

Proficiency Tests

**DLA**

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

## **Auswertungs-Bericht**

Laborvergleichsuntersuchung

**DLA 06/2017**

**Allergene VI:**

**Mandel und Pistazie**

**in Brotaufstrich (Kakaocreme)**

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

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

Koordinator der LVU:  
Dr. Matthias Besler-Scharf

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

<p><i>EP-Anbieter PT-Provider</i></p>	<p><b>DLA - Dienstleistung Lebensmittel Analytik GbR</b> Gesellschafter: Dr. Gerhard Wichmann und Dr. Matthias Besler-Scharf</p> <p>Waldemar-Bonsels-Weg 170, 22926 Ahrensburg, Germany</p> <p>Tel. ++49-(0)4532-9183358 Mob. ++49(0)171-1954375 Fax. ++49(0)4102-9944976 eMail. proficiency-testing@dla-lvu.de</p>
<p><i>EP-Nummer PT-Number</i></p>	<p>DLA 06/2017</p>
<p><i>EP-Koordinator PT-Coordinator</i></p>	<p>Dr. Matthias Besler-Scharf</p>
<p><i>Status des EP-Bericht Status of PT-Report</i></p>	<p>Abschlussbericht / Final report (2. Februar 2018)</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>
<p><i>EP-Bericht Freigabe PT-Report Authorization</i></p>	<p>Dr. Matthias Besler-Scharf (Technischer Leiter / Technical Manager) - <i>gezeichnet / signed M. Besler-Scharf</i> Dr. Gerhard Wichmann (QM-Beauftragter / Quality Manager) - <i>gezeichnet / signed G. Wichmann</i> Datum / Date: 2. Februar 2018</p>
<p><i>Unteraufträge Subcontractors</i></p>	<p>Falls im Rahmen der Eignungsprüfung eine Prüfung der Gehalte, Homogenität und Stabilität von EP-Parametern durchgeführt wurde, hat DLA diese im Unterauftrag vergeben. In case the analysis of the content, homogeneity and stability of PT-parameters was part of the proficiency test, the determinations were subcontracted by DLA.</p>
<p><i>Vertraulichkeit Confidentiality</i></p>	<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 Mandel.....	21
4.1.1 ELISA-Ergebnisse: Mandel.....	21
4.1.2 PCR-Ergebnisse: Mandel.....	31
4.2 Vergleichsuntersuchung Pistazie.....	35
4.2.1 ELISA-Ergebnisse: Pistazie.....	35
4.2.2 PCR-Ergebnisse: Pistazie.....	43
5. Dokumentation.....	47
5.1 Angaben der Teilnehmer.....	47
5.1.1 ELISA: Mandel.....	47
5.1.2 ELISA: Pistazie.....	49
5.1.3 PCR: Mandel.....	50
5.1.4 PCR: Pistazie.....	51
5.2 Homogenität.....	52
5.2.1 Mischungshomogenität vor der Abfüllung.....	52
5.3 Informationen zur Eignungsprüfung (EP).....	53
6. Verzeichnis der Teilnehmer in alphabetischer Reihenfolge.....	54
7. Verzeichnis relevanter Literatur.....	55

## 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 einen handelsüblichen Brotaufstrich "Nuss-Nugat-Creme". Die Grundzusammensetzung war für beide Proben A und B gleich (s. Tabelle 1). Die Grundmischung wurde unter Rühren bei ca. 40°C homogenisiert.

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

Die Dotierungsmaterialien, die die allergenen Zutaten Mandeln und Pistazien enthalten (gesiebt mesh 400 µm), wurden zu einem Aliquot der Grundmatrix gegeben und die Mischung bei ca. 40°C homogenisiert. Anschließend wurde portionsweise erneut Grundmatrix in 3 weiteren Schritten zugegeben und jeweils bei ca. 40°C 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 250 µm) gesiebt.

Die Proben A und B wurden zu Portionen von ca. 25 g in PE-Behälter abgefüllt und in metallisierte PET-Folienbeutel eingeschweißt. Die Dotierungsniveauprobe wurde zu Portionen von ca. 15 g in metallisierte PET-Folienbeutel abgefüllt.

Tabelle 1: Zusammensetzung der DLA-Proben

Zutaten	Probe A	Probe B	Dotierungs- niveauprobe
Nuss-Nugat-Creme Zutaten: Zucker, Palmöl, Haselnüsse (13%), fettarmes Kakaopulver, Magermilchpulver (7,5%), Emulgator: Lecithine, Vanillin Nährwertangaben pro 100 g: Eiweiß 6,6 g, Kohlenhydrate 57 g, Fett 32 g	100 g/100 g	99,5 g/100g	-
Kartoffelpulver Zutaten: Kartoffeln, E471, E304, E223, E100	-	-	99,6 g/100 g
Mandelmus, weiß - als Mandeln* - davon 16,2% Gesamtprotein**	-	29,3 mg/kg 4,8 mg/kg	24,0 mg/kg 3,9 mg/kg
Pistazien, roh gemahlen - als Pistazien* - davon 21,7% Gesamtprotein**	-	33,9 mg/kg 7,4 mg/kg	28,0 mg/kg 6,1 mg/kg
weitere Zutaten: Maltodextrin, Natriumsulfat und Siliciumdioxid	-	<0,5 g/100 g	<0,4 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=5,18 für Mandeln und F=5,30 für Pistazien)

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

### 2.1.1 Homogenität

Die **Mischungshomogenität vor der Abfüllung** wurde in 8-fach Bestimmung mittels **Microtracer-Analyse** untersucht. Es handelt sich um eine normierte Methode, die Bestandteil des internationalen GMP-Zertifizierungssystems für Futtermittel ist [14]. Vor der Mischung werden mit Farbstoff beschichtete Eisenpartikel in  $\mu\text{m}$ -Größe zur Probe gegeben und die Partikelzahl wird nach der Homogenisierung in entnommenen Aliquoten bestimmt. Die Bewertung der Mischungshomogenität erfolgt auf Grundlage der Poissonverteilung anhand des chi-Quadrat-Tests. Eine Wahrscheinlichkeit von  $\geq 5\%$  ist gleichzusetzen mit einer guten homogenen Mischung und von  $\geq 25\%$  mit einer exzellenten Mischung [14, 15].

Da keine pastösen Proben wie die Probenmatrix A mit der Microtracer-Analyse untersucht werden können, wurde nur die pulverförmige Dotierungsneveaprobe untersucht. Die Microtracer-Analyse hat eine Wahrscheinlichkeit von 59% ergeben. Die Partikel-Ergebnisse wurden zusätzlich in Konzentrationen umgerechnet, statistisch als Normalverteilung ausgewertet und mit der Standardabweichung nach Horwitz verglichen. Für die Beurteilung sind HorRat-Werte zwischen 0,3 und 1,3 unter Wiederholbedingungen (Messungen innerhalb des Labors) zu akzeptieren [16, 17]. Es wurde ein HorRat-Wert von 0,85 erhalten. Die Ergebnisse der Microtracer-Analyse sind in der Dokumentation angegeben.

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

#### Durchführung der Homogenitätstests

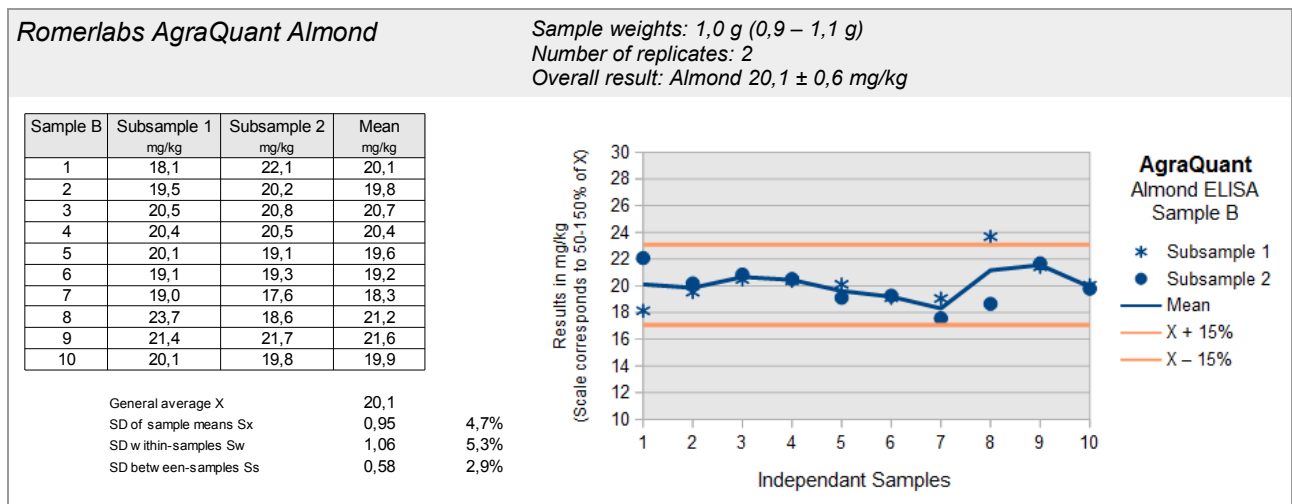
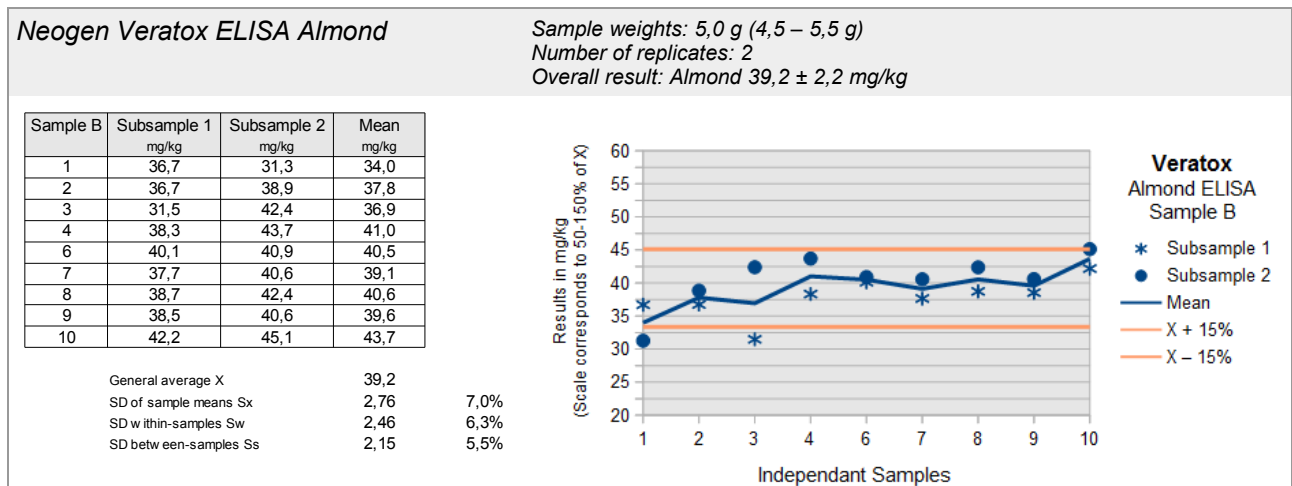
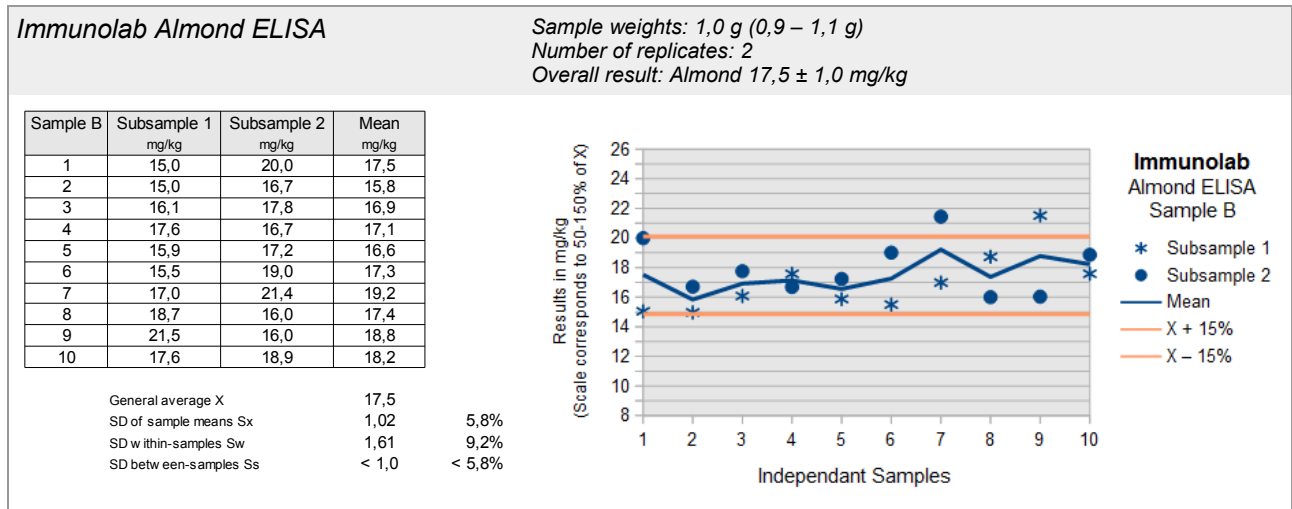
Die Homogenitätstests wurden in Kooperation mit den Labors der angegebenen Testkit-Anbieter durchgeführt. Von DLA wurden zufällig 10 Muster der abgefüllten dotierten Probe ausgewählt und davon jeweils 2 Teilproben in zuvor zufällig-coodierte Extraktionsbehälter eingewogen und anschließend den Labors 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 13528:2015 Anhang B.3 (mit Anm. 1-3) vorgenommen.

