

Proficiency Tests

DLA

food
cosmetics
consumer goods
www.dla-lvu.de

Auswertungs-Bericht

Laborvergleichsuntersuchung

DLA 03/2017

Allergene III:

β-Lactoglobulin, Casein und Gluten

in Kindernahrung

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>	<p>DLA - Dienstleistung Lebensmittel Analytik GbR Gesellschafter: Dr. Gerhard Wichmann und Dr. Matthias Besler</p> <p>Waldemar-Bonsels-Weg 170, 22926 Ahrensburg, Germany</p> <p>Tel. ++49(0)171-1954375 Fax. ++49(0)4102-9944976 eMail. proficiency-testing@dla-lvu.de</p>
<i>EP-Nummer</i> <i>PT-Number</i>	DLA 03/2017
<i>EP-Koordinator</i> <i>PT-Coordinator</i>	Dr. Matthias Besler
<i>Status des EP-Bericht</i> <i>Status of PT-Report</i>	<p>Abschlussbericht / Final report (23. Juni 2017)</p> <p>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.</p>
<i>EP-Bericht Freigabe</i> <i>PT-Report Authorization</i>	<p>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: 23. Juni 2017</p>
<i>Unteraufträge</i> <i>Subcontractors</i>	<p>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.</p>
<i>Vertraulichkeit</i> <i>Confidentiality</i>	<p>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.</p>

Inhalt

1. Einleitung.....	4
2. Durchführung.....	4
2.1 Untersuchungsmaterial.....	4
2.1.1 Homogenität.....	6
2.1.2 Stabilität.....	9
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
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 β -Lactoglobulin.....	21
4.1.1 ELISA-Ergebnisse: β -Lactoglobulin.....	21
4.2 Vergleichsuntersuchung Casein / Milchprotein.....	29
4.2.1 ELISA-Ergebnisse: Casein.....	29
4.2.2 ELISA-Ergebnisse: Milch (als Milchprotein).....	39
4.3 Vergleichsuntersuchung Weizen (Gluten / Weizen).....	42
4.3.1 ELISA-Ergebnisse: Gluten.....	42
4.3.2 PCR-Ergebnisse: Weizen.....	52
5. Dokumentation.....	56
5.1 Angaben der Teilnehmer.....	56
5.1.1 ELISA: β -Lactoglobulin.....	56
5.1.2 ELISA: Casein.....	58
5.1.3 ELISA: Milch.....	60
5.1.4 ELISA: Gluten.....	61
5.1.5 PCR: Weizen.....	63
5.2 Homogenität.....	64
5.2.1 Mischungshomogenität vor der Abfüllung.....	64
5.3 Informationen zur Eignungsprüfung (EP).....	65
6. Verzeichnis der Teilnehmer in alphabetischer Reihenfolge.....	66
7. Verzeichnis relevanter Literatur.....	67

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 ein handelsübliches Kindernahrungsmittel "Hirse-Brei mit Reis" ab dem 4. Monat (gekennzeichnet als milchfrei und glutenfrei). Die Grundzusammensetzung war für beide Proben A und B gleich (s. Tabelle 1).

Nach Zerkleinern und Sieben mittels Schlagmühle (mesh 1,5 mm) wurde die Grundmischung homogenisiert.

Anschließend wurde die **dotierte Probe A** folgendermaßen hergestellt:

Die Dotierungsmaterialien, die die allergenen Zutaten Magermilchpulver und Weizenmehl enthalten, wurden gesiebt (mesh 600 µm) bzw. mittels Zentrifugalmühle gesiebt (mesh 500 µm), dann zu einem Aliquot der Grundmatrix gegeben und die Mischung homogenisiert. Anschließend wurde portionsweise erneut Grundmatrix in 4 weiteren Schritten zugegeben und jeweils maschinell homogenisiert bis die Gesamtmenge erreicht war.

Die **Dotierungsniveauprobe** wurde mit den oben genannten allergenhaltigen Dotierungsmaterialien unter mehrstufiger Zugabe von Kartoffelpulver und Homogenisierung hergestellt. Anschließend wurde die gesamte Menge mittels Zentrifugalmühle (mesh 500 µm) gesiebt.

Die Proben A und B wurden zu Portionen von ca. 25 g und die Dotierungsniveauprobe 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
Bio-Hirsebrei mit Reis, Kinderbrei ab dem 4. Monat Zutaten: Hirsevollkornmehl (75%), Naturreismehl (25%), Vitamin B1 Nährwertangaben pro 100 g: Eiweiß 12 g, Kohlenhydrate 77 g, Fett 3,7 g	99,8 g/100 g	100 g/100g	-
Kartoffelpulver Zutaten: Kartoffeln, E471, E304, E223, E100	-	-	99,8 g/100 g
<i>Milch:</i> - als Magermilchpulver* - davon 37% Gesamtprotein** - davon Casein*** - davon β -Lactoglobulin***	158 mg/kg 58,1 mg/kg 46,5 mg/kg 5,8 mg/kg	-	155 mg/kg 57,0 mg/kg 45,6 mg/kg 5,7 mg/kg
<i>Weizen:</i> - als Weizenmehl* - davon 10% Gesamtprotein** - davon Gluten***	648 mg/kg 64,8 mg/kg 56,4 mg/kg	-	549 mg/kg 54,9 mg/kg 47,8 mg/kg
<i>weitere Zutaten:</i> Maltodextrin, Natriumsulfat und Siliciumdioxid	<0,02 g/100 g	-	<0,02 g/100 g

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

** Proteingehalte gemäß Laboranalyse des Rohstoffs (Gesamtstickstoff nach Kjeldahl mit F=6,25 für Milchprotein und F=5,7 für Weizenprotein)

*** Proteingehalte gemäß Literaturangaben berechnet (ca. 80% Caseine und ca. 10% β -Lactoglobulin in Gesamt-Milchprotein [31]; ca. 8,7% Gluten in Weizenmehlen [32, 33, 34])

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

2.1.1 Homogenität

Die **Mischungshomogenität vor der Abfüllung** wurde in 8-fach Bestimmung mittels **Microtracer-Analyse** untersucht. Es handelt sich um eine normierte Methode, die Bestandteil des internationalen GMP-Zertifizierungssystems für Futtermittel ist [14]. Vor der Mischung werden mit Farbstoff beschichtete Eisenpartikel in μm -Größe zur Probe gegeben und die Partikelzahl wird nach der Homogenisierung in entnommenen Aliquoten bestimmt. Die Bewertung der Mischungshomogenität erfolgt auf Grundlage der Poissonverteilung anhand des chi-Quadrat-Tests. Eine Wahrscheinlichkeit von $\geq 5\%$ ist gleichzusetzen mit einer guten homogenen Mischung und von $\geq 25\%$ mit einer exzellenten Mischung [14, 15]. Die Microtracer-Analyse der vorliegenden LVU-Probe A und der Dotierungsmaterialprobe hat eine Wahrscheinlichkeit von 72% bzw. 75% ergeben. Die Partikel-Ergebnisse wurden zusätzlich in Konzentrationen umgerechnet, statistisch als Normalverteilung ausgewertet und mit der Standardabweichung nach Horwitz verglichen. Es wurden HorRat-Werte von 0,8 bzw. 0,7 erhalten. Die Ergebnisse der Microtracer-Analyse sind in der Dokumentation angegeben.

Homogenität der abgefüllten dotierten Probe A

Durchführung der Homogenitätstests

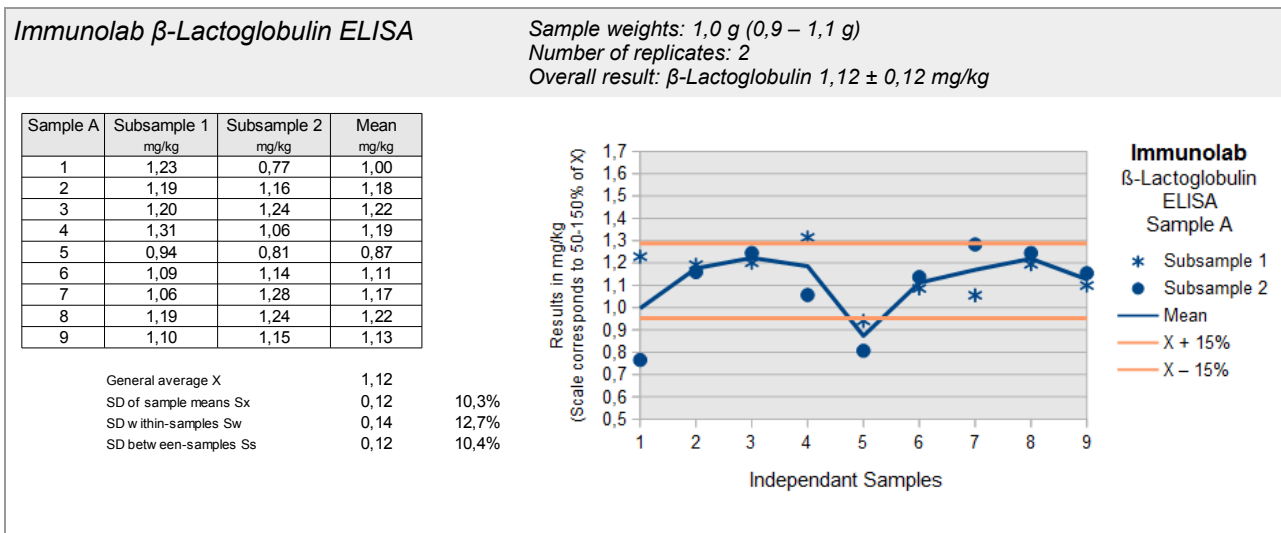
Die Homogenitätstests wurden in Kooperation mit den Labors der angegebenen Testkit-Anbieter durchgeführt. Von DLA wurden zufällig 10 Muster der abgefüllten dotierten Probe ausgewählt und davon jeweils 2 Teilproben in zuvor zufällig-coodierte Extraktionsbehälter eingewogen und anschließend den Labors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

Bewertung der Homogenität

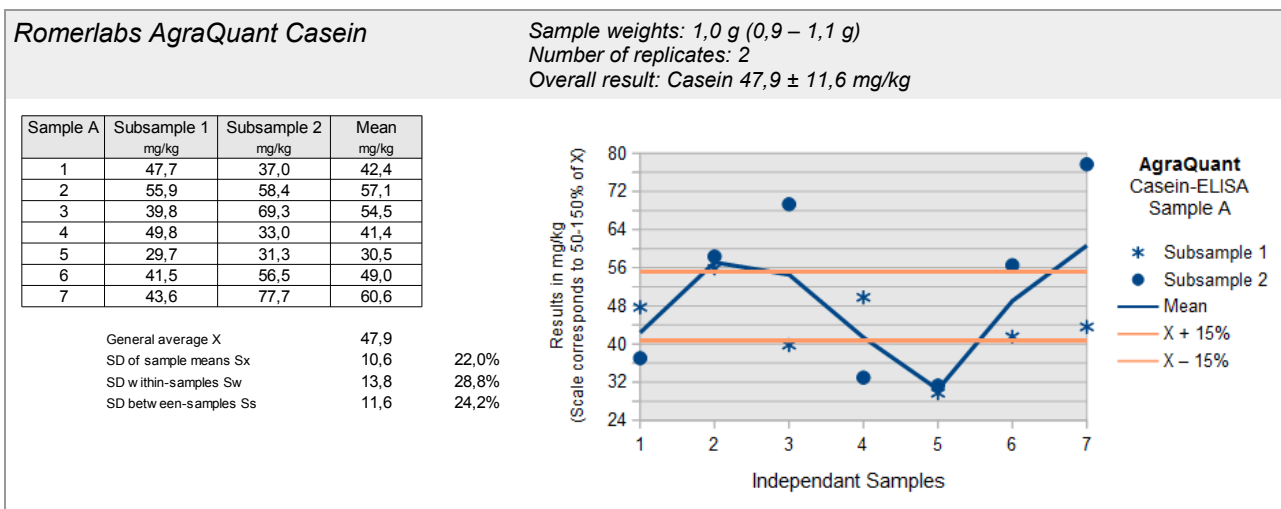
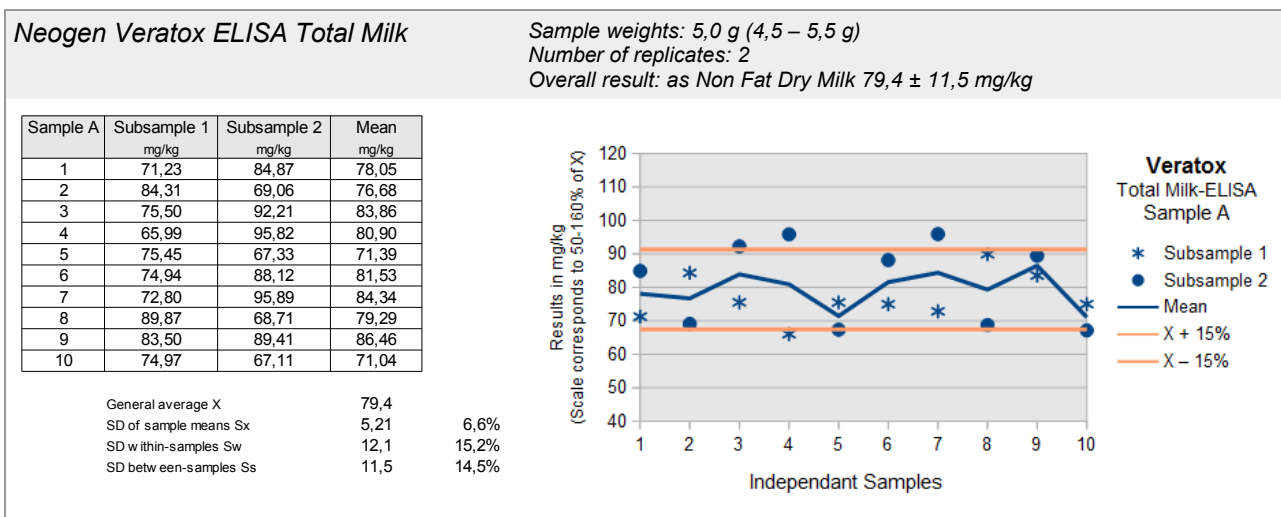
Die Homogenität wird mit einer Standardabweichung zwischen den Proben von $Ss \leq 15\%$ („Heterogenitätsstandardabweichung“) als hinreichend gesichert angesehen. Dieses Kriterium wird für die untersuchte Probe A in den ELISA-Tests sowohl für β -Lactoglobulin (Immunolab) und Milch (Veratox als Magermilchpulver) als auch für Gluten (Immunolab und AgraQuant) erfüllt (s. Seiten 7-9). Die Ergebnisse eines weiteren ELISA Tests für Gluten lagen mit $Ss 15,6\%$ direkt an dem genannten Wert (Veratox). Und ein ELISA Test ergab für Casein eine Ss von kleiner 25% (AgraQuant). 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].

