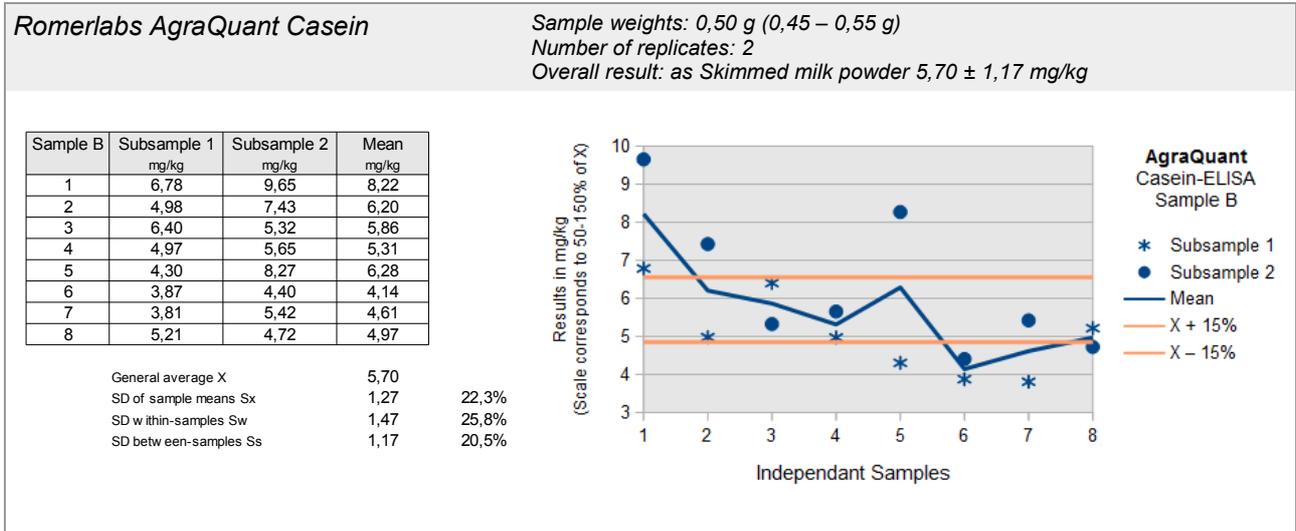
Die Homogenitätstests wurden in Kooperation mit den Labors der angegebenen Testkit-Anbieter durchgeführt. Von DLA wurden zufällig 10 Muster der abgefüllten dotierten Probe ausgewählt und davon jeweils 2 Teilproben in zuvor zufällig-coodierte Extraktionsbehälter eingewogen und anschließend den Labors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

Bewertung der Homogenität

Die Homogenität wird mit einer Standardabweichung zwischen den Proben von $S_s \leq 15\%$ („Heterogenitätsstandardabweichung“) normalerweise von DLA als hinreichend gesichert angesehen. Die Anforderung an Wiederholstandardabweichungen von ELISA- und PCR-Verfahren ist üblicherweise $\leq 25\%$ [16, 17, 20, 21]. Dieses Kriterium wird für die untersuchte Probe B mit einer S_s von 20,5% mit dem ELISA-Test für Casein/Milchprotein erfüllt (AgraQuant) (s. Seite 7). Bei der Einschätzung der Homogenität ist zu beachten, dass die Analytik aufgrund der Prozessierung der Proben stark erschwert ist (vgl. Wiederfindungsraten). Aus diesem Grund standen uns im Rahmen der Homogenitätsprüfungen auch nur die o.g. ELISA-Ergebnisse zur Verfügung.

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 Milch / Homogeneity Milk



2.1.2 Stabilität

Bei dem Lebensmittelmatrix-Probenmaterial handelt es sich um Wurstbrät, das nach der Herstellung und Vakkumabfüllung für 1 h auf 100°C erhitzt wurde. Die Lagerstabilität bzw. Haltbarkeit der Proben (mikrobieller Verderb) ist somit erfahrungsgemäß während des Untersuchungszeitraums unter den angegebenen Lagerbedingungen gewährleistet.

2.2 Probenversand und Informationen zur Untersuchung

An jeden Teilnehmer wurden in der 2. Kalenderwoche 2017 je eine Portion der Untersuchungsmaterialien A und B sowie eine Dotierungsniveauprobe verschickt. Die Untersuchungsverfahren wurden freigestellt. Die Untersuchungen waren durchzuführen bis spätestens 3. März 2017.

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

Es handelt sich um zwei unterschiedliche Proben A und B mit möglichen Gehalten an den allergenen Parametern Milch (Casein) und/oder Soja im mg/kg Bereich in der Matrix Würstbrät. Eine der beiden Proben sowie die "Dotierungsniveauprobe" wurden mit den allergenen Zutaten hergestellt. Die "Dotierungsniveauprobe" enthält die Allergene in einfacher Matrix mit ähnlichen Gehalten ohne weitere Prozessierung. Die Dotierungsniveauprobe soll wie eine normale Probe untersucht werden.

Bitte beachten Sie die beiliegenden Informationen zur Eignungsprüfung.

(siehe Dokumentation unter Punkt 5.4 EP-Informationen)

2.3 Ergebnisübermittlung

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

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

Im Zuge der Auswertung wird ggf. bei einigen Teilnehmern die Art der Angabe der quantitativen Ergebnisse von DLA durch Nachfragen per eMail abgesichert.

Abgefragt und dokumentiert wurden die o.g. Ergebnisse sowie Angaben zu den Testmethoden wie Spezifitäten, Bestimmungsgrenzen, Testkit-Hersteller und Stichpunkte zur Durchführung der Methoden.

Falls Teilnehmer mehrere Ergebnisse für denselben Parameter abgegeben haben, die mit unterschiedlichen Methoden erhalten wurden, wurden diese Ergebnisse mit derselben Auswertenummer mit einem Buchstaben als Suffix unter Angabe der jeweiligen Methode ausgewertet.

Von 14 angemeldeten Teilnehmern haben 13 Teilnehmer mindestens ein Ergebnis eingereicht.

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

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

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

3.4.2 Auswertung eines Versuchs zur Präzision

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

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

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

Tabelle 2a: 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. 2a und 2b).

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 2b: 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 - 31]

Parameter	Matrix	Mittelwerte [mg/kg]	Wiederfindung	rob RSD_r	RSD_r	RSD_R	σ_{pt}	Methode / Literatur
Soja	Weizenmehl	107	107 %	63 %	-	31 %	-	rt-PCR ASU 16.01-9
	Maismehl	145	145 %	34 %	-	24 %	-	
Sojamehl	Brühwurst (100°C, 60 min)	114,1 64,4	114 % 161 %	-	14,7% 27,7%	22,2% 41,4%	19,6% 36,5%	rt-PCR ASU 08.00-65
Sojamehl	Wurst, autoklaviert	33,1	33,1 %	-	21,5%	30,8	26,8%	rt-PCR ASU 08.00-65
Sojamehl	Brühwurst (100°C, 60 min)	82,0	82 %	-	17,3%	24,1%	20,8%	rt-PCR ASU 08.00-59
		39,6	99 %		22,9%	31,8%	27,4%	
		19,6	98 %		22,9%	24,0%	17,7%	
		9,3	93 %		31,1%	30,2%	-	

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 Dotierungsniveauprobe 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 Proben A und B (qualitativ und ggf. quantitativ) und danach für die Dotierungsniveauprobe (nur quantitativ) angegeben. Die Wiederfindungsraten der Ergebnisse für die Dotierungsniveauprobe und die dotierte Probe A oder B werden anschließend 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 Auswertung der ELISA-Ergebnisse für Milch wurde als Milchprotein vorgenommen. Dafür wurden Ergebnisse, die als Vollmilch- bzw. Magermilchpulver angegeben wurden, unter Berücksichtigung von Literatur- bzw. Testkit-Angaben mit einem Proteingehalt von 27,0% (Vollmilchpulver) bzw. 35,1% (Magermilchpulver) umgerechnet (AgraQuant, Veratox).

Für Casein wurden in der vorliegenden LVU alle ELISA-Ergebnisse einheitlich als Casein(e) angegeben, sodass keine Umrechnungen vorgenommen wurden.

Die Auswertung der ELISA-Ergebnisse für Soja wurde als Sojaprotein vorgenommen. Dafür wurden Ergebnisse, die als Sojamehl angegeben wurden, unter Berücksichtigung von Literatur- bzw. Testkit-Angaben mit einem Proteingehalt von 47,0% umgerechnet (Veratox).

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_{ptALL}	z-Score X_{ptMi}	Methode	Hinweis
	pos/neg	[mg/kg]				

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

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

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

4.1 Vergleichsuntersuchung Milch

4.1.1 ELISA-Ergebnisse: Milch (als Milchprotein)

Qualitative Auswertung der Ergebnisse: Proben A und B

Auswertenummer	Probe A	Probe A	Probe B	Probe B	Qualitative Bewertung	Methode	Hinweis
	pos/neg	[mg/kg]	pos/neg	[mg/kg]	Übereinstimmungen mit Konsenswerten		
1	positiv	0,13	positiv	1,79	1/2 (50%)	AQ	Ergebnis umgerechnet °
6	negativ	<2,5	positiv	14,9	2/2 (100%)	RS-F	
8	negativ	<2,5	positiv	6,99	2/2 (100%)	RS-F	
10	negativ	<2,5	positiv	7,20	2/2 (100%)	RS-F	
11	negativ	<2,5	positiv	18,8	2/2 (100%)	RS-F	
12	negativ	< LOD	positiv	10,3	2/2 (100%)	RS-F	
13	negativ	<2,5	positiv	7,33	2/2 (100%)	RS-F	
9	negativ		positiv	2,56	2/2 (100%)	VT	Ergebnis umgerechnet °

° Umrechnung S. 18

	Probe A	Probe B
Anzahl positiv	1	8
Anzahl negativ	7	0
Prozent positiv	13	100
Prozent negativ	88	0
Konsenswert	negativ	positiv

Methoden:

AQ = AgraQuant, RomerLabs

RS-F= Ridascreen® Fast, R-Biopharm

VT = Veratox, Neogen

Anmerkung:

Die Konsenswerte stehen in qualitativer Übereinstimmung mit der Dotierung von Probe B. Ein positives Ergebnis nahe der Bestimmungsgrenze wurde für Probe A erhalten.

Quantitative Auswertung der Ergebnisse: Probe B

Auswertenummer	Milchprotein [mg/kg]	z'-Score X _{pt} ^{ALL}	z-Score X _{pt} ^{RS-F}	Methode	Hinweis
1	1,79	-1,9		AQ	Ergebnis umgerechnet °
6	14,9	1,7	1,5	RS-F	
8	6,99	-0,5	-1,4	RS-F	
10	7,20	-0,4	-1,4	RS-F	
11	18,8	2,8	2,9	RS-F	
12	10,3	0,5	-0,2	RS-F	
13	7,33	-0,4	-1,3	RS-F	
9	2,56	-1,7		VT	Ergebnis umgerechnet °

° Umrechnung S. 18

Methoden:

AQ = AgraQuant, RomerLabs

RS-F= Ridascreen® Fast, R-Biopharm

VT = Veratox, Neogen

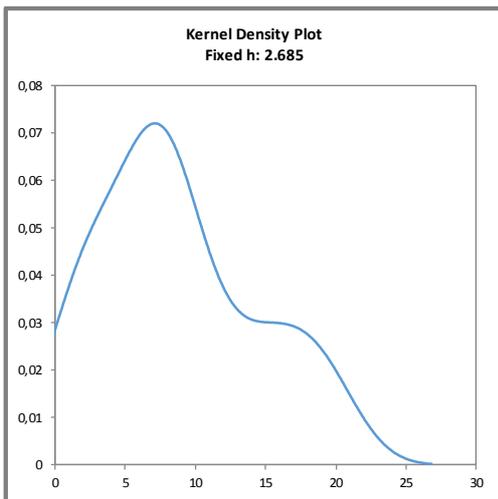


Abb. / Fig. 1:

Kerndichte-Schätzung aller ELISA-Ergebnisse (mit $h = 0,75 \times \sigma_{pt}$ von X_{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 annähernd eine Normalverteilung mit einer Schulter bei > 12 mg/kg, die auf zwei hohe Werte (Methode RS-F) zurückzuführen sind.

Kenndaten: Quantitative Auswertung Milch (als Milchprotein)

Probe B

Kenndaten	Alle Ergebnisse [mg/kg]	Methode RS-F [mg/kg]
Zugewiesener Wert (X_{pt})	X_{pt}_{ALL}	$X_{pt}_{METHOD\ RS-F}$
Anzahl der Messergebnisse	8	6
Anzahl der Ausreißer	0	0
Mittelwert	8,74	10,9
Median	7,27	8,83
Robuster Mittelwert (X_{pt})	8,68	10,9
Robuste Standardabweichung (S^*)	6,45	5,58
<i>Zielkenndaten:</i>		
Zielstandardabweichung σ_{pt}' bzw. σ_{pt}	3,58	2,73
Untere Grenze des Zielbereichs	1,51	5,47
Obere Grenze des Zielbereichs	15,8	16,4
Quotient S^*/σ_{pt}' bzw. σ_{pt}	1,8	2,0
Standardunsicherheit $U(X_{pt})$	2,85	2,85
Quotient $U(X_{pt})/\sigma_{pt}'$ bzw. σ_{pt}	0,80	1,0
Ergebnisse im Zielbereich	7	5
Prozent im Zielbereich	88	83

Methoden:

RS-F = R-Biopharm, Ridascreen® Fast

Anmerkungen zu den Kenndaten und Vergleich der Bezugswerte:

Die Kerndichte-Schätzung zeigte keine eindeutigen methodenabhängigen Unterschiede.

