

Proficiency Tests

**DLA**

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

## **Auswertungs-Bericht**

Laborvergleichsuntersuchung

**DLA 07/2017**

**Allergene VII:**

**Erdnuss und Mollusken**

**in Suppenpulver**

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</i> <i>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</i> <i>PT-Number</i></p>	<p>DLA 07/2017</p>
<p><i>EP-Koordinator</i> <i>PT-Coordinator</i></p>	<p>Dr. Matthias Besler-Scharf</p>
<p><i>Status des EP-Bericht</i> <i>Status of PT-Report</i></p>	<p>Abschlussbericht / Final report (11. April 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</i> <i>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: 11. April 2018</p>
<p><i>Unteraufträge</i> <i>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</i> <i>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.....	7
2.1.2 Stabilität.....	9
2.2 Probenversand und Informationen zur Untersuchung.....	9
2.3 Ergebnisübermittlung.....	10
3. Auswertung.....	11
3.1 Konsenswert der Teilnehmer (zugewiesener Wert).....	11
3.2 Robuste Standardabweichung.....	12
3.3 Ausschluss von Ergebnissen und Ausreißer.....	12
3.4 Zielstandardabweichung (für die Eignungsbeurteilung).....	13
3.4.1 Allgemeines Modell nach Horwitz.....	13
3.4.2 Auswertung eines Versuchs zur Präzision .....	13
3.4.3 Werte aus Erkenntnissen .....	16
3.5 z-Score.....	17
3.6 z'-Score.....	18
3.7 Quotient S*/opt.....	18
3.8 Standardunsicherheit und meteorologische Rückführbarkeit. .	18
3.9 Graphische Darstellung der Bezugswerte.....	19
3.10 Wiederfindungsraten: Dotierung.....	19
4. Ergebnisse.....	20
4.1 Vergleichsuntersuchung Erdnuss.....	22
4.1.1 ELISA-Ergebnisse: Erdnuss.....	22
4.1.2 PCR-Ergebnisse: Erdnuss.....	32
4.2 Vergleichsuntersuchung Mollusken.....	36
4.2.1 ELISA-Ergebnisse: Mollusken (Tintenfisch, getrocknet). .	36
4.2.2 PCR-Ergebnisse: Mollusken (Tintenfisch, getrocknet). .	39
5. Dokumentation.....	41
5.1 Angaben der Teilnehmer.....	41
5.1.1 ELISA: Erdnuss.....	41
5.1.2 ELISA: Mollusken.....	43
5.1.3 PCR: Erdnuss.....	44
5.1.4 PCR: Mollusken.....	45
5.2 Homogenität.....	47
5.2.1 Mischungshomogenität vor der Abfüllung.....	47
5.3 Informationen zur Eignungsprüfung (EP).....	49
6. Verzeichnis der Teilnehmer in alphabetischer Reihenfolge.....	51
7. Verzeichnis relevanter Literatur.....	52

## 1. Einleitung

Die Teilnahme an Laborvergleichsuntersuchungen (LVU) bzw. Eignungsprüfungen (PT) ist ein unverzichtbares Element für das Qualitäts-Management-System eines jeden, mit der Untersuchung von Lebensmitteln, Futtermitteln, kosmetischen Mitteln und Bedarfsgegenständen befassten Labors. Die Durchführung von Laborvergleichsuntersuchungen ermöglicht den teilnehmenden Laboren die eigene analytische Kompetenz unter realen Bedingungen nachzuweisen. Gleichzeitig erhalten sie wertvolle Daten für die erforderliche Verifizierung oder Validierung der durchgeführten Untersuchungsmethode [1, 5].

Das Ziel von DLA ist es, LVU für ausgesuchte Parameter in praxisrelevanten Konzentrationen und Matrices anzubieten.

Durchführung und Auswertung der vorliegenden Laborvergleichsuntersuchung erfolgten nach den technischen Anforderungen der DIN EN ISO/IEC 17043 (2010) und DIN ISO 13528-2009 bzw. ISO 13528-2015 [2, 3].

## 2. Durchführung

### 2.1 Untersuchungsmaterial

Zur Untersuchung wurden zwei 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. *Aufgrund des relativ niedrigen Gehalts an Mollusken, wurden zusätzlich je eine weitere Probe M und Dotierungsniveauprobe M verschickt.*

Bei dem Untersuchungsmaterial handelt es sich um handelsübliche Tomatencremesuppe (Pulver) mit Zusatz von Kartoffelmehl. Die Grundzusammensetzung war für die Proben A und B sowie M gleich (s. Tabellen 1a + 1b). Nach dem Sieben (mesh 2,5 mm) wurde die Grundmischung homogenisiert.

Anschließend wurden die **dotierten Proben A und M** folgendermaßen hergestellt: Die Dotierungsmaterialien (Vormischung), die die allergenen Zutaten Erdnuss und Tintenfisch enthalten, wurden mittels Zentrifugalmühle gesiebt (Probe A mesh 250 µm, Probe M mesh 500 µm), dann zu einem Aliquot der Grundmatrix gegeben und die Mischung homogenisiert. Anschließend wurde portionsweise erneut Grundmatrix in bis zu 4 weiteren Schritten zugegeben und jeweils homogenisiert bis die Gesamtmenge erreicht war.

Die **Dotierungsniveauproben** wurden mit den oben genannten allergenhaltigen Dotierungsmaterialien unter mehrstufiger Zugabe von Kartoffelpulver (mesh 500 µm) und Homogenisierung hergestellt.

Die Proben A und B sowie M wurden zu Portionen von ca. 25 g und die Dotierungsniveauproben von ca. 15 g in metallisierte PET-Folienbeutel abgefüllt.

Tabelle 1a: Zusammensetzung der DLA-Proben A, B und Dotierungsniveauprobe

Zutaten	Probe A	Probe B	Dotierungs- niveauprobe
Tomatencremesuppe (Pulver) Zutaten: Tomatenpulver (39%), Zucker, Stärke, Weizenmehl, jodiertes Salz, Würze, Mal- todextrin, Hefeextrakt, Palmfett, Zwie- beln, Knoblauch, Säuerungsmittel: Ci- tronensäure, Aroma, Verdickungsmittel: Guarkernmehl, Selleriesamen, Kräuter Nährwertangaben pro 100 g: Eiweiß 10 g, Kohlenhydrate 65 g, Fett 2 g	89,7 g/100g	90,0 g/100g	-
Kartoffelmehl	9,7 g/100g	9,7 g/100g	
Kartoffelpulver Zutaten: Kartoffeln, E471, E304, E223, E100	< 0,3 g/100g	-	99,9 g/100 g
<i>Erdnüsse, geröstet:</i> gemahlen, Mischung (18 Produkte aus USA, Asien, Afrika, Südamerika) - als Erdnuss* - davon 23,2% Gesamtprotein**	14,4 mg/kg 3,3 mg/kg	-	18,4 mg/kg 4,3 mg/kg
<i>Tintenfisch (Illex argentinus):</i> getrocknet (60°C), gemahlen - als Tintenfischpulver* - davon 34% Gesamtprotein**	9,9 mg/kg 3,4 mg/kg	-	12,6 mg/kg 4,3 mg/kg
<i>weitere Zutaten:</i> Maltodextrin, Natriumchlorid, Natriumsulfat und Siliciumdioxid	<0,1 g/100 g	-	<0,1 g/100 g

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

\*\* Proteingehalte gemäß Laboranalyse des Rohstoffs (Gesamtstickstoff nach Kjeldahl mit  
F=5,46 für Erdnussprotein und dem allgemeinen Faktor F=6,25 für Tintenfischprotein)

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

Tabelle 1b: Zusammensetzung der DLA-Proben M und Dotierungsniveauprobe M

Zutaten	Probe M	Dotierungsniveauprobe M
Tomatencremesuppe (Pulver) Zutaten: Tomatenpulver (39%), Zucker, Stärke, Weizenmehl, jodiertes Salz, Würze, Maltodextrin, Hefeextrakt, Palmfett, Zwiebeln, Knoblauch, Säuerungsmittel: Citronensäure, Aroma, Verdickungsmittel: Guarkernmehl, Selleriesamen, Kräuter Nährwertangaben pro 100 g: Eiweiß 10 g, Kohlenhydrate 65 g, Fett 2 g	89,7 g/100g	-
Kartoffelmehl	9,7 g/100g	
Kartoffelpulver Zutaten: Kartoffeln, E471, E304, E223, E100	-	99,7 g/100 g
<i>Erdnüsse, geröstet:</i> gemahlen, Mischung (18 Produkte aus USA, Asien, Afrika, Südamerika) - als Erdnuss* - davon 23,2% Gesamtprotein**	-	-
<i>Tintenfisch (Illex argentinus):</i> getrocknet (60°C), gemahlen - als Tintenfischpulver* - davon 34% Gesamtprotein**	79,1 mg/kg 26,9 mg/kg	69,8 mg/kg 23,7 mg/kg
<i>weitere Zutaten:</i> Maltodextrin, Natriumchlorid, Natriumsulfat und Siliciumdioxid	<0,3 g/100 g	<0,3 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=5,46 für Erdnussprotein und dem allgemeinen Faktor F=6,25 für Tintenfischprotein)