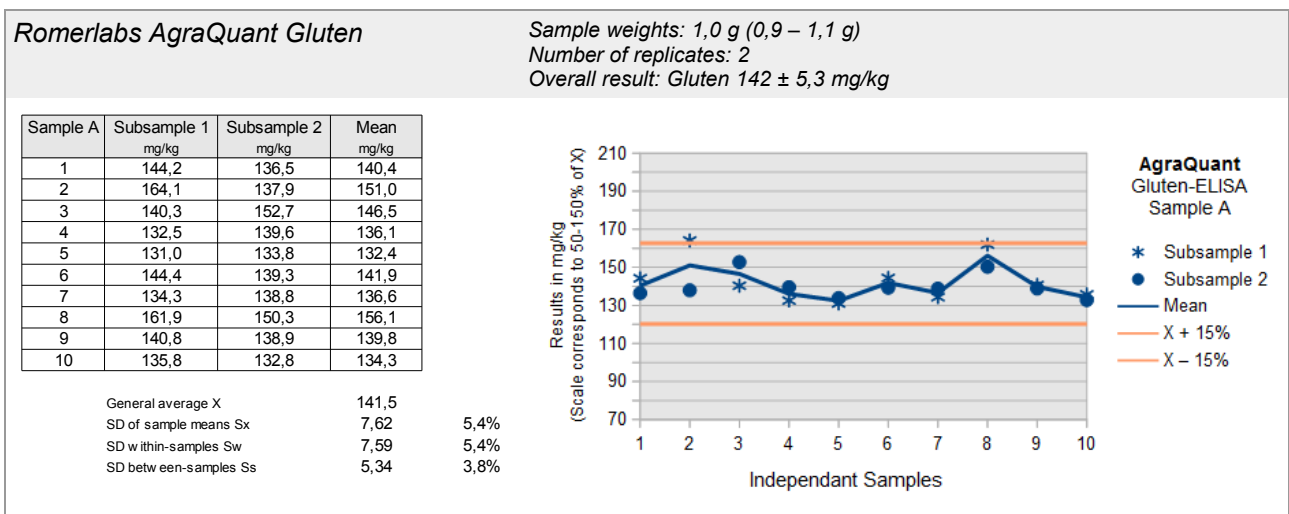
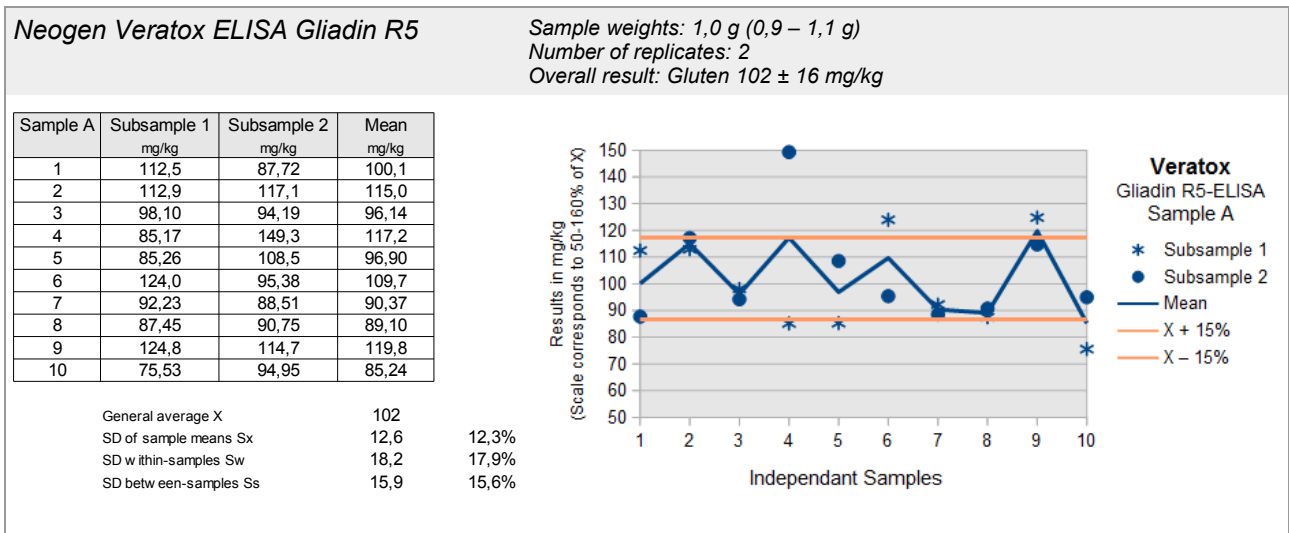
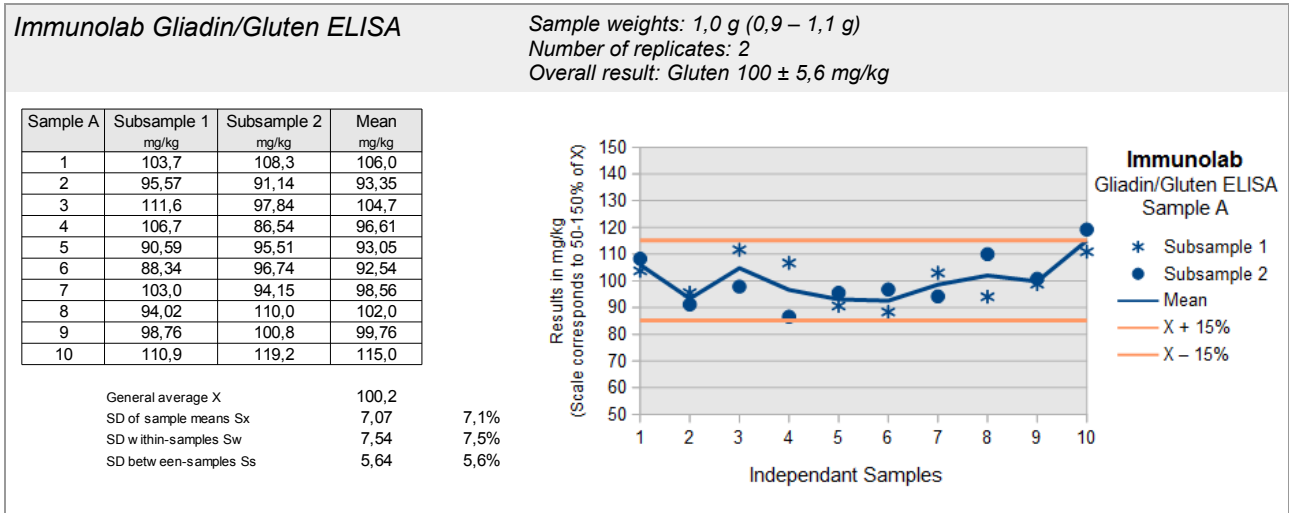
ELISA-Tests: Homogenität / Homogeneity beta-Lactoglobulin



ELISA-Tests: Homogenität Milch / Homogeneity Milk (Protein / Casein)



ELISA-Tests: Homogenität Gluten / Homogeneity Gluten



2.1.2 Stabilität

Die Erfahrungen mit diversen DLA-Referenzmaterialien zeigen bei vergleichbarer Matrix und Wasseraktivität (a_w -Wert $< 0,5$) eine gute Lagerstabilität bezüglich der Haltbarkeit der Probe (mikrobieller Verderb) und des Gehalts an den EP-Parametern β -Lactoglobulin, Casein und Gluten. Die Stabilität des Probenmaterials war somit während des Untersuchungszeitraums unter den angegebenen Lagerbedingungen gewährleistet.

2.2 Probenversand und Informationen zur Untersuchung

An jeden Teilnehmer wurden in der 9. Kalenderwoche 2017 je eine Portion der Untersuchungsmaterialien A und B sowie eine Dotierungsmaterialprobe verschickt. Die Untersuchungsverfahren wurden freigestellt. Die Untersuchungen waren durchzuführen bis spätestens 13. April 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 β -Lactoglobulin, Casein und/oder Gluten im mg/kg Bereich in der Matrix Kindernahrung (Breipulver mit Hirse und Reis). Eine der beiden Proben sowie die "Dotierungsniveauprobe" wurden mit den allergenen Zutaten hergestellt. Die "Dotierungsniveauprobe" enthält die Allergene in einfacher Matrix (Kartoffelpulver) mit ähnlichen Gehalten ohne weitere Prozessierung.

Bitte beachten Sie die beiliegenden Informationen zur Eignungsprüfung.

(siehe Dokumentation unter Punkt 5.3 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.

Alle 18 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 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 Vergleichstandardabweichung σ_R abgeleitet [6]. Später wurde das Modell von Thompson für bestimmte Konzentrationsbereiche modifiziert [10]. Die Vergleichstandardabweichung σ_R kann als relative Zielstandardabweichung σ_{pt} in % des zugewiesenen Wertes verwendet werden und nach untenstehenden Gleichungen berechnet werden [3]. Dabei wird für die Konzentration c der zugewiesene Wert X_{pt} eingesetzt.

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

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

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

3.4.2 Auswertung eines Versuchs zur Präzision

Aus der Vergleichstandardabweichung σ_R und der Wiederholstandardabweichung σ_r 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]:

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

Die in Tabelle 2a (ELISA) und Tabelle 2b (PCR) angegebenen relativen Wiederholstandardabweichungen (RSD_r) und relativen Vergleichstandardabweichungen (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 Vergleichstandardabweichung σ_R gleich der Zielstandardabweichung σ_{pt} .

Tabelle 2a: ELISA-Methoden - Relative Wiederholstandardabweichungen (RSD_r) und relative Vergleichstandardabweichungen (RSD_R) gemäß ausgewählter Auswertungen von Versuchen zur Präzision und die resultierende Zielstandardabweichung σ_{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. 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 Vergleichstandardabweichungen 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 Vergleichstandardabweichungen 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 Vergleichstandardabweichungen (RSD_R) gemäß ausgewählter Auswertungen von Versuchen zur Präzision und die resultierende Zielstandardabweichung σ_{pt} [30-32]

Parameter	Matrix	Mittelwerte [mg/kg]	Wiederfindung	rob RSD_r	RSD_r	RSD_R	σ_{pt}	Methode / Literatur
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 39,6 19,6 9,3	82 % 99 % 98 % 93 %	-	17,3% 22,9% 22,9% 31,1%	24,1% 31,8% 24,0% 30,2%	20,8% 27,4% 17,7% -	rt-PCR ASU 08.00-59
Weizen + Roggen	Brühwurst (100°C, 60 min)	96,1	120 %	-	21,3%	35,4%	32,0%	rt-PCR ASU 08.00-66
Weizen + Roggen	Wurst, autoklaviert	74,9	11,0 %	-	24,6%	32,7%	27,7%	rt-PCR ASU 08.00-66

3.4.3 Werte aus Erkenntnissen

Die Zielstandardabweichung kann für die Eignungsbeurteilung auf einen Wert festgesetzt werden, der dem Leistungsfähigkeitsniveau entspricht, das der Koordinator für ein wünschenswertes Ziel für die teilnehmenden Laboratorien hält [3].

Anforderungen an die Leistungsfähigkeit der Analysemethoden zur quantitativen Bestimmung von Allergenen in Lebensmitteln sind u.a. vom Ministry of Health and Welfare (MHLW) in Japan [20], von der Arbeitsgruppe 12 „Lebensmittelallergene“ des Technischen Komitees CEN/TC 275 [17-19], von einer internationalen "Food Allergen Working Group" unter der Leitung der AOAC Presidential Task Force on Food Allergens [21] und vom Codex Alimentarius Committee (CAC/GL 74-2010) [16] erarbeitet worden.

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

Tabelle 3: ELISA-Validierungskriterien

Literatur [16-22]	Wiederfindungsrate	Wiederholstandard- abweichung	Vergleichstandard- abweichung
MHLW 2006	50 - 150%		≤ 25%
CEN 2009		≤ 20%	
AOAC 2010	50 - 150%	6,9 - 34,4% ^(a)	19,5 - 57,2% ^(a)
CAC 2010	70 - 120%	≤ 25%	≤ 35%

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

Tabelle 4: PCR-Validierungskriterien

Literatur [16]	Wiederfindungsrate	Wiederholstandard- abweichung	Vergleichstandard- 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.

ELISA-Ergebnisse, die als Magermilchpulver angegeben wurden, sind mit Literaturangaben auf den Caseingehalt (ca. 80 % Caseine in 37 % Gesamtmilchprotein, vgl. S.5) umgerechnet worden (ELISA-Systems).

In der vorliegenden LVU wurden alle anderen ELISA-Ergebnisse einheitlich als β -Lactoglobulin bzw. Gluten angegeben, sodass keine weiteren Umrechnungen vorgenommen wurden.

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

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

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

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

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

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

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

4.1 Vergleichsuntersuchung β -Lactoglobulin

4.1.1 ELISA-Ergebnisse: β -Lactoglobulin

Qualitative Auswertung der Ergebnisse: Proben A und B

Auswertenummer	Probe A	Probe A	Probe B	Probe B	Qualitative Bewertung	Methode	Hinweis
	pos/neg	[mg/kg]	pos/neg	[mg/kg]	Übereinstimmungen mit Konsenswerten		
3	positiv	7,80	negativ	< 2	2/2 (100%)	BK	
17	positiv	13,0	negativ	<5	2/2 (100%)	BK	
2	positiv	>1	negativ	<0,1	2/2 (100%)	ES	
18	positiv	6,70	negativ	< 1	2/2 (100%)	ES	
1	positiv	2,30	negativ	<0,5	2/2 (100%)	IG	
14	positiv	1,60	negativ	< 0,01	2/2 (100%)	IL	
8	positiv	3,40	negativ	<0,031	2/2 (100%)	MI	
4	positiv	0,608	negativ	negativ	2/2 (100%)	RS	
11	positiv	3,01	negativ	<1,00	2/2 (100%)	RS	
13	negativ	<5	negativ	<5	1/2 (50%)	RS	
16	positiv	1,40	negativ		2/2 (100%)	RS	
7	positiv	2,10	negativ	< 0,5	2/2 (100%)	RS-F	
12	positiv	2,37	negativ	<0,5	2/2 (100%)	RS-F	
15	positiv	2,37	negativ	<0.5	2/2 (100%)	RS-F	

	Probe A	Probe B
Anzahl positiv	13	0
Anzahl negativ	1	14
Prozent positiv	93	0
Prozent negativ	7	100
Konsenswert	positiv	negativ

Methoden:

BK = BioKits, Neogen
 ES = ELISA-Systems
 IG = Ingezim ELISA, Ingenasa
 IL = Immunolab
 MI = Morinaga Institute ELISA
 RS = Ridascreen®, R-Biopharm
 RS-F= Ridascreen® Fast, R-Biopharm

Anmerkung:

Die Konsenswerte stehen in qualitativer Übereinstimmung mit der Dotierung von Probe A. Ein negatives Ergebnis für Probe A wurde mit der Methode RS (Ridascreen) erhalten.

Quantitative Auswertung ELISA: Probe A

Auswertenummer	β -Lactoglobulin [mg/kg]	z-Score $X_{pt,ALL}$	Methode	Hinweis
3	7,80	9,4	BK	Ergebnis ausgeschlossen
17	13,0	18,0	BK	Ergebnis ausgeschlossen
2	>1		ES	
18	6,70	7,6	ES	Ausreißer X_{Alle}
1	2,30	0,0	IG	
14	1,60	-1,2	IL	
8	3,40	1,9	MI	
4	0,608	-3,0	RS	
11	3,01	1,2	RS	
13	<5		RS	
16	1,40	-1,6	RS	
7	2,10	-0,4	RS-F	
12	2,37	0,1	RS-F	
15	2,37	0,1	RS-F	

Methoden:

- BK = BioKits, Neogen
- ES = ELISA-Systems
- IG = Ingezim ELISA, Ingenasa
- IL = Immunolab
- MI = Morinaga Institute ELISA
- RS = Ridascreen®, R-Biopharm
- RS-F= Ridascreen® Fast, R-Biopharm

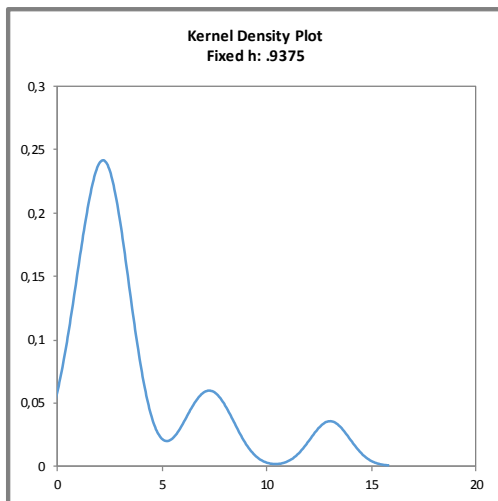


Abb. / Fig. 1:

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 der Ergebnisse mit zwei Nebenpeaks bei ca. 7 mg/kg (Methode BK und ES) und 13 mg/kg (Methode BK).

Kenndaten: Quantitative Auswertung ELISA: β -Lactoglobulin

Probe A

Kenndaten	Alle Ergebnisse [mg/kg]
Zugewiesener Wert (X_{pt})	X_{pt_ALL}
Anzahl der Messergebnisse	10
Anzahl der Ausreißer	1
Mittelwert	2,59
Median	2,34
Robuster Mittelwert (X_{pt})	2,32
Robuste Standardabweichung (S^*)	1,11
<i>Zielkenndaten:</i>	
Zielstandardabweichung σ_{pt}	0,580
Untere Grenze des Zielbereichs	1,16
Obere Grenze des Zielbereichs	3,48
Quotient S^*/σ_{pt}	1,9
Standardunsicherheit $U(X_{pt})$	0,437
Quotient $U(X_{pt})/\sigma_{pt}$	0,75
Ergebnisse im Zielbereich	8
Prozent im Zielbereich	80

Anmerkungen zu den Kenndaten und Vergleich der Bezugswerte:

Die Kerndichte-Schätzung zeigte für Methode BK zwei abweichend erhöhte Ergebnisse, die vorab ausgeschlossen wurden. Das ebenfalls erhöhte Ergebnis von Methode ES wurde nicht ausgeschlossen, da es sich um ein Einzelergebnis handelte. Alle drei Ergebnisse wurden mittels z-Score bewertet.

Die Auswertungen der Ergebnisse aller Methoden zeigte nach Ausschluss der zwei o.g. Ergebnisse eine normale Variabilität der Ergebnisse. Der Quotient S^*/σ_{pt} liegt bei 1,9. Die robuste Standardabweichung liegt im Bereich von etablierten Werten für die Wiederhol- und Vergleichstandardabweichung 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.