Die Verteilung der Ergebnisse aller Methoden wies eine erhöhte Variabilität mit einem Quotienten S^*/σ_{pt} von 3,0 auf. Daher wurde unter Berücksichtigung der Standardunsicherheit mittels z'-Score ausgewertet. Der Quotient S^*/σ_{pt}' lag dann unter 2,0. Die Auswertung der Ergebnisse der Methode RS-F zeigte eine normale Variabilität. Der Quotient S^*/σ_{pt} lag bei 2,0.

Die robusten Standardabweichungen liegen im Bereich von etablierten Werten für die Wiederhol- und 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 21% bzw. 26% vom Zusatzniveau von Milch zu Probe B unterhalb der relevanten Anforderungen für die eingesetzten Methoden (s. 3.4.3 und "Wiederfindungsraten für Milchprotein", s. S.29).

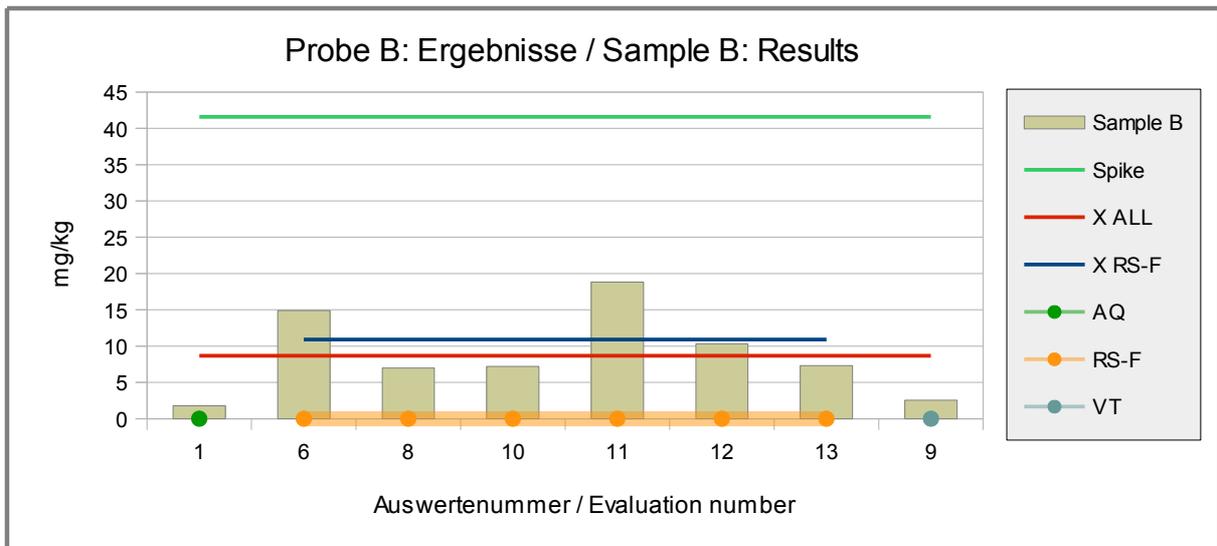


Abb./Fig. 2: ELISA-Ergebnisse Milch (als Milchprotein)
 grüne Linie = Zusatzniveau (Spike)
 rote Linie = robuster Mittelwert aller Ergebnisse
 blaue Linie = robuster Mittelwert Ergebnisse Methode RS-F
 runde Symbole = Zuordnung der Methoden (s. Legende)

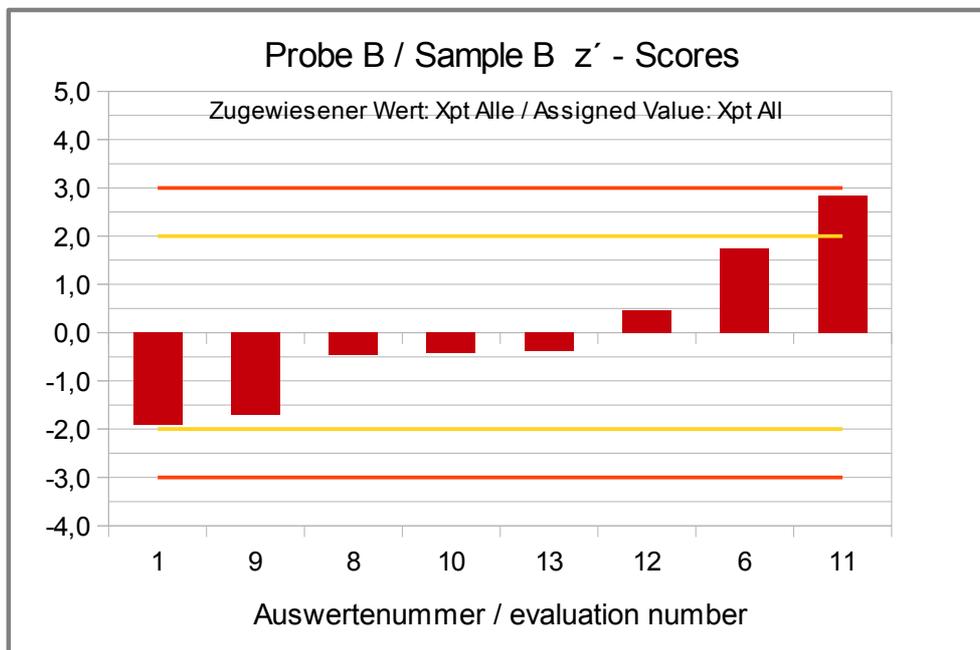


Abb./Fig. 3: z'-Scores (ELISA-Ergebnisse als Milchprotein) Zugewiesener Wert: robuster Mittelwert aller Ergebnisse

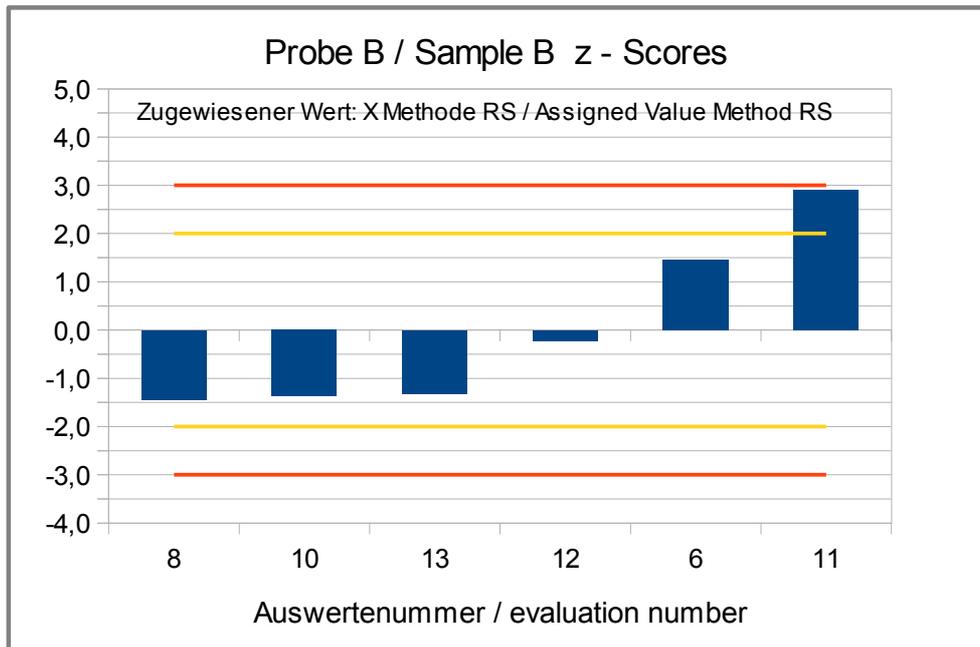


Abb./Fig. 4:

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

Quantitative Auswertung der Ergebnisse: Dotierungsniveauprobe

Auswertenummer	Milchprotein [mg/kg]	z-Score Xpt _{ALL}	z-Score Xpt _{RS-F}	Methode	Hinweis
1	52,4	3,4		AQ	Ergebnis umgerechnet °
6	25,0	-0,5	-0,1	RS-F	
8	27,8	-0,1	0,4	RS-F	
10	28,6	0,1	0,5	RS-F	
11	15,7	-1,8	-1,5	RS-F	
12	18,4	-1,4	-1,1	RS-F	
13	37,0	1,2	1,8	RS-F	
9	29,3	0,2		VT	Ergebnis umgerechnet °

° Umrechnung S. 18

Methoden:

AQ = AgraQuant, RomerLabs

RS-F= Ridascreen® Fast, R-Biopharm

VT = Veratox, Neogen

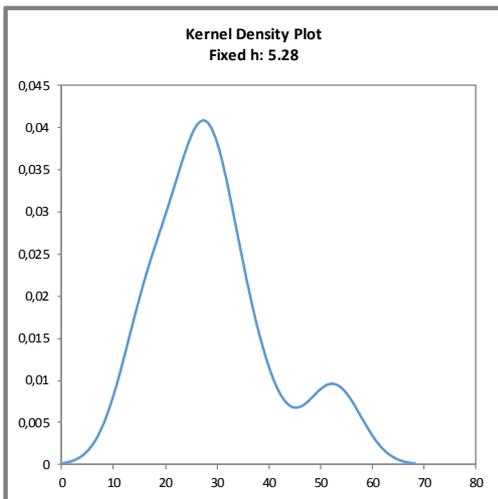


Abb. / Fig. 5:

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 mit einem Nebenpeak bei ca. 50 mg/kg, der auf einen Einzelwert zurückgeht (Methode AQ).

Kenndaten: Quantitative Auswertung Milch (als Milchprotein)

Dotierungsniveauprobe

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	8	6
Anzahl der Ausreißer	0	0
Mittelwert	29,3	25,4
Median	28,2	26,4
Robuster Mittelwert (X_{pt})	28,2	25,4
Robuste Standardabweichung (S^*)	10,3	8,67
<i>Zielkenndaten:</i>		
Zielstandardabweichung σ_{pt}	7,04	6,35
Untere Grenze des Zielbereichs	14,1	12,7
Obere Grenze des Zielbereichs	42,3	38,1
Quotient S^*/σ_{pt}	1,5	1,4
Standardunsicherheit $U(X_{pt})$	4,56	4,43
Quotient $U(X_{pt})/\sigma_{pt}$	0,65	0,70
Ergebnisse im Zielbereich	7	6
Prozent im Zielbereich	88	100

Methoden:

RS-F = R-Biopharm, Ridascreen® Fast

Anmerkungen zu den Kenndaten und Vergleich der Bezugswerte:

Die Kerndichte-Schätzung zeigte keine eindeutigen methodenabhängigen Unterschiede (ein hoher Einzelwert).

Die Verteilung der Ergebnisse aller Methoden sowie für Methode RS-F zeigte jeweils eine normale Variabilität. Die Quotienten S^*/σ_{pt} lagen unter 2,0. Die robusten Standardabweichungen liegen im Bereich von etablierten Werten für die Wiederhol- und 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 74% bzw. 67% vom Zusatzniveau von Milchprotein zur Dotierungsniveauprobe innerhalb der relevanten Anforderungen für die eingesetzten Methoden (s. 3.4.3 und "Wiederfindungsraten für Milchprotein", s. S.29).

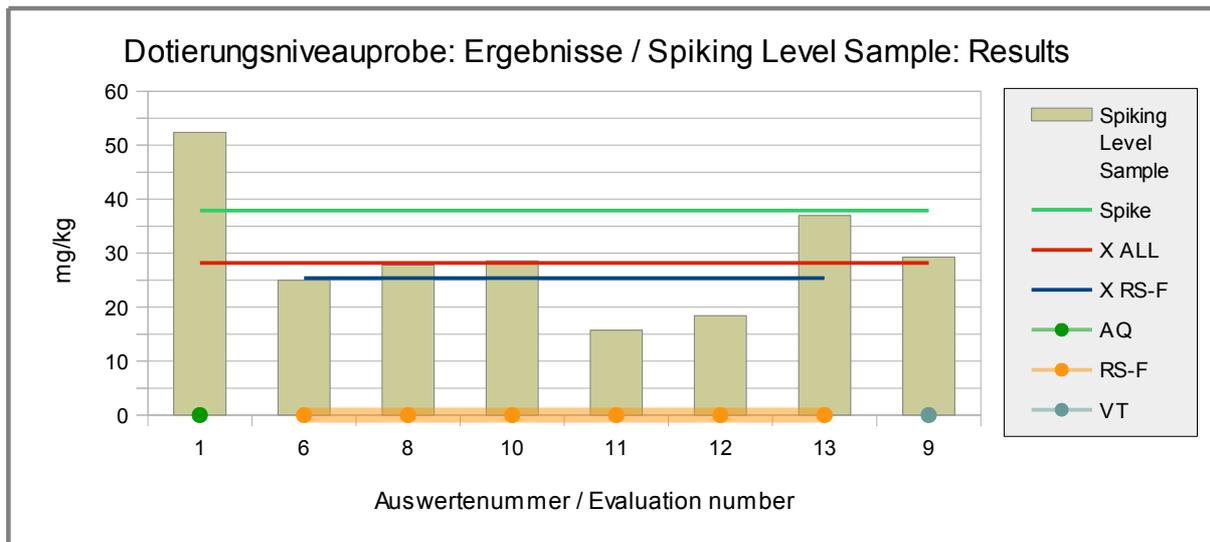


Abb./Fig. 6: ELISA-Ergebnisse Milch (als Milchprotein)
 grüne Linie = Zusatzniveau (Spike)
 rote Linie = robuster Mittelwert aller Ergebnisse
 blaue Linie = robuster Mittelwert Ergebnisse Methode RS-F
 runde Symbole = Zuordnung der Methoden (s. Legende)