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

### 2.1.1 Homogenität

Die **Mischungshomogenität vor der Abfüllung** wurde in 8-fach Bestimmung mittels **Microtracer-Analyse** untersucht. Es handelt sich um eine normierte Methode, die Bestandteil des internationalen GMP-Zertifizierungssystems für Futtermittel ist [14]. Vor der Mischung werden mit Farbstoff beschichtete Eisenpartikel in  $\mu\text{m}$ -Größe zur Probe gegeben und die Partikelzahl wird nach der Homogenisierung in entnommenen Aliquoten bestimmt. Die Bewertung der Mischungshomogenität erfolgt auf Grundlage der Poissonverteilung anhand des chi-Quadrat-Tests. Eine Wahrscheinlichkeit von  $\geq 5\%$  ist gleichzusetzen mit einer guten homogenen Mischung und von  $\geq 25\%$  mit einer exzellenten Mischung [14, 15]. Die Microtracer-Analyse der vorliegenden LVU-Proben A und Dotierungsmaterialprobe sowie M und Dotierungsniveauprobe M hat eine Wahrscheinlichkeit von 40%, 46%, 98% bzw. 98% 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 [17]. Es wurden HorRat-Werte von 1,5, 1,3, 0,6 bzw. 0,7 erhalten. Der HorRat-Wert von 1,5 für Probe A ist leicht erhöht, die Homogenitätsprüfungen mittels ELISA belegen jedoch eine ausreichende Homogenität für Probe A (s. unten). Die Ergebnisse der Microtracer-Analyse sind in der Dokumentation angegeben.

### **Homogenität der abgefüllten dotierten Probe A**

#### Durchführung der Homogenitätstests

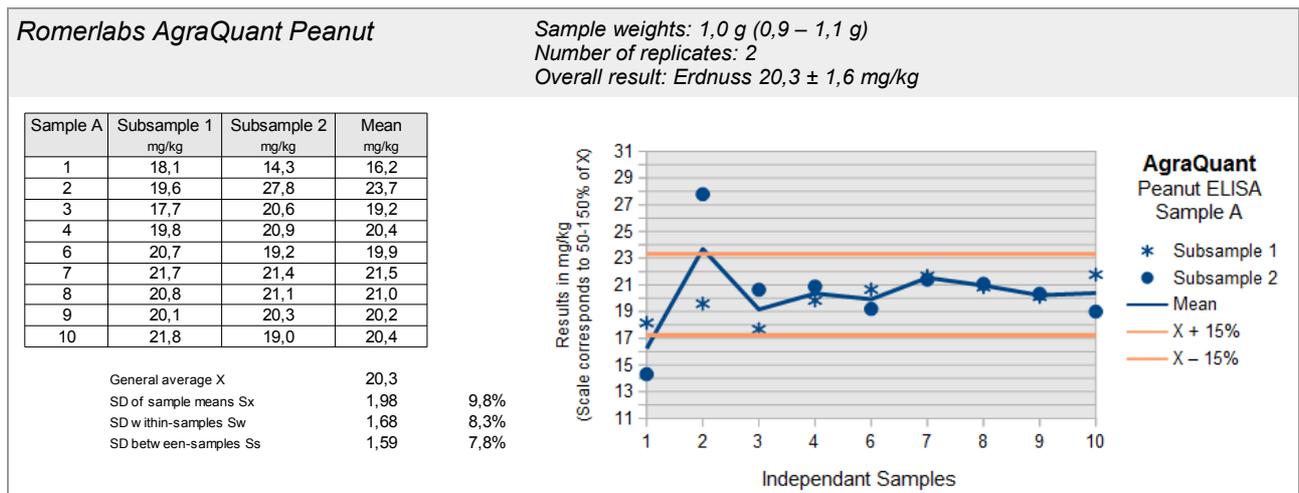
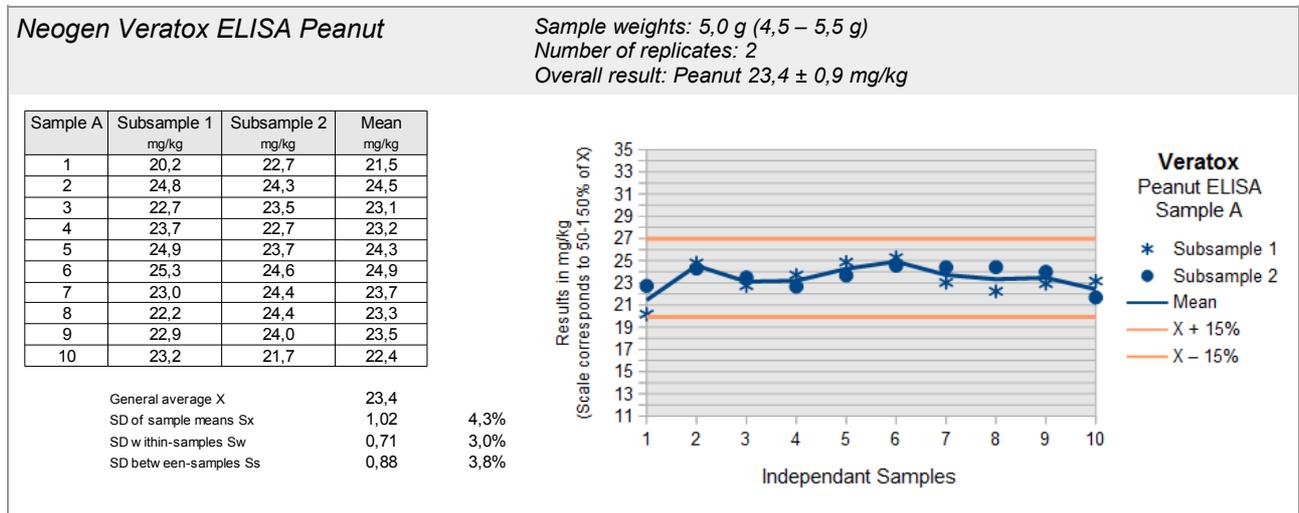
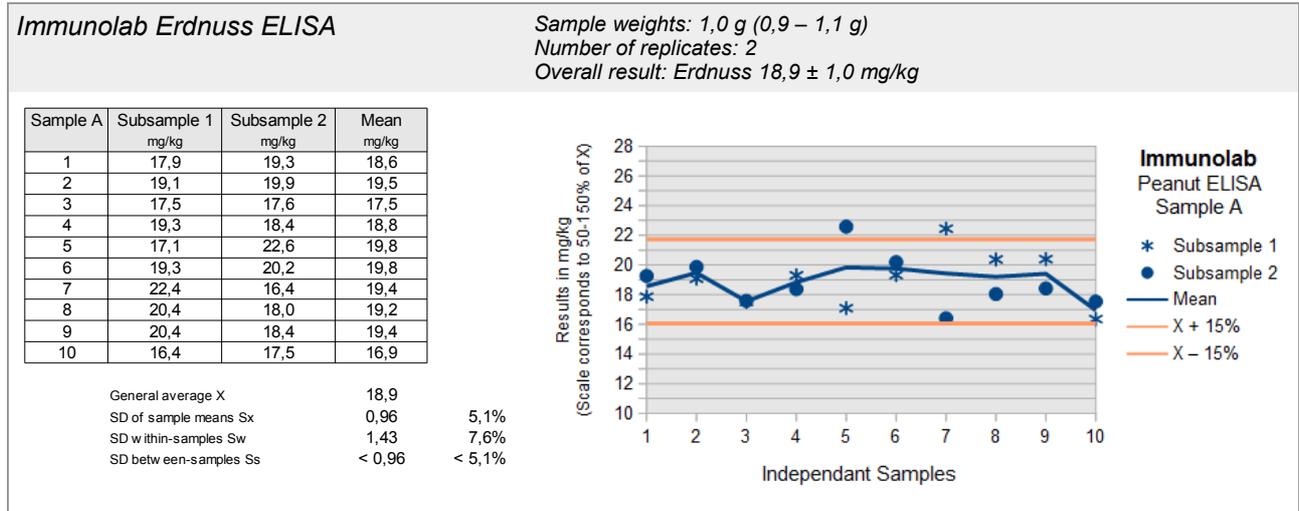
Die Homogenitätstests wurden in Kooperation mit den Labors der angegebenen Testkit-Anbieter durchgeführt. Von DLA wurden zufällig 10 Muster der abgefüllten dotierten Probe ausgewählt und davon jeweils 2 Teilproben in zuvor zufällig-coodierte Extraktionsbehälter eingewogen und anschließend den Labors 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 13528:2015 Anhang B (ggf. inkl. Anmerkungen 1 u. 2) 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 A in allen ELISA-Tests für Erdnuss erfüllt (Immunolab, Veratox und AgraQuant) (s. Seite 7). 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 Erdnuss / Homogeneity Peanut**



### 2.1.2 Stabilität

Eine Wasseraktivität ( $a_w$ ) von  $< 0,5$  ist ein wichtiger Faktor um die Stabilität von trockenen und getrockneten Produkten während der Lagerung zu gewährleisten, optimale Bedingung für die Lagerung ist der  $a_w$ -Wert-Bereich von  $0,15 - 0,3$ , in diesem Bereich ist die geringstmögliche Degradationsrate zu erwarten [16].