Der robuste Mittelwert der Auswertung der Ergebnisse aller Methoden lag mit 40% vom Zusatzniveau von β -Lactoglobulin zu Probe A, unterhalb der relevanten Anforderungen für die eingesetzten Methoden (s. 3.4.3 und "Wiederfindungsraten für β -Lactoglobulin").

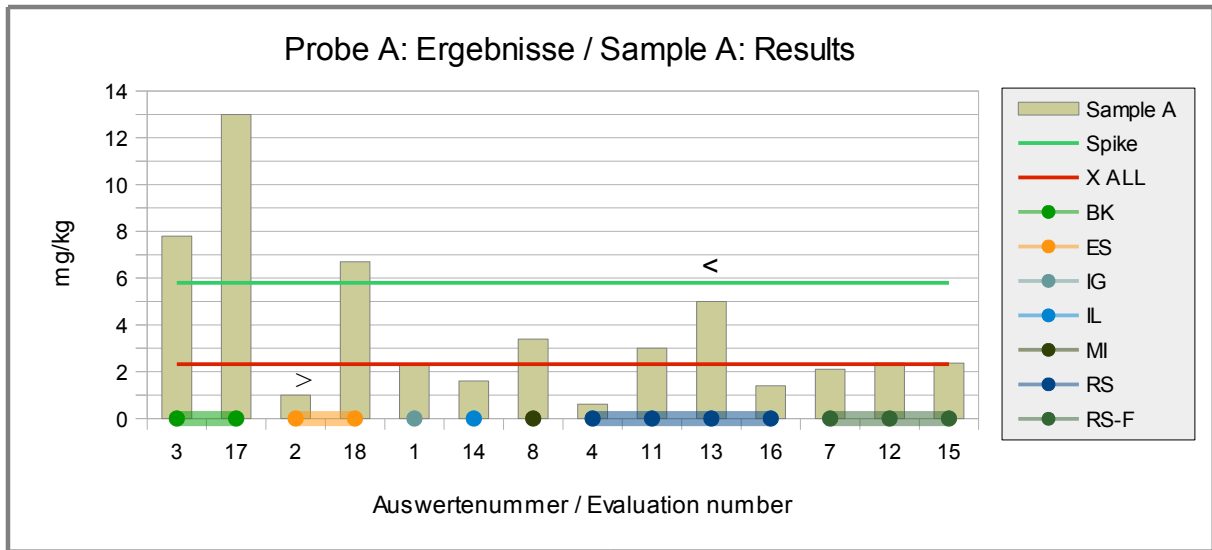


Abb./Fig. 2: ELISA-Ergebnisse β -Lactoglobulin
 grüne Linie = Zusatzniveau (Spike)
 rote Linie = robuster Mittelwert aller Ergebnisse
 runde Symbole = Zuordnung der Methoden (s. Legende)

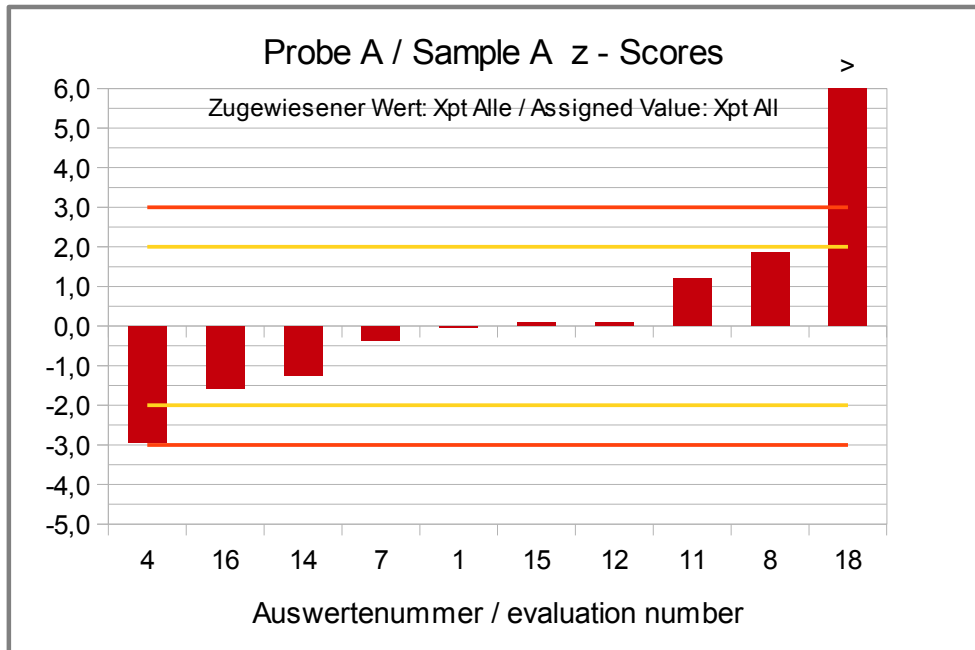


Abb./Fig. 3: z-Scores (ELISA-Ergebnisse β -Lactoglobulin) Zugewiesener Wert: robuster Mittelwert aller Ergebnisse

Quantitative Auswertung ELISA: Dotierungsniveauprobe

Auswertenummer	β -Lactoglobulin [mg/kg]	z-Score $X_{pt,ALL}$	Methode	Hinweis
3	9,50	11,9	BK	Ergebnis ausgeschlossen
17	15,0	21,1	BK	Ergebnis ausgeschlossen
2	>1		ES	
18	5,80	5,7	ES	Ausreißer X_{Alle}
1			IG	
14	1,70	-1,2	IL	
8	3,40	1,7	MI	
4	1,75	-1,1	RS	
11	2,84	0,8	RS	
13	<5		RS	
16	1,40	-1,7	RS	
7	1,50	-1,5	RS-F	
12	2,23	-0,3	RS-F	
15	2,78	0,7	RS-F	

Methoden:

- BK = BioKits, Neogen
- ES = ELISA-Systems
- IG = Ingezim ELISA, Ingenasa
- IL = Immunolab
- MI = Morinaga Institute ELISA
- RS = Ridascreen®, R-Biopharm
- RS-F= Ridascreen® Fast, R-Biopharm

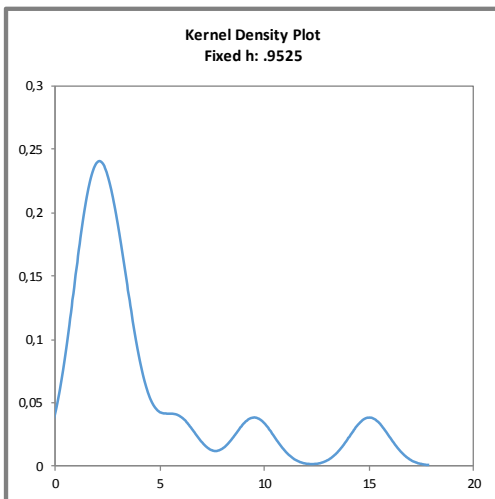


Abb. / Fig. 4:

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 der Ergebnisse mit einer Schulter (Methode ES) und zwei Nebenpeaks bei ca. 7 mg/kg und 13 mg/kg (Methode BK).

Kenndaten: Quantitative Auswertung ELISA β -Lactoglobulin**Dotierungsniveauprobe**

Kenndaten	Alle Ergebnisse [mg/kg]
Zugewiesener Wert (X_{pt})	X_{pt_ALL}
Anzahl der Messergebnisse	9
Anzahl der Ausreißer	1
Mittelwert	2,60
Median	2,23
Robuster Mittelwert (X_{pt})	2,39
Robuste Standardabweichung (S^*)	1,01
<i>Zielkenndaten:</i>	
Zielstandardabweichung σ_{pt}	0,597
Untere Grenze des Zielbereichs	1,19
Obere Grenze des Zielbereichs	3,58
Quotient S^*/σ_{pt}	1,7
Standardunsicherheit $U(X_{pt})$	0,421
Quotient $U(X_{pt})/\sigma_{pt}$	0,70
Ergebnisse im Zielbereich	8
Prozent im Zielbereich	89

Anmerkungen zu den Kenndaten und Vergleich der Bezugswerte:

Die Kerndichte-Schätzung zeigte für Methode BK zwei abweichend erhöhte Ergebnisse, die vorab ausgeschlossen wurden. Das ebenfalls erhöhte Ergebnis von Methode ES wurde nicht ausgeschlossen, da es sich um ein Einzelergebnis handelte. Alle drei Ergebnisse wurden mittels z-Score bewertet.

Die Verteilung der Ergebnisse aller Methoden zeigt eine normale Variabilität. Der Quotient S^*/σ_{pt} liegt bei 1,7. Die robusten Standardabweichungen liegen im Bereich von etablierten Werten für die Wiederhol- und Vergleichstandardabweichung 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.

Der robuste Mittelwert der Auswertung lag mit 42% vom Zusatzniveau von β -Lactoglobulin zur Dotierungsniveauprobe unterhalb der relevanten Anforderungen für die eingesetzten Methoden (s. 3.4.3 und "Wiederfindungsraten für β -Lactoglobulin").

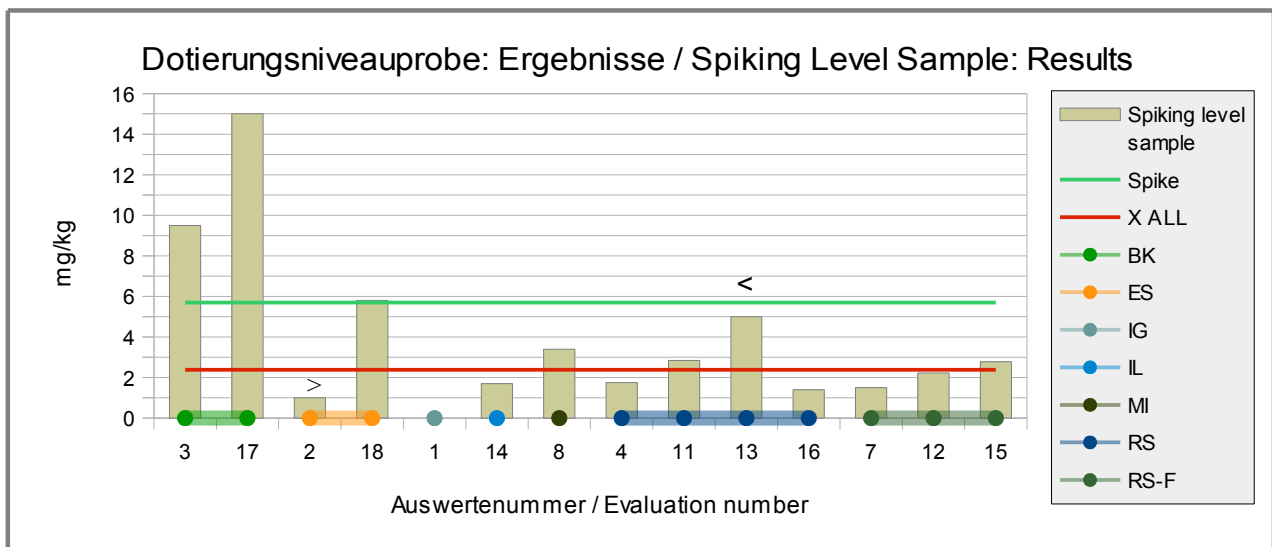


Abb./Fig. 5: ELISA-Ergebnisse β -Lactoglobulin
 grüne Linie = Zusatzniveau (Spike)
 rote Linie = robuster Mittelwert aller Ergebnisse
 runde Symbole = Zuordnung der Methoden (s. Legende)

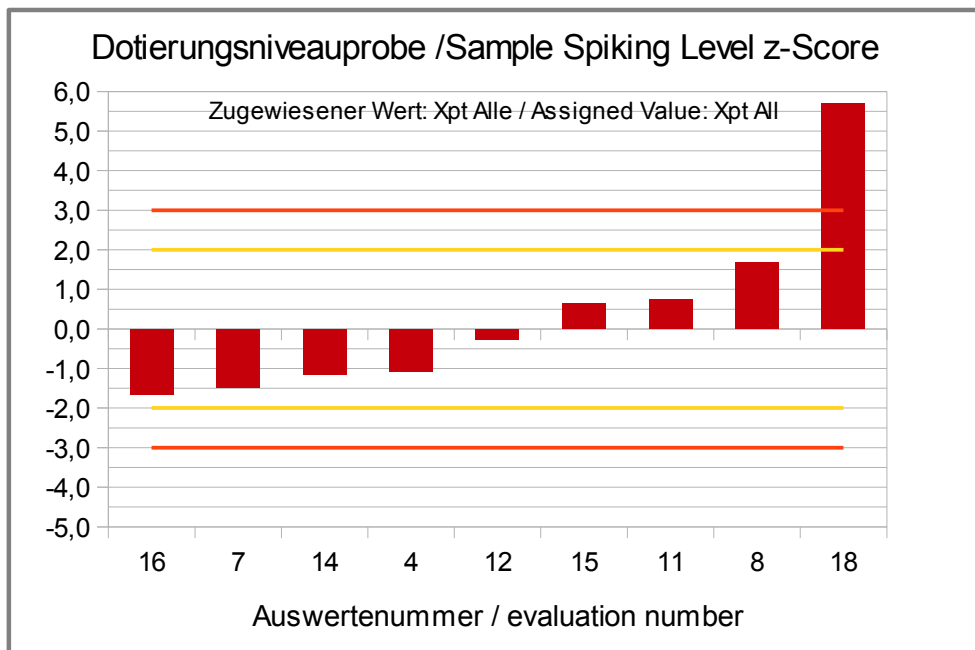


Abb./Fig. 6: z-Scores (ELISA-Ergebnisse β -Lactoglobulin) Zugewiesener Wert: robuster Mittelwert aller Ergebnisse

**Wiederfindungsraten ELISA für β -Lactoglobulin:
Dotierungsniveauprobe und Probe A**

Auswertenummer	Dotierungsniveauprobe	Wiederfindungsrate*	Probe A	Wiederfindungsrate*	Methode	Hinweis
	[mg/kg]	[%]	[mg/kg]	[%]		
3	9,50	167	7,8	134	BK	
17	15,0	263	13	224	BK	
2	>1		>1		ES	
18	5,80	102	6,7	116	ES	
1			2,3	40	IG	
14	1,70	30	1,6	28	IL	
8	3,40	60	3,4	59	MI	
4	1,75	31	0,61	10	RS	
11	2,84	50	3,01	52	RS	
13	<5		<5		RS	
16	1,40	25	1,4	24	RS	
7	1,50	26	2,1	36	RS-F	
12	2,23	39	2,37	41	RS-F	
15	2,78	49	2,37	41	RS-F	

AB**	50-150 %	AB**	50-150 %
Anzahl im AB	3	Anzahl im AB	4
Prozent im AB	27	Prozent im AB	33

* Wiederfindungsrate 100% Bezugsgröße: β -Lactoglobulin, s. Seite 5

** Akzeptanzbereich der AOAC für Allergen-ELISAs

Methoden:

- BK = BioKits, Neogen
- ES = ELISA-Systems
- IG = Ingezim ELISA, Ingenasa
- IL = Immunolab
- MI = Morinaga Institute ELISA
- RS = Ridascreen®, R-Biopharm
- RS-F= Ridascreen® Fast, R-Biopharm

Anmerkung:

27% (3) der Teilnehmer haben mit der Dotierungsniveauprobe mittels ELISA eine Wiederfindungsrate im Bereich der AOAC-Anforderung von 50-150% erhalten. Für die dotierte Lebensmittelmatrix-Probe A lagen 33% (4) der Wiederfindungsraten in diesem Akzeptanzbereich.

4.2 Vergleichsuntersuchung Casein / Milchprotein

4.2.1 ELISA-Ergebnisse: Casein

Qualitative Auswertung der Ergebnisse: Proben A und B

Auswertenummer	Probe A	Probe A	Probe B	Probe B	Qualitative Bewertung	Methode	Hinweis
	pos/neg	[mg/kg]	pos/neg	[mg/kg]			
					Übereinstimmungen mit Konsenswerten		
3	positiv	102	negativ		2/2 (100%)	AQ	
10	positiv	45,4	negativ	<1	2/2 (100%)	AQ	
17	positiv	31,5	negativ	<1,5	2/2 (100%)	AQ	
2	positiv	>3	negativ	<0,3	2/2 (100%)	ES	Ergebnis umgerechnet °
1	positiv	32,0	negativ	<1	2/2 (100%)	IG	
9a	positiv	136	negativ	< 0,2	2/2 (100%)	IL	
14	positiv	36,0	negativ	< 0,2	2/2 (100%)	IL	
8	positiv	46,0	negativ	<0,25	2/2 (100%)	MI	
4	positiv	10,0	negativ	negativ	2/2 (100%)	RS-F	
7	positiv	12,9	negativ	<0,5	2/2 (100%)	RS-F	
9b	positiv	42,9	negativ	<0,5	2/2 (100%)	RS-F	
12	positiv	30,9	negativ	<2,5	2/2 (100%)	RS-F	
15	positiv	49,7	negativ	<2,5	2/2 (100%)	RS-F	
16a	positiv	44,0	negativ		2/2 (100%)	RS-F	
18	positiv	38,0	negativ		2/2 (100%)	RS-F	
16b	positiv	46,0	negativ		2/2 (100%)	VT	
5	positiv	31,3	negativ	<2,0	2/2 (100%)	div.	