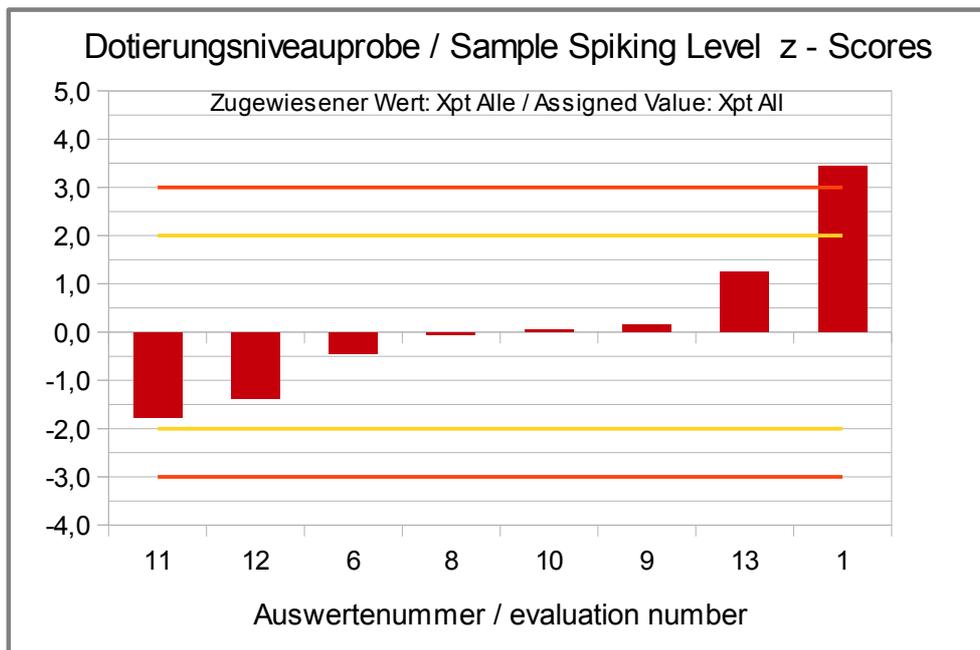


Abb./Fig. 7: z-Scores (ELISA-Ergebnisse als Milchprotein) Zugewiesener Wert: robuster Mittelwert aller Ergebnisse

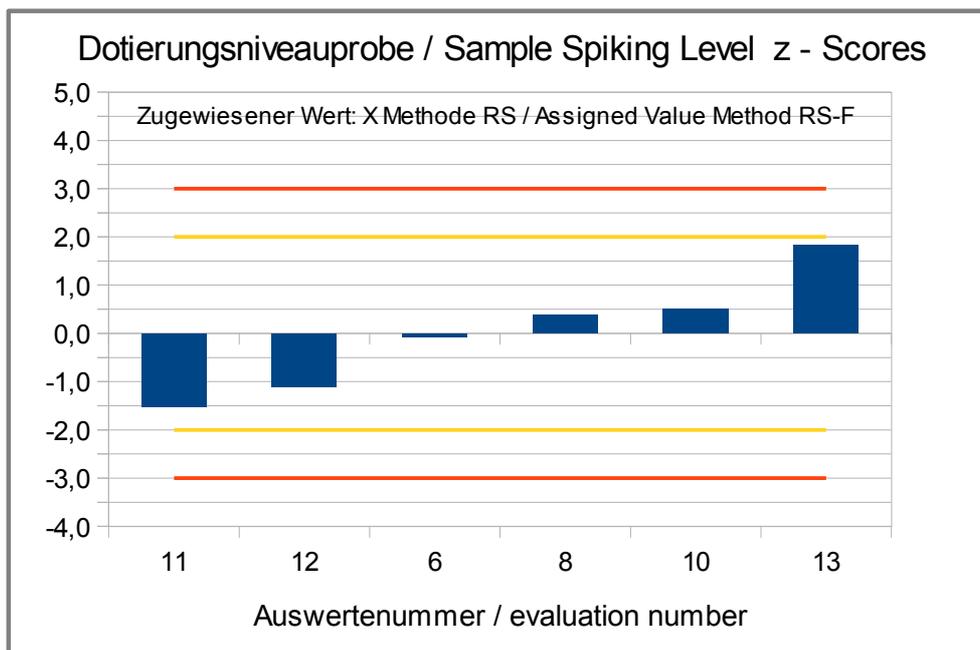


Abb./Fig. 8:

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

**Wiederfindungsraten für Milch (als Milchprotein):
Dotierungsniveauprobe und Probe B**

Auswertenummer	Dotierungsniveauprobe	Wiederfindungsrate*	Probe B	Wiederfindungsrate*	Methode	Hinweis
	[mg/kg]	[%]	[mg/kg]	[%]		
1	52,4	138	1,79	4	AQ	Ergebnis umgerechnet °
6	25,0	66	14,9	36	RS-F	
8	27,8	73	6,99	17	RS-F	
10	28,6	75	7,20	17	RS-F	
11	15,7	41	18,8	45	RS-F	
12	18,4	49	10,3	25	RS-F	
13	37,0	98	7,33	18	RS-F	
9	29,3	77	2,56	6	VT	Ergebnis umgerechnet °

° Umrechnung S. 18

AB**	50-150 %	AB**	50-150 %
Anzahl im AB	6	Anzahl im AB	0
Prozent im AB	75	Prozent im AB	0

Methoden:

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

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

** Akzeptanzbereich der AOAC für Allergen-ELISAs

Anmerkung:

75% (6) der Teilnehmer haben mit der Dotierungsniveauprobe mittels ELISA eine Wiederfindungsrate im Bereich der AOAC-Anforderung von 50-150% erhalten. Für die prozessierte dotierte Lebensmittelmatrix-Probe B lag keine der Wiederfindungsraten in diesem Akzeptanzbereich.

4.1.2 ELISA-Ergebnisse: Casein

Qualitative Auswertung der Ergebnisse: Proben A und B

Auswertenummer	Probe A pos/neg	Probe A [mg/kg]	Probe B pos/neg	Probe B [mg/kg]	Qualitative Bewertung Übereinstimmungen mit Konsenswerten	Methode	Hinweis
2	negativ	<1	positiv	1,60	2/2 (100%)	AQ	
3	negativ		positiv	1,37	2/2 (100%)	AQ	
7a	negativ	<1	positiv	1,70	2/2 (100%)	AQ	
8a	negativ	< 0,2	positiv	2,34	2/2 (100%)	IL	
7b	negativ	<1	positiv	11,0	2/2 (100%)	MI	
4	negativ	<1,36	positiv	3,90	2/2 (100%)	RS-F	
6	negativ	<2,5	positiv	9,07	2/2 (100%)	RS-F	
8b	negativ	<2,5	positiv	5,50	2/2 (100%)	RS-F	8b und 8c: unterschiedliche Extraktion
8c	negativ	< 0,5	positiv	1,48	2/2 (100%)	RS-F	8b und 8c: unterschiedliche Extraktion
9	negativ		positiv	7,91	2/2 (100%)	RS-F	
10	negativ	<2,5	positiv	7,20	2/2 (100%)	RS-F	
12	negativ	< LOD	positiv	4,74	2/2 (100%)	RS-F	
13	negativ	<2.5	positiv	5,66	2/2 (100%)	RS-F	

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

Methoden:

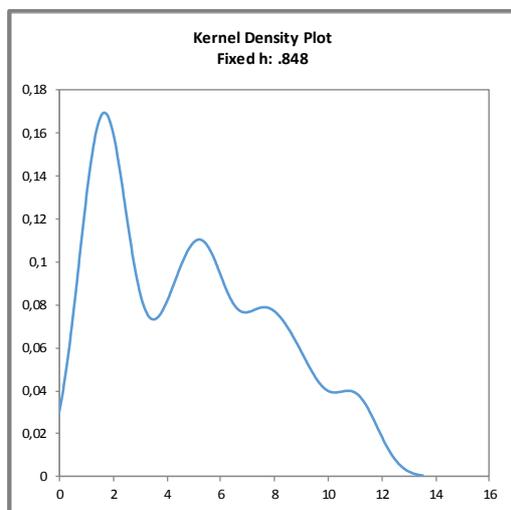
AQ = AgraQuant, RomerLabs
 IL = Immunolab
 MI = Morinaga Institute ELISA
 RS-F= Ridascreen® Fast, R-Biopharm

Anmerkung:

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

Quantitative Auswertung der Ergebnisse: Probe B

Auswertenummer	Casein [mg/kg]	z'-Score X _{pt} ^{ALL}	z-Score X _{pt} ^{RS-F}	Methode	Hinweis
2	1,60	-1,9		AQ	
3	1,37	-2,0		AQ	
7a	1,70	-1,8		AQ	
8a	2,34	-1,5		IL	
7b	11,0	3,7		MI	
4	3,90	-0,5	-1,3	RS-F	
6	9,07	2,5	2,4	RS-F	
8b	5,50	0,4	-0,1	RS-F	8b und 8c: unterschiedliche Extraktion
8c	1,48	-2,0	-3,0	RS-F	8b und 8c: unterschiedliche Extraktion
9	7,91	1,8	1,5	RS-F	
10	7,20	1,4	1,0	RS-F	
12	4,74	0,0	-0,7	RS-F	
13	5,66	0,5	0,0	RS-F	



Methoden:

- AQ = AgraQuant, RomerLabs
- IL = Immunolab
- MI = Morinaga Institute ELISA
- RS-F= Ridascreen® Fast, R-Biopharm

Abb. / Fig. 9:

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 ein Hauptmaximum bei < 2,5 mg/kg, das auf Ergebnisse von 3 Methoden zurückgeht (AQ, IL, RS-F), sowie mehrere Nebenpeaks in absteigender Intensität bei > 4 mg/kg, die auf Ergebnisse der Methode RS-F und einen Einzelwert der Methode MI zurückgehen.

Kenndaten: Quantitative Auswertung Casein

Probe B

Kenndaten	Alle Ergebnisse [mg/kg]	Methode RS-F [mg/kg]
Zugewiesener Wert (X_{pt})	X_{pt}_{ALL}	$X_{pt}_{METHOD\ RS-F}$
Anzahl der Messergebnisse	13	8
Anzahl der Ausreißer	0	0
Mittelwert	4,88	5,68
Median	4,74	5,58
Robuster Mittelwert (X_{pt})	4,80	5,71
Robuste Standardabweichung (S^*)	3,45	2,66
<i>Zielkenndaten:</i>		
Zielstandardabweichung σ_{pt}' bzw. σ_{pt}	1,70	1,43
Untere Grenze des Zielbereichs	1,41	2,86
Obere Grenze des Zielbereichs	8,20	8,57
<i>Quotient S^*/σ_{pt}' bzw. σ_{pt}</i>	<i>2,0</i>	<i>1,9</i>
<i>Standardunsicherheit $U(X_{pt})$</i>	<i>1,20</i>	<i>1,18</i>
<i>Quotient $U(X_{pt})/\sigma_{pt}'$ bzw. σ_{pt}</i>	<i>0,7</i>	<i>0,8</i>
<i>Ergebnisse im Zielbereich</i>	<i>10</i>	<i>6</i>
<i>Prozent im Zielbereich</i>	<i>77</i>	<i>75</i>

Methoden:

RS-F = R-Biopharm, Ridascreen® Fast

Anmerkungen zu den Kenndaten und Vergleich der Bezugswerte:

Die Kerndichte-Schätzung zeigte keine eindeutigen methodenabhängigen Unterschiede. Es lagen relativ niedrigen Messergebnisse bei guter Übereinstimmung von Median, arithmetischem und robustem Mittelwert vor.

Die Verteilung der Ergebnisse aller Methoden wies eine erhöhte Variabilität mit einem Quotienten S^*/σ_{pt}' von 2,9 auf. Daher wurde unter Berücksichtigung der Standardunsicherheit mittels z'-Score ausgewertet. Der Quotient S^*/σ_{pt}' lag dann unter 2,0.

Die Auswertung der Ergebnisse der Methode RS-F zeigte eine normale Variabilität. Der Quotient S^*/σ_{pt}' lag unter 2,0.

Die robusten Standardabweichungen liegen im Bereich von etablierten Werten für die Wiederhol- und 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 14% bzw. 17% vom Zusatzniveau von Casein zu Probe B, deutlich unterhalb der relevanten Anforderungen für die eingesetzten Methoden (s. 3.4.3 und "Wiederfindungsraten für Casein", s. S.39).