Die Erfahrungen mit diversen DLA-Materialien zeigen bei vergleichbarer Matrix und Wasseraktivität ( $a_w$ -Wert  $< 0,5$ ) eine gute Haltbarkeit der EP-Proben und Lagerstabilität gegenüber mikrobiellem Verderb und bezüglich des Gehalts an den EP-Parametern.

Der  $a_w$ -Wert der EP-Proben lag bei ca.  $0,35$  ( $23,3^\circ\text{C}$ ). 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 45. Kalenderwoche 2017 je eine Portion der Untersuchungsmaterialien A, B und eine Dotierungsmaterialprobe sowie die Proben M und eine Dotierungsniveauprobe M in der 50. Kalenderwoche 2017 verschickt. Die Untersuchungsverfahren wurden freigestellt. Die Untersuchungen waren durchzuführen bis spätestens 22. Dezember 2017 bzw. 26. Januar 2018.

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

#### *a) (1. Anschreiben)*

*Es handelt sich um zwei unterschiedliche Proben A und B mit möglichen Gehalten an den allergenen Parametern Erdnuss (geröstet) und/oder Mollusken (Tintenfisch, getrocknet) im mg/kg Bereich in der Matrix Instantsuppenpulver. 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.*

#### *b) (Information per eMail und 2. Anschreiben)*

*Aufgrund des relativ niedrigen Niveaus von Mollusken (hier Tintenfisch) in den zuvor versandten EP-Proben haben wir uns entschlossen eine zusätzliche Probe M sowie eine zusätzliche Dotierungsniveauprobe M, an alle Teilnehmer zu versenden.*

*Wie per eMail angekündigt erhalten Sie hiermit eine zusätzliche Probe M sowie eine zusätzliche Dotierungsniveauprobe M. Diese Proben weisen deutlich höhere Gehalte an Mollusken (Tintenfisch, getrocknet) auf und können optional analysiert werden (Erdnuss ist nicht enthalten).*

*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 14 Teilnehmer haben fristgerecht Ergebnisse abgegeben.

### 3. Auswertung

Verschiedene ELISA-Methoden zur quantitativen Bestimmung von Allergenen in Lebensmitteln können verschiedene Antikörper-Spezifitäten aufweisen, mit unterschiedlichem Referenzmaterial kalibriert worden sein und sich unterschiedlicher Extraktionsverfahren bedienen. Die verschiedenen ELISA-Methoden können daher zu einer unterschiedlichen Bewertung des Gehalts eines Analyten führen [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:  $\Delta \text{Median} - \text{rob. Mittelwert} > 0,3 \sigma_{pt}$ ) [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, zu geringe Anzahl signifikanter Stellen (gültige Ziffern) 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 (Algorithmus A) geprüft: Ergebnisse, die um mehr als das Dreifache der robusten Standardabweichung vom robusten Mittelwert abweichen, können danach als Ausreißer eingestuft werden [3]. Aufgrund der Anwendung der robusten Statistik werden Ausreißer i.d.R. nicht von der Auswertung ausgeschlossen, sofern keine anderen Gründe vorliegen (s.o.) [3]. Ermittelte Ausreißer werden im Ergebnisteil nur genannt, wenn sie von der statistischen Auswertung ausgeschlossen wurden.

### 3.4 Zielstandardabweichung (für die Eignungsbeurteilung)

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

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

#### 3.4.1 Allgemeines Modell nach Horwitz

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

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

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

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

#### 3.4.2 Auswertung eines Versuchs zur Präzision

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

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

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

**Tabelle 2a:** ELISA-Methoden - Relative Wiederholstandardabweichungen ( $RSD_r$ ) und relative Vergleichsstandardabweichungen ( $RSD_R$ ) gemäß ausgewählter Auswertungen von Versuchen zur Präzision und die resultierende Zielstandardabweichung  $\sigma_{pt}$  [30-31]

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 25 - 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 [22] 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 und meteorologische Rückführbarkeit

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.

Die metrologische Rückführbarkeit des zugewiesenen Wertes wird anhand des Konsenswertes als robuster Mittelwert der Teilnehmerergebnisse gewährleistet.

### 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 **Erdnussprotein** angegeben wurden, sind mit dem experimentell bestimmten Proteingehalt der Rohstoffe (s. Seite 5) auf das Gesamtlebensmittel (**Erdnuss**) umgerechnet worden.

Für Tintenfisch / Mollusken lagen nur wenige quantitative Ergebnisse vor. Für die Abschätzung der Wiederfindungsraten wurden die ELISA-Ergebnisse, die als Molluskenprotein angegeben wurden (Elution Technologies), mit dem experimentell bestimmten Proteingehalt der Rohstoffe (s. Seite 5) auf das Gesamtlebensmittel (Tintenfisch, getrocknet) umgerechnet worden. Die als **Tintenfisch, frisch** angegebenen Ergebnisse wurden mit einem Wassergehalt von 80% auf **Trockengewicht** umgerechnet (USDA Nutrient Data Base und Souci/Fachmann/Kraut Nährwert-Tabellen).

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 Erdnuss

#### 4.1.1 ELISA-Ergebnisse: Erdnuss

#### 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	20,3	negativ	<1.0	2/2 (100%)	AQ	
7	positiv	18,0	negativ	< 1	2/2 (100%)	BK	
14	positiv	20,0	negativ	<1	2/2 (100%)	BK	
12b	positiv	24,0	negativ	<1	2/2 (100%)	BK	
6	positiv	123	negativ	< 4	2/2 (100%)	IL	Ergebnis umgerechnet °
8	positiv	18,6	negativ	< 0.1	2/2 (100%)	IL	
10a	positiv	17,3	negativ	<0,3	2/2 (100%)	NL	
1	positiv	42,8	negativ	< 0,13	2/2 (100%)	RS-F	
3	positiv	25,0	negativ	<1.5	2/2 (100%)	RS-F	
4	positiv	24,5	negativ	<2.5	2/2 (100%)	RS-F	
5	positiv	30,9	negativ	< 2,5	2/2 (100%)	RS-F	
9	positiv	140	negativ		2/2 (100%)	RS-F	Ergebnis umgerechnet °
11	positiv	25,1	negativ	<2.5	2/2 (100%)	RS-F	
10b	positiv	17,7	negativ	<0,13	2/2 (100%)	RS-F	
12a	positiv	23,7	negativ	<2,5	2/2 (100%)	VT	

° Umrechnung S. 20

	Probe A	Probe B
Anzahl positiv	15	0
Anzahl negativ	0	15
Prozent positiv	100	0
Prozent negativ	0	100
Konsenswert	positiv	negativ

**Methoden:**

AQ = AgraQuant, RomerLabs  
 BK = BioKits, Neogen  
 IL = Immunolab  
 NL = nutriLinia® Allergen-ELISA  
 RS-F= Ridascreen® Fast, R-Biopharm  
 VT = Veratox, Neogen

Anmerkung:

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

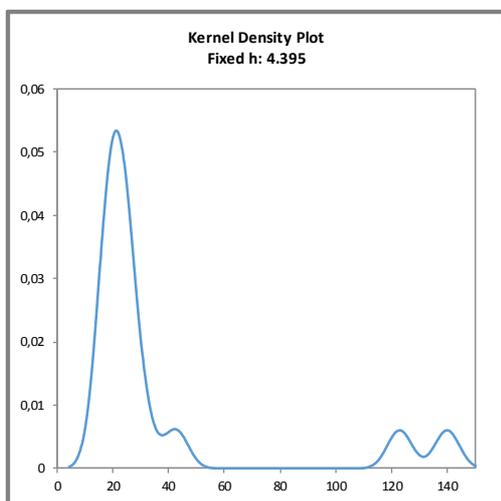
**Quantitative Auswertung ELISA: Probe A**

Auswertenummer	Erdnuss [mg/kg]	z-Score X <sub>pt</sub> ALL	z-Score X <sub>pt</sub> RS-F	Methode	Hinweis
13	20,3	-0,42		AQ	
7	18,0	-0,82		BK	
14	20,0	-0,47		BK	
12b	24,0	0,23		BK	
6	123	18		IL	Ergebnis umgerechnet, Ausreißer ausgeschlossen °
8	18,6	-0,72		IL	
10a	17,3	-0,94		NL	
1	42,8	3,5	6,8	RS-F	
3	25,0	0,41	-0,01	RS-F	
4	24,5	0,32	-0,09	RS-F	
5	30,9	1,5	0,93	RS-F	
9	140	21	18	RS-F	Ergebnis umgerechnet, Ausreißer ausgeschlossen °
11	25,1	0,43	0,01	RS-F	
10b	17,7	-0,9		RS-F	
12a	23,7	0,18		VT	

° Umrechnung S. 20

**Methoden:**

- AQ = AgraQuant, RomerLabs
- BK = BioKits, Neogen
- IL = Immunolab
- NL = nutrilinia® Allergen-ELISA
- 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 einem Nebenpeak eines Ergebnisses bei ca. 43 mg/kg (Methode RS-F) und zwei Peaks > 100 mg/kg, die auf zwei Ausreißer zurückgehen (eventuell wurden hier die Ergebnisse irrtümlich als Erdnussprotein abgegeben).