° Umrechnung S. 19

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

Methoden:

AQ = AgraQuant, RomerLabs
 ES = ELISA-Systeme
 IG = Ingezim ELISA, Ingenasa
 IL = Immunolab
 MI = Morinaga Institute ELISA
 RS-F= Ridascreen® Fast, R-Biopharm
 VT = Veratox, Neogen
 div = keine genaue Angabe / andere Methode

Anmerkung:

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

Quantitative Auswertung ELISA: Probe A

Auswertenummer	Casein [mg/kg]	z-Score X _{pt,ALL}	z'-Score X _{pt,RS-F}	Methode	Hinweis
3	102	6,3		AQ	Ausreißer X _{Alle}
10	45,4	0,6		AQ	
17	31,5	-0,8		AQ	
2	>3			ES	Ergebnis umgerechnet °
1	32,0	-0,8		IG	
9a	136	9,8		IL	Ausreißer X _{Alle}
14	36,0	-0,4		IL	
8	46,0	0,7		MI	
4	10,0	-3,0	-1,9	RS-F	
7	12,9	-2,7	-1,7	RS-F	
9b	42,9	0,4	0,9	RS-F	
12	30,9	-0,9	-0,1	RS-F	
15	49,7	1,0	1,5	RS-F	
16a	44,0	0,5	1,0	RS-F	
18	38,0	-0,1	0,5	RS-F	
16b	46,0	0,7		VT	
5	31,3	-0,8		div.	

° Umrechnung S. 19

Methoden:

- AQ = AgraQuant, RomerLabs
- ES = ELISA-Systeme
- IG = Ingezim ELISA, Ingenasa
- IL = Immunolab
- MI = Morinaga Institute ELISA
- RS-F= Ridascreen® Fast, R-Biopharm
- VT = Veratox, Neogen
- div = keine genaue Angabe / andere Methode

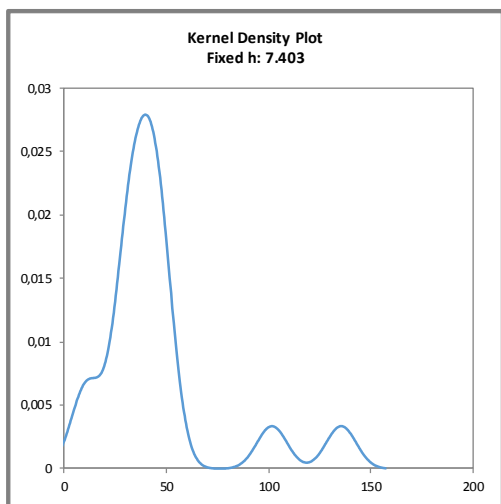


Abb. / Fig. 7:

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 der Ergebnisse mit einer Schulter bei < 15 mg/kg (Methode RS-F) und zwei Nebenpeaks bei > 100 mg/kg (Methode AQ und IL).

Kenndaten: Quantitative Auswertung ELISA Casein

Probe A

Kenndaten	Alle Ergebnisse [mg/kg]	Methode RS-F [mg/kg]
Zugewiesener Wert (X_{pt})	X_{pt}_{ALL}	$X_{pt}_{METHOD\ RS-F}$
Anzahl der Messergebnisse	16	7
Anzahl der Ausreißer	2	0
Mittelwert	45,9	32,6
Median	40,5	38,0
Robuster Mittelwert (X_{pt})	39,5	32,6
Robuste Standardabweichung (S^*)	14,0	17,7
<i>Zielkenndaten:</i>		
Zielstandardabweichung σ_{pt} bzw. σ_{pt}'	9,87	11,7
Untere Grenze des Zielbereichs	19,7	9,3
Obere Grenze des Zielbereichs	59,2	56,0
Quotient S^*/σ_{pt} bzw. σ_{pt}'	1,4	1,5
Standardunsicherheit $U(X_{pt})$	4,37	8,3
Quotient $U(X_{pt})/\sigma_{pt}$ bzw. σ_{pt}'	0,44	0,72
Ergebnisse im Zielbereich	12	7
Prozent im Zielbereich	75	100

Methode:

RS-F = R-Biopharm, Ridascreen® FAST

Anmerkungen zu den Kenndaten und Vergleich der Bezugswerte:

Die Kerndichte-Schätzung zeigte keine eindeutigen methodenabhängigen Unterschiede.

Die Auswertungen der Ergebnisse aller Methoden zeigte eine normale Variabilität der Ergebnisse. Der Quotient S^*/σ_{pt} lag unter 2,0. Die Auswertungen der Ergebnisse von Methode RS-F zeigte eine leicht erhöhte Variabilität der Ergebnisse. Daher wurde unter Berücksichtigung der Standardunsicherheit mittels z'-Score ausgewertet. Der Quotient S^*/σ_{pt}' lag dann unter 2,0. Die robusten Standardabweichungen liegen im Bereich von etablierten Werten für die Wiederhol- und Vergleichstandardabweichung der eingesetzten Bestimmungsmethoden (vgl. 3.4.2 Auswertung eines Versuchs zur Präzision und 3.4.3 Werte aus Erkenntnissen). Die Vergleichbarkeit der Ergebnisse ist gegeben. Diese Aussage ist für die methodenübergreifende Auswertung nur eingeschränkt gültig, da für einige Methoden nur wenige Ergebnisse vorlagen.

Die robusten Mittelwerte der Auswertungen lagen mit 85% bzw. 70% vom Zusatzniveau von Casein zu Probe A innerhalb der relevanten Anforderungen für die eingesetzten Methoden (s. 3.4.3 und "Wiederfindungsraten für Casein").

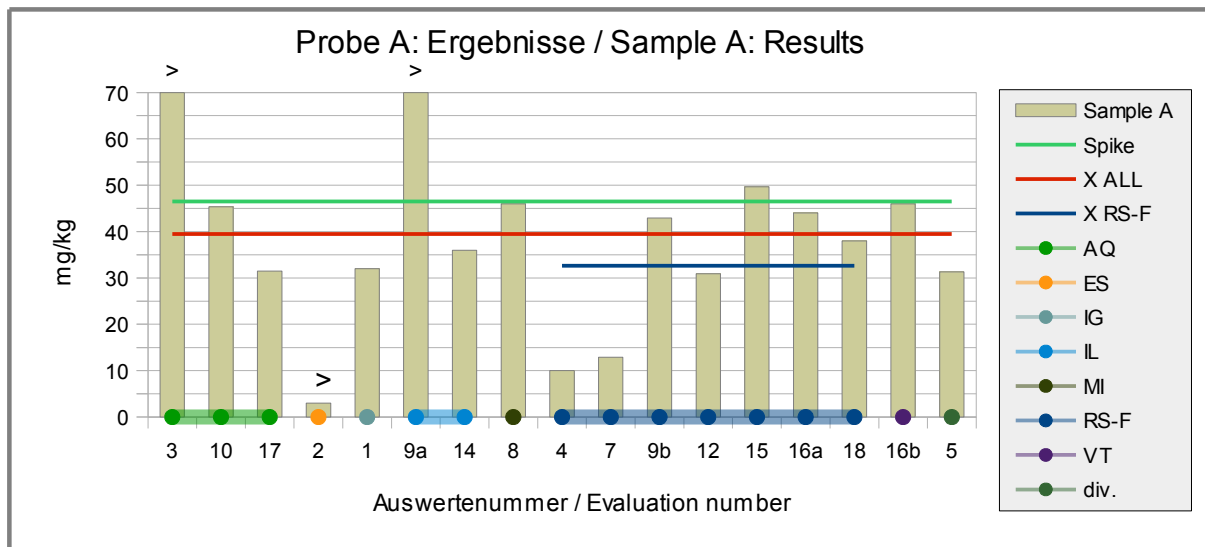


Abb./Fig. 8: ELISA-Ergebnisse Casein
 grüne Linie = Zusatzniveau (Spike)
 rote Linie = robuster Mittelwert aller Ergebnisse
 blaue Linie = robuster Mittelwert Ergebnisse Methode RS-F
 runde Symbole = Zuordnung der Methoden (s. Legende)

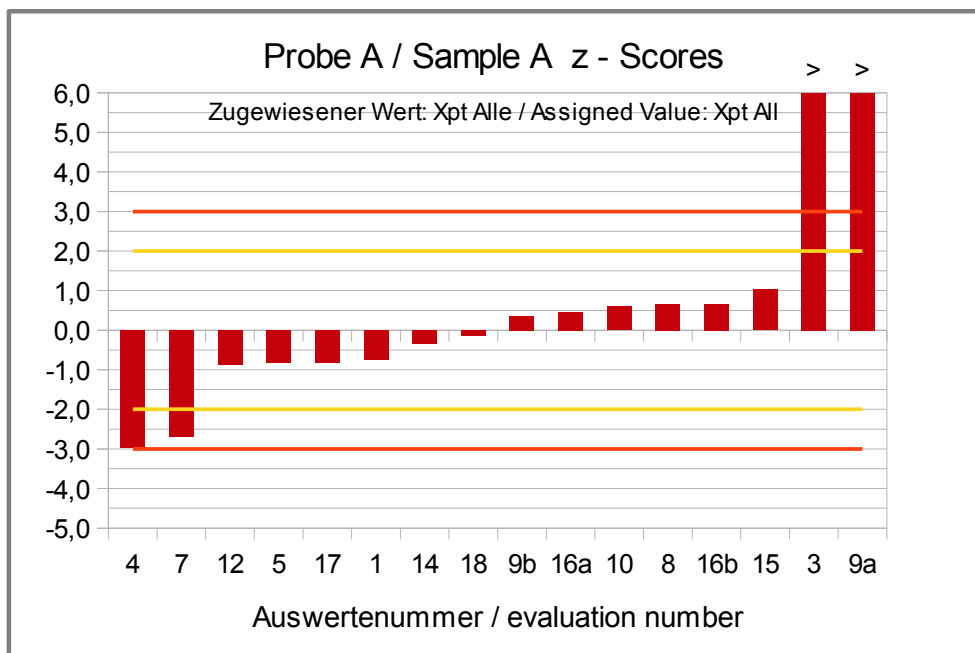


Abb./Fig. 9: z-Scores (ELISA-Ergebnisse Casein) Zugewiesener Wert: robuster Mittelwert aller Ergebnisse

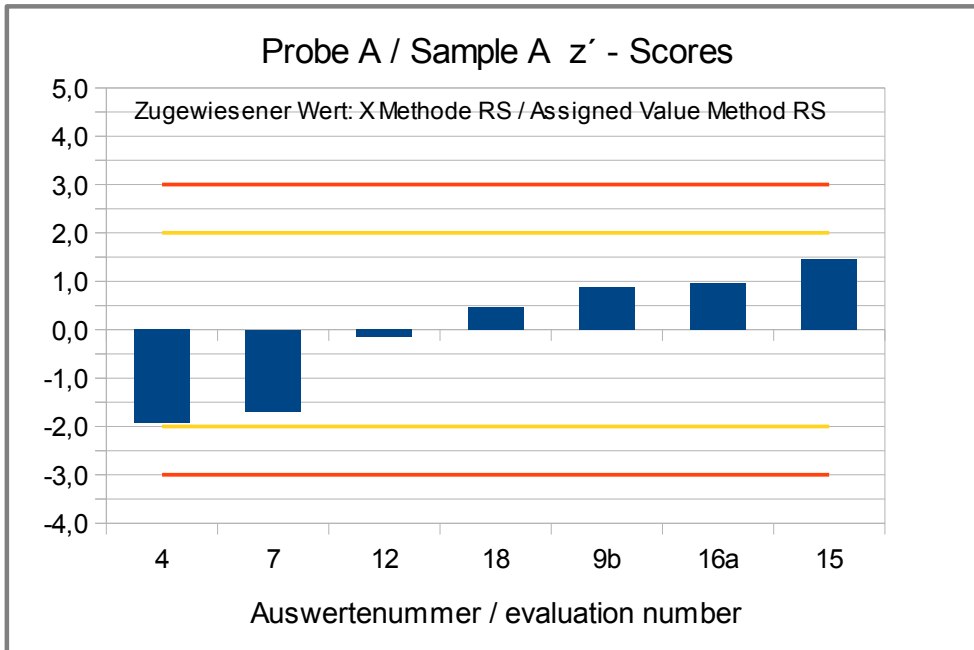


Abb./Fig. 10:

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

Quantitative Auswertung ELISA: Dotierungsniveauprobe

Auswertenummer	Casein [mg/kg]	z-Score X _{pt} _{ALL}	z-Score X _{pt} _{RS}	Methode	Hinweis
3	77,5	3,1		AQ	Ausreißer X _{Alle}
10	43,4	0,0		AQ	
17	28,8	-1,4		AQ	
2	>3			ES	Ergebnis umgerechnet °
1		-4,0		IG	
9a	98,9	5,1		IL	Ausreißer X _{Alle}
14	44,0	0,0		IL	
8	43,0	0,0		MI	
4	49,6	0,6	1,2	RS-F	
7	7,00	-3,4	-3,3	RS-F	
9b	40,1	-0,3	0,2	RS-F	
12	22,8	-1,9	-1,6	RS-F	
15	42,0	-0,1	0,4	RS-F	
16a	56,0	1,1	1,9	RS-F	
18	45,0	0,1	0,7	RS-F	
16b	48,0	0,4		VT	
5	38,6	-0,5		div.	

° Umrechnung S. 19

Methoden:

AQ = AgraQuant, RomerLabs

ES = ELISA-Systems

IG = Ingezim ELISA, Ingenasa

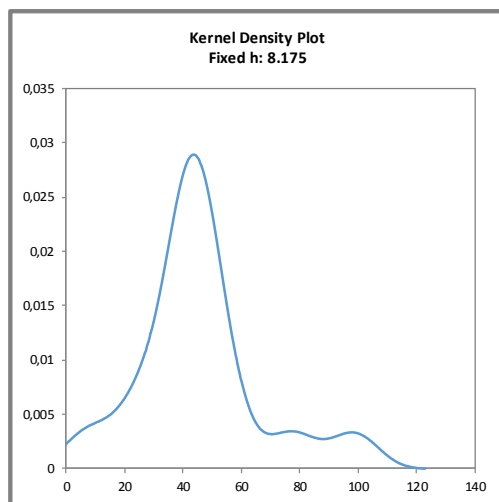
IL = Immunolab

MI = Morinaga Institute ELISA

RS-F= Ridascreen® Fast, R-Biopharm

VT = Veratox, Neogen

div = keine genaue Angabe / andere Methode

**Abb. / Fig. 11:**Kerndichte-Schätzung aller ELISA-Ergebnisse (mit $h = 0,75 \times \sigma_{pt}$ von X_{ptALL})Kernel density plot of all ELISA results (with $h = 0,75 \times \sigma_{pt}$ of X_{ptALL})**Anmerkung:**

Die Kerndichte-Schätzung zeigt annähernd eine Normalverteilung der Ergebnisse mit einer Schulter bei < 10 mg/kg (Methode RS-F) und zwei Nebenpeaks bei > 70 mg/kg (Methode AQ und IL).

Kenndaten: Quantitative Auswertung ELISA 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	15	7
Anzahl der Ausreißer	1	0
Mittelwert	45,6	37,5
Median	43,4	42,0
Robuster Mittelwert (X_{pt})	43,5	38,2
Robuste Standardabweichung (S^*)	14,4	17,5
<i>Zielkenndaten:</i>		
Zielstandardabweichung σ_{pt}	10,9	9,55
Untere Grenze des Zielbereichs	21,8	19,1
Obere Grenze des Zielbereichs	65,3	57,3
Quotient S^*/σ_{pt}	1,3	1,8
Standardunsicherheit $U(X_{pt})$	4,65	8,28
Quotient $U(X_{pt})/\sigma_{pt}$	0,43	0,87
Ergebnisse im Zielbereich	12	6
Prozent im Zielbereich	80	86

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 zeigten 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 Vergleichstandardabweichung 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 95% bzw. 84% vom Zusatzniveau von Casein zur Dotierungsniveauprobe innerhalb der relevanten Anforderungen für die eingesetzten Methoden (s. 3.4.3 und "Wiederfindungsraten für Casein").