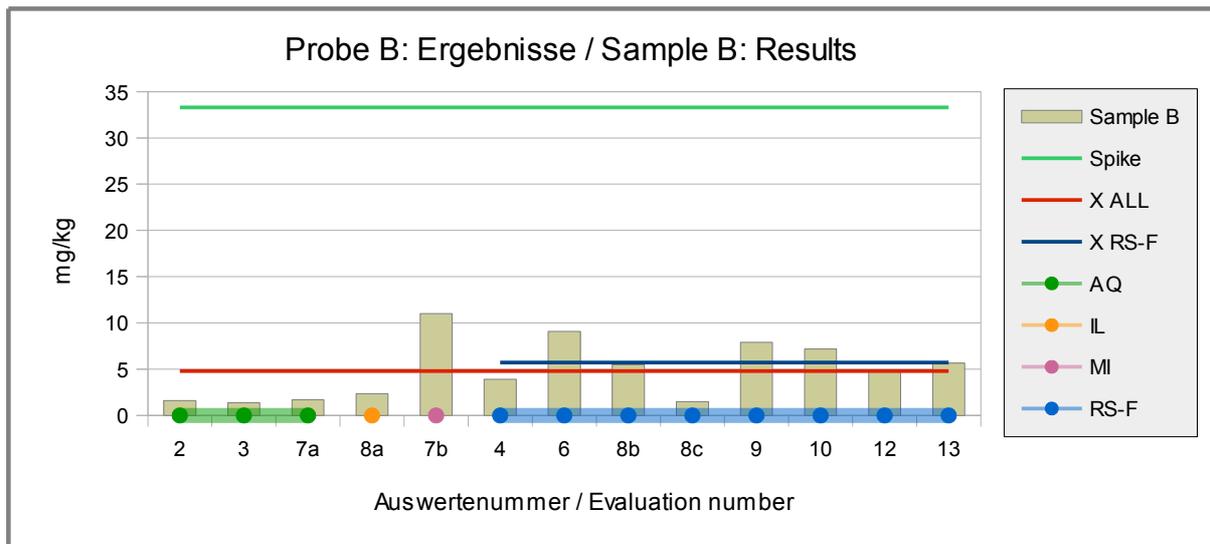


Abb./Fig. 10: ELISA-Ergebnisse Casein
 grüne Linie = Zusatzniveau (Spike)
 rote Linie = robuster Mittelwert aller Ergebnisse
 blaue Linie = robuster Mittelwert Ergebnisse Methode RS-F
 runde Symbole = Zuordnung der Methoden (s. Legende)

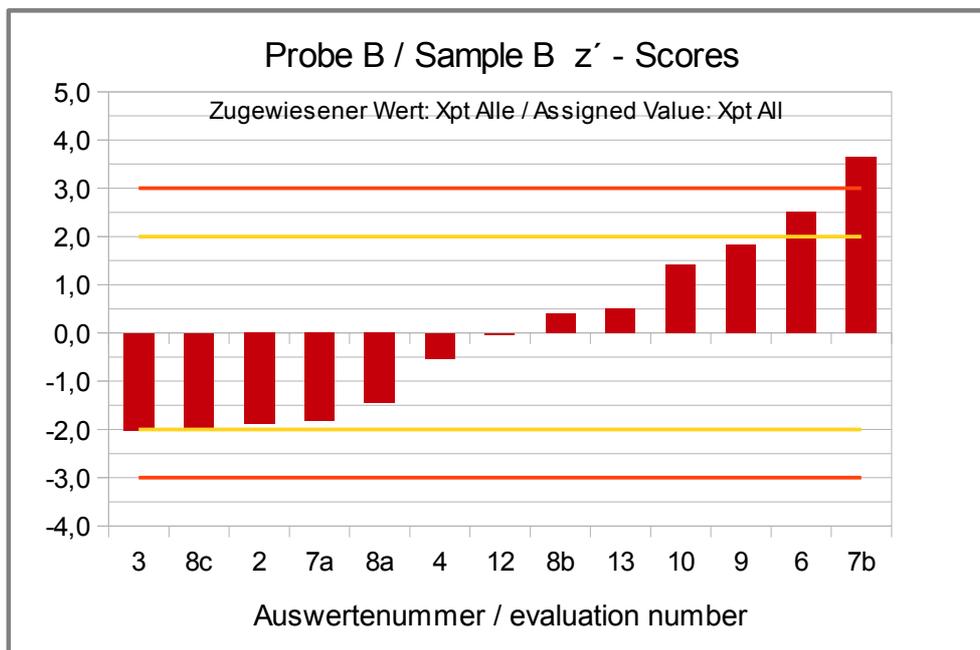


Abb./Fig. 11: z'-Scores (ELISA-Ergebnisse Casein) Zugewiesener Wert: robuster Mittelwert aller Ergebnisse

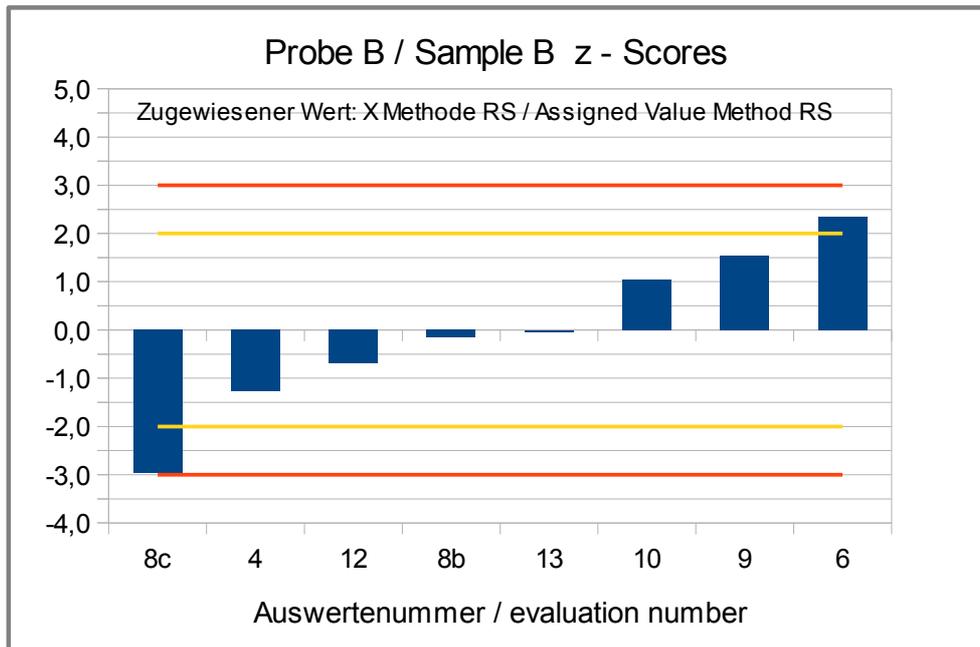


Abb./Fig. 12:

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

Quantitative Auswertung der Ergebnisse: Dotierungsniveauprobe

Auswertenummer	Casein	z-Score Xpt _{ALL}	z-Score Xpt _{RS-F}	Methode	Hinweis
	[mg/kg]				
2	32,8	0,5		AQ	
3	27,2	-0,3		AQ	
7	40,0	1,5		AQ	
8a	33,6	0,6		IL	
7	52,0	3,1		MI	
4	18,0	-1,5	-0,9	RS-F	
6	16,3	-1,8	-1,2	RS-F	
8b	29,4	0,0	1,0	RS-F	8b und 8c: unterschiedliche Extraktion
8c	17,4	-1,6	-1,0	RS-F	8b und 8c: unterschiedliche Extraktion
9	19,5	-1,3	-0,7	RS-F	
10	48,4	2,6	4,3	RS-F	
12	17,5	-1,6	-1,0	RS-F	
13	32,4	0,4	1,5	RS-F	

Methoden:

AQ = AgraQuant, RomerLabs

IL = Immunolab

MI = Morinaga Institute ELISA

RS-F= Ridascreen® Fast, R-Biopharm

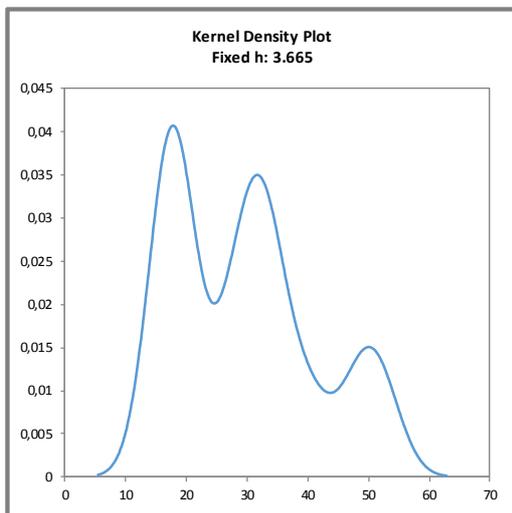


Abb. / Fig. 13:

Kerndichte-Schätzung aller ELISA-Ergebnisse (mit $h = 0,5 \times \sigma_{pt}$ von X_{ptALL})

Kernel density plot of all ELISA results (with $h = 0,5 \times \sigma_{pt}$ of X_{ptALL})

Anmerkung:

Die Kerndichte-Schätzung zeigt zwei größere Maxima bei 15-20 mg/kg und 25-35 mg/kg sowie einen kleineren Nebenpeak bei > 30 mg/kg, die keine eindeutigen methodenabhängigen Zusammenhänge aufzeigen.

Kenndaten: Quantitative Auswertung Casein

Dotierungsniveauprobe

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	13	8
Anzahl der Ausreißer	0	0
Mittelwert	29,6	24,9
Median	29,4	18,7
Robuster Mittelwert (X_{pt})	29,3	23,5
Robuste Standardabweichung (S^*)	13,0	9,33
<i>Zielkenndaten:</i>		
Zielstandardabweichung σ_{pt}	7,33	5,86
Untere Grenze des Zielbereichs	14,7	11,7
Obere Grenze des Zielbereichs	44,0	35,2
Quotient S^*/σ_{pt}	1,8	1,6
Standardunsicherheit $U(X_{pt})$	4,51	4,12
Quotient $U(X_{pt})/\sigma_{pt}$	0,6	0,7
Ergebnisse im Zielbereich	11	7
Prozent im Zielbereich	85	88

Methoden:

RS-F = R-Biopharm, Ridascreen® Fast

Anmerkungen zu den Kenndaten und Vergleich der Bezugswerte:

Die Kerndichte-Schätzung zeigte keine eindeutigen methodenabhängigen Unterschiede.

Die Verteilung der Ergebnisse aller Methoden sowie für Methode RS-F zeigte jeweils eine normale Variabilität. Die Quotienten S^*/σ_{pt} lagen unter 2,0. Die robusten Standardabweichungen liegen im Bereich von etablierten Werten für die Wiederhol- und 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 97% bzw. 78% vom Zusatzniveau von Casein zur Dotierungsniveauprobe innerhalb der relevanten Anforderungen für die eingesetzten Methoden (s. 3.4.3 und "Wiederfindungsraten für Casein", s. S,39).

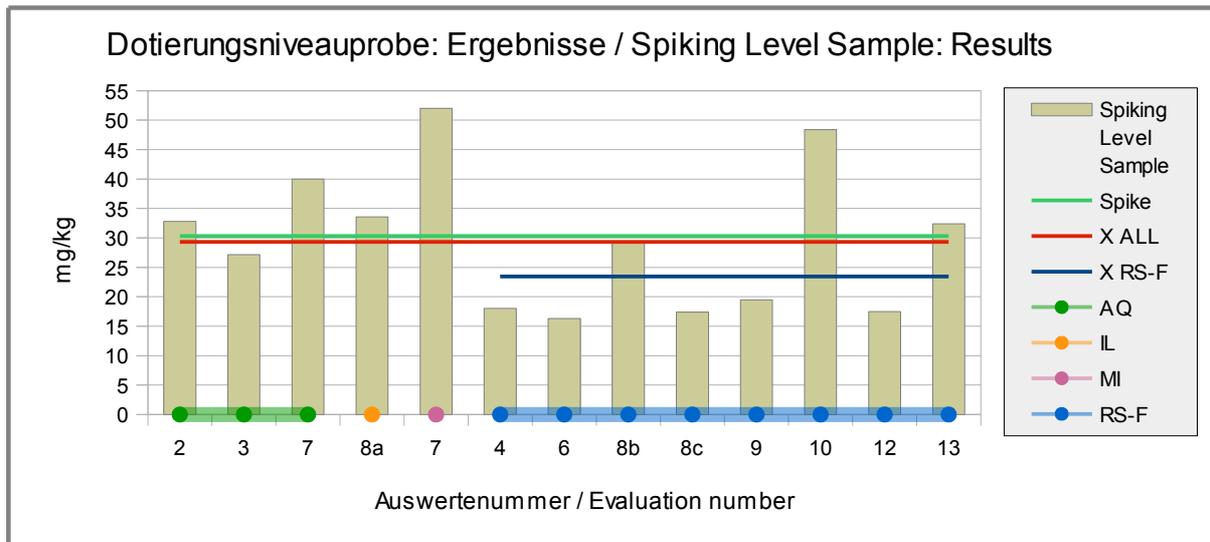


Abb./Fig. 14: ELISA-Ergebnisse Casein
 grüne Linie = Zusatzniveau (Spike)
 rote Linie = robuster Mittelwert aller Ergebnisse
 blaue Linie = robuster Mittelwert Ergebnisse Methode RS-F
 runde Symbole = Zuordnung der Methoden (s. Legende)