Kenndaten: Quantitative Auswertung ELISA Erdnuss

**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 **	13	6
Anzahl der Ausreißer	0	0
Mittelwert	23,7	27,7
<b>Median (nur RS-F: <math>X_{pt}</math>)</b>	23,7	<b>25,1</b>
<b>Robuster Mittelwert (<math>X_{pt}</math>)</b>	<b>22,7</b>	27,2
<b>Robuste Standardabweichung (S*)</b>	<b>5,05</b>	<b>8,50</b>
Zielkenndaten:		
<b>Zielstandardabweichung <math>\sigma_{pt}</math></b>	<b>5,67</b>	<b>6,27</b>
<b>Untere Grenze des Zielbereichs</b>	<b>11,3</b>	<b>12,5</b>
<b>Obere Grenze des Zielbereichs</b>	<b>34,0</b>	<b>38,6</b>
Quotient $S^*/\sigma_{pt}$	0,89	1,4
Standardunsicherheit $U(X_{pt})$	1,75	4,30
Quotient $U(X_{pt})/\sigma_{pt}$	0,31	0,69
Ergebnisse im Zielbereich	12	5
Prozent im Zielbereich	92	83

\*\* ohne Ergebnisse von Teilnehmer 6 und 9

**Methoden:**

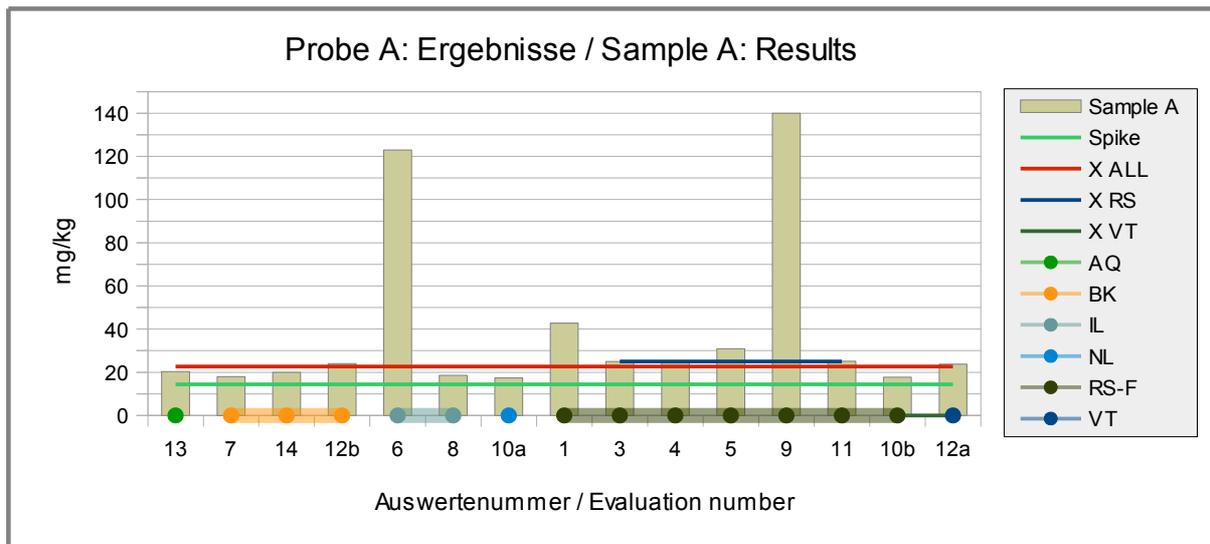
RS-F = R-Biopharm, Ridascreen® Fast

Anmerkungen zu den Kenndaten und Vergleich der Bezugswerte:

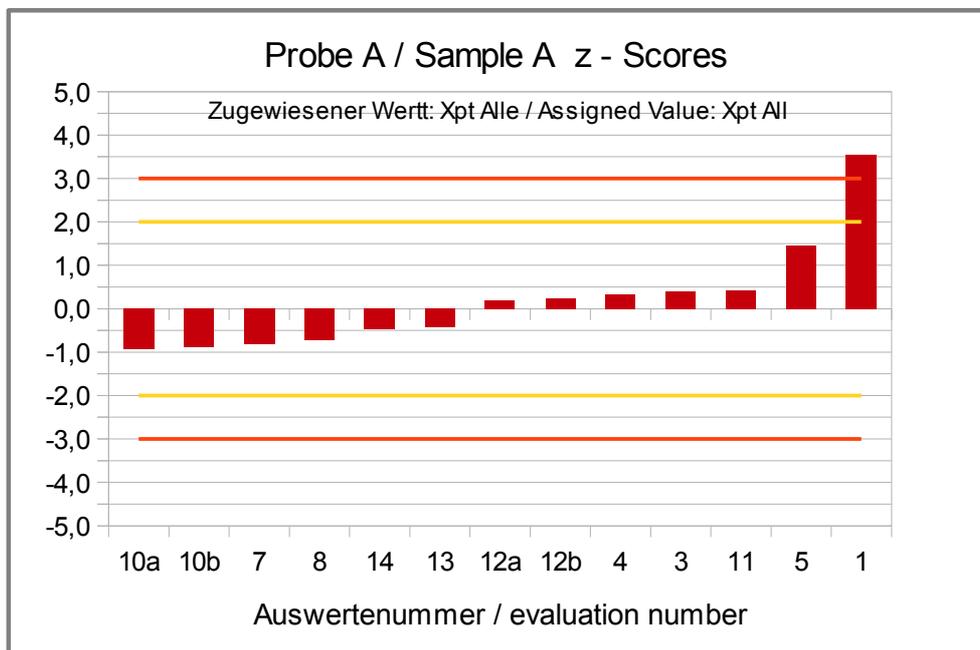
Die Kerndichte-Schätzung zeigte annähernd eine symmetrische Verteilung der Ergebnisse. Die Ergebnisse der Auswertenummern 6 und 9 wurden von den statistischen Berechnungen ausgeschlossen.

Die Auswertungen der Ergebnisse aller Methoden und von Methode RS-F zeigten eine geringe bis normale Variabilität der Ergebnisse. Als zugewiesener Wert für Methode RS-F wurde der Median verwendet (vgl. 3.1). Der Quotient  $S^*/\sigma_{pt}$  lag jeweils 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 für einige Methoden nur wenige Ergebnisse vorlagen.

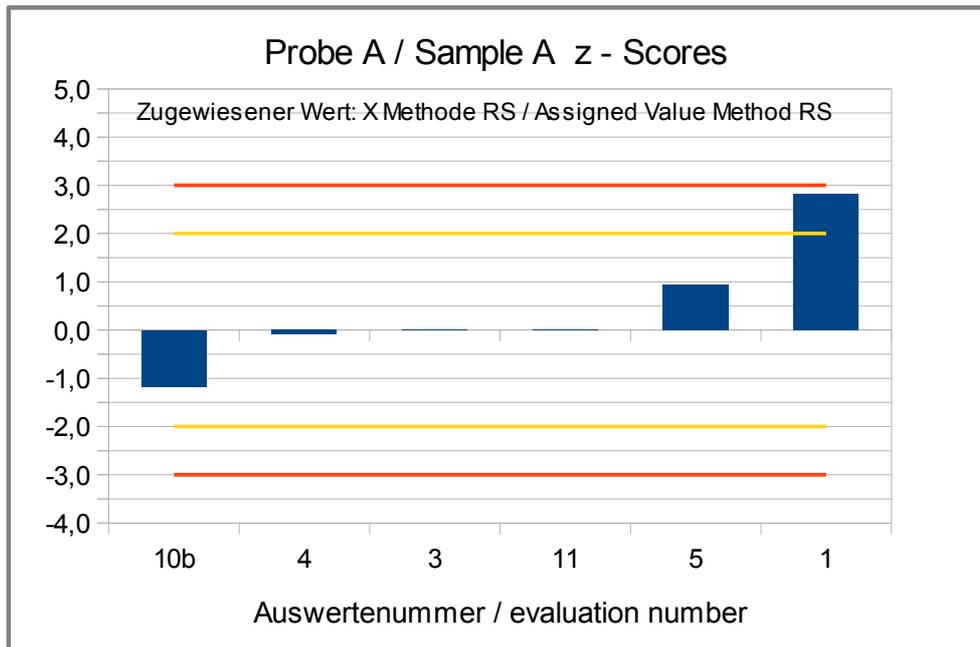
Die zugewiesenen Werte der Auswertungen lagen mit 158% bzw. 174% vom Zusatzniveau von Erdnuss zu Probe A, etwas oberhalb der relevanten Anforderungen für die eingesetzten Methoden (s. 3.4.3 und "Wiederfindungsraten für Erdnuss" S.31).