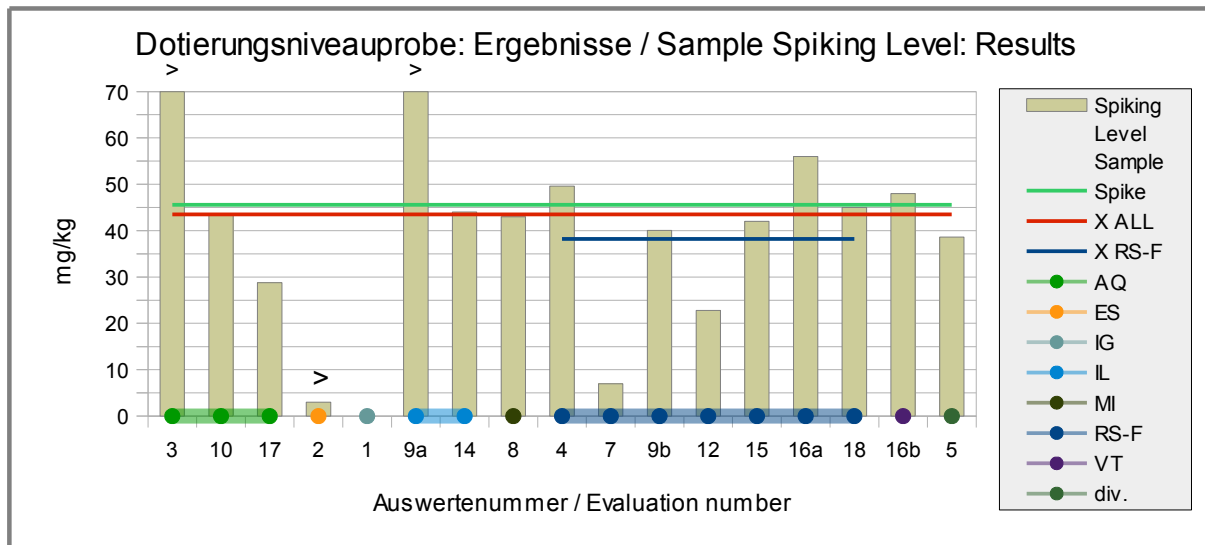


Abb./Fig. 12: ELISA-Ergebnisse Casein
 grüne Linie = Zusatzniveau (Spike)
 rote Linie = robuster Mittelwert aller Ergebnisse
 blaue Linie = robuster Mittelwert Ergebnisse Methode RS-F
 runde Symbole = Zuordnung der Methoden (s. Legende)

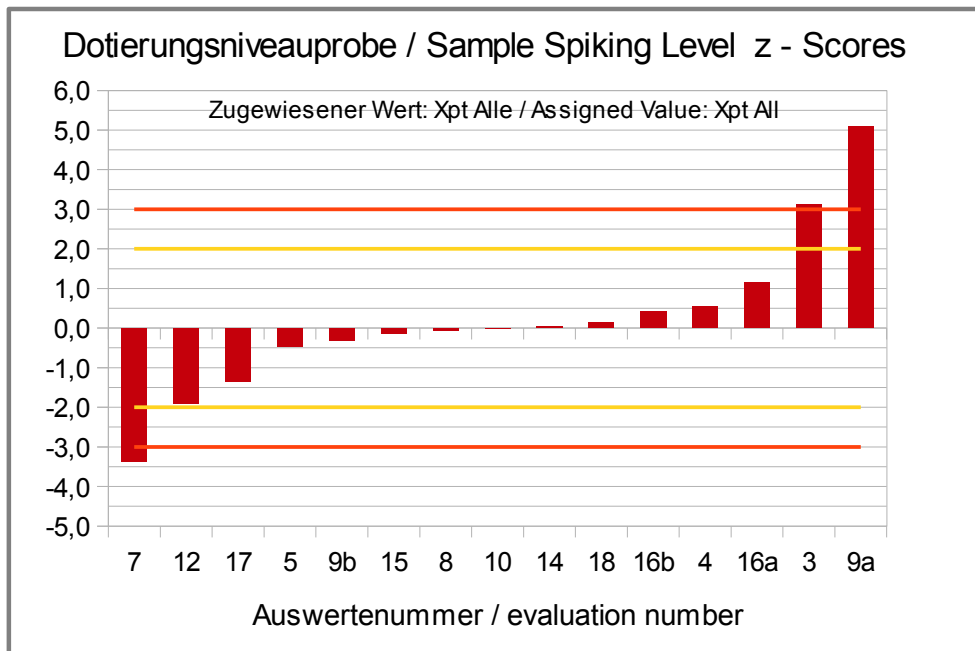


Abb./Fig. 13: z-Scores (ELISA-Ergebnisse Casein) Zugewiesener Wert: robuster Mittelwert aller Ergebnisse

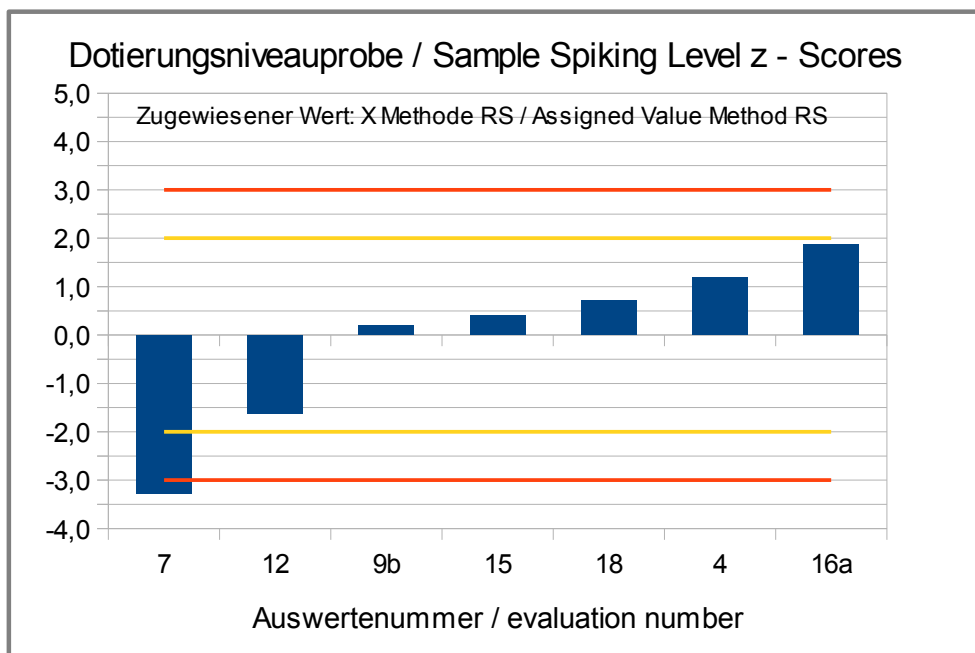


Abb./Fig. 14:

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

**Wiederfindungsraten ELISA für Casein:
Dotierungsniveauprobe und Probe A**

Auswertenummer	Dotierungsniveauprobe	Wiederfindungsrate*	Probe A	Wiederfindungsrate*	Methode	Hinweis
	[mg/kg]	[%]	[mg/kg]	[%]		
3	77,5	170	102	219	AQ	
10	43,4	95	45,4	98	AQ	
17	28,8	63	31,5	68	AQ	
2	>8		>10		ES	Ergebnis umgerechnet °
1			32,0	69	IG	
9a	98,9	217	136	292	IL	
14	44,0	96	36,0	77	IL	
8	43,0	94	46,0	99	MI	
4	49,6	109	10,0	22	RS-F	
7	7,00	15	12,9	28	RS-F	
9b	40,1	88	42,9	92	RS-F	
12	22,8	50	30,9	66	RS-F	
15	42,0	92	49,7	107	RS-F	
16a	56,0	123	44,0	95	RS-F	
18	45,0	99	38,0	82	RS-F	
16b	48,0	105	46,0	99	VT	
5	38,6	85	31,3	67	div.	

° Umrechnung S. 19

AB**	50-150 %	AB**	50-150 %
Anzahl im AB	12	Anzahl im AB	12
Prozent im AB	80	Prozent im AB	75

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

** Akzeptanzbereich der AOAC für Allergen-ELISAs

Methoden:

AQ = AgraQuant, RomerLabs

ES = ELISA-Systeme

IG = Ingezim ELISA, Ingenasa

IL = Immunolab

MI = Morinaga Institute ELISA

RS-F = Ridascreen® Fast, R-Biopharm

VT = Veratox, Neogen

div = keine genaue Angabe / andere Methode

Anmerkung:

80% (12) der Teilnehmer haben mit der Dotierungsniveauprobe mittels ELISA eine Wiederfindungsrate im Bereich der AOAC-Anforderung von 50-150% erhalten. Für die dotierte Lebensmittelmatrix-Probe A lagen 75% (12) der Wiederfindungsraten in diesem Akzeptanzbereich.

4.2.2 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		
4	positiv	10,9	negativ	negativ	2/2 (100%)	RS-F	
12	positiv	49,9	negativ	<2,5	2/2 (100%)	RS-F	
15	positiv	76,2	negativ	<2,5	2/2 (100%)	RS-F	
5	positiv	39,1	negativ	<2,5	2/2 (100%)	div.	

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

Methoden:

RS-F= Ridascreeen® Fast, R-Biopharm
div = keine genaue Angabe / andere Methode

Anmerkung:

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

Quantitative Auswertung ELISA: Probe A

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

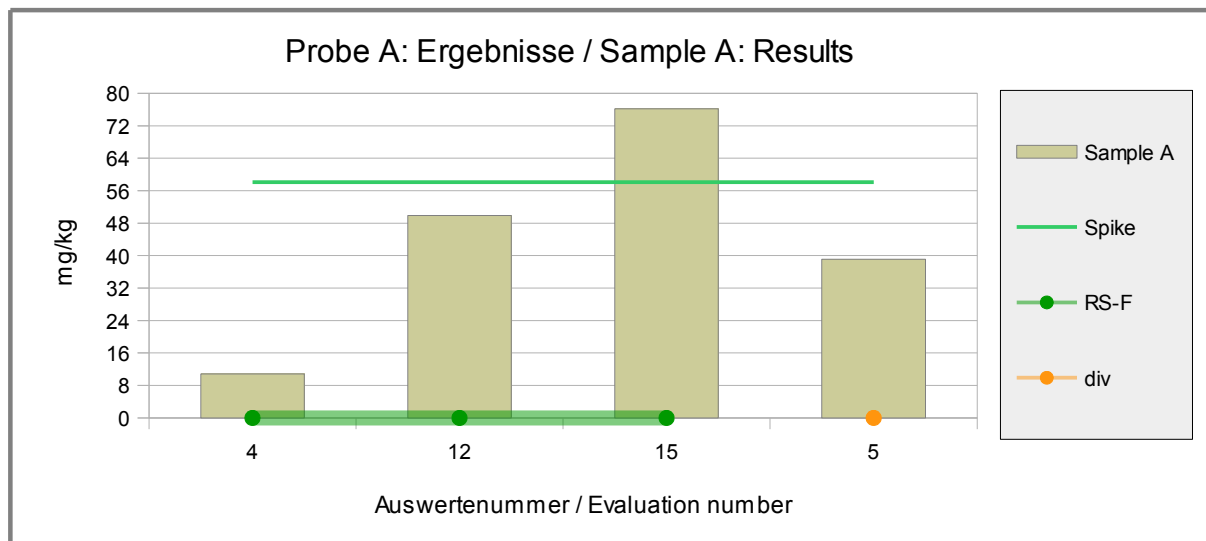


Abb./Fig. 15: ELISA-Ergebnisse Milch (als Milchprotein)

grüne Linie = Zusatzniveau (Spike)

runde Symbole = Zuordnung der Methoden (s. Legende)

Quantitative Auswertung der Ergebnisse: Dotierungsniveauprobe

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

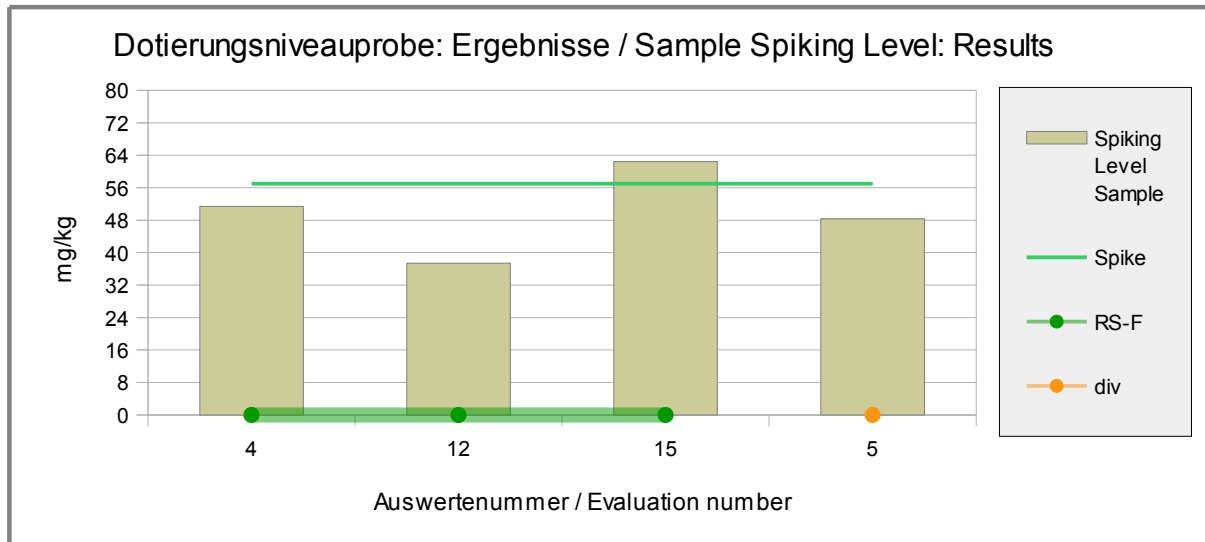


Abb./Fig. 16: ELISA-Ergebnisse Milch (als Milchprotein)
 grüne Linie = Zusatzniveau (Spike)
 runde Symbole = Zuordnung der Methoden (s. Legende)

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

Auswertenummer	Dotierungsniveauprobe	Wiederfindungsrate*	Probe A	Wiederfindungsrate*	Methode	Hinweis
	[mg/kg]	[%]	[mg/kg]	[%]		
4	51,4	90	10,9	19	RS-F	
12	37,4	66	49,9	86	RS-F	
15	62,4	110	76,2	131	RS-F	
5	48,3	85	39,1	67	div.	

AB**	50-150 %	AB**	50-150 %
Anzahl im AB	4	Anzahl im AB	3
Prozent im AB	100	Prozent im AB	75

Methoden:

RS-F= Ridascreen® Fast, R-Biopharm

div = keine genaue Angabe / andere Methode

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

** Akzeptanzbereich der AOAC für Allergen-ELISAs

Anmerkung:

100% (4) der Teilnehmer haben mit der Dotierungsniveauprobe mittels ELISA eine Wiederfindungsrate im Bereich der AOAC-Anforderung von 50-150% erhalten. Für die dotierte Lebensmittelmatrix-Probe A lagen 75% (3) der Wiederfindungsraten in diesem Akzeptanzbereich.

4.3 Vergleichsuntersuchung Weizen (Gluten / Weizen)

4.3.1 ELISA-Ergebnisse: Gluten

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		
14	positiv	102	negativ	< 4	2/2 (100%)	IL	
1	positiv	81,0	negativ	<5	2/2 (100%)	RS	
2	positiv	>80	negativ	<5	2/2 (100%)	RS	
3	positiv	94,5	negativ		2/2 (100%)	RS	
4	positiv	78,3	negativ	negativ	2/2 (100%)	RS	
5	positiv	152	negativ	<4,0	2/2 (100%)	RS	
6	positiv	86,0	negativ	< 5,0	2/2 (100%)	RS	
7	positiv	130	positiv	< 10	1/2 (50%)	RS	
8	positiv	89,0	negativ	<5	2/2 (100%)	RS	
9	positiv	107	negativ	< 5,0	2/2 (100%)	RS	
10	positiv	52,6	positiv	<5	1/2 (50%)	RS	
12	positiv	86,4	negativ	<5,0	2/2 (100%)	RS	
13	positiv	72,4	negativ	<5	2/2 (100%)	RS	
15	positiv	75,9	negativ	<5	2/2 (100%)	RS	
16	positiv	65,0	negativ		2/2 (100%)	RS	
17	positiv	55,0	negativ	<5	2/2 (100%)	RS	
18	positiv	71,0	negativ		2/2 (100%)	RS	

	Probe A	Probe B
Anzahl positiv	17	2
Anzahl negativ	0	15
Prozent positiv	100	12
Prozent negativ	0	88
Konsenswert	positiv	negativ

Methoden:

IL = Immunolab

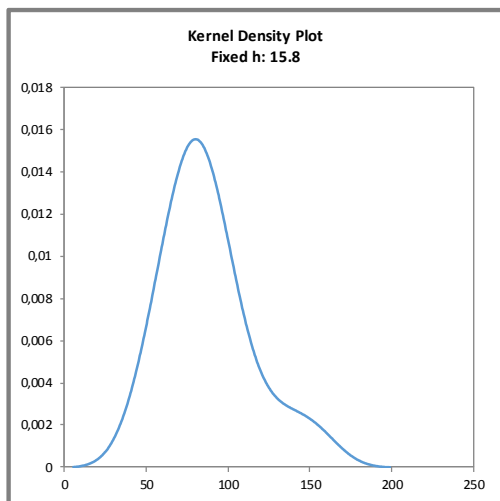
RS = Ridascreen®, R-Biopharm

Anmerkung:

Die Konsenswerte stehen in qualitativer Übereinstimmung mit der Dotierung von Probe A. Zwei positive Ergebnisse jeweils unterhalb der Bestimmungsgrenzen wurden für Probe B mit der Methode RS erhalten.