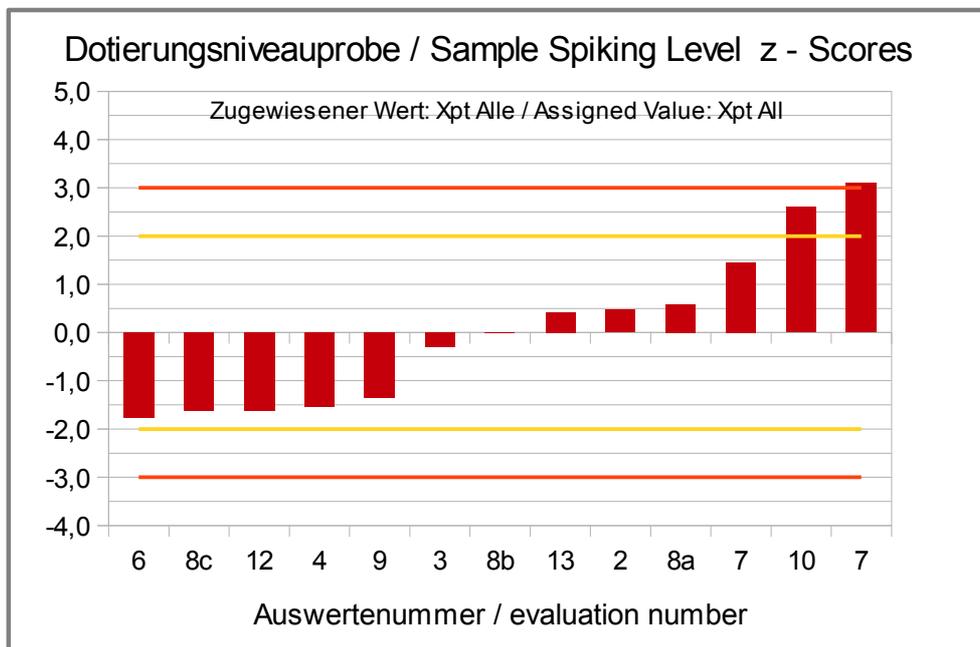


Abb./Fig. 15: z-Scores (ELISA-Ergebnisse Casein) Zugewiesener Wert: robuster Mittelwert aller Ergebnisse

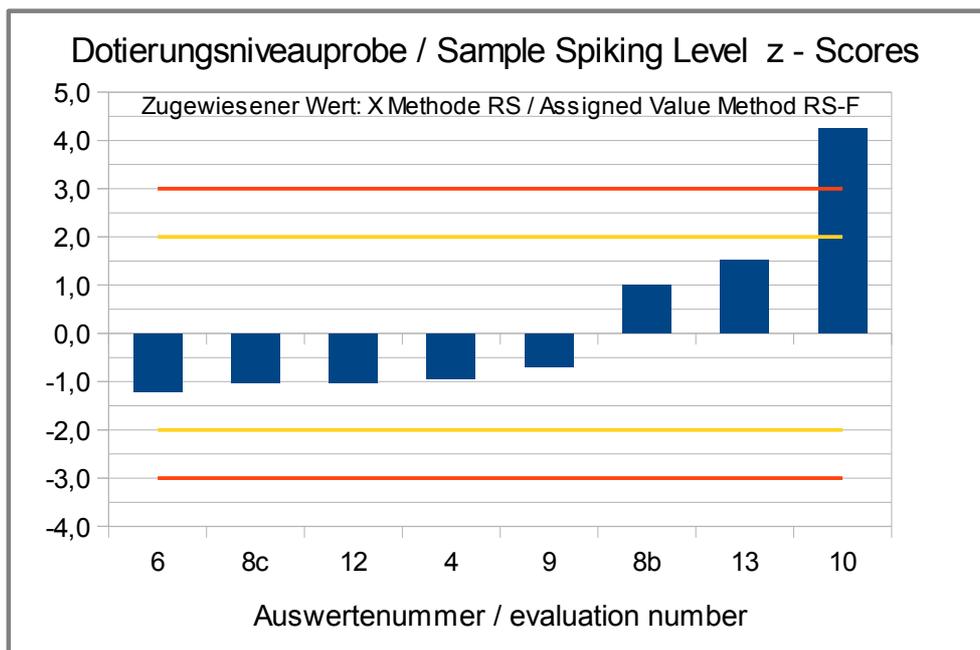


Abb./Fig. 16:

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

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

Auswertenummer	Dotierungsniveauprobe	Wiederfindungsrate*	Probe B	Wiederfindungsrate*	Methode	Hinweis
	[mg/kg]	[%]	[mg/kg]	[%]		
2	32,8	108	1,60	5	AQ	
3	27,2	90	1,37	4	AQ	
7a	40,0	132	1,70	5	AQ	
8a	33,6	111	2,34	7	IL	
7b	52,0	172	11,0	33	MI	
4	18,0	59	3,90	12	RS-F	
6	16,3	54	9,07	27	RS-F	
8b	29,4	97	5,50	17	RS-F	8b und 8c: unterschiedliche Extraktion
8c	17,4	57	1,48	4	RS-F	8b und 8c: unterschiedliche Extraktion
9	19,5	64	7,91	24	RS-F	
10	48,4	160	7,20	22	RS-F	
12	17,5	58	4,74	14	RS-F	
13	32,4	107	5,66	17	RS-F	

AB**	50-150 %	AB**	50-150 %
Anzahl im AB	11	Anzahl im AB	0
Prozent im AB	85	Prozent im AB	0

Methoden:

AQ = AgraQuant, RomerLabs
 IL = Immunolab
 MI = Morinaga Institute ELISA
 RS-F= Ridascreen® Fast, R-Biopharm

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

** Akzeptanzbereich der AOAC für Allergen-ELISAs

Anmerkung:

85% (11) der Teilnehmer haben mit der Dotierungsniveauprobe mittels ELISA eine Wiederfindungsrate im Bereich der AOAC-Anforderung von 50-150% erhalten. Für die prozessierte dotierte Lebensmittelmatrix-Probe B lag keine der Wiederfindungsraten in diesem Akzeptanzbereich.

4.2 Vergleichsuntersuchung Soja

4.2.1 ELISA-Ergebnisse: Soja (als Sojaprotein)

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 <i>Dotierung</i>		
2	negativ	<10	negativ	<10	1/2 (50%)	BC	
3	negativ		negativ		1/2 (50%)	BK	
4	negativ	<2,5	negativ	<2,5	1/2 (50%)	ES	
7	negativ	<2,5	positiv	52,0	2/2 (100%)	MI	
6	negativ	<2,5	positiv	47,3	2/2 (100%)	RS-F	
8	negativ	< 2,5	positiv	35,7	2/2 (100%)	RS-F	
9	negativ		positiv	49,7	2/2 (100%)	RS-F	
12	negativ	<LOD	positiv	26,6	2/2 (100%)	RS-F	
13a	negativ	<2,5	positiv	36,0	2/2 (100%)	RS-F	
5	negativ	<1,2	negativ	<1,2	1/2 (50%)	VT	Ergebnis umgerechnet °
13b	negativ	<1,2	negativ	<1,2	1/2 (50%)	VT	Ergebnis umgerechnet °

° Umrechnung S. 21

	Probe A	Probe B
Anzahl positiv	0	6
Anzahl negativ	11	5
Prozent positiv	0	55
Prozent negativ	100	45
Konsenswert	negativ	keiner

Methoden:

BC = BioCheck ELISA
 BK = BioKits, Neogen
 ES = ELISA-Systems
 MI = Morinaga Institute ELISA
 RS-F= Ridascreen® Fast, R-Biopharm
 VT = Veratox, Neogen

* Übereinstimmung mit *Dotierung*

Anmerkung:

Die Ergebnisse für Probe A stehen in qualitativer Übereinstimmung mit der *Dotierung* von Probe B. Für Probe B wurde kein Konsenswert von ≥75% positiver oder negativer Ergebnisse erhalten. Durchgängig positive Ergebnisse für Probe B wurden mit den Methoden MI und RS-F in Übereinstimmung mit der *Dotierung* von Probe B erhalten, während die übrigen Methoden ausschließlich negative Ergebnisse ergeben haben. Die qualitative Bewertung der Ergebnisse wurde daher im Vergleich der Übereinstimmung mit der *Dotierung* der Proben vorgenommen.

Quantitative Auswertung der Ergebnisse: Probe B

Auswertenummer	Soja-protein [mg/kg]	z-Score Xpt _{ALL}	z-Score Xpt _{RS-F}	Methode	Hinweis
2	<10			BC	
3				BK	
4	<2.5			ES	
7	52,0	1,0		MI	
6	47,3	0,6	0,8	RS-F	
8	35,7	-0,5	-0,3	RS-F	
9	49,7	0,8	1,1	RS-F	
12	26,6	-1,4	-1,3	RS-F	
13a	36,0	-0,5	-0,3	RS-F	
5	<1,2			VT	Ergebnis umgerechnet °
13b	<1,2			VT	Ergebnis umgerechnet °

° Umrechnung S. 18

Methoden:

BC = BioCheck ELISA

BK = BioKits, Neogen

ES = ELISA-Systems

MI = Morinaga Institute ELISA

RS-F= Ridascreen® Fast, R-Biopharm

VT = Veratox, Neogen

Anmerkung:

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

Kenndaten: Quantitative Auswertung Soja (als Sojaprotein)

Probe B

Kenndaten	Alle Ergebnisse [mg/kg]	Methode RS-F [mg/kg]
Zugewiesener Wert (X_{pt})	X_{pt}_{ALL}	$X_{pt}_{METHOD\ RS-F}$
Anzahl der Messergebnisse	6	5
Anzahl der Ausreißer	0	0
Mittelwert	41,2	39,1
Median	41,7	36,0
Robuster Mittelwert (X_{pt})	41,2	39,1
Robuste Standardabweichung (S^*)	11,3	10,7
<i>Zielkenndaten:</i>		
Zielstandardabweichung σ_{pt}	10,3	9,77
Untere Grenze des Zielbereichs	20,6	19,5
Obere Grenze des Zielbereichs	61,8	58,6
Quotient S^*/σ_{pt}	1,1	1,1
Standardunsicherheit $U(X_{pt})$	5,78	6,00
Quotient $U(X_{pt})/\sigma_{pt}$	0,60	0,60
Ergebnisse im Zielbereich	6	5
Prozent im Zielbereich	100	100

Methoden:

RS-F = R-Biopharm, Ridascreen® Fast

Anmerkungen zu den Kenndaten und Vergleich der Bezugswerte:

Die Verteilung der Ergebnisse aller Methoden und von Methode RS-F zeigte eine normale bis geringe Variabilität. Die Quotienten S^*/σ_{pt} lagen jeweils bei 1,1. Die robusten Standardabweichungen liegen im Bereich von etablierten Werten für die Wiederhol- und Vergleichsstandardabweichung der eingesetzten Bestimmungsmethoden (vgl. 3.4.2 Auswertung eines Versuchs zur Präzision und 3.4.3 Werte aus Erkenntnissen). Die Vergleichbarkeit der Ergebnisse ist gegeben. Diese Aussage ist für die methodenübergreifende Auswertung nur eingeschränkt gültig, da für die Methoden nur wenige Ergebnisse vorlagen.

Alle Ergebnisse lagen im Zielbereich.

Die robusten Mittelwerte der Auswertungen lagen mit 49% bzw. 47% vom Zusatzniveau von Sojaprotein zu Probe B, knapp unterhalb der relevanten Anforderungen für die eingesetzten Methoden (s. 3.4.3 und "Wiederfindungsraten für Soja", s. S.49).

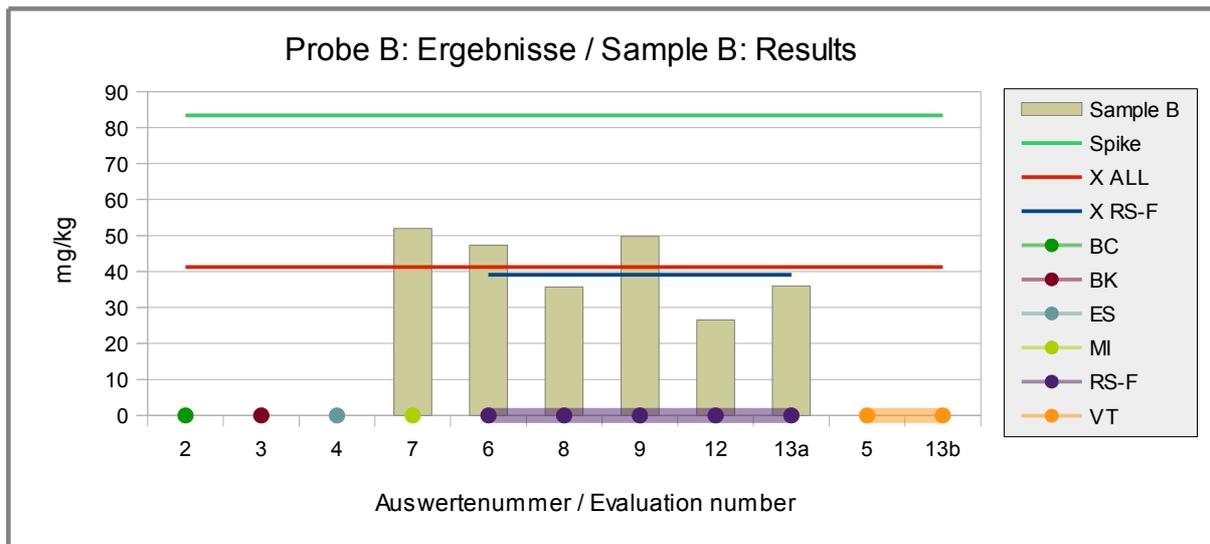


Abb./Fig. 17: ELISA-Ergebnisse Soja (als Sojaprotein)
 grüne Linie = Zusatzniveau (Spike)
 rote Linie = robuster Mittelwert aller Ergebnisse
 blaue Linie = robuster Mittelwert Ergebnisse Methode RS-F
 runde Symbole = Zuordnung der Methoden (s. Legende)