**Abb./Fig. 2:** ELISA-Ergebnisse Erdnuss  
 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 Erdnuss)  
 Zugewiesener Wert: robuster Mittelwert (Alg. A) aller Ergebnisse



**Abb./Fig. 4:**

z-Scores (ELISA-Ergebnisse als Erdnuss) Bezugswert Median Ergebnisse Methode RS-F (R-Biopharm, Ridascreen Fast)

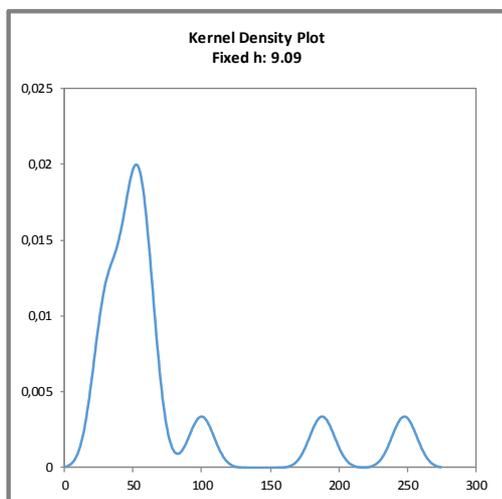
**Quantitative Auswertung ELISA: Dotierungsniveauprobe**

Auswertenummer	Erdnuss [mg/kg]	z-Score X <sub>pt</sub> ALL	z-Score X <sub>pt</sub> RS-F	Methode	Hinweis
13	>40			AQ	
7	43,0	-0,45		BK	
14	48,5	0,00		BK	
12b				BK	
6	188	12		IL	Ergebnis umgerechnet, Ausreißer ausgeschlossen °
8	30,1	-1,5		IL	
10a	27,8	-1,7		NL	
1	100	4,3	6,8	RS-F	
3	60,0	0,95	0,10	RS-F	
4	56,7	0,68	-0,13	RS-F	
5	60,3	1,0	0,12	RS-F	
9	248	16	13	RS-F	Ergebnis umgerechnet, Ausreißer ausgeschlossen °
11	51,5	0,25	-0,48	RS-F	
10b	31,6	-1,4		RS-F	
12a	51,2	0,22		VT	

° Umrechnung S. 20

**Methoden:**

- AQ = AgraQuant, RomerLabs
- BK = BioKits, Neogen
- IL = Immunolab
- NL = nutriLinia® Allergen-ELISA
- RS-F= Ridascreeen® 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 einer leichten Schulter und einem Ergebnispeak bei ca. 100 mg/kg (Methode RS-F) und zwei weiteren Peaks > 150 mg/kg, die auf zwei Ausreißer zurückgehen (eventuell wurden hier die Ergebnisse irrtümlich als Erdnussprotein abgegeben).

**Kenndaten: Quantitative Auswertung ELISA Erdnuss****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 **	11	6
Anzahl der Ausreißer	0	0
Mittelwert	51,0	60,0
Median	51,2	58,4
<b>Robuster Mittelwert (<math>X_{pt}</math>)</b>	<b>48,5</b>	<b>58,6</b>
<b>Robuste Standardabweichung (<math>S^*</math>)</b>	<b>16,10</b>	<b>21,9</b>
<i>Zielkenndaten:</i>		
<b>Zielstandardabweichung <math>\sigma_{pt}</math></b>	<b>12,1</b>	<b>14,60</b>
<b>Untere Grenze des Zielbereichs</b>	<b>24,2</b>	<b>29,3</b>
<b>Obere Grenze des Zielbereichs</b>	<b>72,7</b>	<b>87,8</b>
Quotient $S^*/\sigma_{pt}$	1,3	1,5
Standardunsicherheit $U(X_{pt})$	6,08	11,2
Quotient $U(X_{pt})/\sigma_{pt}$	0,50	0,76
Ergebnisse im Zielbereich	10	5
Prozent im Zielbereich	91	83

\*\* ohne Ergebnisse von Teilnehmer 6 und 9

**Methoden:**

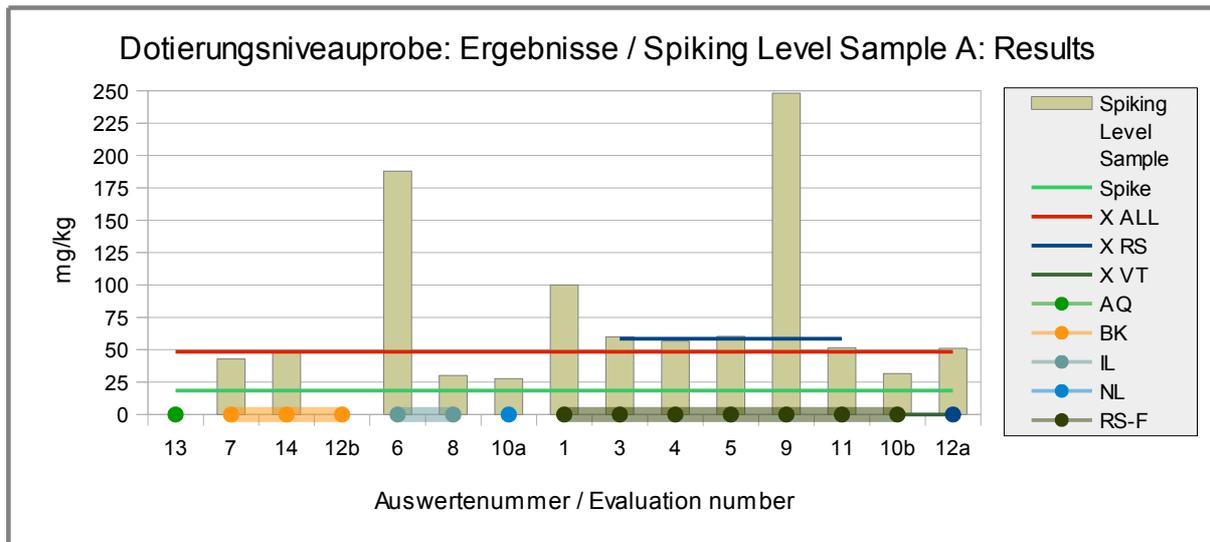
RS-F = R-Biopharm, Ridascreen® Fast

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

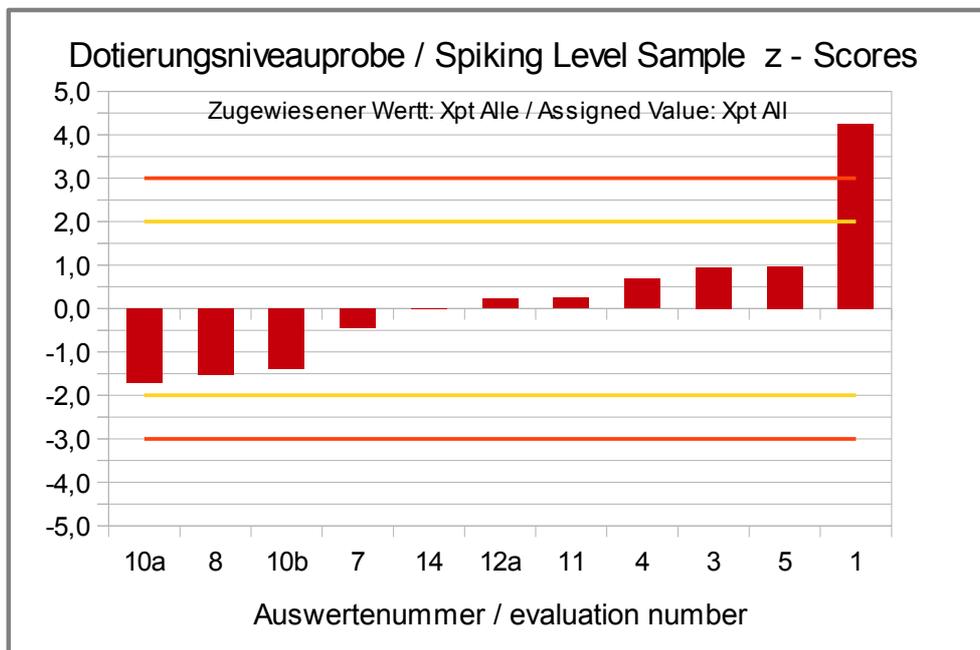
Die Kerndichte-Schätzung zeigte annähernd eine symmetrische Verteilung der Ergebnisse. Die Ergebnisse der Auswertenummern 6 und 9 wurden von den statistischen Berechnungen ausgeschlossen.