Quantitative Auswertung ELISA: Probe A

Auswertenummer	Gluten [mg/kg]	z-Score Xpt _{ALL}	z-Score Xpt _{RS}	Methode	Hinweis
14	102	0,8		IL	
1	81,0	-0,2	-0,1	RS	
2	>80			RS	
3	94,5	0,5	0,6	RS	
4	78,3	-0,3	-0,2	RS	
5	152	3,2	3,3	RS	Ausreißer XRS
6	86,0	0,1	0,1	RS	
7	130	2,2	2,3	RS	
8	89,0	0,2	0,3	RS	
9	107	1,0	1,1	RS	
10	52,6	-1,5	-1,5	RS	
12	86,4	0,1	0,2	RS	
13	72,4	-0,6	-0,5	RS	
15	75,9	-0,4	-0,3	RS	
16	65,0	-0,9	-0,9	RS	
17	55,0	-1,4	-1,4	RS	
18	71,0	-0,6	-0,6	RS	



Methoden:

IL = Immunolab

RS = Ridascreen®, R-Biopharm

Abb. / Fig. 17:

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 der Ergebnisse mit einer Schulter bei ca. 150 mg/kg, die auf einen Ausreißer zurückgeht.

Kenndaten: Quantitative Auswertung ELISA Gluten

Probe A

Kenndaten	Alle Ergebnisse [mg/kg]	Methode RS [mg/kg]
Zugewiesener Wert (X_{pt})	X_{pt}^{ALL}	$X_{pt}^{METHOD RS}$
Anzahl der Messergebnisse	16	15
Anzahl der Ausreißer	1	1
Mittelwert	87,4	86,4
Median	83,5	81,0
Robuster Mittelwert (X_{pt})	84,5	83,1
Robuste Standardabweichung (S^*)	22,6	22,1
<i>Zielkenndaten:</i>		
Zielstandardabweichung σ_{pt}	21,1	20,8
Untere Grenze des Zielbereichs	42,3	41,5
Obere Grenze des Zielbereichs	127	125
Quotient S^*/σ_{pt}	1,1	1,06
Standardunsicherheit $U(X_{pt})$	7,05	7,1
Quotient $U(X_{pt})/\sigma_{pt}$	0,33	0,34
Ergebnisse im Zielbereich	14	13
Prozent im Zielbereich	88	87

Methode:

RS = R-Biopharm, Ridascreen®

Anmerkungen zu den Kenndaten und Vergleich der Bezugswerte:

Die Kerndichte-Schätzung zeigte keine eindeutigen methodenabhängigen Unterschiede.

Die Auswertungen der Ergebnisse aller Methoden und von Methode RS zeigten eine normale bis geringe Variabilität der Ergebnisse. Die Quotienten S^*/σ_{pt} lagen jeweils unter 2,0. Die robuste Standardabweichung liegt im Bereich von etablierten Werten für die Wiederhol- und Vergleichstandardabweichung 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 150% bzw. 147% vom Zusatzniveau von Gluten zu Probe A, innerhalb der relevanten Anforderungen für die eingesetzten Methoden (s. 3.4.3 und "Wiederfindungsraten für Gluten").

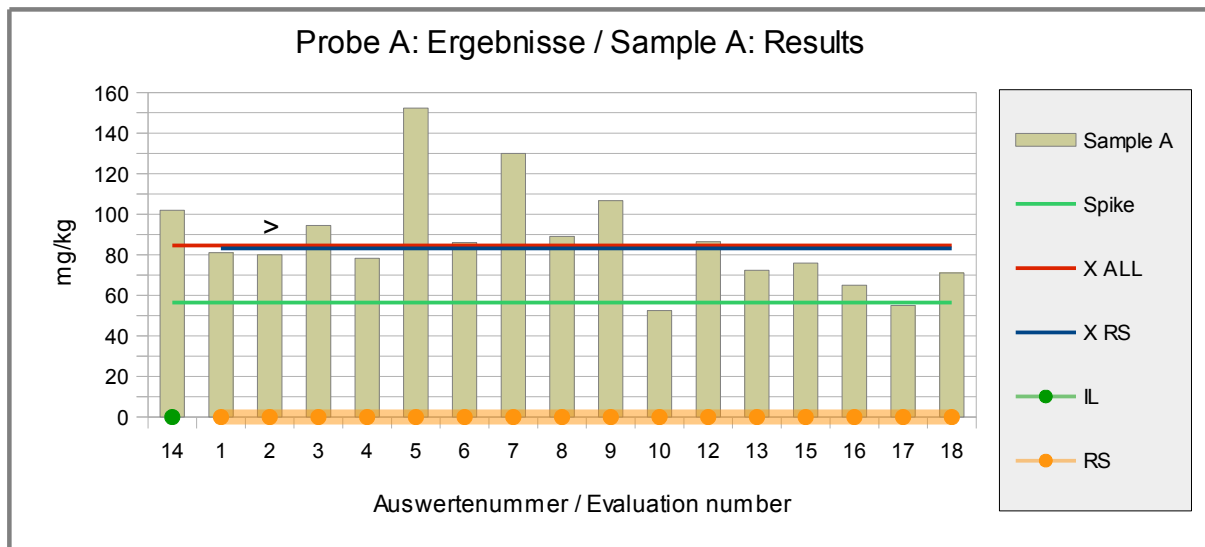


Abb./Fig. 18: ELISA-Ergebnisse Gluten
 grüne Linie = Zusatzniveau (Spike)
 rote Linie = robuster Mittelwert aller Ergebnisse
 blaue Linie = robuster Mittelwert Ergebnisse Methode RS
 runde Symbole = Zuordnung der Methoden (s. Legende)

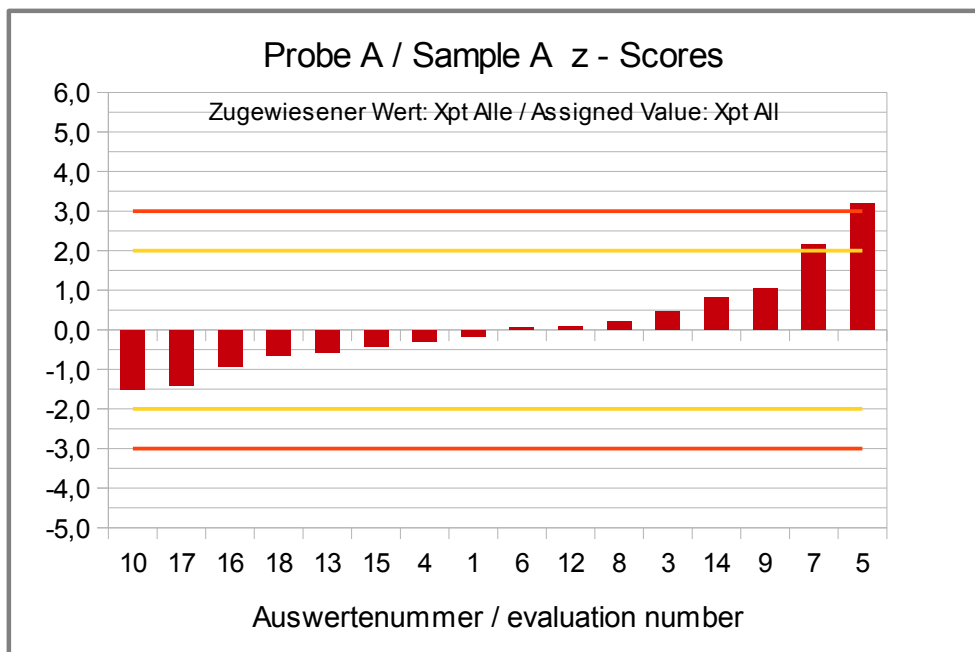


Abb./Fig. 19: z-Scores (ELISA-Ergebnisse Gluten) Zugewiesener Wert: robuster Mittelwert aller Ergebnisse

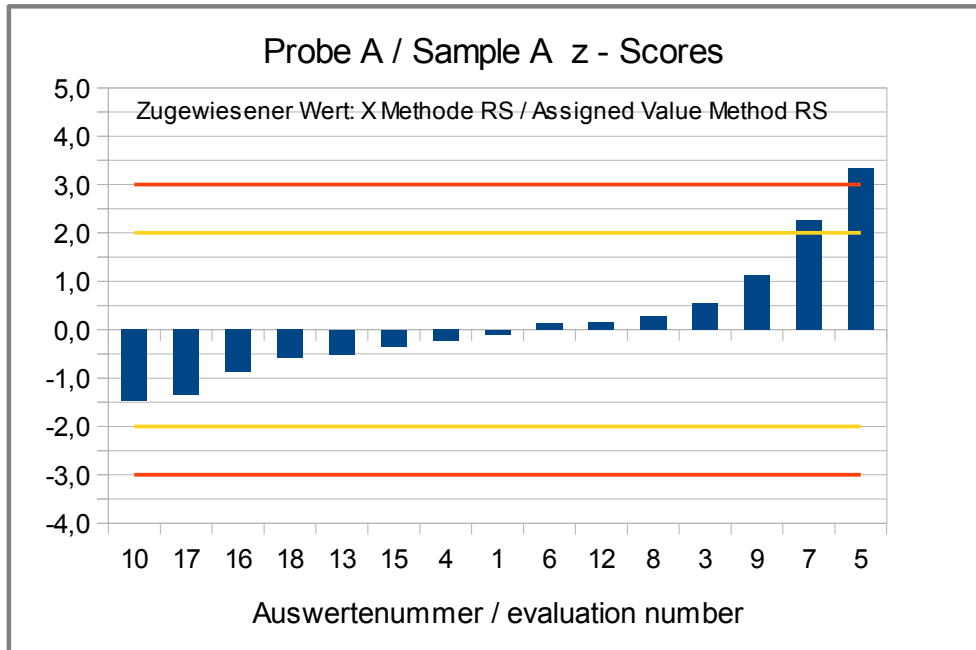
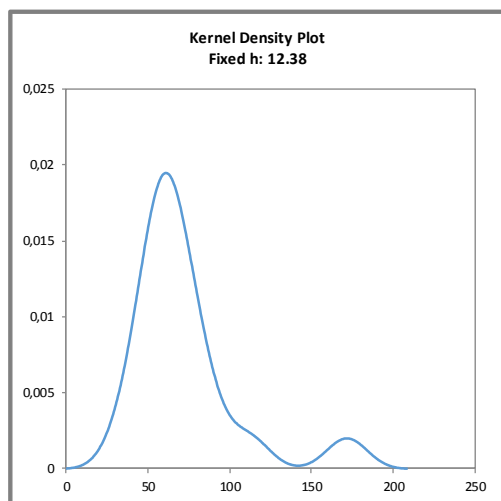


Abb./Fig. 20:

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

Quantitative Auswertung ELISA: Dotierungsniveauprobe

Auswertenummer	Gluten [mg/kg]	z-Score X _{pt,ALL}	z-Score X _{pt,RS}	Methode	Hinweis
14	112	2,8		IL	
1				RS	
2	57,0	-0,6	-0,4	RS	
3	58,7	-0,5	-0,3	RS	
4	76,2	0,6	0,8	RS	
5	172	6,4	6,7	RS	Ausreißer Xrs
6	67,0	0,0	0,2	RS	
7	80,0	0,8	1,0	RS	
8	62,0	-0,3	-0,1	RS	
9	87,5	1,3	1,5	RS	
10	47,2	-1,1	-1,1	RS	
12	54,9	-0,7	-0,6	RS	
13	64,3	-0,1	0,0	RS	
15	49,1	-1,0	-0,9	RS	
16	69,0	0,2	0,3	RS	
17	36,0	-1,8	-1,8	RS	
18	59,5	-0,4	-0,3	RS	



Methoden:

IL = Immunolab

RS = Ridascreen®, R-Biopharm

Abb. / Fig. 21:

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 und einem Nebenpeak bei > 100 mg/kg, welche auf zwei Ergebnisse oberhalb des Zielbereichs zurück zu führen sind.

Kenndaten: Quantitative Auswertung ELISA Gluten**Dotierungsniveauprobe**

Kenndaten	Alle Ergebnisse [mg/kg]	Methode RS [mg/kg]
Zugewiesener Wert (X_{pt})	X_{pt}_{ALL}	$X_{pt}_{METHOD\ RS-F}$
Anzahl der Messergebnisse	16	15
Anzahl der Ausreißer	1	1
Mittelwert	72,0	69,3
Median	63,2	62,0
Robuster Mittelwert (X_{pt})	66,2	64,0
Robuste Standardabweichung (S^*)	18,8	16,2
<i>Zielkenndaten:</i>		
Zielstandardabweichung σ_{pt}	16,5	16,0
Untere Grenze des Zielbereichs	33,1	32,0
Obere Grenze des Zielbereichs	99,3	96,0
Quotient S^*/σ_{pt}	1,1	1,0
Standardunsicherheit $U(X_{pt})$	5,86	5,22
Quotient $U(X_{pt})/\sigma_{pt}$	0,35	0,33
Ergebnisse im Zielbereich	14	14
Prozent im Zielbereich	88	93

Methoden:

RS= R-Biopharm, Ridascreen®

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 zeigten jeweils eine normale Variabilität. Die Quotienten S^*/σ_{pt} lagen unter deutlich unter 2,0. Die robusten Standardabweichungen liegen im Bereich von etablierten Werten für die Wiederhol- und Vergleichstandardabweichung 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 138% bzw. 134% vom Zusatzniveau von Gluten zur Dotierungsniveauprobe innerhalb der relevanten Anforderungen für die eingesetzten Methoden (s. 3.4.3 und "Wiederfindungsraten für Gluten").