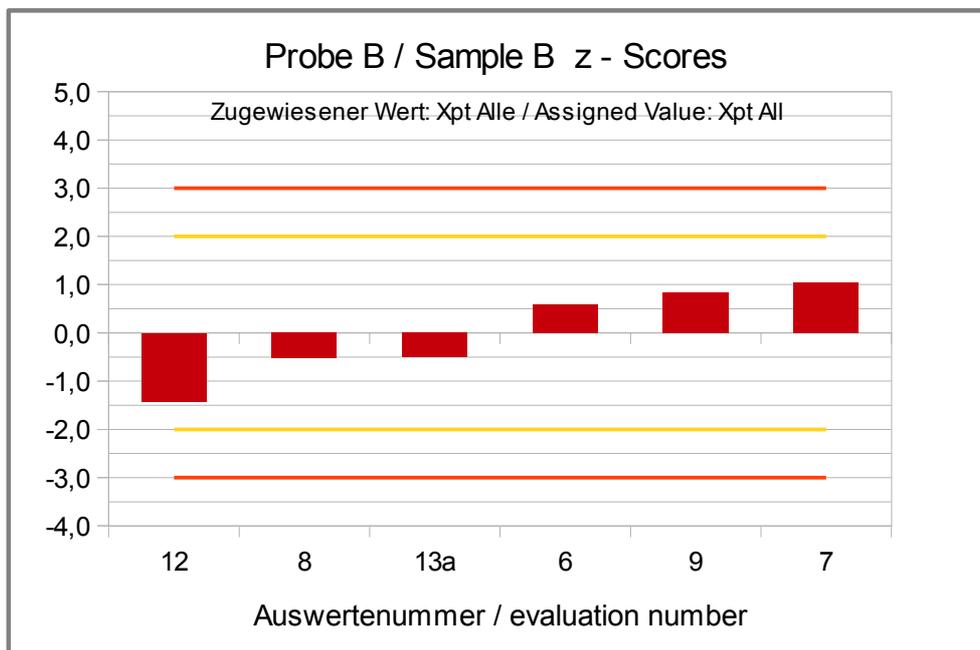


Abb./Fig. 18: z-Scores (ELISA-Ergebnisse als Sojaprotein) Zugewiesener Wert: robuster Mittelwert aller Ergebnisse

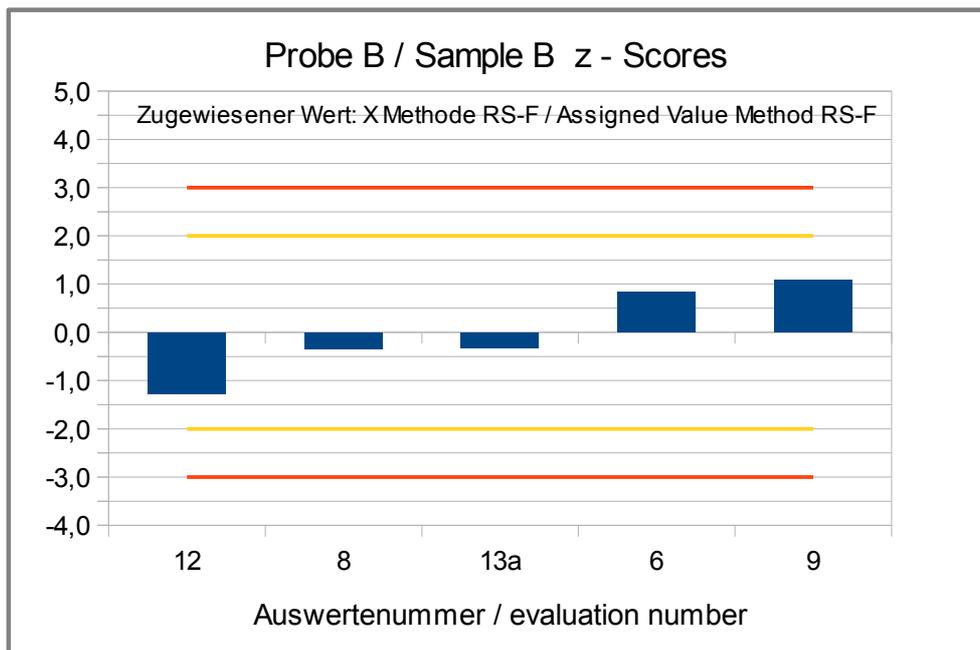


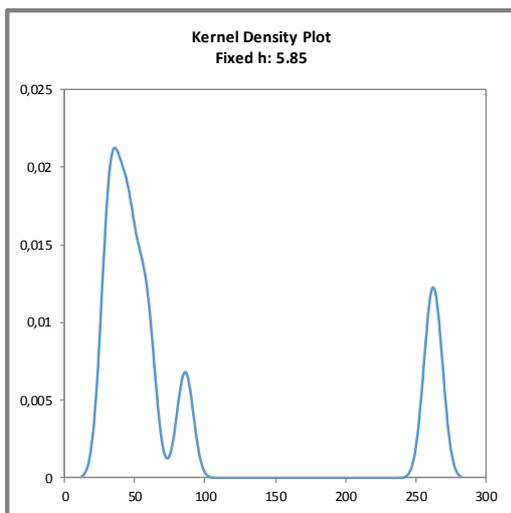
Abb./Fig. 19:

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

Quantitative Auswertung der Ergebnisse: Dotierungsniveauprobe

Auswertenummer	Sojaprotein [mg/kg]	z-Score Xpt _{ALL}	z-Score Xpt _{RS-F}	Methode	Hinweis
2	265	18,7		BC	Ergebnis ausgeschlossen
3				BK	
4	86,0	3,4		ES	
7	260	18,3		MI	Ergebnis ausgeschlossen
6	33,6	-1,1	-1,0	RS-F	
8	54,1	0,6	0,9	RS-F	
9	43,8	-0,2	0,0	RS-F	
12	29,3	-1,5	-1,4	RS-F	
13a	60,4	1,2	1,5	RS-F	
5	35,7	-0,9		VT	Ergebnis umgerechnet °
13b	45,6	-0,1		VT	Ergebnis umgerechnet °

° Umrechnung S. 18



Methoden:

- BC = BioCheck ELISA
- BK = BioKits, Neogen
- ES = ELISA-Systems
- MI = Morinaga Institute ELISA
- RS-F= Ridascreen® Fast, R-Biopharm
- VT = Veratox, Neogen

Abb. / Fig. 20:

Kerndichte-Schätzung aller ELISA-Ergebnisse (mit $h = 0,5 \times \sigma_{pt}$ von X_{ptALL})

Kernel density plot of all ELISA results (with $h = 0,5 \times \sigma_{pt}$ of X_{ptALL})

Anmerkung:

Die Kerndichte-Schätzung zeigt einen Hauptpeak samt Nebenpeak bei <100 mg/kg sowie einen weiteren Nebenpeak bei >250 mg/kg, welcher auf die beiden ausgeschlossenen Ergebnisse zurück zu führen ist.

Kenndaten: Quantitative Auswertung Soja (als Sojaprotein)

Dotierungsniveauprobe

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	8	5
Anzahl der Ausreißer	0	0
Mittelwert	48,6	44,2
Median	44,7	43,8
Robuster Mittelwert (X_{pt})	46,7	44,2
Robuste Standardabweichung (S^*)	16,3	14,9
<i>Zielkenndaten:</i>		
Zielstandardabweichung σ_{pt}	11,7	11,1
Untere Grenze des Zielbereichs	23,3	22,1
Obere Grenze des Zielbereichs	70,0	66,3
Quotient S^*/σ_{pt}	1,4	1,4
Standardunsicherheit $U(X_{pt})$	7,19	8,35
Quotient $U(X_{pt})/\sigma_{pt}$	0,60	0,80
Ergebnisse im Zielbereich	7	5
Prozent im Zielbereich	88	100

Methoden:

RS-F = R-Biopharm, Ridascreen® Fast

Anmerkungen zu den Kenndaten und Vergleich der Bezugswerte:

Die Kerndichte-Schätzung zeigte mit Ausnahme der ausgeschlossenen Werte und einen Einzelwert außerhalb des Zielbereichs annähernd eine Normalverteilung.

Die Verteilung der Ergebnisse aller Methoden und von Methode RS-F zeigte eine normale Variabilität. Die Quotienten S^*/σ_{pt} lagen jeweils unter 2,0. Die robusten Standardabweichungen liegen im Bereich von etablierten Werten für die Wiederhol- und 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.

88% bzw. 100% der Ergebnisse lagen im Zielbereich.

Die robusten Mittelwerte der Auswertungen lagen mit 125% bzw. 118% vom Zusatzniveau von Sojaprotein zur Dotierungsniveauprobe im Bereich der relevanten Anforderungen für die eingesetzten Methoden (s. 3.4.3 und "Wiederfindungsraten für Soja", s. S.49).

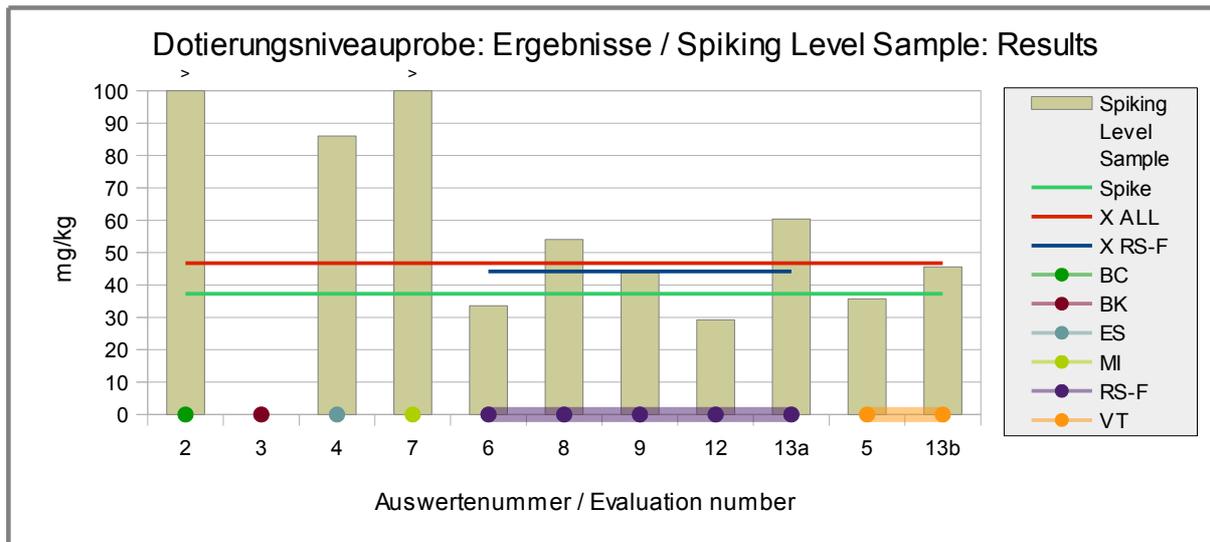


Abb./Fig. 21: ELISA-Ergebnisse Soja (als Sojaprotein)
 grüne Linie = Zusatzniveau (Spike)
 rote Linie = robuster Mittelwert aller Ergebnisse
 blaue Linie = robuster Mittelwert Ergebnisse Methode RS-F
 runde Symbole = Zuordnung der Methoden (s. Legende)

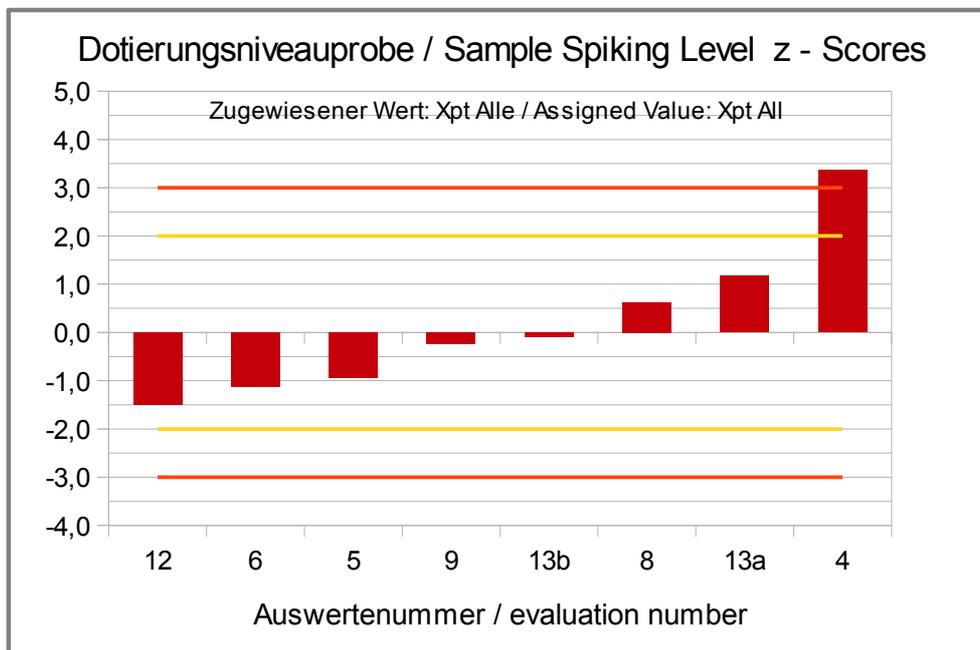


Abb./Fig. 22: z-Scores (ELISA-Ergebnisse als Sojaprotein) Zugewiesener Wert: robuster Mittelwert aller Ergebnisse