Die Auswertungen der Ergebnisse aller Methoden und von Methode RS-F zeigten eine normale Variabilität der Ergebnisse. Der Quotient  $S^*/\sigma_{pt}$  lag jeweils 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 für einige Methoden nur wenige Ergebnisse vorlagen.

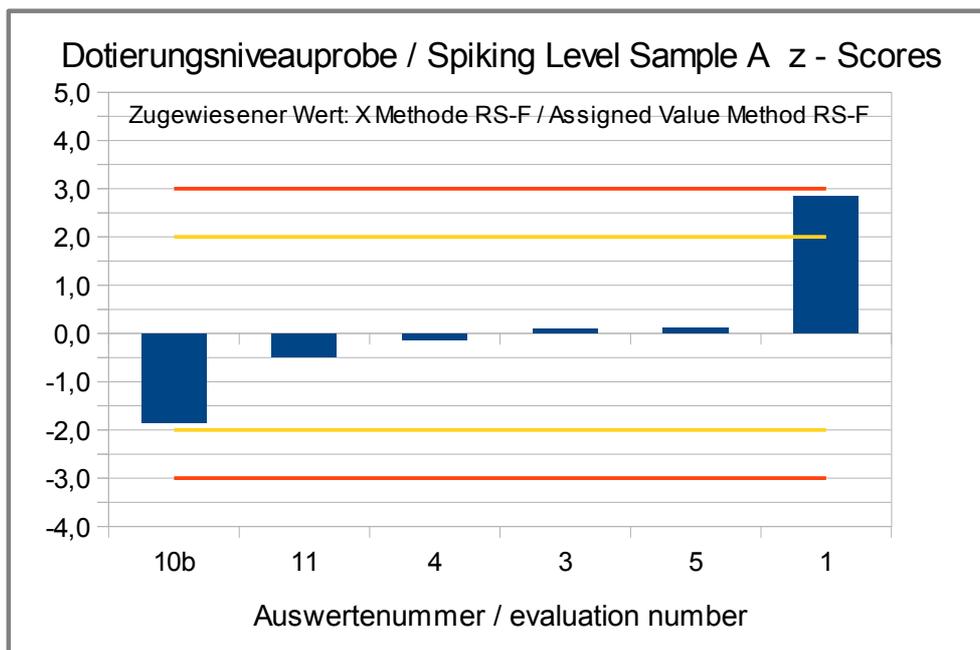
Die zugewiesenen Werte der Auswertungen lagen mit 264% bzw. 318% vom Zusatzniveau von Erdnuss zur Dotierungsniveauprobe, deutlich oberhalb der relevanten Anforderungen für die eingesetzten Methoden (s. 3.4.3 und "Wiederfindungsraten für Erdnuss" S.32).



**Abb./Fig. 6:** ELISA-Ergebnisse Erdnuss  
 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 Erdnuss)  
 Zugewiesener Wert: robuster Mittelwert aller Ergebnisse



**Abb./Fig. 8:**

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

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

Auswertenummer	Dotierungsniveauprobe	Wiederfindungsrate*	Probe A	Wiederfindungsrate*	Methode	Hinweis
	[mg/kg]	[%]	[mg/kg]	[%]		
13	>40		20,3	<b>141</b>	AQ	
7	43,0	234	18,0	<b>125</b>	BK	
14	48,5	264	20,0	<b>139</b>	BK	
12b			24,0	167	BK	
6	188	1024	123	857	IL	Ergebnis umgerechnet °
8	30,1	164	18,6	<b>130</b>	IL	
10a	27,8	151	17,3	<b>121</b>	NL	
1	100	545	42,8	298	RS-F	
3	60,0	327	25,0	174	RS-F	
4	56,7	309	24,5	171	RS-F	
5	60,3	328	30,9	215	RS-F	
9	248	1351	140	976	RS-F	Ergebnis umgerechnet °
11	51,5	280	25,1	175	RS-F	
10b	31,6	172	17,7	<b>123</b>	RS-F	
12a	51,2	279	23,7	165	VT	

° Umrechnung S. 20

AB**	50-150 %	AB**	50-150 %
Anzahl im AB	<b>0</b>	Anzahl im AB	<b>6</b>
Prozent im AB	<b>0</b>	Prozent im AB	<b>40</b>

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

\*\* Akzeptanzbereich der AOAC für Allergen-ELISAs

**Methoden:**

AQ = AgraQuant, RomerLabs

BK = BioKits, Neogen

IL = Immunolab

NL = nutriLinia® Allergen-ELISA

RS-F= Ridascreen® Fast, R-Biopharm

VT = Veratox, Neogen

Anmerkung:

Keine Wiederfindungsrate der Ergebnisse für die Dotierungsniveauprobe lag im Bereich der AOAC-Anforderung von 50-150% mittels der ELISA-Methoden. Für die dotierte Lebensmittelmatrix-Probe A lagen 40% (6) der Wiederfindungsraten in diesem Akzeptanzbereich.

**4.1.2 PCR-Ergebnisse: Erdnuss**

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

Auswertenummer	Probe A	Probe A	Probe B	Probe B	Qualitative Bewertung	Methode	Hinweis
	pos/neg	[mg/kg]	pos/neg	[mg/kg]	Übereinstimmungen mit Konsenswerten		
7	positiv		negativ		2/2 (100%)	ASU	
2	positiv		negativ		2/2 (100%)	MS	
1	positiv	> 4	negativ	< 1	2/2 (100%)	SFA-ID	
3	positiv	> 1	negativ	< 1	2/2 (100%)	SFA-ID	
11	positiv	7,31	negativ	< 1	2/2 (100%)	SFA-ID	
9	positiv	< BG	negativ		2/2 (100%)	SFA-Q	
13	positiv		negativ		2/2 (100%)	div	

	Probe A	Probe B
Anzahl positiv	7	0
Anzahl negativ	0	7
Prozent positiv	100	0
Prozent negativ	0	100
Konsenswert	positiv	negativ

**Methoden:**

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

Anmerkung:

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

**Quantitative Auswertung PCR: Probe A**

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

**(Quantitative) Auswertung PCR: Dotierungsniveauprobe**

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

Auswertenummer	Erdnuss pos/neg	Erdnuss [mg/kg]	z-Score $X_{pt,ALL}$	Methode	Hinweis
7	positiv			ASU	
2	positiv			MS	
1	positiv	> 4		SFA-ID	
3	positiv	> 1		SFA-ID	
11	positiv	21,1		SFA-ID	
9	positiv	< BG		SFA-Q	
13	positiv			div	

Anzahl positiv	7	
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

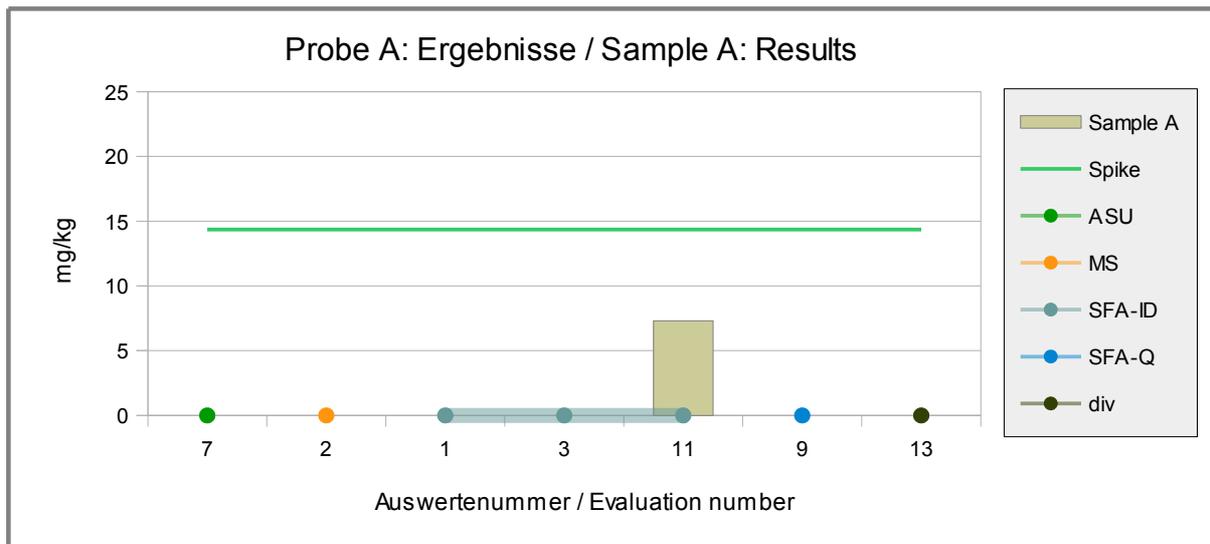
SFA-Q = Sure Food Allergen Quant, R-Biopharm / Congen