#### Bewertung der Homogenität

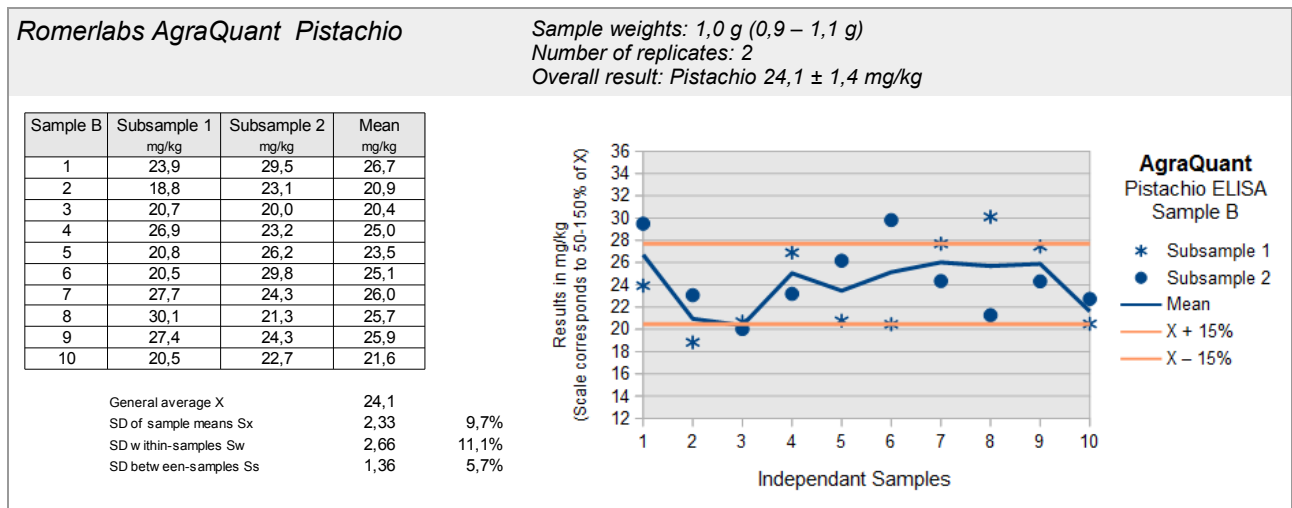
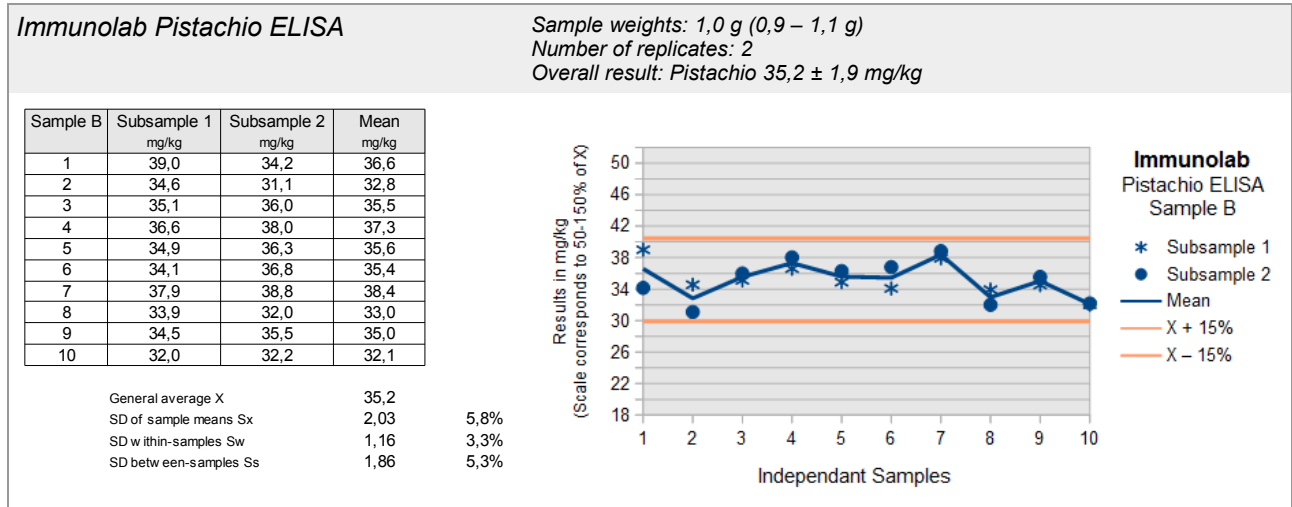
Die Homogenität wird mit einer Standardabweichung zwischen den Proben von  $S_s \leq 15\%$  („Heterogenitätsstandardabweichung“) als hinreichend gesichert angesehen. Dieses Kriterium wird für die untersuchte Probe B in allen ELISA-Tests sowohl für Mandel (Immunolab, Veratox, AgraQuant) als auch für Pistazie (Immunolab, AgraQuant) erfüllt (s. Seite 8 und 9). Die Anforderung an Wiederholstandardabweichungen von ELISA- und PCR-Verfahren ist üblicherweise  $\leq 25\%$  [18, 19, 22, 23].

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 Mandel / Homogeneity Almond**



**ELISA-Tests: Homogenität Pistazie / Homogeneity Pistachio**





### 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 Mandel und Pistazie. 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 10. Kalenderwoche 2017 je eine Portion der Untersuchungsmaterialien A und B sowie eine Dotierungsniveauprobe verschickt. Die Untersuchungsverfahren wurden freigestellt. Die Untersuchungen waren durchzuführen bis spätestens 17. November 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 Mandel und/oder Pistazie im mg/kg Bereich in der Matrix Brotaufstrich (Nuss-Nugat-Creme mit Haselnuss und Kakao). Eine der beiden Proben sowie die "Dotierungsniveauprobe" wurden mit den allergenen Zutaten hergestellt. Die "Dotierungsniveauprobe" enthält die Allergene in einfacher Matrix mit ähnlichen Gehalten ohne weitere Prozessierung. Die Dotierungsniveauprobe soll wie eine normale Probe untersucht werden.*

*Bitte beachten Sie die beiliegenden Informationen zur Eignungsprüfung. (siehe Dokumentation unter Punkt 5.3 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.

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 [25, 26, 27, 28]. 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]. Liegen  $< 12$  quantitative Ergebnisse und eine erhöhte Differenz zwischen robustem Mittelwert und Median vor, ist ggf. der **Median** als zugewiesener Wert zu verwenden (Kriterium:  $\Delta$  Median - rob. Mittelwert  $> 0,3 \sigma_{pt}$ ) [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) **Zugewiesener Wert aller Ergebnisse** -  $X_{ptALL}$
- ii) **Zugewiesener Wert von Einzelmethoden** -  $X_{ptMETHOD i}$   
mit mindestens 5 quantitativen Ergebnisangaben.

Einzelergebnisse die außerhalb des angegebenen Messbereiches eines teilnehmenden Labors liegen (z.B. mit der Angabe  $> 25$  mg/kg oder  $< 2,5$  mg/kg) oder die Angabe „0“ werden für die statistische Auswertung generell nicht berücksichtigt [3].

### 3.2 Robuste Standardabweichung

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

Folgende robuste Standardabweichungen werden herangezogen:

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

### 3.3 Ausschluss von Ergebnissen und Ausreißer

Ergebnisse können vorab von der statistischen Auswertung ausgeschlossen werden, wenn offensichtliche grobe Fehler, wie z. B. falsche Einheiten, Dezimalstellen oder Angaben für einen falschen Prüfgegenstand vorliegen [2]. Auch wenn ein Ergebnis z.B. mit einem Faktor  $>10$  deutlich vom Mittelwert abweicht und einen Einfluss auf die robuste Statistik hat, kann ein Ergebnis von der statistischen Auswertung ausgeschlossen werden [3].

Alle Ergebnisse sollen mit mindestens 2 signifikanten Stellen (gültige Ziffern) angegeben werden. Die Angabe von 3 Stellen ist i.d.R. ausreichend.

Ergebnisse, die mit unterschiedlichen Verfahren erhalten wurden und zu einer erhöhten Variabilität und/oder zu einer bi- oder mehrmodalen Verteilung der Ergebnisse führen, werden separat behandelt oder, wenn dafür zu wenige Ergebnisse vorliegen, ausgeschlossen. Hierfür erfolgt die Prüfung der Ergebnisse anhand der Kern-Dichte-Schätzung [3, 12].

Auf Ausreißer wird mittels robuster Statistik geprüft: Ergebnisse, die um mehr als das Dreifache der robusten Standardabweichung vom robusten Mittelwert abweichen, werden als Ausreißer eingestuft [3]. Ermittelte Ausreißer werden informativ genannt sofern gleichzeitig der z-Score des Teilnehmers  $< -2$  oder  $> 2$  ist. Aufgrund der Anwendung der robusten Statistik werden Ausreißer nicht ausgeschlossen, sofern keine anderen Gründe vorliegen [3].

3.4 Zielstandardabweichung (für die Eignungsbeurteilung)

Die Zielstandardabweichung des zugewiesenen Wertes  $\sigma_{pt}$  (= Standardabweichung für die Eignungsbeurteilung) kann nach unten dargestellten, unterschiedlichen Verfahren bestimmt.

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

3.4.1 Allgemeines Modell nach Horwitz

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

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

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

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

3.4.2 Auswertung eines Versuchs zur Präzision

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

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

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

**Tabelle 2a:** ELISA-Methoden - Relative Wiederholstandardabweichungen (RSD<sub>r</sub>) und relative Vergleichsstandardabweichungen (RSD<sub>R</sub>) gemäß ausgewählter Auswertungen von Versuchen zur Präzision und die resultierende Zielstandardabweichung  $\sigma_{pt}$  [30-31]

Parameter	Matrix	Mittelwerte [mg/kg]	Wiederfindung	rob RSD <sub>r</sub>	RSD <sub>r</sub>	RSD <sub>R</sub>	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 für die Allergene Erdnuss, Haselnuss und Mandel im Bereich von 11 - 32% für die ELISA-Methoden und 24 - 42% 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 [24]. Es wurden 12 Lebensmittelproben mit Gliadinegehalten im Bereich von 0 - 168 mg/kg von 20 Laboratorien untersucht. Die Wiederfindungsraten lagen zwischen 65 und 110%, die relativen Wiederholstandardabweichungen lagen bei 13 - 25% (1. Methode) bzw. 11 - 22% (2. Methode) und die relativen Vergleichsstandardabweichungen bei 23 - 47% (1. Methode) bzw. 25 - 33% (2. Methode). Laut den Autoren erfüllten beide ELISA-Test-Kits damit die Validierungskriterien für ELISA Methoden [24].

Das IRMM (Institute for Reference Materials and Measurements) hat in einem Ringversuch die Eignung fünf verschiedener ELISA-Test-Kits zur Bestimmung von Erdnuss getestet [27]. Die Mittelwerte lagen im Konzentrationsbereich von 0,3 - 16,1 mg/kg bzw. 1,2 - 20,4 mg/kg. Die jeweils niedrigsten relativen Vergleichsstandardabweichungen der fünf Test-Kits lagen für die Matrix Bitterschokolade bei 20 - 42% und für Kekse bei 23 - 61%.

**Tabelle 2b:** PCR-Methoden - Relative Wiederholstandardabweichungen ( $RSD_r$ ) und relative Vergleichsstandardabweichungen ( $RSD_R$ ) gemäß ausgewählter Auswertungen von Versuchen zur Präzision und die resultierende Zielstandardabweichung  $\sigma_{pt}$  [32-34]

Parameter	Matrix	Mittelwerte [mg/kg]	Wiederfindung	rob $RSD_r$	$RSD_r$	$RSD_R$	$\sigma_{pt}$	Methode / Literatur
Mandel	Reiskekse	105,2 18,0 10,5	105 % 90 % 105 %	-	19,3% 44,0% 32,0%	27,5% 49,1% 38,8%	23,9% 38,0% 31,5%	rt-PCR ASU 18.00-20
Mandel	Weizenkekse Soßenpulver	114,3 88,1	94,6 % 88,1 %	-	22,1% 43,9%	41,8% 43,1%	38,8% - %	rt-PCR ASU 18.00-20
Mandel	Reiskekse	109 21,3 12,3	109 % 107 % 121 %	-	17,6% 35,8% 32,0%	32,8% 45,0% 47,8%	30,3% 37,2% 42,1%	rt-PCR multiplex ASU 18.00-22
Mandel	Weizenkekse Soßenpulver	120,7 112	98,2 % 94,1 %	-	15,7% 36,2%	32,5% 42,8%	30,5% 34,3%	rt-PCR multiplex ASU 18.00-22
Paranuss	Reiskekse	89,1 17,3 9,8	89,1 % 86,5 % 98 %	-	34,1% 36,2% 40,2%	34,4% 38,2% 41,8%	24,5% 28,4% 30,6%	rt-PCR ASU 18.00-21
Paranuss	Weizenkekse Soßenpulver	80,8 42,6	65,7 % 42,6 %	-	25,6% 27,5%	36,4% 39,7%	31,6% 34,6%	rt-PCR ASU 18.00-21
Paranuss	Reiskekse	96,6 14,2	96,6 % 71 %	-	16,8% 54,2%	31,8% 56,5%	29,5% 41,5%	rt-PCR multiplex ASU 18.00-22
Paranuss	Weizenkekse Soßenpulver	76,5 48,4	62,2 % 48,4 %	-	15,6% 34,4%	35,8% 37,5%	34,1% 28,5%	rt-PCR multiplex ASU 18.00-22

3.4.3 Werte aus Erkenntnissen

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

Anforderungen an die Leistungsfähigkeit der Analysemethoden zur quantitativen Bestimmung von Allergenen in Lebensmitteln sind u.a. vom Ministry of Health and Welfare (MHLW) in Japan [22], von der Arbeitsgruppe 12 „Lebensmittelallergene“ des Technischen Komitees CEN/TC 275 [19-21], von einer internationalen "Food Allergen Working Group" unter der Leitung der AOAC Presidential Task Force on Food Allergens [23] und vom Codex Alimentarius Committee (CAC/GL 74-2010) [18] erarbeitet worden.