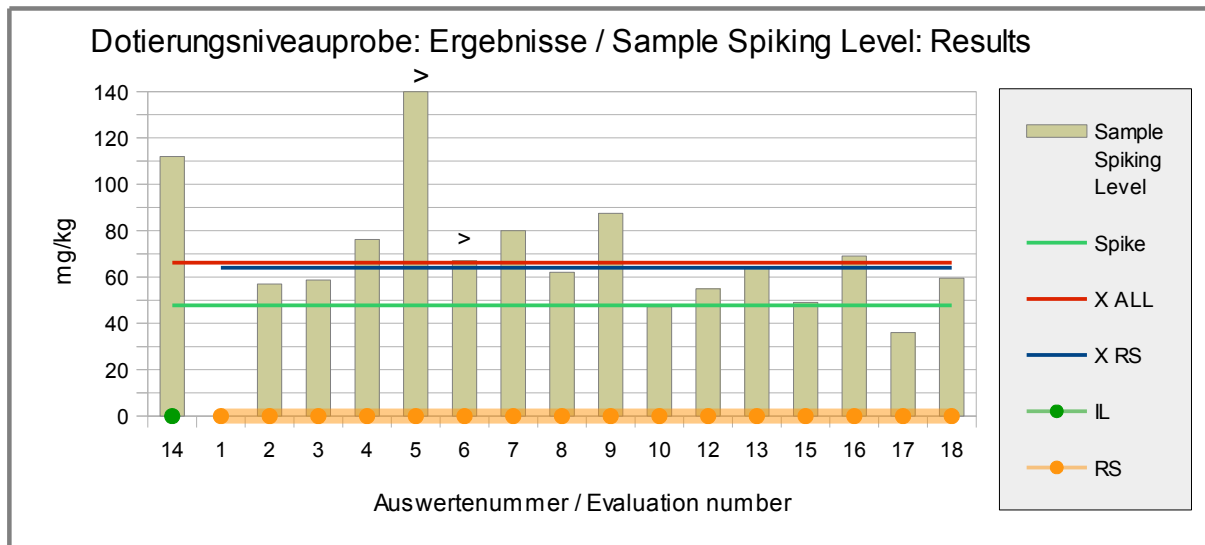


Abb./Fig. 22: ELISA-Ergebnisse Gluten
 grüne Linie = Zusatzniveau (Spike)
 rote Linie = robuster Mittelwert aller Ergebnisse
 blaue Linie = robuster Mittelwert Ergebnisse Methode RS
 runde Symbole = Zuordnung der Methoden (s. Legende)

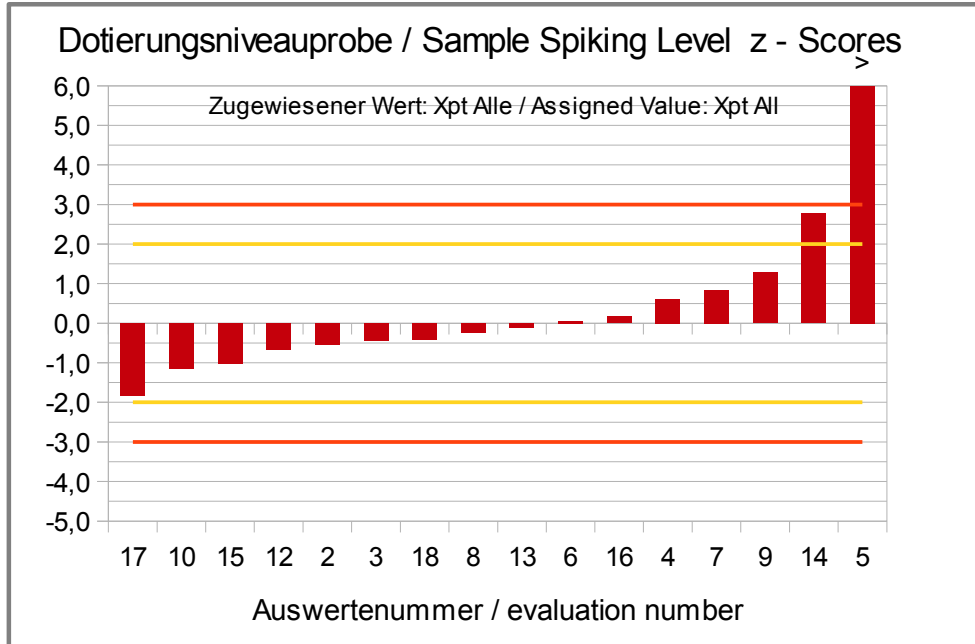


Abb./Fig. 23: z-Scores (ELISA-Ergebnisse Gluten) Zugewiesener Wert: robuster Mittelwert aller Ergebnisse

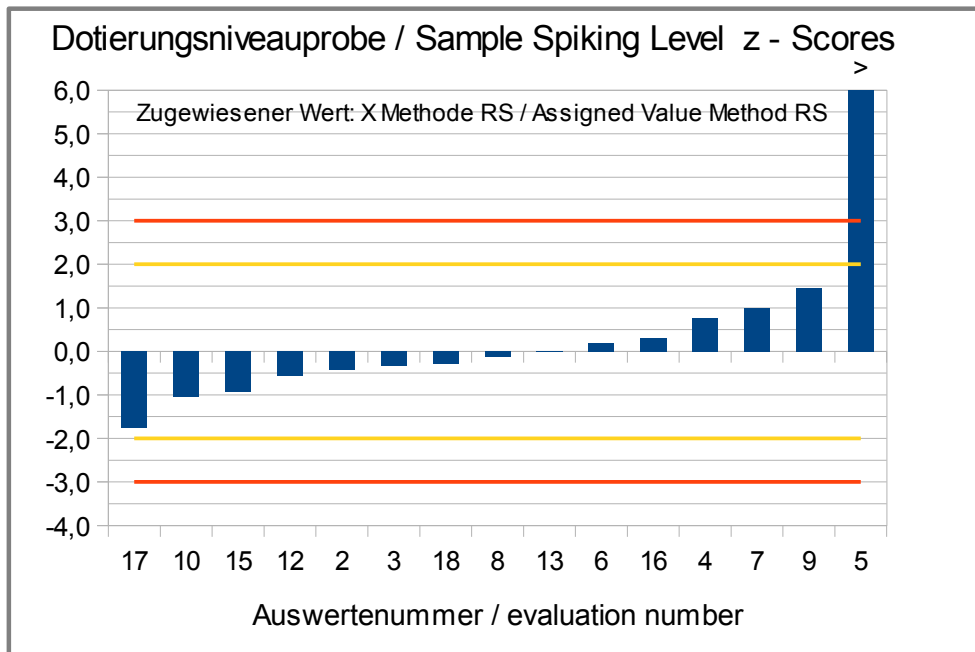


Abb./Fig. 24:

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

**Wiederfindungsraten ELISA für Gluten:
Dotierungsniveauprobe und Probe A**

Auswertenummer	Dotierungsniveauprobe	Wiederfindungsrate*	Probe A	Wiederfindungsrate*	Methode	Hinweis
	[mg/kg]	[%]	[mg/kg]	[%]		
14	112	234	102	181	IL	
1			81,0	144	RS	
2	57,0	119	>80		RS	
3	58,7	123	94,5	168	RS	
4	76,2	159	78,3	139	RS	
5	172	359	152	270	RS	
6	67,0	140	86,0	152	RS	
7	80,0	167	130	230	RS	
8	62,0	130	89,0	158	RS	
9	87,5	183	107	189	RS	
10	47,2	99	52,6	93	RS	
12	54,9	115	86,4	153	RS	
13	64,3	135	72,4	128	RS	
15	49,1	103	75,9	135	RS	
16	69,0	144	65,0	115	RS	
17	36,0	75	55,0	98	RS	
18	59,5	124	71,0	126	RS	

AB**	50-150 %	AB**	50-150 %
Anzahl im AB	11	Anzahl im AB	8
Prozent im AB	69	Prozent im AB	50

Methoden:

IL = Immunolab

RS = Ridascreen®, R-Biopharm

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

** Akzeptanzbereich der AOAC für Allergen-ELISAs

Anmerkung:

69% (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 A lagen 50% (8) der Wiederfindungsraten in diesem Akzeptanzbereich.

4.3.2 PCR-Ergebnisse: Weizen

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		
9	positiv	107	positiv	< 1,0	2/2 (100%)	SFA-Q	
7	positiv		negativ		2/2 (100%)	div.	

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

Methoden:

SFA-Q = Sure Food Allergen Quant, R-Biopharm / Congen
 div = keine genaue Angabe / andere Methode

Anmerkung:

Der Konsenswert für Probe A steht in qualitativer Übereinstimmung mit der Dotierung von Probe A. Für Probe B wurde ein positive Ergebnis mit Methode SFA-Q erhalten, sodass kein Konsenswert erhalten wurde.

Quantitative Auswertung ELISA: Probe A

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

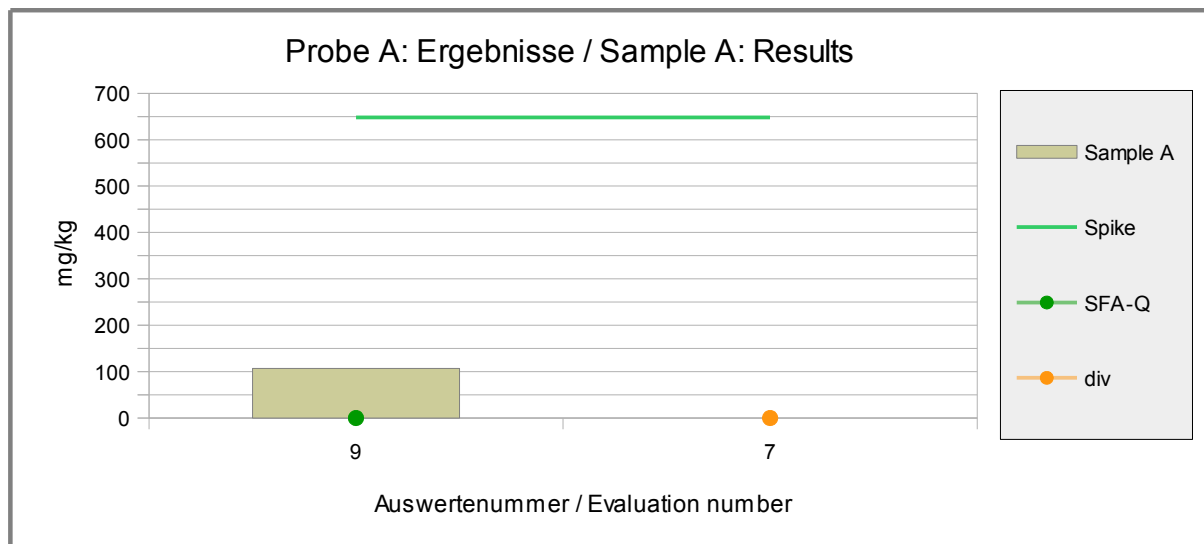


Abb./Fig. 25: PCR-Ergebnisse Weizen
grüne Linie = Zusatzniveau (Spike)
runde Symbole = Zuordnung der Methoden (s. Legende)

Quantitative Auswertung der Ergebnisse: Dotierungsniveauprobe

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

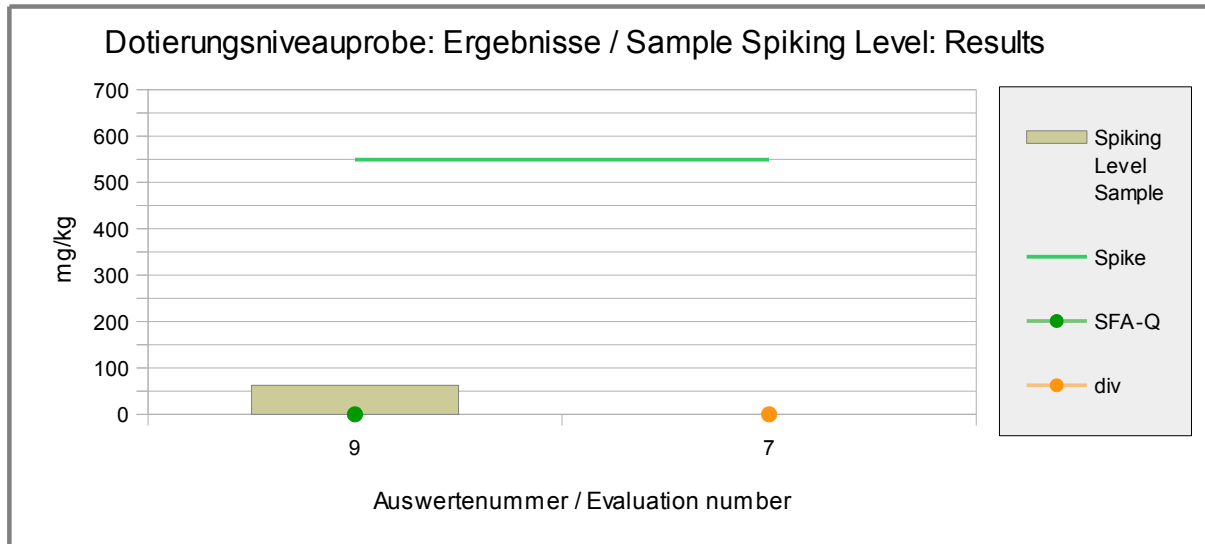


Abb./Fig. 26: PCR-Ergebnisse Weizen
 grüne Linie = Zusatzniveau (Spike)
 runde Symbole = Zuordnung der Methoden (s. Legende)

**Wiederfindungsraten PCR für Weizen (als Weizenmehl):
Dotierungsniveauprobe und Probe A**

Auswertenummer	Dotierungsniveauprobe	Wiederfindungsrate*	Probe A	Wiederfindungsrate*	Methode	Hinweis
	[mg/kg]	[%]	[mg/kg]	[%]		
9	62,9	10	107	17	SFA-Q	
7					div.	

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

Methoden:

SFA-Q = Sure Food Allergen Quant, R-Biopharm / Congen
div = keine genaue Angabe / andere Methode

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

** Akzeptanzbereich der AOAC für Allergen-ELISAs

Anmerkung:

Ein Teilnehmer hat sowohl mit der Dotierungsniveauprobe als auch mit der Lebensmittelmatrix-Probe A mittels PCR Wiederfindungsraten unterhalb des Bereichs der AOAC-Anforderung von 50-150% erhalten.

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: β -Lactoglobulin

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
BK	3	31.03.	positiv	7,8	negativ		positiv	9,5	beta-Lactoglobulin	BioKits BLG Assay Kit, Neogen
BK	17	09.03.17	positiv	13	negativ	<5	positiv	15	beta-Lactoglobulin	BLG assay kit - Biokits
ES	2	07.03.17	positiv	>1	negativ	<0,1	positiv	>1	beta-Lactoglobulin	ELISA Systems Beta-Lactoglobulin ESMRDBLG-48
ES	18	12.04.17	positiv	6,7	negativ		positiv	5,8	beta-Lactoglobulin	ELISA Systems Beta-Lactoglobulin ESMRDBLG-48
IG	1		positiv	2,3	negativ	<0,5	-		beta-Lactoglobulin	Ingenzim Blactoglobulin(ingenasa)
IL	14		positiv	1,6	negativ	< 0,01	positiv	1,7	beta-Lactoglobulin	Immunolab Beta-Lactoglobulin ELISA
MI	8	29.03.	positiv	3,4	negativ	<0,031	positiv	3,4	beta-Lactoglobulin	Morinaga β Lac ELISA Kit II
RS	4	15.03.17	-	0,608	-	negativ	-	1,752	beta-Lactoglobulin	Ridascreen® β -Lactoglobulin R4901, R-Biopharm
RS	11	15.03.17	positiv	3,01	negativ	<1,00	positiv	2,84	bitte auswählen!	Ridascreen® β -Lactoglobulin R4901, R-Biopharm
RS	13		-	<5	-	<5	-	<5	beta-Lactoglobulin	Ridascreen® β -Lactoglobulin R4901, R-Biopharm
RS	16	13.04.17	nachgewiesen	1,4	nicht nachgewiesen		nachgewiesen	1,4	Protein	Ridascreen Betalactoglobulin R4901
RS-F	7	30.04.17	positiv	2,1	negativ	< 0,5	positiv	1,5	beta-Lactoglobulin	Ridascreen® FAST β -Lactoglobulin R4902, R-Biopharm
RS-F	12	08.03.17	positiv	2,37	negativ	<0,5	positiv	2,23	beta-Lactoglobulin	Ridascreen® FAST β -Lactoglobulin R4902, R-Biopharm
RS-F	15	09.03.17	positiv	2,37	negativ	<0,5	positiv	2,78	beta-Lactoglobulin	Ridascreen® FAST β -Lactoglobulin R4902, R-Biopharm

Fortsetzung ELISA β -Lactoglobulin:

Meth. Abk.	Auswertenummer	Spezifität	Hinweise zur Methode (Extraktion und Bestimmung)	Methode akkreditiert nach ISO/IEC 17025	Sonstige Hinweise
		Antikörper	z.B. Extraktionslösung / Zeit / Temperatur	ja/nein	
BK	3	beta-Lactoglobulin		nein	
BK	17			ja	
ES	2			nein	
ES	18			ja	
IG	1	Anti Betalactoglobulin Antikörper	Kit Extraktionspuffer	ja	Operator: Poletti Alessia Methode MI 22 rev04 2015
IL	14	polyklonal			Umrechnungsfaktor auf Magermilchpulver 66,7 (entspricht Probe A 107 mg/kg, Dot.probe 113 mg/kg)*
MI	8	β Lactoglobulin	nach Herstellerangaben, Overnight extraction method	ja	
RS	4	spezifisch f. β - Lactoglobulin von Kuh, Schaf, Ziege, Büffel	Extraktionslösung 100 °C, Extraktor 2 60 °C	ja	
RS	11	Anti-BLG	Wasch-Puffer, 10 Minuten, 50°C	nein	-
RS	13		<5		<5;<5;<5 mg/kg A
RS	16	Betalactoglobulin	gemäß Herstelleranleitung	ja	
RS-F	7			nein	
RS-F	12		nach Testanweisung	nein	
RS-F	15	laut Herstelleranleitung	laut Herstelleranleitung	ja	

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	3	30.03.	positiv	102	negativ		positiv	77,5	Casein	Test-Kit + Anbieter AgraQuant Casein COKAL 1200, RomerLabs
AQ	10		positiv	45,35	negativ	<1	positiv	43,42	Casein	AgraQuant Casein COKAL 1200, RomerLabs
AQ	17	05.04.17	positiv	31,48	negativ	<1.5	positiv	28,8	Casein	AgraQuant Casein COKAL 1200, RomerLabs
ES	2	07.03.17	positiv	>10	negativ	<1	positiv	>10	Magermilchpulver	ELISA Systems Casein ESCASPRD-48
IG	1		positiv	32	negativ	<1	-		Casein	Ingenzim casein(Ingenasa)
IL	9	24.03.	positiv	135,87	negativ	< 0,2	positiv	98,87	Casein	Immunolab Casein ELISA
IL	14		positiv	36	negativ	< 0,2	positiv	44	Casein	Immunolab Casein ELISA
MI	8	07.04.	positiv	46	negativ	<0,25	positiv	43	Casein	Morinaga Casein ELISA Kit II
RS-F	4	15.03.17	-	10,04	-	negativ	-	49,6	Casein	Ridascreen® FAST Casein R4612, R-Biopharm
RS-F	7	28.04.17	positiv	12,9	negativ	< 0,5	positiv	7	Casein	Ridascreen® FAST Casein R4612, R-Biopharm
RS-F	9	28.03.	positiv	42,94	negativ	< 0,5	positiv	40,06	Casein	Ridascreen® FAST Casein R4612, R-Biopharm
RS-F	12	02.03.17	positiv	30,91	negativ	<2,5	positiv	22,78	Casein	Ridascreen® FAST Casein R4612, R-Biopharm
RS-F	15	11.03.17	positiv	49,65	negativ	<2.5	positiv	41,99	Casein	Ridascreen® FAST Casein R4612, R-Biopharm
RS-F	16a	13.04.17	nachgewiesen	44	nicht nachgewiesen		nachgewiesen	56	Protein	Ridascreen FAST Casein R4612
RS-F	18	12.04.17	positiv	38	negativ		positiv	45	Casein	Ridascreen® FAST Casein R4612, R-Biopharm
VT	16b	13.04.17	nachgewiesen	46	nicht nachgewiesen		nachgewiesen	48	protein	Neogen Veratox Casein
div.	5	06.03.17	-	31,3	-	<2,0	-	38,6	Casein	andere bitte angeben!