div = keine genaue Angabe / andere Methode

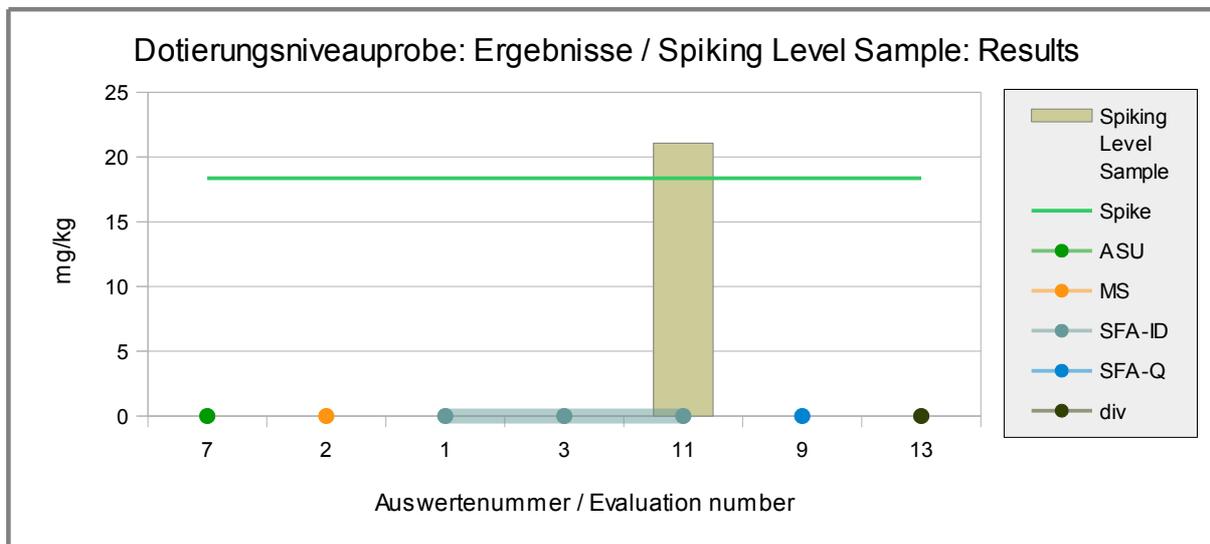
div = not indicated / other method

**Anmerkung:**

Es wurden 100% positive Ergebnisse für die Dotierungsniveauprobe erhalten.



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



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

**Wiederfindungsraten PCR für Erdnuss:  
Dotierungsniveauprobe und Probe A**

Auswertenummer	Dotierungsniveauprobe	Wiederfindungsrate*	Probe A	Wiederfindungsrate*	Methode	Hinweis
	[mg/kg]	[%]	[mg/kg]	[%]		
7					ASU	
2					MS	
1	> 4		> 4		SFA-ID	
3	> 1		> 1		SFA-ID	
11	21,1	<b>115</b>	7,31	<b>51</b>	SFA-ID	
9	< BG		< BG		SFA-Q	
13					div	

AB**	50-150 %	AB**	50-150 %
Anzahl im AB	<b>1</b>	Anzahl im AB	<b>1</b>
Prozent im AB	<b>100</b>	Prozent im AB	<b>100</b>

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

\*\* Akzeptanzbereich der AOAC für Allergen-ELISAs

**Methoden:**

ASU = ASU §64 Methode/method

MS = Microsynth

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

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

div = keine genaue Angabe / andere Methode

div = not indicated / other method

Anmerkung:

Ein Teilnehmer hat sowohl mit der Dotierungsniveauprobe als auch für die dotierte Lebensmittelmatrix-Probe A mittels PCR Wiederfindungsraten im Bereich der AOAC-Anforderung von 50-150% erhalten.

## 4.2 Vergleichsuntersuchung Mollusken

### *4.2.1 ELISA-Ergebnisse: Mollusken (Tintenfisch, getrocknet)*

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

Auswertenummer	Probe A	Probe A	Probe B	Probe B	Probe M	Probe M	Qualitative Bewertung*	Methode	Hinweis
	pos/neg	[mg/kg]	pos/neg	[mg/kg]	pos/neg	[mg/kg]	Übereinstimmungen mit Dotierungen		
11					positiv	1,86	1/1 (100%)	ET	als Molluskenprotein
12	negativ	<1	negativ	< 1	positiv	2,20	2/3 (67%)	ET	als Molluskenprotein
8	positiv	2,5	negativ	< 1,7	positiv	10,0	3/3 (100%)	IL	als Tintenfisch, frisch

° Umrechnung S. 20

#### Methoden:

ET = Elution Technologies ELISA Kit

IL = Immunolab

#### Anmerkung:

Mittels ELISA-Methoden haben 3 Teilnehmer Mollusken (Tintenfisch) in der Probe M und ein Teilnehmer in Probe A nachgewiesen.

\* Die qualitative Bewertung der Ergebnisse erfolgte anhand der Dotierungen der Proben (s. Seite 5-6).

#### Quantitative Auswertung ELISA: Proben A und M

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

**Qualitative Auswertung der Ergebnisse:  
Dotierungsniveauprobe und Dotierungsniveauprobe M**

Auswertenummer	Dotierungsniveauprobe		Dotierungsniveauprobe M		Qualitative Bewertung* Übereinstimmungen mit Dotierungen	Methode	Hinweis
	pos/neg	[mg/kg]	pos/neg	[mg/kg]			
11			positiv	3,08	1/1 (100%)	ET	als Molluskenprotein
12	negativ	<1	positiv	14,0	1/2 (50%)	ET	als Molluskenprotein
8	positiv	3,50	positiv	25,0	2/2 (100%)	IL	als Tintenfisch, frisch

° Umrechnung S. 20

**Methoden:**

ET = Elution Technologies ELISA Kit

IL = Immunolab

Anmerkung:

Mittels ELISA-Methoden haben 3 Teilnehmer Mollusken (Tintenfisch) in der Dotierungsniveauprobe M und ein Teilnehmer in der Dotierungsniveauprobe nachgewiesen.

\* Die qualitative Bewertung der Ergebnisse erfolgte anhand der Dotierungen der Proben (s. Seite 5-6).

**Quantitative Auswertung ELISA: Dotierungsniveauproben**

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

**Wiederfindungsraten ELISA für Mollusken  
(als Tintenfisch, getrocknet):  
Dotierungsniveauprobe M und Probe M**

Auswertenummer	Dotierungsniveauprobe M	Wiederfindungsrate*	Probe M	Wiederfindungsrate*	Methode	Hinweis
	[mg/kg]	[%]	[mg/kg]	[%]		
11	9,06	13	5,47	7	ET	Ergebnis umgerechnet °
12	41,2	<b>59</b>	6,47	8	ET	Ergebnis umgerechnet °
8	5,00	7	2,00	3	IL	Ergebnis umgerechnet °

° Umrechnung S. 20

AB**	50-150 %	AB**	50-150 %
Anzahl im AB	<b>1</b>	Anzahl im AB	<b>0</b>
Prozent im AB	<b>33</b>	Prozent im AB	<b>0</b>

\* Wiederfindungsrate 100% Bezugsgröße: Tintenfisch, getrocknet, s. Seite 6

\*\* Akzeptanzbereich der AOAC für Allergen-ELISAs

**Methoden:**

ET = Elution Technologies ELISA Kit

IL = Immunolab

Anmerkung:

Ein Teilnehmer hat mit der Dotierungsniveauprobe M mittels ELISA eine Wiederfindungsrate im Bereich der AOAC-Anforderung von 50-150% erhalten. Alle anderen Ergebnisse haben Wiederfindungsraten unterhalb des Akzeptanzbereichs ergeben.