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

Tabelle 3: ELISA-Validierungskriterien

Literatur [18-24]	Wiederfindungsrate	Wiederholstandard- abweichung	Vergleichsstandard- abweichung
MHLW 2006	50 - 150%		≤ 25%
CEN 2009		≤ 20%	
AOAC 2010	50 - 150%	6,9 - 34,4% <sup>(a)</sup>	19,5 - 57,2% <sup>(a)</sup>
CAC 2010	70 - 120%	≤ 25%	≤ 35%

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

Tabelle 4: PCR-Validierungskriterien

Literatur [18]	Wiederfindungsrate	Wiederholstandard- abweichung	Vergleichsstandard- abweichung
CAC 2010	± 25% <sup>(a)</sup>	≤ 25%	≤ 35%

(a) = Trueness / Richtigkeit

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

Diese Zielstandardabweichung wurde zur statistischen Bewertung der Ergebnisse mittels z-Score bzw. falls erforderlich mittels z'-Score herangezogen und auf alle unter 3.1 angegebenen Bezugswerte angewandt.

### 3.5 z-Score

Der z-Score wird herangezogen zur Beurteilung der Ergebnisse der teilnehmenden Labore. Er besagt um welches Vielfache der Zielstandardabweichung ( $\sigma_{pt}$ ) das Ergebnis ( $x_i$ ) des betreffenden Teilnehmers vom zugewiesenen Wert ( $x_{pt}$ ) abweicht [3].

Die Berechnung erfolgt nach:

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

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

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

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

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

#### 3.5.1 Warn- und Eingriffssignale

Gemäß der ISO 13528 für statistische Verfahren für Eignungsprüfungen wird empfohlen, dass ein Ergebnis, das einen z-Wert  $> 3,0$  oder  $< -3,0$  ergibt, als „Eingriffssignal“ zu werten ist [3]. 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  $\geq 10$  Ergebnisse vorliegen [3].



### 3.6 z'-Score

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

Die Berechnung erfolgt nach:

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

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

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

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

Zu Warn- und Eingriffssignalen siehe 3.5.1.

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

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

### 3.8 Standardunsicherheit des zugewiesenen Werts

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

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

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

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

### 3.9 Graphische Darstellung der Bezugswerte

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

### 3.10 Wiederfindungsraten: Dotierung

Für die Ergebnisse von 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 [23]. Für quantitative PCR- oder LC/MS-Bestimmungen wird ebenfalls dieser Akzeptanzbereich herangezogen.

## 4. Ergebnisse

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

Die Auswertung erfolgte getrennt nach ELISA und PCR-Methoden. Die Ergebnisse wurden in den entsprechenden Kapiteln nach durchgeführten Methoden (Testkits) zusammengefasst und die Auswertenummern innerhalb der Gruppen aufsteigend sortiert.

Die folgenden Ergebnisseiten sind für die allergenen Bestandteile jeweils gleich aufgebaut. Es werden zunächst die Ergebnisse aller ELISA- bzw. PCR-Methoden zu einem Parameter für die Proben A und B (qualitativ und ggf. quantitativ) und danach für die Dotierungsniveauprobe (nur quantitativ) angegeben. Die Wiederfindungsraten der Ergebnisse für die Dotierungsniveauprobe und die dotierte Probe A oder B werden anschließend behandelt.

Im Ergebnisteil werden alle quantitativen Teilnehmerergebnisse auf 3 signifikante Stellen (gültige Ziffern) formatiert dargestellt. Im Dokumentationsteil sind die Ergebnisse so angegeben wie sie von den Teilnehmern übermittelt wurden.

Um die **Vergleichbarkeit von quantitativen Ergebnissen** zu gewährleisten, wurden Teilnehmerergebnisse mit unterschiedlichen Angaben (z.B. als Protein oder allergenes Lebensmittel) soweit möglich von DLA harmonisiert.

Die ELISA-Ergebnisse, die als **Mandel-** oder **Pistazienprotein** angegeben wurden, sind mit dem experimentell bestimmten Proteingehalt der Rohstoffe auf das Gesamtlebensmittel (Mandel, Pistazie) umgerechnet worden (s. S.5).

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

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

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

Auswertenummer	Ergebnis	Ergebnis	z-Score $X_{ptALL}$	z-Score $X_{ptM i}$	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 ( $X_{pt}$ )	$X_{ptALL}$	$X_{ptMETHOD i}$
Anzahl der Messergebnisse		
Anzahl der Ausreißer		
Median		
Robuster Mittelwert ( $X_{pt}$ )		
Robuste Standardabweichung ( $S^*$ )		
Zielkenndaten:		
Zielstandardabweichung $\sigma_{pt}$		
untere Grenze des Zielbereichs ( $X_{pt} - 2\sigma_{pt}$ )		
obere Grenze des Zielbereichs ( $X_{pt} + 2\sigma_{pt}$ )		
Quotient $S^*/\sigma_{pt}$		
Standardunsicherheit $U(X_{pt})$		
Quotient $U(X_{pt})/\sigma_{pt}$		
Ergebnisse im Zielbereich		
Prozent im Zielbereich		

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

## 4.1 Vergleichsuntersuchung Mandel

### 4.1.1 ELISA-Ergebnisse: Mandel

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

Auswertenummer	Probe A	Probe A	Probe B	Probe B	Qualitative Bewertung	Methode	Hinweis
	pos/neg	[mg/kg]	pos/neg	[mg/kg]	Übereinstimmungen mit Konsenswerten		
13	positiv	0,5	positiv	26,0	1/2 (50%)	AQ	
3	negativ	ND	positiv	41,9	2/2 (100%)	BF	Ausreißer X <sub>Ala</sub>
4	positiv	0,53	positiv	16,8	1/2 (50%)	BM	
1	negativ	< 0,4	positiv	21,8	2/2 (100%)	IL	
2	negativ	< 0,4	positiv	22,6	2/2 (100%)	IL	
12	negativ	< 1	positiv	25,0	2/2 (100%)	IL	
5	negativ	< 1,2	positiv	23,0	2/2 (100%)	RS-F	
8	negativ		positiv	147	2/2 (100%)	RS-F	Ergebnis umgerechnet °
9	negativ	< 2,5	positiv	16,2	2/2 (100%)	RS-F	
10	negativ	< 2,5	positiv	22,4	2/2 (100%)	RS-F	
15	negativ	< 2,5	positiv	13,0	2/2 (100%)	RS-F	
17	negativ	< 2,5	positiv	>20	2/2 (100%)	RS-F	
18a	negativ	< 2,5	positiv	17,0	2/2 (100%)	RS-F	
6	negativ	< 2,5	positiv	41,0	2/2 (100%)	VT	
11	positiv	3,8	positiv	20,1	1/2 (50%)	VT	
14	negativ	< 2,5	positiv	11,0	2/2 (100%)	VT	
18b	negativ	< 2,5	positiv	16,0	2/2 (100%)	VT	

° Umrechnung S. 19

	Probe A	Probe B
Anzahl positiv	3	17
Anzahl negativ	14	0
Prozent positiv	18	100
Prozent negativ	82	0
Konsenswert	negativ	positiv

#### Methoden:

AQ = AgraQuant, RomerLabs  
 BF = MonoTrace ELISA, BioFront Technologies  
 BM = AlerTox ELISA, Biomedal  
 IL = Immunolab  
 RS-F= Ridascreen® Fast, R-Biopharm  
 VT = Veratox, Neogen

#### Anmerkung:

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

Für Probe A wurden drei positive Ergebnisse im Bereich der Bestimmungsgrenzen der Methoden erhalten (Testkit-Anleitungen/Handbücher: AQ 0,4 mg/kg, BM 0,5 mg/kg, VT 2,5 mg/kg).

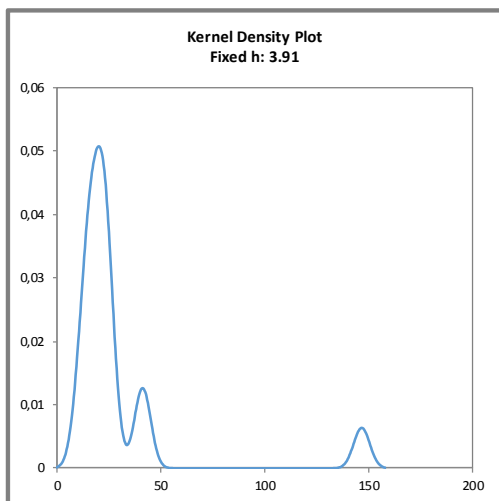
**Quantitative Auswertung ELISA: Probe B**

Auswertenummer	Mandel [mg/kg]	z-Score Xpt <sub>ALL</sub>	z-Score Xpt <sub>RS-F</sub>	Methode	Hinweis
13	26,0	1,0		AQ	
3	41,9	4,0		BF	
4	16,8	-0,78		BM	
1	21,8	0,18		IL	
2	22,6	0,34		IL	
12	25,0	0,80		IL	
5	23,0	0,41	1,0	RS-F	
8	147	24	28	RS-F	Ergebnis umgerechnet ° / und ausgeschlossen
9	16,2	-0,90	-0,47	RS-F	
10	22,4	0,30	0,89	RS-F	
15	13,0	-1,5	-1,2	RS-F	
17	>20			RS-F	
18a	17,0	-0,74	-0,29	RS-F	
6	41,0	3,9		VT	
11	20,1	-0,14		VT	
14	11,0	-1,9		VT	
18b	16,0	-0,93		VT	

° Umrechnung S. 19

**Methoden:**

- AQ = AgraQuant, RomerLabs
- BF = MonoTrace ELISA, BioFront Technologies
- BM = AlerTox ELISA, Biomedal
- IL = Immunolab
- RS-F= Ridascreen® Fast, R-Biopharm
- VT = Veratox, Neogen



**Abb. / Fig. 1:**

Kerndichte-Schätzung aller ELISA-Ergebnisse (mit  $h = 0,75 \times \sigma_{pt}$  von  $X_{ptALL}$ )

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

**Anmerkung:**

Die Kerndichte-Schätzung zeigt annähernd eine symmetrische Verteilung der Ergebnisse mit zwei kleineren Peaks bei ca. 40 mg/kg (2 Einzelergebnisse Methoden BF und VT) und ca. 150 mg/kg (Methode RS-F), der auf ein ausgeschlossenes Ergebnis zurückgeht.

Kenndaten: Quantitative Auswertung ELISA Mandel

**Probe B**

<b>Kenndaten</b>	<b>Alle Ergebnisse</b> [mg/kg]	<b>Methode RS-F</b> [mg/kg]
Zugewiesener Wert ( $X_{pt}$ )	$X_{pt}_{ALL}$	$X_{pt}_{METHOD\ RS-F}$
Anzahl der Messergebnisse **	15	5
Anzahl der Ausreißer	0	0
Mittelwert	22,3	18,3
Median	21,8	17,0
<b>Robuster Mittelwert (<math>X_{pt}</math>)</b>	<b>20,9</b>	<b>18,3</b>
<b>Robuste Standardabweichung (<math>S^*</math>)</b>	<b>6,75</b>	<b>4,85</b>
<i>Zielkenndaten:</i>		
<b>Zielstandardabweichung <math>\sigma_{pt}</math></b>	<b>5,21</b>	<b>4,58</b>
<b>Untere Grenze des Zielbereichs</b>	<b>10,4</b>	<b>9,16</b>
<b>Obere Grenze des Zielbereichs</b>	<b>31,3</b>	<b>27,5</b>
Quotient $S^*/\sigma_{pt}$	1,3	1,10
Standardunsicherheit $U(X_{pt})$	2,18	2,71
Quotient $U(X_{pt})/\sigma_{pt}$	0,42	0,59
Ergebnisse im Zielbereich	13	5
Prozent im Zielbereich	87	100

\*\* ohne Auswertenummer 8

**Methoden:**

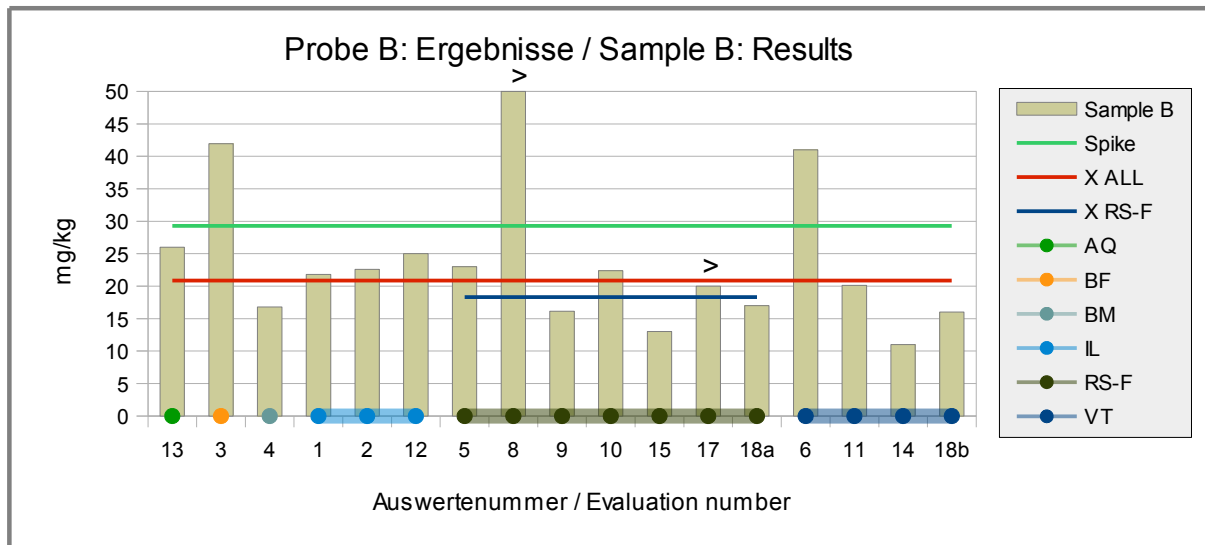
RS-F = R-Biopharm, Ridascreen® Fast

Anmerkungen zu den Kenndaten und Vergleich der Bezugswerte:

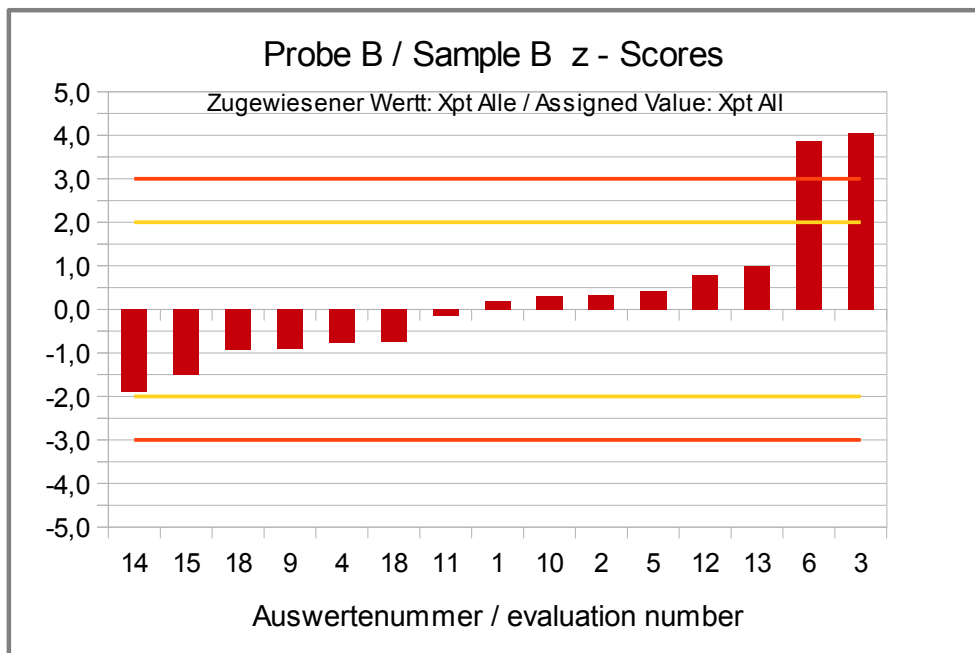
Die Kerndichte-Schätzung zeigte annähernd eine symmetrische Verteilung der Ergebnisse.