Fortsetzung ELISA Casein:

Meth. Abk.	Auswertenummer	Spezifität	Hinweise zur Methode (Extraktion und Bestimmung)	Methode akkreditiert nach ISO/IEC 17025	Sonstige Hinweise
		Antikörper	z.B. Extraktionslösung / Zeit / Temperatur	ja/nein	
AQ	3	Casein		nein	
AQ	10		Einwaage: 0,5 g, Extraktion: Extraktionspuffer (1+4 verdünnt), 15 min bei 60°C (alle 2 min von Hand geschüttelt), Verdünnung: 1:25, ELISA-Reader: Multiskan FC	nein	dk
AQ	17			ja	
ES	2			nein	
IG	1	Anti Casein Antikörper	Kit Extraktionspuffer	ja	Mitarbeiter: P.A. Methode: MI 23 rev04 2015
IL	9		nach Herstelleranleitung		
IL	14	polyklonal			Umrechnungsfaktor auf Magermilchpulver 3,6 (entspricht Probe A 130 mg/kg, Dot.probe 158 mg/kg)*
MI	8	Casein	nach Herstellerangaben, Übernacht Extraktionsmethode	ja	
RS-F	4	spezifisch f. Caseine und β -Lactoglobuline von Kuh, Schaf, Ziege, Büffel	Extraktionslösung 100 °C, Extraktor 2 60 °C	ja	
RS-F	7			nein	
RS-F	9		nach Herstelleranleitung mit Extraktionspuffer		
RS-F	12		nach Testanweisung	nein	
RS-F	15	laut Testkitanweisung	laut Testkitanweisung	ja	Generelle Extraktionsmethode
RS-F	16a	Casein	Extrahiert mit Extraktionslösung R7098 und Extraktionspuffer.	ja	
RS-F	18			ja	
VT	16b	Casein	gemäß Herstelleranweisung	ja	
div.	5				

5.1.3 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		
RS-F	4	04.04.17	-	10,854	-	negativ	-	51,41	Milchproteine, gesamt	Test-Kit + Anbieter
RS-F	12	08.03.17	positiv	49,88	negativ	<2,5	positiv	37,41	Milchproteine, gesamt	Ridascreen® FAST Milk R4652, R-Biopharm
RS-F	15	09.03.17	positiv	76,15	negativ	<2,5	positiv	62,42	Milchproteine, gesamt	Ridascreen® FAST Milk R4652, R-Biopharm
div.	5	06.03.17	-	39,1	-	<2,5	-	48,3	Milchproteine, gesamt	Bitte auswählen!

Meth. Abk.	Auswertenummer	Spezifität	Hinweise zur Methode (Extraktion und Bestimmung)	Methode akkreditiert nach ISO/IEC 17025	Sonstige Hinweise
		Antikörper	z.B. Extraktionslösung / Zeit / Temperatur	ja/nein	
RS-F	4	spezifisch f. Caseine von Kuh, Schaf, Ziege, Büffel	Extraktionslösung 100 °C, Extraktor 2 60 °C	ja	
RS-F	12		nach Testanweisung	ja	
RS-F	15	laut Testkitanleitung	laut Testkitanleitung	ja	
div.	5				

5.1.4 ELISA: Gluten

Meth. Abk.	Auswertenummer	Datum der Analyse Tag/Monat	Ergebnis Probe A		Ergebnis Probe B		Ergebnis Dotierungsprobe		Quantitatives Ergebnis als z.B. Lebensmittel / Protein	Methode Test-Kit + Anbieter
			qualitativ	mg/kg	qualitativ	mg/kg	qualitativ	mg/kg		
IL	14		positiv	102	negativ	< 4	positiv	112	Gluten	ImmunoLab Gliadin/Gluten ELISA
RS	1		positiv	81	negativ	<5	-		Gluten	Ridascreen® Gliadin R7001, R-Biopharm
RS	2	15.03.17	positiv	>80	negativ	<5	positiv	57	Gluten	Ridascreen® Gliadin R7001, R-Biopharm
RS	3	30.03.	positiv	94,5	negativ		positiv	58,7	Gluten	Ridascreen® Gliadin R7001, R-Biopharm
RS	4	15.03.17	-	78,31	-	negativ	-	76,17	Gluten	Ridascreen® Gliadin R7001, R-Biopharm
RS	5	06.03.17	-	152,3	-	<4,0	-	171,5	Gluten	andere bitte angeben!
RS	6	23.03.17	positiv	86	negativ	< 5,0	positiv	67	Gluten	Ridascreen® Gliadin R7001, R-Biopharm
RS	7	06.04.17	positiv	130	positiv	< 10	positiv	80	Gluten	Ridascreen® Gliadin R7001, R-Biopharm
RS	8	13.03.	positiv	89	negativ	<5	positiv	62	Gluten	Ridascreen® Gliadin R7001, R-Biopharm
RS	9	05.04.	positiv	106,7	negativ	< 5,0	positiv	87,45	Gluten	Ridascreen® Gliadin R7001, R-Biopharm
RS	10		positiv	52,58	positiv	<5	positiv	47,21	Gluten	Ridascreen® Gliadin R7001, R-Biopharm
RS	12	13.03.17	positiv	86,37	negativ	<5,0	positiv	54,92	Gluten	Ridascreen® Gliadin R7001, R-Biopharm
RS	13		-	72,4	-	<5	-	64,3	Bitte auswählen!	Ridascreen® Gliadin R7001, R-Biopharm
RS	15	06.03.17	positiv	75,86	negativ	<5	positiv	49,11	Gluten	Ridascreen® Gliadin R7001, R-Biopharm
RS	16	13.04.17	nachgewiesen	65	nicht nachgewiesen		nachgewiesen	69	Protein	Ridascreen Gliadin R7001
RS	17	17.03.17	positiv	55	negativ	<5	positiv	36	Gluten	Ridascreen® Gliadin R7001, R-Biopharm
RS	18	12.04.17	positiv	71	negativ		positiv	59,5	Gluten	Ridascreen® Gliadin R7001, R-Biopharm

Fortsetzung *ELISA Gluten*:

Meth. Abk.	Auswertenummer	Spezifität	Hinweise zur Methode (Extraktion und Bestimmung)	Methode akkreditiert nach ISO/IEC 17025	Sonstige Hinweise
		Antikörper polyclonal	z.B. Extraktionslösung / Zeit / Temperatur	ja/nein	
IL	14				
RS	1	R-5 Antikörper	Cocktail Lösung	ja	Mitarbeiter: P.A. Method: AOAC 2012.01
RS	2	R5		ja	
RS	3	Gluten		AOAC	
RS	4	spezif. F. Gliadinfraktionen aus Weizen und Prolamine aus Roggen und Gerste	Cocktaillösung bei 50°C, 80% Ethanol bei 20-25 °C	ja	
RS	5				
RS	6	monoclonal R5	80% Ethanol / 1Stunde / Raumtemperatur/	ja	LAB_AR result
RS	7			nein	
RS	8	R5, Prolamine aus Weizen, Roggen und Gerste	nach Herstellerangaben, mit Cocktaillösung	ja	
RS	9		nach Herstelleranleitung		
RS	10		Einwaage: 0,25 g, Extraktion: 2,5 ml Cocktail-Lösung + 7,5 ml Ethanol, 40 min bei 50°C, 60 min Schütteln, Verdünnung 1:500, ELISA-Reader Multiskan FC	nein	ak
RS	12		nach Testanweisung	ja	
RS	13				57,1;>80;>80mg /kg A
RS	15	laut Herstelleranleitung	laut Herstelleranleitung	ja	
RS	16	R5	gemäß Herstelleranleitung	ja	
RS	17			ja	
RS	18			ja	

5.1.5 PCR: Weizen

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-Q	9	23.03.	positiv	107,04	positiv	< 1,0	positiv	62,87	glutenhaltiges Getreide	Sure Food Allergen Quant, R-Biopharm / Congen
div.	7		positiv		negativ		positiv		Bitte auswählen!	Auswahl PCR-Methoden

Meth. Abk.	Auswertenummer	Spezifität	Hinweise zur Methode (Extraktion und Bestimmung)	Methode akkreditiert nach ISO/IEC 17025	Sonstige Hinweise
		Antikörper	z.B. Extraktionslösung / Zeit / Temperatur	ja/nein	
SFA-Q	9		nach Herstelleranleitung, DNA-Extraktion mit SureFood®PREP Advanced, Protokoll 1, Fa. R-Biopharm/Congen		
div.	7				

5.2 Homogenität

5.2.1 Mischungshomogenität vor der Abfüllung

Microtracer Homogenitätstest

DLA 03-2017 Probe A

Gewicht Gesamtprobe	2,59	kg
Microtracer	FSS-rot lake	
Teilchengröße	75 – 300	µm
Gewicht pro Partikel	2,0	µg
Tracerzugabe	52,7	mg/kg

Analysenergebnisse:

Probe	Einwaage [g]	Partikel Anzahl	Partikel [mg/kg]
1	5,00	101	40,4
2	5,00	108	43,2
3	5,00	106	42,4
4	5,00	108	43,2
5	5,00	115	46,0
6	5,00	116	46,4
7	5,00	128	51,2
8	5,00	118	47,2

Poisson-Verteilung

Probenanzahl	8	
Freiheitsgrad	7	
Mittelwert	112,5	Partikel
Standardabweichung	8,49	Partikel
χ ² (CHI-Quadrat)	4,48	
Wahrscheinlichkeit	72	%
Wiederfindungsrate	85	%

Normalverteilung

Probenanzahl	8	
Mittelwert	45,0	mg/kg
Standardabweichung	3,39	mg/kg
rel. Standardabweichung	7,5	%
Horwitz Standardabweichung	9,0	%
HorRat-Wert	0,84	
Wiederfindungsrate	85	%

Microtracer Homogenitätstest

DLA 03-2017 Dotierungsniveauprobe

Gewicht Gesamtprobe	1,01	kg
Microtracer	FSS-rot lake	
Teilchengröße	75 – 300	µm
Gewicht pro Partikel	2,0	µg
Tracerzugabe	62,3	mg/kg

Analysenergebnisse:

Probe	Einwaage [g]	Partikel Anzahl	Partikel [mg/kg]
1	5,00	160	64,0
2	5,00	148	59,2
3	5,00	138	55,2
4	5,00	156	62,4
5	5,00	147	58,8
6	5,00	132	52,8
7	5,00	148	59,2
8	5,00	156	62,4

Poisson-Verteilung

Probenanzahl	8	
Freiheitsgrad	7	
Mittelwert	148,1	Partikel
Standardabweichung	9,48	Partikel
χ ² (CHI-Quadrat)	4,25	
Wahrscheinlichkeit	75	%
Wiederfindungsrate	95	%

Normalverteilung

Probenanzahl	8	
Mittelwert	59,3	mg/kg
Standardabweichung	3,79	mg/kg
rel. Standardabweichung	6,4	%
Horwitz Standardabweichung	8,7	%
HorRat-Wert	0,7	
Wiederfindungsrate	95	%

5.3 Informationen zur Eignungsprüfung (EP)

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

EP-Nummer	DLA 03-2017
EP-Name	Allergene III: β-Lactoglobulin, Casein und Gluten in Kindernahrung
Probenmatrix	Proben A + B: „Glutenfreier“ Getreidebrei (Pulver)/ Zutaten: Hirsevollkornmehl, Naturreismehl, Thiamin, 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: Raumtemperatur (Langzeit 2 - 10°C) Dotierungsniveauprobe: Raumtemperatur
Verwendungszweck	Ausschließlich für Laboruntersuchungen (Qualitätskontrollproben)
Parameter	qualitativ + quantitativ: Milch (β -Lactoglobulin, Casein, DNA), Gluten (Weizenprotein, Weizen-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.
Ergebnisangabe	Es werden für jede Probe A , B und Dotierungsniveauprobe je ein Ergebnis ermittelt. Die Einzelergebnisse sind in die Ergebnisabgabe-Datei einzutragen, bei Mehrfachbestimmungen der Mittelwert.
Einheiten	mg/kg
Anzahl von Stellen	mindestens 2 signifikante Stellen
Ergebnisabgabe	Die Ergebnisabgabe-Datei wird per eMail übermittelt an: pt@dla-lvu.de
Abgabetermin	spätestens 13. April 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
		Deutschland
		ITALIEN
		Deutschland
		SPANIEN
		Deutschland
		SCHWEDEN
		ÖSTERREICH
		Deutschland
		ITALIEN
		BELGIEN
		Deutschland
		GROSSBRITANNIEN
		Deutschland
		NIEDERLANDE
		Deutschland
		SCHWEDEN
		SPANIEN
		Deutschland

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

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

7. Verzeichnis relevanter Literatur

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

- methods
20. Ministry of Health and Welfare, JSM, Japan 2006
 21. Working Group Food Allergens, Abbott et al., Validation Procedures for Quantitative Food Allergen ELISA Methods: Community Guidance and Best Practices JAOAC Int. 93:442-50 (2010)
 22. Working Group on Prolamin Analysis and Toxicity (WGPAT): Méndez et al. Report of a collaborative trial to investigate the performance of the R5 enzyme linked immunoassay to determine gliadin in gluten-free food. Eur J Gastroenterol Hepatol. 17:1053-63 (2005)
 23. DLA Publikation: Performance of ELISA and PCR methods for the determination of allergens in food: an evaluation of six years of proficiency testing for soy (*Glycine max* L.) and wheat gluten (*Triticum aestivum* L.); Scharf et al.; J Agric Food Chem. 61(43):10261-72 (2013)
 24. EFSA (2014) Scientific Opinion on the evaluation of allergenic foods and food ingredients for labelling purposes¹, EFSA Panel on Dietetic Products, Nutrition and Allergies (NDA), European Food Safety Authority (EFSA), Parma, Italy, EFSA Journal 2014;12(11):3894
 25. IRMM, Poms et al.; Inter-laboratory validation study of five different commercial ELISA test kits for determination of peanut residues in cookie and dark chocolate; European Commission, Joint Research Centre, Belgium; GE/R/FSQ/D08/05/2004
 26. Jayasena et al. (2015) Comparison of six commercial ELISA kits for their specificity and sensitivity in detecting different major peanut allergens. J Agric Food Chem. 2015 Feb 18;63(6):1849-55
 27. ASU §64 LFGB L 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 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. ASU §64 LFGB L 08.00-66 Untersuchung von Lebensmitteln - Nachweis und Bestimmung von Weizen (*Triticum* L.) und Roggen (*Secale cereale*) in Brühwurst mittels real-time PCR (2016)

DLA 03/2017 - Allergene III

Alle 18 Teilnehmer haben mindestens ein Ergebnis eingereicht. Die Auswertung erfolgte hinsichtlich der Parameter β -Lactoglobulin, Casein und Gluten für ELISA- (qualitativ und quantitativ). Die Auswertung für Milch (ELISA-Methode) und Weizen (PCR-Methode) erfolgte qualitativ. Zusätzlich wurden für jeden Teilnehmer Wiederfindungsraten für die Dotierungsniveauprobe und die dotierte Probe ermittelt. Details zu den einzelnen Parametern inklusive separater Auswertung nach Testkit-Herstellern sind dem Auswertebereicht zu entnehmen.

10 Teilnehmer hatten ihren Sitz im Europäischen Ausland (Belgien, Großbritannien, Italien, Niederlande, Österreich, Spanien, Schweden).