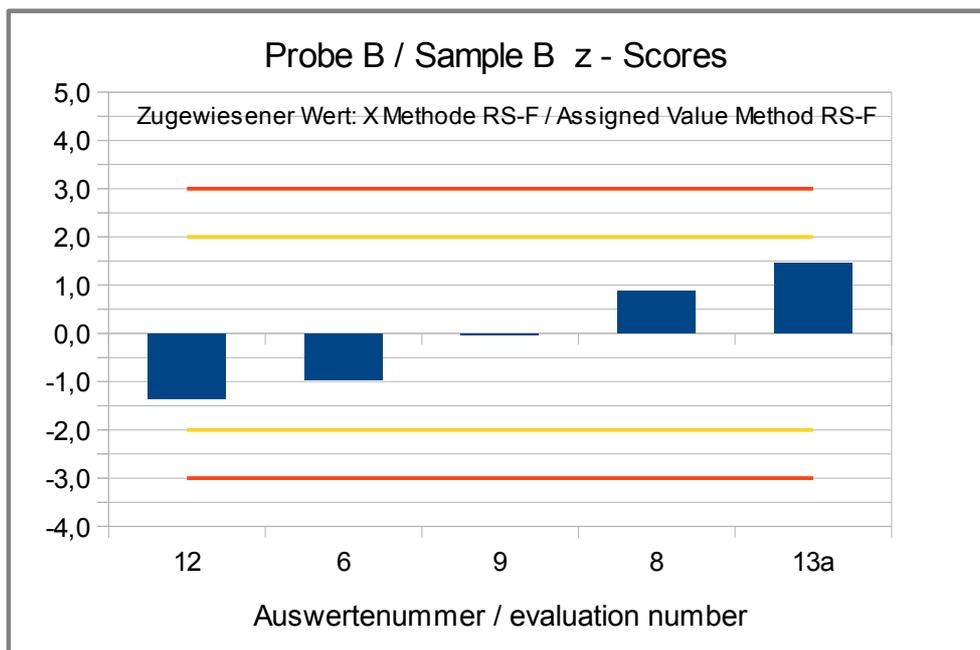


Abb./Fig. 23:

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

**Wiederfindungsraten für Soja (als Sojaprotein):
Dotierungsniveauprobe und Probe B**

Auswertenummer	Dotierungsniveauprobe	Wiederfindungsrate*	Probe B	Wiederfindungsrate*	Methode	Hinweis
	[mg/kg]	[%]	[mg/kg]	[%]		
2	265	712	<10		BC	
3					BK	
4	86,0	231	<2,5		ES	
7	260	697	52,0	62	MI	
6	33,6	90	47,3	57	RS-F	
8	54,1	145	35,7	43	RS-F	
9	43,8	117	49,7	60	RS-F	
12	29,3	78	26,6	32	RS-F	
13a	60,4	162	36,0	43	RS-F	
5	35,7	96	<1,2		VT	Ergebnis umgerechnet °
13b	45,6	122	<1,2		VT	Ergebnis umgerechnet °

° Umrechnung S. 18

AB**	50-150 %	AB**	50-150 %
Anzahl im AB	6	Anzahl im AB	3
Prozent im AB	60	Prozent im AB	50

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

** Akzeptanzbereich der AOAC für Allergen-ELISAs

Methoden:

- BC = BioCheck ELISA
- BK = BioKits, Neogen
- ES = ELISA-Systems
- MI = Morinaga Institute ELISA
- RS-F= Ridascreen® Fast, R-Biopharm
- VT = Veratox, Neogen

Anmerkung:

60% (6) der Teilnehmer haben mit der Dotierungsniveauprobe mittels ELISA eine Wiederfindungsrate im Bereich der AOAC-Anforderung von 50-150% erhalten. Für die prozessierte dotierte Lebensmittelmatrix-Probe B lagen 50% (3) der Wiederfindungsraten in diesem Akzeptanzbereich und die anderen 50% knapp unterhalb des Bereichs.

4.2.2 PCR-Ergebnisse: Soja (als Sojabohne / Sojamehl)

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		
3	negativ		positiv		2/2 (100%)	ASU	
6	negativ		positiv		2/2 (100%)	ASU	
9	negativ		positiv		2/2 (100%)	ASU	
13	negativ	<1	positiv	44,2	2/2 (100%)	SFA-ID	
7	negativ		positiv		2/2 (100%)	div.	

	Probe A	Probe B
Anzahl positiv	0	5
Anzahl negativ	5	0
Prozent positiv	0	100
Prozent negativ	100	0
Konsenswert	negativ	positiv

Methoden:

ASU = ASU §64 Methode/method

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

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

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

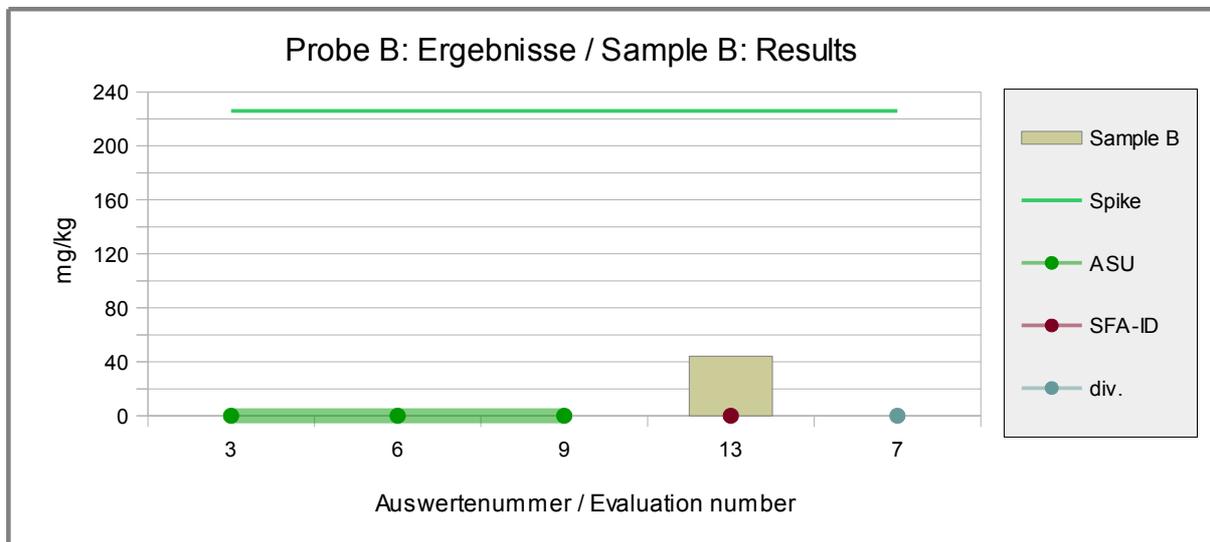


Abb./Fig. 24: PCR-Ergebnisse Soja (als Sojabohne / Sojamehl)
 grüne Linie = Zusatzniveau (Spike)
 runde Symbole = Zuordnung der Methoden (s. Legende)

Quantitative Auswertung der Ergebnisse: Dotierungsprobe

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

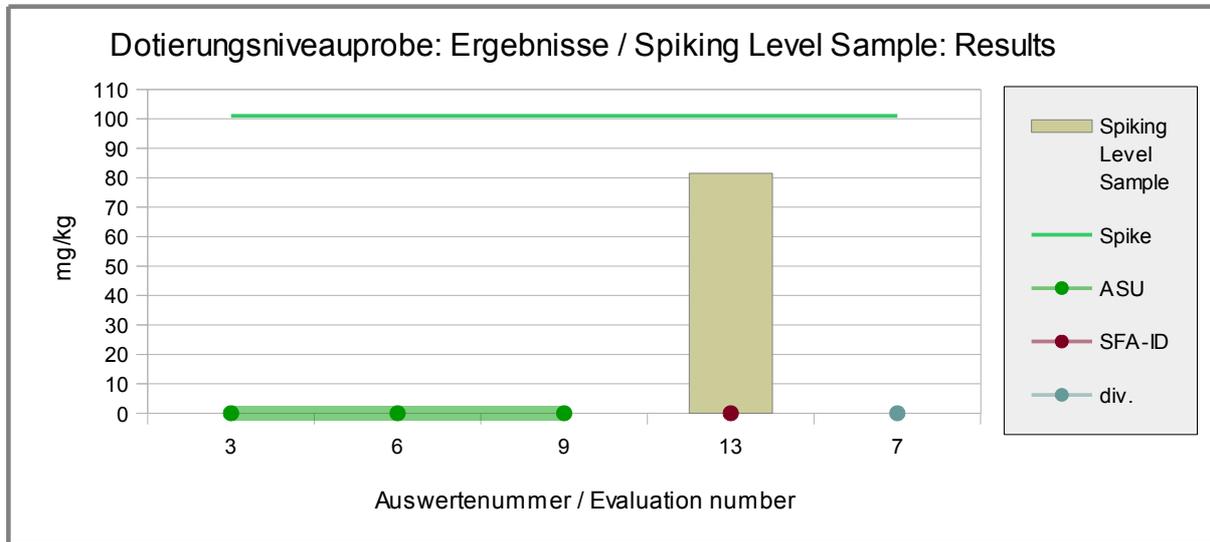


Abb./Fig. 25: PCR-Ergebnisse Soja
 grüne Linie = Zusatzniveau (Spike)
 runde Symbole = Zuordnung der Methoden (s. Legende)

**Wiederfindungsraten für Soja (als Sojamehl/Sojabohne):
Dotierungsniveauprobe und Probe B**

Auswertenummer	Dotierungsniveauprobe	Wiederfindungsrate*	Probe B	Wiederfindungsrate*	Methode	Hinweis
	[mg/kg]	[%]	[mg/kg]	[%]		
3					ASU	
6					ASU	
9					ASU	
13	81,49	81	44,2	20	SFA-ID	
7					div.	

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

Methoden:

ASU = ASU §64 Methode/method
 SFA-ID = Sure Food Allergen ID, R-Biopharm / Congen
 div = keine genaue Angabe / andere Methode

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

** Akzeptanzbereich der AOAC für Allergen-ELISAs

Anmerkung:

Ein Teilnehmer hat quantitative Ergebnisse übermittelt und mit der Dotierungsniveauprobe mittels PCR eine Wiederfindungsrate im Bereich der AOAC-Anforderung von 50-150% erhalten. Mit der prozessierten dotierten Lebensmittelmatrix-Probe lag die Wiederfindungsrate mit 20% unterhalb dieses Bereichs.

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: Milch

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	27.02.17	-	0,484	-	6,644	-	194,04	Lebensmittel	AgraQuant ELISA Milk COKAL2448, RomerLabs
RS-F	6	13.02.17	negativ	<2,5	positiv	14,9	positiv	24,98	Milchproteine, gesamt	Ridascreen® FAST Milk R4652, R-Biopharm
RS-F	8	20./21.01.	negativ	< 2,5	positiv	6,99	positiv	27,78	Milchproteine, gesamt	Ridascreen® FAST Milk R4652, R-Biopharm
RS-F	10	14.02.17	negativ	<2,5	positiv	7,2	positiv	28,6	Protein	r-biopharm, RIDASCREEN®FAST Milk (R4652)
RS-F	11	09.02.17	negativ	<2,5	positiv	18,84	positiv	15,7	Bitte auswählen!	Ridascreen® FAST Milk R4652, R-Biopharm
RS-F	12	25.01.17	-	< LOD	-	10,32	-	18,42	Milchproteine, gesamt	Ridascreen® FAST Milk R4652, R-Biopharm
RS-F	13	27.01.17	negativ	<2.5	positiv	7,33	positiv	36,96	Milchprotein, gesamt	Ridascreen® FAST Milk R4652, R-Biopharm
VT	9	10.02.17	negativ		positiv	7,3	positiv	83,42	Magermilchpulver	Veratox Total Milk Allergen, Neogen

Meth. Abk.	Auswertenummer	Spezifität	Hinweise zur Methode (Extraktion und Bestimmung)	Sonstige Hinweise
		Antikörper	z.B. Extraktionslösung / Zeit / Temperatur	
AQ	1		bei Vollmilchpulver => 194,04 mg/kg Dotierungsprobe; A 0,484 mg/kg; B= 6,644 mg/kg.	Dotierungsprobe=positiv mit/vorhanden mit ETMLK-1004
RS-F	6		lt. Testkitbeschreibung	Probenmaterial erschien bei Eingang inhomogen, im Zuge der Erhitzung war offensichtlich Fleischsaft ausgetreten. Eine annähernde Homogenisation gelang nur mittels Mörser. (Probenmenge zu gering)
RS-F	8		nach Herstelleranleitung	
RS-F	10		nach Herstelleranleitung	
RS-F	11	siehe Kitanleitung	Bearbeitung der Proben exakt nach Kitanleitung	Quantitatives Ergebnis als Mittelwert aus drei Mehrfachbestimmungen
RS-F	12	Milchproteine, gesamt		
RS-F	13	siehe Kitanleitung	nach Herstelleranleitung	
VT	9			zu wenig Probenmaterial für eine Doppelbestimmung