Die Auswertung der Ergebnisse aller Methoden bzw. von Methode RS-F zeigten eine normale Variabilität der Ergebnisse. Der Quotient  $S^*/\sigma_{pt}$  lag jeweils deutlich unter 2,0. Die robusten Standardabweichungen liegen im Bereich von etablierten Werten für die Wiederhol- und Vergleichsstandardabweichung der eingesetzten Bestimmungsmethoden (vgl. 3.4.2 Auswertung eines Versuchs zur Präzision und 3.4.3 Werte aus Erkenntnissen). Die Vergleichbarkeit der Ergebnisse ist gegeben. Diese Aussage ist für die methodenübergreifende Auswertung nur eingeschränkt gültig, da für einige Methoden nur wenige Ergebnisse vorlagen.

Die robusten Mittelwerte der Auswertungen lagen mit 71% bzw. 62% vom Zusatzniveau von Mandel zu Probe B im Bereich der relevanten Anforderungen für die eingesetzten Methoden (s. 3.4.3 und "Wiederfindungsraten für Mandel" S.30).

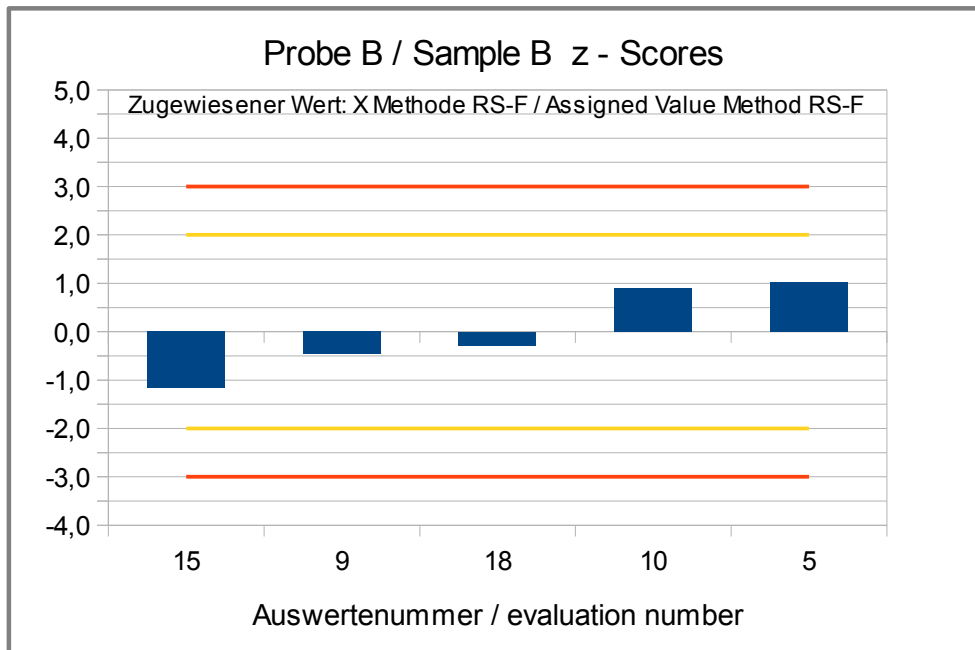


**Abb./Fig. 2:** ELISA-Ergebnisse Mandel  
 grüne Linie = Zusatzniveau (Spike)  
 rote Linie = robuster Mittelwert aller Ergebnisse  
 blaue Linie = robuster Mittelwert Ergebnisse Methode RS-F  
 runde Symbole = Zuordnung der Methoden (s. Legende)



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





**Abb./Fig. 4:**

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

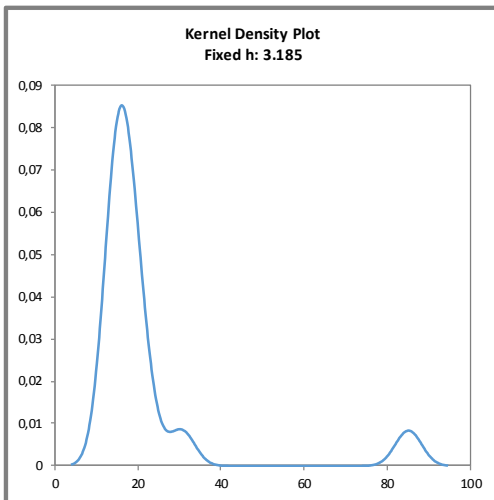
**Quantitative Auswertung ELISA: Dotierungsniveauprobe**

Auswertenummer	Mandel	z-Score X <sub>pt,ALL</sub>	z-Score X <sub>pt,RS-F</sub>	Methode	Hinweis
	[mg/kg]				
13	22,0	1,2		AQ	
3	30,6	3,2		BF	Ausreißer X <sub>Alle</sub>
4	13,9	-0,72		BM	
1	18,6	0,38		IL	
2	16,8	-0,04		IL	
12	15,0	-0,47		IL	
5	16,0	-0,23	-0,01	RS-F	
8	85,2	16	17,3	RS-F	Ergebnis umgerechnet ° / und ausgeschlossen
9	19,9	0,69	1,0	RS-F	
10	13,8	-0,75	-0,56	RS-F	
15	13,5	-0,82	-0,63	RS-F	
17	16,0	-0,23	-0,01	RS-F	
18a	17,0	0,00	0,24	RS-F	
6				VT	
11	18,8	0,43		VT	
14				VT	
18b	15,0	-0,47		VT	

° Umrechnung S. 19

**Methoden:**

- AQ = AgraQuant, RomerLabs
- BF = MonoTrace ELISA, BioFront Technologies
- BM = AlerTox ELISA, Biomedal
- IL = Immunolab
- RS-F = Ridascreen® Fast, R-Biopharm
- VT = Veratox, Neogen



**Abb. / Fig. 5:**

Kerndichte-Schätzung aller ELISA-Ergebnisse (mit  $h = 0,75 \times \sigma_{pt}$  von  $X_{pt,ALL}$ )

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 symmetrische Verteilung der Ergebnisse mit zwei kleineren Peaks bei ca. 30 mg/kg (Methode BF) und ca. 85 mg/kg (Methode RS-F), der auf ein ausgeschlossenes Ergebnis zurückgeht.

Kenndaten: Quantitative Auswertung ELISA Mandel

### Dotierungsniveauprobe

<b>Kenndaten</b>	<b>Alle Ergebnisse</b> [mg/kg]	<b>Methode RS-F</b> [mg/kg]
Zugewiesener Wert ( $X_{pt}$ )	$X_{pt}_{ALL}$	$X_{pt}_{METHOD\ RS-F}$
Anzahl der Messergebnisse**	14	6
Anzahl der Ausreißer	1	0
Mittelwert	17,6	16,0
Median	16,4	16,0
<b>Robuster Mittelwert (<math>X_{pt}</math>)</b>	<b>17,0</b>	<b>16,0</b>
<b>Robuste Standardabweichung (<math>S^*</math>)</b>	<b>3,16</b>	<b>2,65</b>
<i>Zielkenndaten:</i>		
<b>Zielstandardabweichung <math>\sigma_{pt}</math></b>	<b>4,25</b>	<b>4,01</b>
<b>Untere Grenze des Zielbereichs</b>	<b>8,49</b>	<b>8,02</b>
<b>Obere Grenze des Zielbereichs</b>	<b>25,5</b>	<b>24,1</b>
Quotient $S^*/\sigma_{pt}$	0,74	0,66
Standardunsicherheit $U(X_{pt})$	1,06	1,35
Quotient $U(X_{pt})/\sigma_{pt}$	0,25	0,34
Ergebnisse im Zielbereich	13	6
Prozent im Zielbereich	93	100

\*\* ohne Auswertenummer 8

### Methoden:

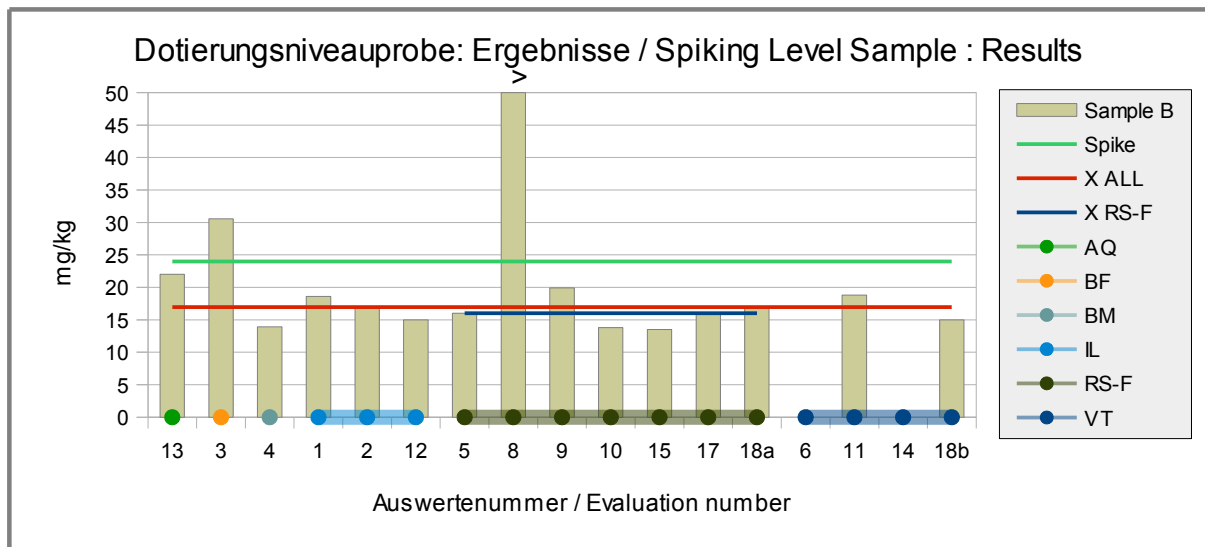
RS-F = R-Biopharm, Ridascreen® Fast

### Anmerkungen zu den Kenndaten und Vergleich der Bezugswerte:

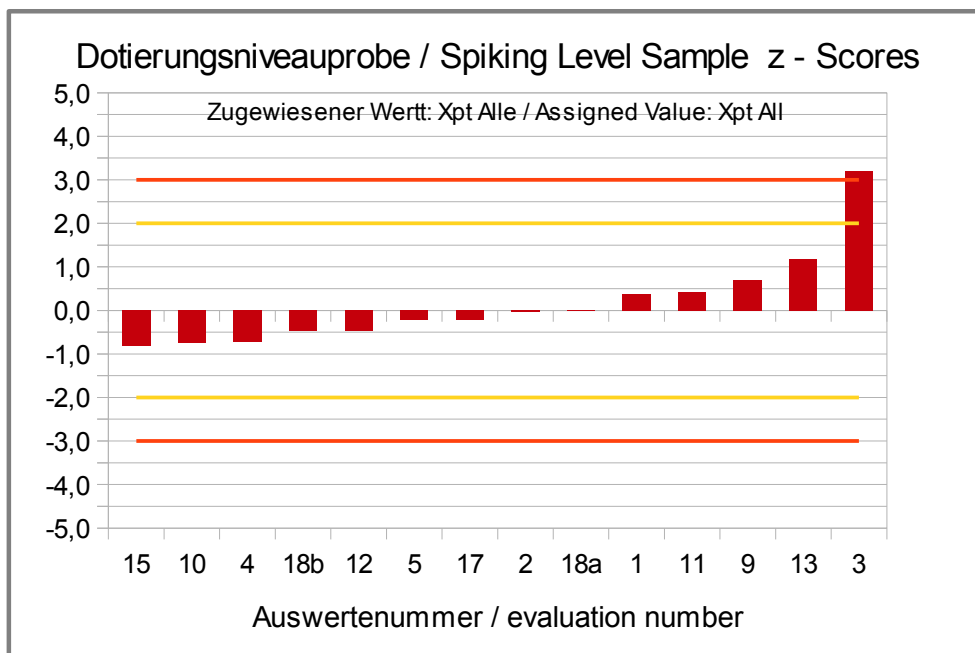
Die Kerndichte-Schätzung zeigte annähernd eine symmetrische Verteilung der Ergebnisse.

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

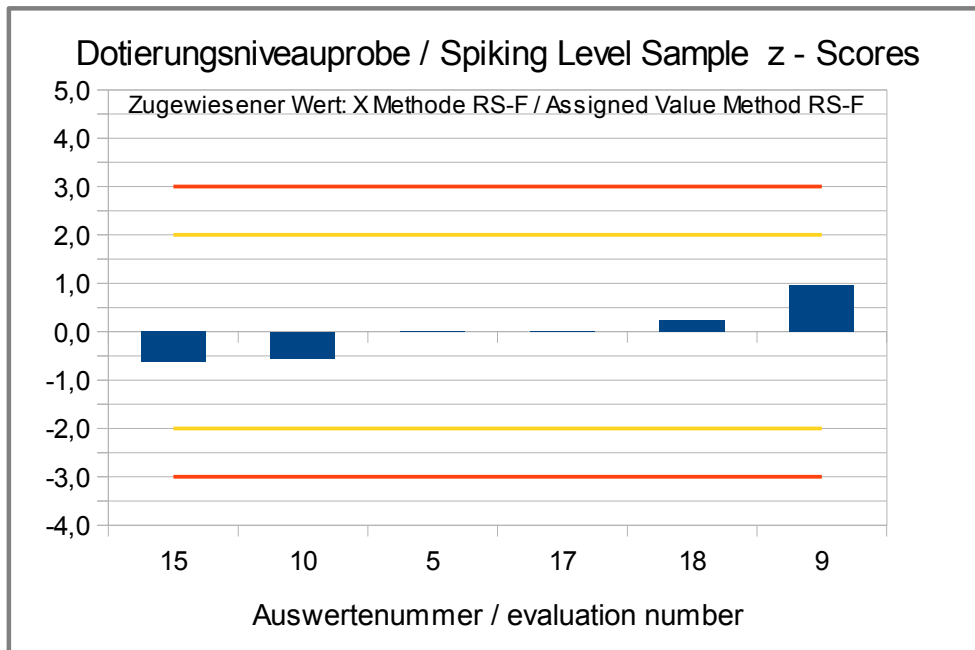
Die robusten Mittelwerte der Auswertungen lagen mit 71% bzw. 67% vom Zusatzniveau von Mandel zur Dotierungsniveauprobe im Bereich der relevanten Anforderungen für die eingesetzten Methoden (s. 3.4.3 und "Wiederfindungsraten für Mandel" S.30).



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



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



**Abb./Fig. 8:**

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

**Wiederfindungsraten ELISA für Mandel:  
Dotierungsniveauprobe und Probe B**

Auswertenummer	Dotierungsniveauprobe	Wiederfindungsrate*	Probe B	Wiederfindungsrate*	Methode	Hinweis
	[mg/kg]	[%]	[mg/kg]	[%]		
13	22,0	<b>92</b>	26,0	<b>89</b>	AQ	
3	30,6	<b>127</b>	41,9	<b>143</b>	BF	
4	13,9	<b>58</b>	16,8	<b>57</b>	BM	
1	18,6	<b>78</b>	21,8	<b>74</b>	IL	
2	16,8	<b>70</b>	22,6	<b>77</b>	IL	
12	15,0	<b>63</b>	25,0	<b>85</b>	IL	
5	16,0	<b>67</b>	23,0	<b>78</b>	RS-F	
8	85,2	355	147	502	RS-F	Ergebnis umgerechnet °
9	19,9	<b>83</b>	16,2	<b>55</b>	RS-F	
10	13,8	<b>58</b>	22,4	<b>76</b>	RS-F	
15	13,5	<b>56</b>	13,0	44	RS-F	
17	16,0	<b>67</b>	20,0	<b>68</b>	RS-F	
18a	17,0	<b>71</b>	17,0	<b>58</b>	RS-F	
6			41,0	<b>140</b>	VT	
11	18,8	<b>78</b>	20,1	<b>69</b>	VT	
14			11,0	38	VT	
18b	15,0	<b>63</b>	16,0	<b>55</b>	VT	

° Umrechnung S. 19

AB**	50-150 %	AB**	50-150 %
Anzahl im AB	<b>14</b>	Anzahl im AB	<b>14</b>
Prozent im AB	<b>93</b>	Prozent im AB	<b>82</b>

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

\*\* Akzeptanzbereich der AOAC für Allergen-ELISAs

**Methoden:**

- AQ = AgraQuant, RomerLabs
- BF = MonoTrace ELISA, BioFront Technologies
- BM = AlerTox ELISA, Biomedal
- IL = Immunolab
- RS-F= Ridascreen® Fast, R-Biopharm
- VT = Veratox, Neogen

Anmerkung:

93% der Teilnehmer haben mit der Dotierungsniveauprobe mittels ELISA eine Wiederfindungsrate im Bereich der AOAC-Anforderung von 50-150% erhalten. Für die dotierte Lebensmittelmatrix-Probe B lagen 82% der Wiederfindungsraten in diesem Akzeptanzbereich.

**4.1.2 PCR-Ergebnisse: Mandel**

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

Auswertenummer	Probe A	Probe A	Probe B	Probe B	Qualitative Bewertung	Methode	Hinweis
	pos/neg	[mg/kg]	pos/neg	[mg/kg]	Übereinstimmungen mit Konsenswerten		
13	negativ		positiv		2/2 (100%)	ASU	
16	negativ		positiv		2/2 (100%)	ASU	
7	negativ		positiv		2/2 (100%)	MS	
5	negativ	< 4	positiv	> 4	2/2 (100%)	SFA-ID	
8	negativ		positiv		2/2 (100%)	SFA-ID	
9	negativ	< 1	positiv	13,1	2/2 (100%)	SFA-ID	
15	negativ		positiv		2/2 (100%)	SFA-ID	
18	negativ		positiv		2/2 (100%)	div	

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

**Methoden:**

ASU = ASU §64 Methode/method

MS = Microsynth

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

div = keine genaue Angabe / andere Methode

Anmerkung:

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

**Quantitative Auswertung PCR: Probe B**

Eine quantitative Auswertung erfolgte nicht, weil zu wenige quantitative Ergebnisse angegeben wurden.

**(Quantitative) Auswertung PCR: Dotierungsniveauprobe**

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

Auswertenummer	Mandel	Mandel	z-Score X <sub>pt</sub> <sub>ALL</sub>	Methode	Hinweis
	pos/neg	[mg/kg]			
13	positiv			ASU	
16	positiv			ASU	
7	positiv			MS	
5	positiv	> 4		SFA-ID	
8	positiv			SFA-ID	
9	positiv	7,22		SFA-ID	
15	positiv			SFA-ID	
18	positiv			div	

Anzahl positiv	8	
Anzahl negativ	0	
Prozent positiv	100	
Prozent negativ	0	
Konsenswert	positiv	

**Methoden:**

ASU = ASU §64 Methode/method

MS = Microsynth

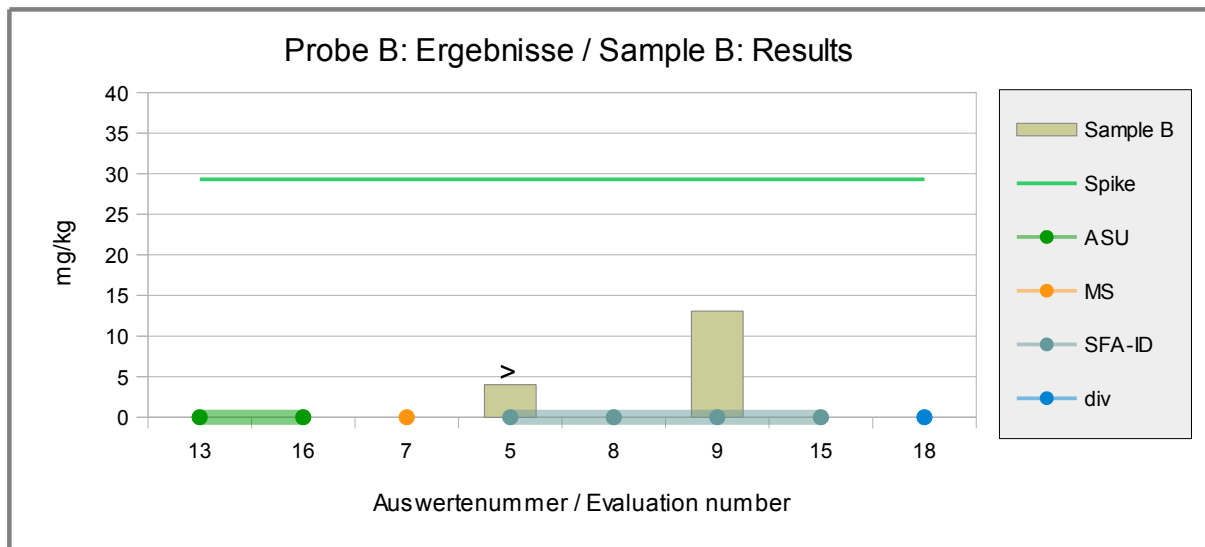
SFA-ID = Sure Food Allergen ID, R-Biopharm / Congen

div = keine genaue Angabe / andere Methode

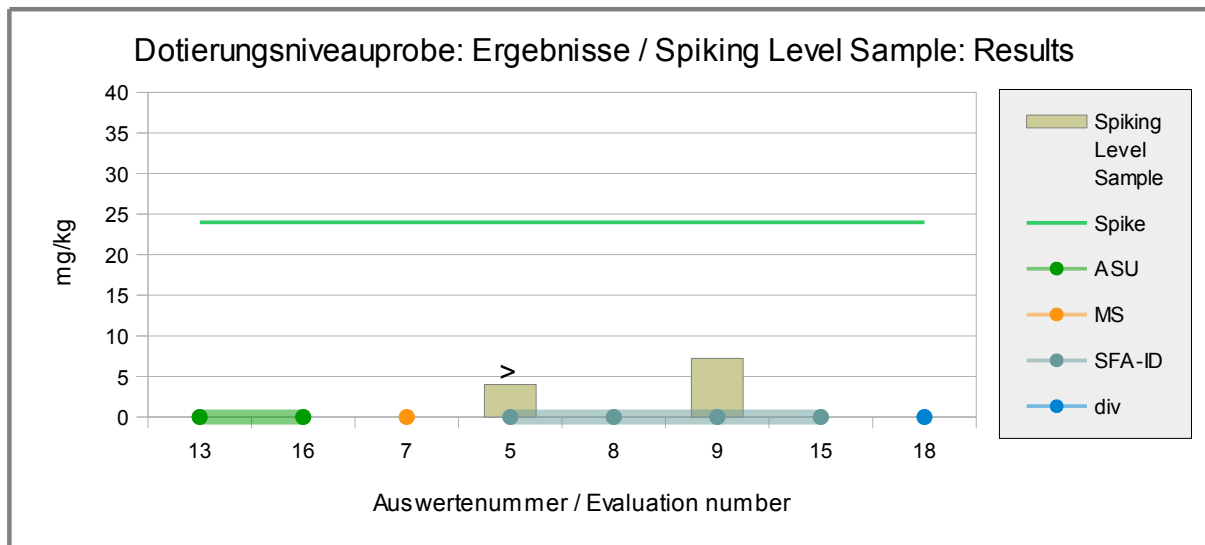
Anmerkung:

Für die Dotierungsniveauprobe wurden 100% positive Ergebnisse erhalten.





**Abb./Fig. 9:** PCR-Ergebnisse Mandel Probe B  
 grüne Linie = Zusatzniveau (Spike)  
 runde Symbole = Zuordnung der Methoden (s. Legende)



**Abb./Fig. 10:** PCR-Ergebnisse Mandel Dotierungsniveauprobe  
 grüne Linie = Zusatzniveau (Spike)  
 runde Symbole = Zuordnung der Methoden (s. Legende)

**Wiederfindungsraten PCR für Mandel:  
Dotierungsniveauprobe und Probe B**

Auswertenummer	Dotierungsniveauprobe	Wiederfindungsrate*	Probe B	Wiederfindungsrate*	Methode	Hinweis
	[mg/kg]	[%]	[mg/kg]	[%]		
13					ASU	
16					ASU	
7					MS	
5	> 4		> 4		SFA-ID	
8					SFA-ID	
9	7,22	30	13,1	45	SFA-ID	
15					SFA-ID	
18					div	

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

**Methoden:**

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

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

\*\* Akzeptanzbereich der AOAC für Allergen-ELISAs

Anmerkung:

Ein Teilnehmer hat quantitative Ergebnisse mittels PCR bestimmt. Sowohl für die Dotierungsniveauprobe als auch die dotierte Lebensmittelmatrix-Probe B lagen die Wiederfindungsraten etwas unterhalb des Bereichs der AOAC-Anforderung von 50-150%.

## 4.2 Vergleichsuntersuchung Pistazie

### 4.2.1 ELISA-Ergebnisse: Pistazie

#### 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		
18	negativ	< 10	positiv	50,0	1/2 (100%)	AQ-P	
9	positiv	6,88	positiv	111	1/2 (100%)	BC	
3	negativ	ND	positiv	42,4	1/2 (100%)	BF	
11	negativ	< 2,0	positiv	55,6	1/2 (100%)	BF	
17	negativ	< 2	positiv	47,0	1/2 (100%)	BF	
6	negativ	< 5	positiv	18,0	1/2 (100%)	ET	Ergebnis umgerechnet °
2	positiv	9,20	positiv	126	1/2 (100%)	IL	
12	positiv	5,30**	positiv	34,0**	1/2 (100%)	IL	** leichte Kreuzreaktivität zu Haselnuss (s. Dokumentation)

° Umrechnung S. 19

	Probe A	Probe B
Anzahl positiv	3	8
Anzahl negativ	5	0
Prozent positiv	38	100
Prozent negativ	63	0
Konsenswert	keiner	positiv

#### Methoden:

AQ-P = AgraQuant Plus, RomerLabs  
 BC = BioCheck ELISA  
 BF = MonoTrace ELISA, BioFront Technologies  
 ET = Elution Technologies ELISA Kit  
 IL = Immunolab

#### Anmerkung:

Für die dotierte Probe B wurde ein Konsenswert von 100% positiven Ergebnissen erhalten. Für Probe A wurden 3 positive und 5 negative (< 75%) Ergebnisse erhalten. Es ist eine geringe Kreuzreaktivität von 0,17% zu Haselnuss für die Methode IL in der Testkit-Anleitung beschrieben. Haselnuss ist in der Lebensmittelmatrix der Proben A und B enthalten.