5.1.2 ELISA: Casein

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	27.02.17	-	0,11	-	1,51	-	44,1	Lebensmittel	AgraQuant ELISA MILK COKAL2448, RomerLabs
AQ	2	03.03.17	negativ	<1	positiv	1,6	positiv	32,8	Bitte auswählen!	Romer Casein Kit
AQ	3	03.03.17	negativ		positiv	1,37	positiv	27,15	Casein	AgraQuant Casein COKAL 1200, RomerLabs
AQ	7a	20.01.	negativ	<1	positiv	1,7	positiv	40	Casein	AgraQuant Casein COKAL 1200, RomerLabs
IL	8a	21.02.	negativ	< 0,2	positiv	2,34	positiv	33,56	Casein	Immunolab Casein ELISA
Mi	7b	20.01.	negativ	<1	positiv	11	positiv	52	Casein	Morinaga Casein ELISA Kit
RS-F	4	02.03.17	negativ	<1.36	positiv	3,9	positiv	18	Casein	Ridascreen® FAST Casein R4612, R-Biopharm
RS-F	6	02.03.17	negativ	<2,5	positiv	9,07	positiv	16,31	Casein	Ridascreen® FAST Casein R4612, R-Biopharm
RS-F	8b	21.02.	negativ	< 2,5	positiv	5,5	positiv	29,35	Casein	Ridascreen® FAST Casein R4612, R-Biopharm
RS-F	8c	21.02.	negativ	< 0,5	positiv	1,48	positiv	17,39	Casein	RIDASCREEN® FAST Casein R4612, R-Biopharm
RS-F	9	08.02.17	negativ		positiv	7,91	positiv	19,46	Casein	Ridascreen® FAST Casein R4612, R-Biopharm
RS-F	10	13.02.17	negativ	<2,5	positiv	7,2	positiv	48,4	Casein	r-biopharm, RIDASCREEN®FAST Casein (R4612)
RS-F	12	23.01.17	-	< LOD	-	4,74	-	17,48	Casein	Ridascreen® FAST Casein R4612, R-Biopharm
RS-F	13	23.01.17	negativ	<2.5	positiv	5,66	positiv	32,41	Casein	Ridascreen® FAST Casein R4612, R-Biopharm

Fortsetzung ELISA: Casein

Meth. Abk.	Auswertenummer	Spezifität	Hinweise zur Methode (Extraktion und Bestimmung)	Sonstige Hinweise
		Antikörper	z.B. Extraktionslösung / Zeit / Temperatur	
AQ	1			Dotierungsprobe=positiv mit/vorhanden mit ETMLK-1004
AQ	2	Casein		
AQ	3	Casein	nach Testkitanleitung	NG = 0,2 mg/kg
AQ	7a	Casein	lt. Herstellerangaben	
IL	8a		nach Herstelleranleitung	
Mi	7b		lt. Herstellerangaben	Kit II
RS-F	4			
RS-F	6		lt. Testkitbeschreibung	s. Milch
RS-F	8b		nach Herstelleranleitung mit Extractor 2	
RS-F	8c		nach Herstelleranleitung ohne Extractor 2	
RS-F	9		Extraktion mit Extractor 2	zu wenig Probenmaterial für eine Doppelbestimmung
RS-F	10		nach Herstelleranleitung	
RS-F	12	Casein		
RS-F	13	nach Herstelleranleitung	nach Herstelleranleitung	

5.1.3 ELISA: Soja

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
BC	2	03.03.17	negativ	<10	negativ	<10	positiv	265,4	geröstetes Sojaprotein	Biocheck - Soya Check
BK	3	16.02.17	negativ		negativ		negativ		Sojaprotein	Neogen Biokits 902001T
ES	4	02.03.17	negativ	<2.5	negativ	<2.5	positiv	86	Sojaprotein	ELISA Systems Soy ESSOYPRD-48
Mi	7	24.02.	negativ	<2,5	positiv	52	positiv	260	Sojaprotein	Morinaga Soya ELISA Kit II
RS-F	6	10.02.17	negativ	<2,5	positiv	47,3	positiv	33,61	Sojaprotein	Ridascreen® FAST Soya R7102, R-Biopharm
RS-F	8	27.01./21.02.	negativ	< 2,5	positiv	35,74	positiv	54,05	Sojaprotein	Ridascreen® FAST Soya R7102, R-Biopharm
RS-F	9	23.01.17	negativ		positiv	49,74	positiv	43,82	Sojaprotein	Ridascreen® FAST Soya R7102, R-Biopharm
RS-F	12	23.01.17	-	<LOD	-	26,56	-	29,27	Sojaprotein	Ridascreen® FAST Soya R7102, R-Biopharm
RS-F	13a	10.02.17	negativ	<2.5	positiv	36	positiv	60,4	Sojaprotein	Ridascreen® FAST Soya R7102, R-Biopharm
VT	5	02.03.17	-	<2.5	-	<2.5	-	76	PPM Sojamehl	Veratox for soy allergen kit 8410
VT	13b	23.01.17	negativ	<2.5	negativ	<2.5	positiv	97	Sojamehl	Veratox Soy Allergen, Neogen

Meth. Abk.	Auswertenummer	Spezifität	Hinweise zur Methode (Extraktion und Bestimmung)		Sonstige Hinweise
			Antikörper	z.B. Extraktionslösung / Zeit / Temperatur	
BC	2	geröstetes Sojaprotein	Methode detektiert Soja Trypsin Inhibitor – der übermittelte Wert ist konvertiert in ein geröstetes Sojaprotein Equivalent		
BK	3	Sojaprotein	nach Testkitanleitung für einen Bestimmungsbereich von 0,7 - 14% Sojaprotein; Einw aage = 12g; Aufarbeitung B für geringeren Konzentrationsbereich nicht möglich, da zu wenig Probenmaterial.		Aufgrund des positiven PCR-Ergebnisses bei Probe B kann die Konzentration dort nur < 0,7% Sojaprotein liegen. Auch das Dotierungsmaterial kann nur einen Gehalt von <0,7% Sojaprotein aufweisen, da mittels ELISA im Bestimmungsbereich 0,7 - 14%: nicht nachweisbar
ES	4				
Mi	7		lt. Herstellerangaben		
RS-F	6		lt. Testkitbeschreibung		s. Milch
RS-F	8		nach Herstelleranleitung		
RS-F	9				
RS-F	12	Sojaprotein			
RS-F	13a	nach Herstelleranleitung	nach Herstelleranleitung		
VT	5				
VT	13b	lt. Herstellerangaben	lt. Herstellerangaben		

5.1.4 PCR: Soja

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	qualitativ	mg/kg	qualitativ	mg/kg	qualitativ	mg/kg	z.B. Lebensmittel / Protein	Test-Kit + Anbieter
ASU	3	16.02.17	negativ		positiv		-		Soja-DNA	ASU §64 Methode/method
ASU	6		negativ		positiv		positiv		Soja-DNA	ASU § 64 LFGB L 00.00-105, Anhang C.2 (modifiziert)
ASU	9	30.01.17	negativ		positiv		positiv		Soja-spezifische DNA Sequenzen	§64 LFGB L 08-00-59
SFA-ID	13	26.01.17	negativ	<1	positiv	44, 18	positiv	81,49	Sojabohne	Sure Food Allergen ID, R-Biopharm / Congen
div.	7	20.01.	negativ		positiv		positiv		Soja-DNA	andere: bitte eingeben!

Meth. Abk.	Auswertenummer	Spezifität	Hinweise zur Methode (Extraktion und Bestimmung)	Sonstige Hinweise
		Target-Sequenz / -DNA	z.B. Extraktion / Enzyme / Clean-Up / Real Time PCR / Gelelektrophorese / Cyclen	
ASU	3	Lectin	Extraktion: NucleospinFood; Real-Time-PCR L08.00-59	
ASU	6	Lektin Gen (74 bp)	Puffer mit Proteinase K, Aufarbeitung mittels Wizard-Kit der Fa. Promega)	Probe B: < 50 haploide Genomkopien; Dotierungsprobe: < 475 haploide Genomkopien
ASU	9	Lektin	Machery & Nagel NucleoSpin Food Kit	
SFA-ID	13	laut Herstellerangaben	laut Herstellerangaben	
div.	7		CTAB/Proteinase K/Promega Wizard DNA CleanUp/Real Time PCR/45 Cyclen	Eur F Res Tech 216 (2003) 412ff, mod. (45 Zyklen)

5.2 Homogenität

5.2.1 Mischungshomogenität vor der Abfüllung

Microtracer Homogenitätstest

DLA 01-2017 Dotierungsniveauprobe

Gewicht Gesamtprobe 1,53 kg
 Microtracer FSS-rot lake
 Teilchengröße 75 – 300 µm
 Gewicht pro Partikel 2,0 µg
 Tracerzugabe 28,5 mg/kg

Analysenergebnisse:

Probe	Einwaage [g]	Partikel Anzahl	Partikel [mg/kg]
1	5,16	82	31,8
2	4,99	109	43,7
3	5,13	81	31,6
4	5,00	100	40,0
5	5,07	107	42,2
6	5,03	98	39,0
7	5,12	88	34,4
8	5,02	94	37,5

Poisson-Verteilung		
Probenanzahl	8	
Freiheitsgrad	7	
Mittelwert	95,0	Partikel
Standardabweichung	11,6	Partikel
χ^2 (CHI-Quadrat)	9,88	
Wahrscheinlichkeit	20	%
Wiederfindungsrate	132	%

Normalverteilung		
Probenanzahl	8	
Mittelwert	37,5	mg/kg
Standardabweichung	4,57	mg/kg
rel. Standardabweichung	12,2	%
Horwitz Standardabweichung	9,3	%
HorRat-Wert	1,3	
Wiederfindungsrate	132	%

5.3 Informationen zur Eignungsprüfung (EP)

Vor der LVU wurden den Teilnehmern im Proben-Anschreiben folgende Informationen mitgeteilt:

EP-Nummer	DLA 01-2017
EP-Name	Allergene I: Milch (Casein) und Soja in Wurstbrät mit „Dotierungsniveauprobe“
Probenmatrix	Proben A + B: Wurstbrät (erhitzt)/ Zutaten: Rindfleisch, Schweinefleisch, Wasser, Kartoffelpulver, Salz, Natriumcitrat, weitere Zusatzstoffe und Allergene Lebensmittel (eine der beiden Proben) Dotierungsniveauprobe: Kartoffelpulver, weitere Zusatzstoffe und Allergene Lebensmittel
Probenzahl und Probenmenge	2 unterschiedliche Proben A + B: je 25 g + 1 Dotierungsniveauprobe: 15 g
Lagerungsinformation	Proben A + B: gekühlt 2 - 10 °C (Langzeit < -18°C) Dotierungsniveauprobe: Raumtemperatur
Verwendungszweck	Ausschließlich für Laboruntersuchungen (Qualitätskontrollproben)
Parameter	qualitativ + quantitativ: Milch (Milchprotein, Casein, DNA), Soja (Sojaprotein, DNA) Proben A + B: < 500 mg/kg Dotierungsniveauprobe: < 500 mg/kg
Untersuchungsmethoden	Methode ist freigestellt
Hinweis zur Analyse	Die Untersuchung der Eignungsprüfung soll entsprechend einer laborüblichen Routineanalyse vorgenommen werden. Generell empfehlen wir vor der Analyse, insbesondere bei kleinen Analyseneinwaagen, eine repräsentative Probenmenge entsprechend guter Laborpraxis zu homogenisieren. Von den Proben A + B soll die Gesamtmenge homogenisiert werden.
Ergebnisangabe	Es werden für jede Probe A , B und Dotierungsniveauprobe je ein Ergebnis ermittelt. Die Einzelergebnisse sind in die Ergebnisabgabe-Datei einzutragen.
Einheiten	mg/kg
Anzahl von Dezimalstellen	mindestens 2
Ergebnisabgabe	Die Ergebnisabgabe-Datei wird per eMail übermittelt an: pt@dla-lvu.de
Abgabetermin	spätestens 3. März 2017
Auswertebericht	Der Auswertebericht wird voraussichtlich 6 Wochen nach Abgabetermin der Ergebnisse fertiggestellt und per eMail als PDF-Datei zugesandt.
Koordinator und Ansprechpartner der EP	Dr. Matthias Besler

* Die Kontrolle der Mischungshomogenität wird von DLA durchgeführt. Die Prüfung der Gehalte, Homogenität und Stabilität von EP-Parametern wird von DLA im Unterauftrag vergeben.

6. Verzeichnis der Teilnehmer in alphabetischer Reihenfolge

Teilnehmer / Participant	Ort / Town	Land / Country
		GROSSBRITANNIEN
		Deutschland
		ITALIEN
		ISRAEL
		Deutschland
		Deutschland
		GROSSBRITANNIEN
		Deutschland
		ITALIEN

[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 16.01-9 Untersuchung von Lebensmitteln - Bestimmung von Soja (*Glycine max*) in Getreidemehl mittels real-time PCR (2016)
 30. ASU §64 LFGB L 08.00-59 Untersuchung von Lebensmitteln - Nachweis und Bestimmung von Senf (*Sinapis alba*) sowie Soja (*Glycine max*) in Brühwürsten mittels real-time PCR (2013)
 31. ASU §64 LFGB L 08.00-65 Untersuchung von Lebensmitteln - Simultaner Nachweis und Bestimmung von schwarzem Senf (*Brassica nigra* L.), braunem Senf (*Brassica juncea* L.), weißem Senf (*Sinapis alba*). Sellerie (*Apium graveolens*) und Soja (*Glycine max*) in Brühwurst mittels real-time PCR (2016)
 32. 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 01/2017 - Allergene I

Von 14 haben 13 Teilnehmer mindestens ein Ergebnis eingereicht. Die Auswertung erfolgte für ELISA-Methoden hinsichtlich der Parameter Milch (Milchprotein, Casein) und Soja (als Sojaprotein) qualitativ und quantitativ. Die Auswertung der PCR-Methode für Soja wurde qualitativ bewertet. Zusätzlich wurden für jeden Teilnehmer Wiederfindungsraten der Ergebnisse für die Dotierungsniveauprobe 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, Italien) und ein Teilnehmer in Israel.