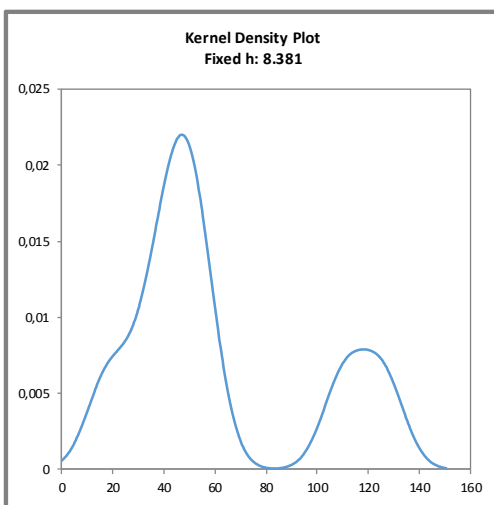
**Quantitative Auswertung ELISA: Probe B**

Auswertenummer	Probe B	z-Score $X_{pt,ALL}$	Methode	Hinweis
	[mg/kg]			
18	50,0	0,5	AQ-P	
9	111	5,9	BC	Ergebnis ausgeschlossen
3	42,4	-0,2	BF	
11	55,6	1,0	BF	
17	47,0	0,2	BF	
6	18,0	-2,4	ET	Ergebnis umgerechnet °
2	126	7,3	IL	Ergebnis ausgeschlossen
12	34,0**	-1,0	IL	** leichte Kreuzreaktivität zu Haselhuss (s. Dokumentation)

° Umrechnung S. 19

**Methoden:**

- AQ-P = AgraQuant Plus, RomerLabs
- BC = BioCheck ELISA
- BF = MonoTrace ELISA, BioFront Technologies
- ET = Elution Technologies ELISA Kit
- IL = Immunolab



**Abb. / Fig. 11:**

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 einen Hauptpeak mit annähernd einer symmetrischen Verteilung der Ergebnisse sowie eine Schulter bei ca. 18 mg/kg (Methode ET) und einen Nebenpeak bei > 100 mg/kg (Methoden BC und IL), der auf zwei ausgeschlossene Ergebnisse zurückgeht.

Kenndaten: Quantitative Auswertung ELISA Pistazie

**Probe B**

<b>Kenndaten</b>	<b>Alle Ergebnisse</b> [mg/kg]
Zugewiesener Wert ( $X_{pt}$ )	$X_{pt\_ALL}$
Anzahl der Messergebnisse **	6
Anzahl der Ausreißer	0
Mittelwert	41,2
Robuster Mittelwert	41,3
<b>Median (<math>X_{pt}</math>)</b>	<b>44,7</b>
<b>Robuste Standardabweichung (<math>S^*</math>)</b>	<b>14,9</b>
Zielkenndaten:	
<b>Zielstandardabweichung <math>\sigma_{pt}</math></b>	<b>11,2</b>
<b>Untere Grenze des Zielbereichs</b>	<b>22,35</b>
<b>Obere Grenze des Zielbereichs</b>	<b>67,1</b>
Quotient $S^*/\sigma_{pt}$	1,3
Standardunsicherheit $U_{(X_{pt})}$	7,6
Quotient $U_{(X_{pt})}/\sigma_{pt}$	0,68
Ergebnisse im Zielbereich	5
Prozent im Zielbereich	83

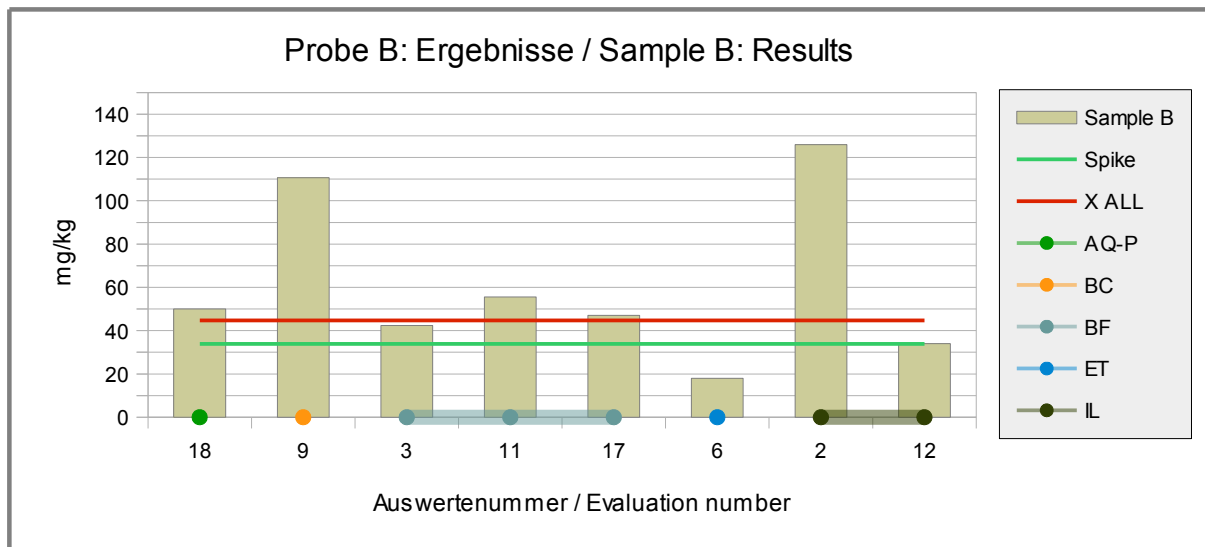
\*\* ohne Auswertenummern 2 u. 9

Anmerkungen zu den Kenndaten und Vergleich der Bezugswerte:

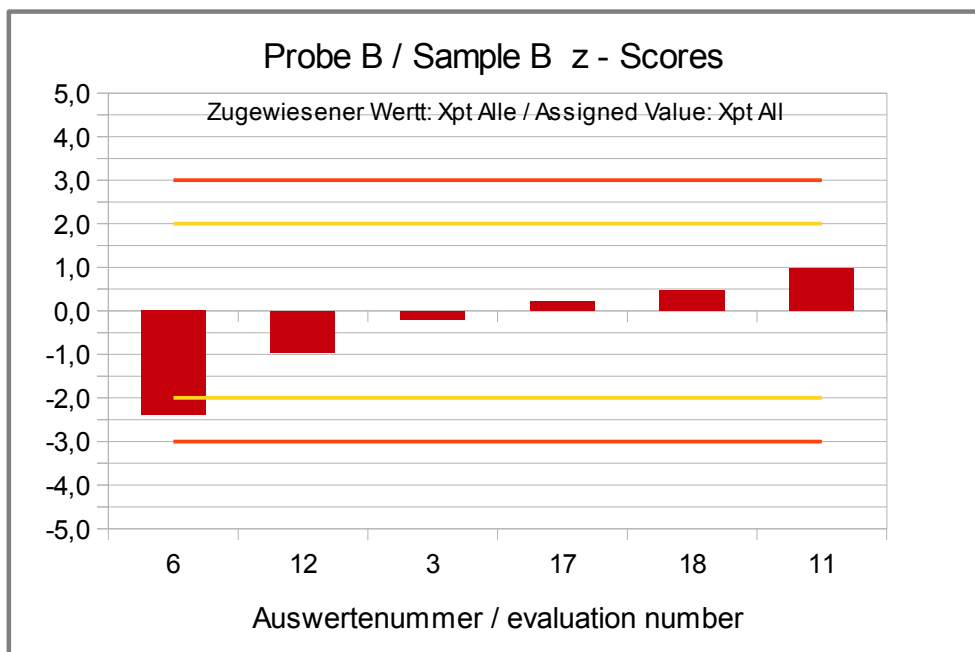
Die Kerndichte-Schätzung zeigte einen Hauptpeak mit annähernd symmetrischer Verteilung der Ergebnisse. Die Ergebnisse eines Nebenpeaks bei > 100 mg/kg wurden für die Berechnung der o.g. statistischen Kenndaten ausgeschlossen.

Als zugewiesener Wert wurde der Median verwendet (vgl. 3.1). Die Auswertung der Ergebnisse aller Methoden zeigte eine normale Variabilität der Ergebnisse. Der Quotient  $S^*/\sigma_{pt}$  lag deutlich unter 2,0. Die robuste Standardabweichung liegt im Bereich von etablierten Werten für die Wiederhol- und Vergleichsstandardabweichung der eingesetzten Bestimmungsmethoden (vgl. 3.4.2 Auswertung eines Versuchs zur Präzision und 3.4.3 Werte aus Erkenntnissen). Die Vergleichbarkeit der Ergebnisse ist gegeben. Diese Aussage ist für die methodenübergreifende Auswertung nur eingeschränkt gültig, da insgesamt und die einzelnen Methoden nur wenige Ergebnisse vorlagen.

Der zugewiesene Wert der Auswertung lag mit 132% vom Zusatzniveau von Pistazie zu Probe B innerhalb der relevanten Anforderungen für die eingesetzten Methoden (s. 3.4.3 und "Wiederfindungsraten für Pistazie" S.42).



**Abb./Fig. 12:** ELISA-Ergebnisse Pistazie  
 grüne Linie = Zusatzniveau (Spike)  
 rote Linie = zugewiesener Wert Median aller Ergebnisse  
 runde Symbole = Zuordnung der Methoden (s. Legende)



**Abb./Fig. 13:**  
 z-Scores (ELISA-Ergebnisse als Pistazie)  
 Zugewiesener Wert: Median aller Ergebnisse

**Quantitative Auswertung ELISA: Dotierungsniveauprobe**

Auswertenummer	Pistazie	z-Score Xpt <sub>ALL</sub>	Methode	Hinweis
	[mg/kg]			
18	37,0	-1,1	AQ-P	
9	83,4	2,4	BC	
3	44,4	-0,6	BF	
11	52,8	0,1	BF	
17	> 80		BF	
6			ET	
2	88,2	2,8	IL	
12	51,0	-0,1	IL	** leichte Kreuzreaktivität zu Haselnuss (s. Dokumentation)

° Umrechnung S. 19

**Methoden:**

AQ-P = AgraQuant Plus, RomerLabs

BC = BioCheck ELISA

BF = MonoTrace ELISA, BioFront Technologies

ET = Elution Technologies ELISA Kit

IL = Immunolab

**Anmerkung:**

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

Kenndaten: Quantitative Auswertung ELISA Pistazie

### Dotierungsniveauprobe

Kenndaten	Alle Ergebnisse [mg/kg]
Zugewiesener Wert ( $X_{pt}$ )	$X_{pt\_ALL}$
Anzahl der Messergebnisse	6
Anzahl der Ausreißer	0
Mittelwert	59,5
Robuster Mittelwert	59,5
<b>Median (<math>X_{pt}</math>)</b>	<b>51,9</b>
<b>Robuste Standardabweichung (<math>S^*</math>)</b>	<b>24,0</b>
<i>Zielkenndaten:</i>	
<b>Zielstandardabweichung <math>\sigma_{pt}</math></b>	<b>13,0</b>
<b>Untere Grenze des Zielbereichs</b>	<b>26,0</b>
<b>Obere Grenze des Zielbereichs</b>	<b>77,9</b>
Quotient $S^*/\sigma_{pt}$	1,9
Standardunsicherheit $U(X_{pt})$	12,3
Quotient $U(X_{pt})/\sigma_{pt}$	0,95
Ergebnisse im Zielbereich	4
Prozent im Zielbereich	67

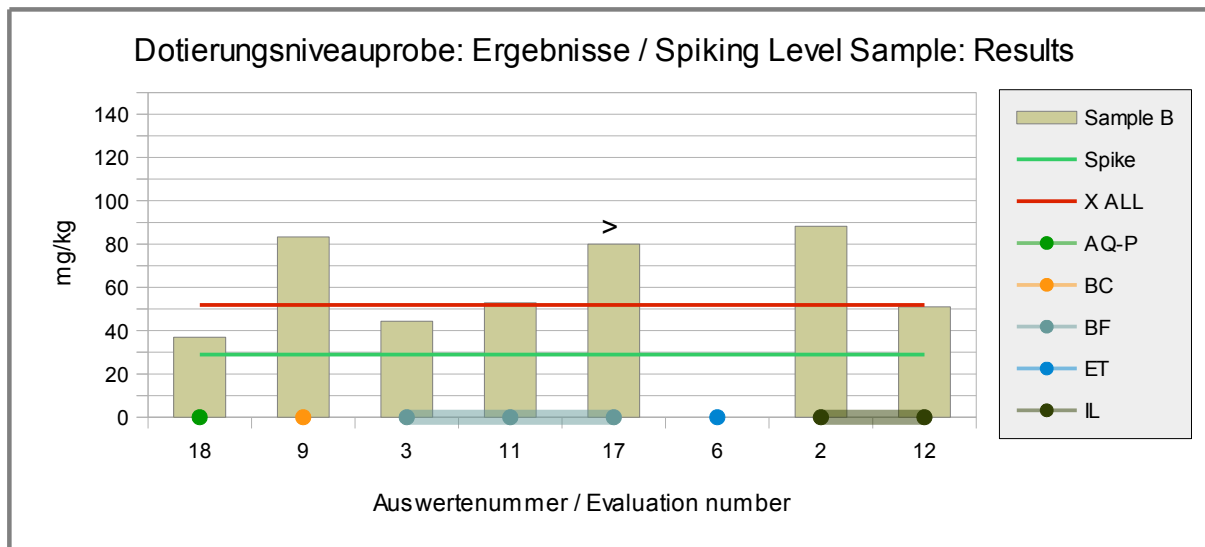
#### Anmerkungen zu den Kenndaten und Vergleich der Bezugswerte:

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

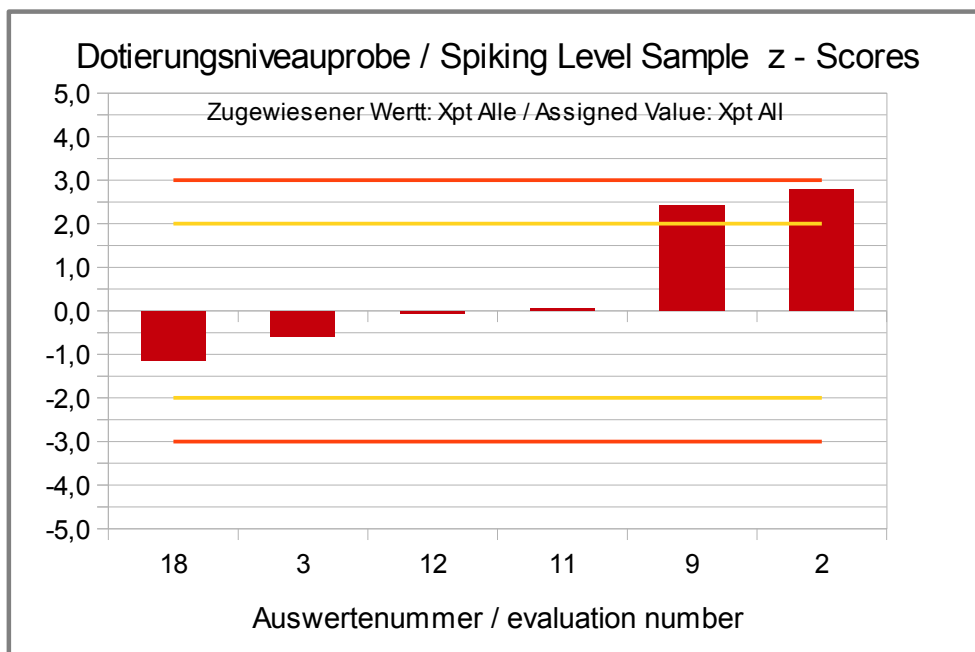
Als zugewiesener Wert wurde der Median verwendet (vgl. 3.1). Die Auswertung der Ergebnisse aller Methoden zeigte eine normale Variabilität der Ergebnisse. Der Quotient  $S^*/\sigma_{pt}$  lag unter 2,0. Die robuste Standardabweichung liegt im oberen Bereich von etablierten Werten für die Wiederhol- und Vergleichsstandardabweichung der eingesetzten Bestimmungsmethoden (vgl. 3.4.2 Auswertung eines Versuchs zur Präzision und 3.4.3 Werte aus Erkenntnissen). Die Vergleichbarkeit der Ergebnisse ist gegeben. Diese Aussage ist für die methodenübergreifende Auswertung nur eingeschränkt gültig, da insgesamt und die einzelnen Methoden nur wenige Ergebnisse vorlagen.

Der zugewiesene Wert der Auswertung lag mit 179% vom Zusatzniveau von Pistazie zur Dotierungsniveauprobe oberhalb des Bereichs der relevanten Anforderungen für die eingesetzten Methoden (s. 3.4.3 und "Wiederfindungsraten für Pistazie" S.42).





**Abb./Fig. 14:** ELISA-Ergebnisse Pistazie  
 grüne Linie = Zusatzniveau (Spike)  
 rote Linie = robuster Mittelwert aller Ergebnisse  
 runde Symbole = Zuordnung der Methoden (s. Legende)



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

**Wiederfindungsraten ELISA für Pistazie:  
Dotierungsniveauprobe und Probe B**

Auswertenummer	Dotierungsniveauprobe	Wiederfindungsrate*	Probe B	Wiederfindungsrate*	Methode	Hinweis
	[mg/kg]	[%]	[mg/kg]	[%]		
18	37,0	128	50,0	148	AQ-P	
9	83,4	288	111	327	BC	
3	44,4	153	42,4	125	BF	
11	52,8	182	55,6	164	BF	
17	>80		47,0	139	BF	
6			18,0	53	ET	Ergebnis umgerechnet °
2	88,2	304	126	372	IL	
12	51,0	176	34	100	IL	** leichte Kreuzreaktivität zu Haselnuss (s. Dokumentation)

° Umrechnung S. 19

AB**	50-150 %	AB**	50-150 %
Anzahl im AB	1	Anzahl im AB	5
Prozent im AB	17	Prozent im AB	63

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

\*\* Akzeptanzbereich der AOAC für Allergen-ELISAs

**Methoden:**

AQ-P = AgraQuant Plus, RomerLabs

BC = BioCheck ELISA

BF = MonoTrace ELISA, BioFront Technologies

ET = Elution Technologies ELISA Kit

IL = Immunolab

Anmerkung:

Eine der Wiederfindungsraten für die Dotierungsniveauprobe lag mittels ELISA im Bereich der AOAC-Anforderung von 50-150%. Alle anderen lagen oberhalb von 150%.

Für die dotierte Lebensmittelmatrix-Probe B lagen 63% der Wiederfindungsraten im Akzeptanzbereich. Drei weitere lagen oberhalb von 150%. Für die Ergebnisse der Auswertenummern 9, 2 und 12 ist zu beachten, dass auch geringe Gehalte in der undotierten Probe A bestimmt wurden, die zu einer erhöhten Wiederfindungsrate führen können.

**4.2.2 PCR-Ergebnisse: Pistazie**

**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		
5	negativ	< 0,4	positiv	> 0,4	2/2 (100%)	SFA-ID	
10	negativ		positiv		2/2 (100%)	SFA-ID	
8	negativ		positiv	9,6	2/2 (100%)	SFA-Q	
13	negativ		positiv		2/2 (100%)	div	
16	negativ		positiv		2/2 (100%)	div	
18	negativ		positiv		2/2 (100%)	div	

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

**Methoden:**

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

Anmerkung:

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

**Quantitative Auswertung PCR: Probe B**

Eine quantitative Auswertung erfolgte nicht, weil zu wenige quantitative Ergebnisse vorlagen.

**(Quantitative) Auswertung PCR: Dotierungsniveauprobe**

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

Auswertenummer	Pistazie	Pistazie	Methode	Hinweis
	pos/neg	[mg/kg]		
5	positiv	> 0,4	SFA-ID	
10	positiv		SFA-ID	
8	positiv	5,7	SFA-Q	
13	positiv		div	
16	positiv		div	
18	positiv		div	

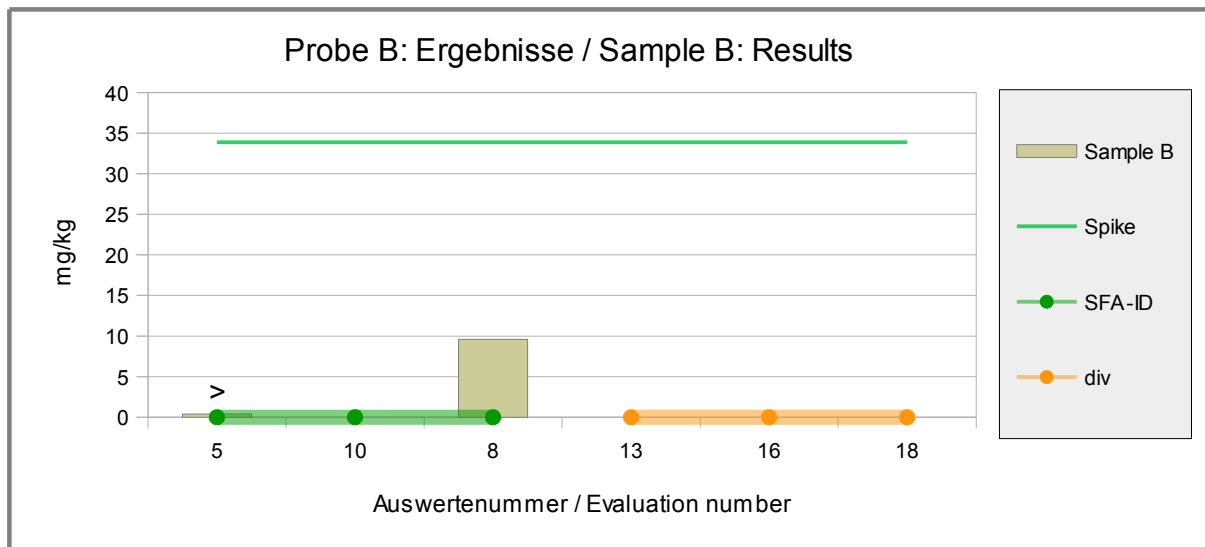
Anzahl positiv	6
Anzahl negativ	0
Prozent positiv	100
Prozent negativ	0
Konsenswert	positiv

**Methoden:**

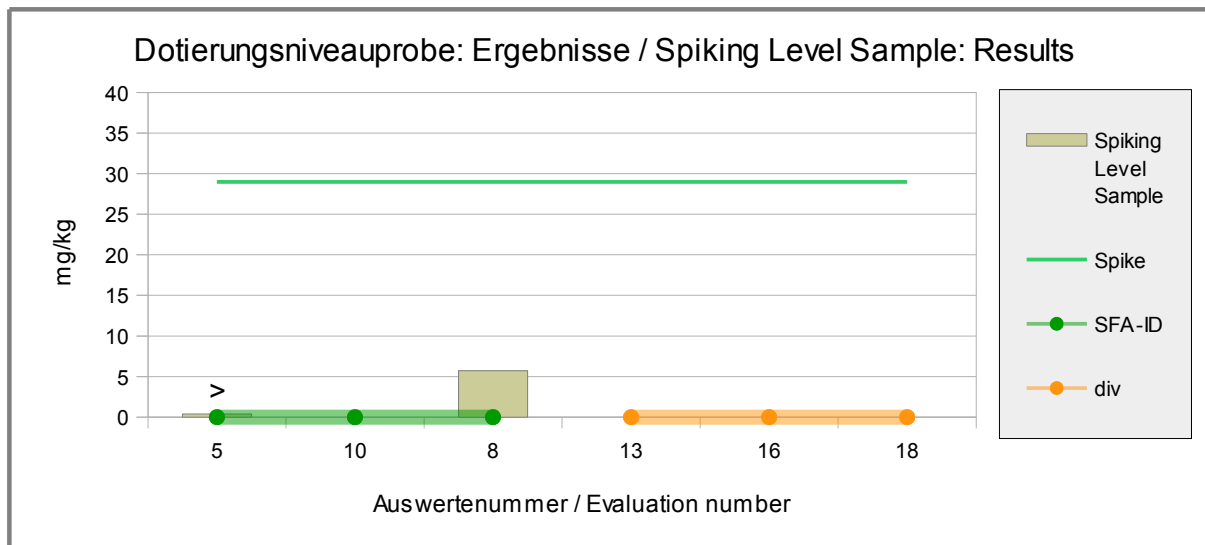
SFA-ID = Sure Food Allergen ID, R-Biopharm / Congen  
 div = keine genaue Angabe / andere Methode

Anmerkung:

Für die Dotierungsniveauprobe wurden 100% positive Ergebnisse erhalten.



**Abb./Fig. 16:** PCR-Ergebnisse Pistazie Probe B  
 grüne Linie = Zusatzniveau (Spike)  
 runde Symbole = Zuordnung der Methoden (s. Legende)



**Abb./Fig. 17:** PCR-Ergebnisse Pistazie Dotierungsniveauprobe  
 grüne Linie = Zusatzniveau (Spike)  
 runde Symbole = Zuordnung der Methoden (s. Legende)

**Wiederfindungsraten PCR für Pistazie:  
Dotierungsniveauprobe und Probe B**

Auswertenummer	Dotierungsniveauprobe	Wiederfindungsrate*	Probe B	Wiederfindungsrate*	Methode	Hinweis
	[mg/kg]	[%]	[mg/kg]	[%]		
5	> 0,4		> 0,4		SFA-ID	
10					SFA-ID	
8	5,7	20	9,6	28	SFA-Q	
13					div	
16					div	
18					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-ID = Sure Food Allergen ID, R-Biopharm / Congen  
div = keine genaue Angabe / andere Methode

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

\*\* Akzeptanzbereich der AOAC für Allergen-ELISAs

Anmerkung:

Ein Teilnehmer hat quantitative Ergebnisse mittels PCR bestimmt. Sowohl für die Dotierungsniveauprobe als auch die dotierte Lebensmittelmatrix-Probe B lagen die Wiederfindungsraten unterhalb des Bereichs der AOAC-Anforderung von 50-150%.

## 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: Mandel

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	13	06.10.17	positiv	0,5	positiv	26	positiv	22	Mandel	AgraQuant ELISA Almond COKAL0748, RomerLabs
BF	3	07.10.17	negativ	ND	positiv	41,93	positiv	30,57	Mandel	MonoTrace Almond ELISA kit, BioFront Technologies
BM	4	26.10.17	positiv	0,53	positiv	16,79	positiv	13,91	Mandel	ALERTOX ELISA ALMOND / KT-5910 / BIOMEDAL DIAGNOSTICS
IL	1	24.10.17	-	<0,4	-	21,8	-	18,6	Mandel	Immunolab Almond ELISA
IL	2	17.10.17	negativ	< 0,4	positiv	22,6	positiv	16,8	Mandel	Immunolab Almond ELISA
IL	12	09.10.17	negativ	< 1	positiv	25	positiv	15	Mandel	Immunolab Almond ELISA
RS-F	5		negativ	<1.2	positiv	23	positiv	16	Mandel	R6901 RIDASCREEN FAST Almond R-Biopharm
RS-F	8	19.10.17	negativ		positiv	23,8	positiv	13,8	Mandelprotein	Ridascreen® FAST Almond R6901, R-Biopharm
RS-F	9	17.10.17	negativ	<2.5	positiv	16,16	positiv	19,9	Mandel	Ridascreen® FAST Almond R6901, R-Biopharm
RS-F	10	27.10.	negativ	< 2,5	positiv	22,4	positiv	13,8	Mandel	RIDASCREEN® FAST Almond, R6901, R-Biopharm
RS-F	15		negativ	< 2,5	positiv	13	positiv	13,5	Lebensmittel Mandel	Ridascreen® FAST Almond R6901, R-Biopharm
RS-F	17	17.10.17	negativ	<2,5	positiv	>20	positiv	16	Mandel	Ridascreen® FAST Almond R6901, R-Biopharm
RS-F	18a	25.10./14.11.17	negativ	<2.5	positiv	17	positiv	17	Mandel	Ridascreen® FAST Almond R6901, R-Biopharm
VT	6	2017-10-13 et 20	negativ	<2,5	positiv	41	-		Mandel	Veratox Almond, Neogen
VT	11	30/10	positiv	3,8	positiv	20,1	positiv	18,8	Mandel	Veratox Almond, Neogen
VT	14	17.10.17	negativ	<2.5	positiv	11	-		Mandel	Veratox Almond, Neogen
VT	18b	09.11./13.11.17	negativ	<2.5	positiv	16	positiv	15	Mandel	Veratox Almond, Neogen

Fortsetzung ELISA Mandel:

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	13		gemäß Testkit-Anleitung	ja	
BF	3	Monoklonaler Antikörper	1:20 Extraktionsverhältnis, 10 min bei 60°C	nein	nn = nicht nachweisbar
BM	4	Kreuzreaktivitäten: Mandel 100%, Pfirsichkerne 15.95%, Pflaumenk. 9.82%, Süßkirsche 1.74%, Mahalebk. 1.42%, Chilip. 0.00018%	Einwaage: 0,5 g/ Extraktionslösung: 10ml / Inkubationstemp. 60°C für 15min / ELISA FILTER: 450nm /	ja	
IL	1			nein	
IL	2			ja	
IL	12				
RS-F	5				
RS-F	8			ja	
RS-F	9	nach Testkitanleitung	nach Testkitanleitung	ja	
RS-F	10		nach Herstelleranleitung	ja	
RS-F	15	Mandelprotein	nach Testanleitung	ja	
RS-F	17			ja	
RS-F	18a				Nachweisgrenze: 2.5 mg/kg
VT	6			ja	
VT	11			ja	
VT	14		125mL PBS / 15min / 60°C	ja	
VT	18b				Nachweisgrenze: 2.5 mg/kg



**5.1.2 ELISA: Pistazie**

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
AQ-P	18	23.11./30.11.17	negativ	<10	positiv	50	positiv	37	Pistazie	AgraQuant Plus ELISA Pistachio COKAL2748F, RomerLabs
BC	9	17.10.17	positiv	6,88	positiv	110,66	positiv	83,36	Pistazie	BioCheck ELISA Pistachio-Check
BF	3	14.11.17	negativ	n.n.	positiv	42,4	positiv	44,35	Pistazie	MonoTrace Pistachio ELISA kit, BioFront Technologies
BF	11	30/10	negativ	<2.0	positiv	55,6	positiv	52,8	Pistazie	MonoTrace Pistachio ELISA kit, BioFront Technologies
BF	17	13.10.17	negativ	<2	positiv	47	positiv	>80	Pistazie	BioFront
ET	6	07.11.17	negativ	<1	positiv	3,9	-		Pistazienprotein	Elution Technologies ELISA Kit Pistachio Protein E-75PST
IL	2	16.11.17	positiv	9,2	positiv	125,9	positiv	88,2	Pistazie	Immunolab Pistachio ELISA
IL	12	09.10.17	positiv**	5,3	positiv	34**	positiv	51	Pistazie	Immunolab Pistachio ELISA

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-P	18				Nachweisgrenze: 10 mg/kg
BC	9	nach Testkitanleitung	nach Testkitanleitung	ja	
BF	3	Monoklonaler Antikörper	1:10 Extraktionsverhältnis, 10 min bei 60°C	nein	nn = nicht nachweisbar
BF	11			nein	
BF	17			nein	
ET	6			ja	
IL	2			ja	
IL	12				** Test hat leichte Kreuzreaktion zu Haselnuss, Probe A ggf. negativ, Probe B ist in Folge dessen nicht verdünnungslinear

5.1.3 PCR: Mandel

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							z.B. Lebensmittel / Protein	Test-Kit + Anbieter
ASU	13	24.10.17	negativ		positiv		positiv		Mandel-DNA	\$64 ASU L 18.00-22
ASU	16		negativ		positiv		positiv		Bitte auswählen!	ASU \$64 Methode/method
MS	7	25.10.17	negativ		positiv		positiv		Mandel-DNA	Microsynth
SFA-ID	5		negativ	<4	positiv	> 4	positiv	> 4	DNA Mandel	SureFood® ALLERGEN Almond Art.-No. S3104 Congen
SFA-ID	8	19.10.17	negativ		positiv		positiv		Mandel	Sure Food Allergen ID, R-Biopharm / Congen
SFA-ID	9	07.10.17	negativ	<1	positiv	13,08	positiv	7,22	Mandel	Sure Food Allergen ID, R-Biopharm / Congen
SFA-ID	15		negativ		positiv		positiv		Mandel	SureFood®Allergen ID AlmondFa. r-biopharm (S3104)
div	18	14./17./21.1.17	negativ		positiv		positiv		Bitte auswählen!	realtime PCR

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	
ASU	13		Extraktion mit Macherey & Nagel NucleoSpin Food Kit, 2 g Einw aage, als Singleplex durchgeführt	ja	
ASU	16	non specific lipid transfer protein	Silica-Säulchen	nein	
MS	7	Mandel	Macherey Nagel Nucleo Spin Food mit Optimierungen: erhöhte Einw aage, Umpufferung (Waschschrift mit Lysis Buffer) RNase-Schritt, Chloroform-Schritt, 2xCQW; RealTime PCR mit 45 Zyklen, Dekontaminationsschritt mit UNG; Inhibitionskontrolle	ja	NWG: 0,005% DNA
SFA-ID	5				
SFA-ID	8			ja	LOD 4 ppm
SFA-ID	9	nach Testkitanleitung	nach Testkitanleitung	nein	
SFA-ID	15		Dneasy American Food Kit/ Proteinase K/ Real Time PCR/ 45 Zyklen	ja	
div	18	nsLTP			Nachweisgrenze: 10-20 DNA-Kopien

**5.1.4 PCR: Pistazie**

Meth. Abk.	Auswertenummer	Datum der Analyse	Ergebnis Probe A		Ergebnis Probe B		Ergebnis Dotierungsprobe		Quantitatives Ergebnis als	Methode
			qualitativ	mg/kg	qualitativ	mg/kg	qualitativ	mg/kg		
SFA-ID	5		negativ	<0.4	positiv	> 0.4	positiv	> 0.4	DNA Pistazie	SureFood® ALLERGEN Pistachio Art.-No. S3114 Congen
SFA-ID	10	13.10.	negativ		positiv		positiv		Pistazie	SureFood® Allergen ID Pistachio, R3114, R-Biopharm/Congen
SFA-Q	8	19.10.17	negativ		positiv	9,6	positiv	5,7	Pistazie	Sure Food Allergen Quant, R-Biopharm / Congen
div	13	16.10.17	negativ		positiv		positiv		Pistazie-DNA	Köppel et al 2012
div	16		negativ		positiv		positiv		Bitte auswählen!	Hausmethode
div	18	17.11.17	negativ		positiv		positiv		Bitte auswählen!	realtime PCR

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-ID	5				
SFA-ID	10		SureFood® PREP Allergen, Protokoll 2, S1053, R-Biopharm/Congen	ja	
SFA-Q	8			nein	LOD 0,4 ppm, LOQ 1 ppm
div	13	Dehydrin Y07600	Extraktion mit Macherey & Nagel NucleoSpin Food Kit, 2 g Einw aage,	ja	
div	16	Pistazie	Silica-Säulchen	nein	
div	18	COR			Nachweisgrenze: 10-20 DNA-Kopien

## 5.2 Homogenität

### 5.2.1 Mischungshomogenität vor der Abfüllung

#### Microtracer Homogenitätstest

##### DLA 06-2017 Dotierungsprobe

Gewicht Gesamtprobe	1,56	kg
Microtracer	FSS-rot lake	
Teilchengröße	75 – 300	µm
Gewicht pro Partikel	2,0	µg
Tracerzugabe	34,6	mg/kg

#### Analysenergebnisse:

Probe	Einwaage [g]	Partikel Anzahl	Partikel [mg/kg]
1	5,02	152	60,6
2	5,01	162	64,7
3	5,03	157	62,4
4	4,97	139	55,9
5	5,03	149	59,2
6	4,98	127	51,0
7	5,12	154	60,2
8	5,06	159	62,8

#### Poisson-Verteilung

Probenanzahl	8	
Freiheitsgrad	7	
Mittelwert	149,8	Partikel
Standardabweichung	10,95	Partikel
$\chi^2$ (CHI-Quadrat)	5,60	
<b>Wahrscheinlichkeit</b>	<b>59</b>	%
Wiederfindungsrate	172	%

#### Normalverteilung

Probenanzahl	8	
Mittelwert	59,6	mg/kg
Standardabweichung	4,36	mg/kg
rel. Standardabweichung	7,31	%
Horwitz Standardabweichung	8,65	%
<b>HorRat-Wert</b>	<b>0,85</b>	
Wiederfindungsrate	172	%

**5.3 Informationen zur Eignungsprüfung (EP)**

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

EP-Nummer	<b>DLA 06-2017</b>
EP-Name	<b>Allergene VI: Mandel und Pistazie in Brotaufstrich (Kakaocreme)</b>
Probenmatrix (Prozessierung)	<b>Proben A + B:</b> Nuss-Nugat-Creme / Zutaten: Zucker, Pflanzenfett, Haselnüsse, fettarmer Kakao, Magermilchpulver, Emulgator: Lecithine, Vanillin, weitere Zusatzstoffe und Allergene Lebensmittel (eine der beiden Proben) <b>Dotierungsniveauprobe:</b> Kartoffelpulver, weitere Zusatzstoffe und Allergene Lebensmittel
Probenzahl und Probenmenge	2 unterschiedliche Proben A + B: je 25 g + 1 Dotierungsniveauprobe: 15 g
Lagerungsinformation	Proben A + B: gekühlt 2 - 10 °C (Langzeit < -18°C) Dotierungsniveauprobe: Raumtemperatur
Verwendungszweck	Ausschließlich für Laboruntersuchungen (Qualitätskontrollproben)
Parameter	qualitativ + quantitativ: Mandel, Pistazie (als Lebensmittel, Protein, 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. Am besten wird jeweils die gesamte Probenmenge homogenisiert.
Ergebnisangabe	Es werden für jede Probe A , B und Dotierungsniveauprobe je ein Ergebnis ermittelt. Die Einzelergebnisse sind in die Ergebnisabgabe-Datei einzutragen.
Einheiten	mg/kg
Anzahl von Stellen	mindestens 2 signifikante Stellen
Ergebnisabgabe	Die Ergebnisabgabe-Datei wird per eMail übermittelt an: <b>pt@dla-lvu.de</b>
Abgabetermin	<b>spätestens 17. November 2017</b>
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.



## 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 inter-laboratory comparisons
4. ASU §64 LFGB: Planung und statistische Auswertung von Ringversuchen zur Methodenvalidierung / 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. Horwitz Equation as Quality Benchmark in ISO/IEC 17025 Testing Laboratory, Rivera & Rodriguez, Bufete de ingenieros industriales, S.C. (Corrigendum 2014)
17. AOAC Official Methods of Analysis: Guidelines for Standard Method Performance Requirements, Appendix F, p. 2, AOAC Int (2016)
18. 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
19. 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
20. 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
21. 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
22. Ministry of Health and Welfare, JSM, Japan 2006

23. 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)
24. 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)
25. 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)
26. EFSA (2014) Scientific Opinion on the evaluation of allergenic foods and food ingredients for labelling purposes<sup>1</sup>, EFSA Panel on Dietetic Products, Nutrition and Allergies (NDA), European Food Safety Authority (EFSA), Parma, Italy, EFSA Journal 2014;12(11):3894
27. 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
28. 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
29. ASU §64 LFGB L 06.00-56 Bestimmung von Sojaprotein in Fleisch und Fleischerzeugnissen Enzymimmunologisches Verfahren (2007) [Determination of soyprotein in meat and meat products by enzyme immunoassay]
30. ASU §64 LFGB L 00.00-69 Bestimmung von Erdnuss-Kontaminationen in Lebensmitteln mittels ELISA im Mikrotiterplattensystem (2003) [Foodstuffs, determination of peanut contaminations in foodstuffs by ELISA in microtiterplates]
31. ASU §64 LFGB L 44.00-7 Bestimmung von Haselnuss-Kontaminationen in Schokolade und Schokoladenwaren mittels ELISA im Mikrotiterplattensystem (2006) [Foodstuffs, determination of hazelnut contaminations in chocolate and chocolate products by ELISA in microtiterplates]
32. ASU §64 LFGB L 18.00-20 Untersuchung von Lebensmitteln - Nachweis und Bestimmung von Mandel (Prunus dulcis) in Reis- und Weizenkeksen sowie in Soßenpulver mittels real-time PCR (2014) [Foodstuffs, detection and determination of almond (Prunus dulcis) in rice and wheat cookies and sauce powders by PCR]
33. ASU §64 LFGB L 18.00-21 Untersuchung von Lebensmitteln - Nachweis und Bestimmung von Paranuss (Bertholletia exceisa) in Reis- und Weizenkeksen sowie in Soßenpulver mittels real-time PCR (2014) [Foodstuffs, detection and determination of brazil nut (Bertholletia exceisa) in rice and wheat cookies and sauce powders by PCR]
34. ASU §64 LFGB L 18.00-22 Untersuchung von Lebensmitteln - Simultaner Nachweis und Bestimmung von Lupine, Mandel, Paranuss und Sesam in Reis- und Weizenkeksen sowie Soßenpulver mittels real-time PCR (2014) [Foodstuffs, simultaneous detection and determination of lupin, almond, brazil nut and sesame in rice and wheat cookies and sauce powders by PCR]



**DLA 06/2017 - Allergene VI**

Alle 18 Teilnehmer haben mindestens ein Ergebnis eingereicht. Die Auswertung hinsichtlich der Parameter Mandel und Pistazie erfolgte für ELISA-Methoden qualitativ und quantitativ. Die PCR-Methoden wurden für die beiden Parameter qualitativ bewertet. Zusätzlich wurde für jedes quantitative Ergebnis eine Wiederfindungsrate für die Dotierungsmaterialprobe und die dotierte Probe ermittelt. Details zu den einzelnen Parametern inklusive separater Auswertung nach Testkit-Herstellern sind dem Auswertebereich zu entnehmen.

7 Teilnehmer hatten ihren Sitz im Europäischen Ausland (Griechenland, Großbritannien, Italien, Österreich, Schweiz, Spanien) und vier Teilnehmer in Kanada und den USA.