**4.2.2 PCR-Ergebnisse: Mollusken (Tintenfisch, getrocknet)****Qualitative Auswertung der Ergebnisse: Proben A, B und M**

Auswertenummer	Probe A pos/neg	Probe A [mg/kg]	Probe B pos/neg	Probe B [mg/kg]	Probe M pos/neg	Probe M [mg/kg]	Qualitative Bewertung* Übereinstimmungen mit Dotierungen	Methode	Hinweis
3	negativ	< 0,4	negativ	< 0,4	positiv	>0.4	2/3 (67%)	SFA-ID	
9	negativ		negativ		positiv		2/3 (67%)	SFA-ID	
11	-		-		negativ	< 1	0/1 (0%)	SFA-ID	keine Positivprobe nachgewiesen
13	negativ		negativ		negativ		1/3 (33%)	SFA-ID	keine Positivprobe nachgewiesen
14	positiv		negativ		-		2/2 (100%)	SFA-ID	
10	positiv		negativ		positiv		3/3 (100%)	div	

**Methoden:**

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

div = keine genaue Angabe / andere Methode

div = not indicated / other method

Anmerkung:

Mittels PCR-Methoden haben 2 von 5 Teilnehmern Mollusken (Tintenfisch) in der Probe A und 3 von 5 Teilnehmern in der Probe M nachgewiesen.

\* Die qualitative Bewertung der Ergebnisse erfolgte anhand der Dotierungen der Proben (s. Seite 5-6).

**Quantitative Auswertung PCR: Proben A und M**

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

**Qualitative Auswertung der Ergebnisse:  
Dotierungsniveauprobe und Dotierungsniveauprobe M**

Auswertenummer	Dotierungsniveauprobe		Dotierungsniveauprobe M		Qualitative Bewertung*	Methode	Hinweis
	pos/neg	[mg/kg]	pos/neg	[mg/kg]			
3	negativ	< 0,4	positiv	> 0,4	1/2 (50%)	SFA-ID	
9	negativ		positiv		1/2 (50%)	SFA-ID	
11			negativ	<1	0/1 (0%)	SFA-ID	keine Positivprobe nachgewiesen
13	negativ		negativ		0/2 (0%)	SFA-ID	keine Positivprobe nachgewiesen
14	positiv		-		1/1 (100%)	SFA-ID	
10	positiv		positiv		2/2 (100%)	div	

**Methoden:**

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

div = keine genaue Angabe / andere Methode

div = not indicated / other method

Anmerkung:

Mittels PCR-Methoden haben 2 von 5 Teilnehmern Mollusken (Tintenfisch) in der Dotierungsprobe und 3 von 5 Teilnehmern in der Dotierungsprobe M nachgewiesen.

\* Die qualitative Bewertung der Ergebnisse erfolgte anhand der Dotierungen der Proben (s. Seite 5-6).

**Quantitative Auswertung PCR: Dotierungsniveauprobe**

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

## 5. Dokumentation

### 5.1 Angaben der Teilnehmer

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

#### 5.1.1 ELISA: Erdnuss

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	26.01.18	positiv	20,27	negativ	<1.0	positiv	>40	Erdnuss	AgraQuant ELISA Peanut COKAL0148, RomerLabs
BK	7	20/21.11	positiv	18	negativ	< 1	positiv	43	Erdnuss	BioKits Peanut Assay Kit, Neogen
BK	14	17.11./22.11.17	positiv	20	negativ	<1	positiv	48,5	Erdnuss	BioKits Peanut Assay Kit, Neogen
BK	12b	19.12.17	positiv	24	negativ	<1	positiv	n/a	Erdnuss	BioKits Peanut Assay Kit, Neogen
IL	6	27.11.17	-	28,6	-	<1,0	-	43,5	Erdnussprotein	Immunolab Peanut ELISA
IL	8	14.11.17	positiv	18,6	negativ	< 0.1	positiv	30,1	Erdnuss	Immunolab Peanut ELISA
NL	10a	04.12.17	positiv	17,33	negativ	<0,3	positiv	27,81	Erdnuss	nutriLinia Peanut-E ELISA (NC-6014), RomerLabs
RS-F	1	20/12	positiv	42,78	negativ	< 0,13	positiv	100,07	Erdnuss	Ridascreen Fast Peanut (R6202), r-Biopharm
RS-F	3	21.12.17	positiv	25	negativ	<1.5	positiv	60	Erdnuss	R6202 Ridascreen Fast Peanut
RS-F	4		24,5	PPM	<2.5	PPM	56,7	PPM		Ridascreen Fast Peanut (R6202), r-Biopharm
RS-F	5	19.12.17	positiv	30,9	negativ	< 2,5	positiv	60,3	Erdnuss	Ridascreen Fast Peanut (R6202), R-Biopharm
RS-F	9	14.11.17	positiv	32,5	negativ		positiv	57,5	Erdnussprotein	Ridascreen Fast Peanut (R6202), r-Biopharm
RS-F	11	09.01.18	positiv	25,12	negativ	<2.5	positiv	51,48	Erdnuss	Ridascreen Fast Peanut (R6202), r-Biopharm
RS-F	10b	04.12.17	positiv	17,7	negativ	<0,13	positiv	31,58	Erdnuss	Ridascreen Fast Peanut (R6202), r-Biopharm
VT	12a	04.12.17	positiv	23,7	negativ	<2,5	positiv	51,2	Erdnuss	Veratox Peanut, Neogen

Fortsetzung ELISA Erdnuss:

Meth. Abk.	Auswertenummer	Spezifität	Hinweise zur Methode (Extraktion und Bestimmung)	Methode akkr. nach ISO/IEC 17025	Sonstige Hinweise
		Antikörper	z.B. Extraktionslösung / Zeit / Temperatur	ja/nein	
AQ	13		ELISA kit instructions followed	ja	
BK	7	Polyklonaler AK gegen Conarachin (Ara h 1)	nach Testanleitung	ja	
BK	14				
BK	12b			ja	
IL	6			nein	
IL	8	Erdnussprotein			
NL	10a		gemäß Testkitaanleitung	ja	
RS-F	1	Antikörper detektiert spezifisch Erdnussproteine, inklusive der Erdnussallergene Ara h 1 und Ara h 2	nach Testkitaanleitung	ja	
RS-F	3				
RS-F	4				
RS-F	5		nach Herstelleranleitung, mit Magermilchpulver	ja	
RS-F	9		Querempfindlichkeit zu Linsen, grünen Erbsen, Bockshornklee	ja	LOD 0,8 mg/kg, LOQ 2,4 mg/kg, Artikelnr. R6202
RS-F	11	nach Testkitaanleitung	nach Testkitaanleitung	ja	
RS-F	10b		gemäß Testkitaanleitung	nein	Methodik in Erarbeitung
VT	12a			ja	

**5.1.2 ELISA: Mollusken**

**Proben A, B und Dotierungsprobe**

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		
ET	12	07.12.17	negativ	<1	negativ	<1	-		Molluskenprotein	Elution Technologies ELISA Kit Mollusk Protein E-75MSK
IL	8	14.11.17	positiv	2,5	negativ	< 1.7	positiv	3,5	Tintenfisch, frisch	Immunolab Mollusc ELISA

Meth. Abk.	Auswertenummer	Spezifität	Hinweise zur Methode (Extraktion und Bestimmung)	Methode akkr. nach ISO/IEC 17025	Sonstige Hinweise
ET	12			ja	
IL	8	Mollusken Tropomyosin			

**Probe M und Dotierungsprobe M**

Meth. Abk.	Auswertenummer	Datum der Analyse	Ergebnis Probe M		Ergebnis Dotierungsprobe M		Quantitatives Ergebnis als	Methode
			qualitativ	mg/kg	qualitativ	mg/kg		
ET	11	15.01.18	positiv	1,86	positiv	3,08	Molluskenprotein	Elution Technologies ELISA Kit Mollusk Protein E-75MSK
ET	12	29.12.17	positiv	2,2	positiv	14	Molluskenprotein	Elution Technologies ELISA Kit Mollusk Protein E-75MSK
IL	8	18.12.17	positiv	10	positiv	25	Tintenfisch, frisch	Immunolab Mollusken ELISA

Meth. Abk.	Auswertenummer	Spezifität	Hinweise zur Methode (Extraktion und Bestimmung)	Methode akkr. nach ISO/IEC 17025	Sonstige Hinweise
ET	11	nach Testkitanleitung	nach Testkitanleitung	nein	
ET	12			ja	
IL	8	Mollusken Tropomyosin			

**5.1.3 PCR: Erdnuss**

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	
ASU	7	16.11.17	positiv		negativ		positiv		Erdnuss	ASU L44.00-11 vom Januar 2013
MS	2	14.11.	positiv		negativ		positiv		Erdnuss-DNA	Microsynth
SFA-ID	1	19/12	positiv	> 4	negativ	< 1	positiv	> 4	Erdnuss-DNA	Sure Food Allergen ID, R-Biopharm / Congen
SFA-ID	3	21.12.17	positiv	>1	negativ	<1	positiv	>1	Erdnuss-DNA	SureFood® ALLERGEN Peanut Art.-No. S3103 Congen
SFA-ID	11	06.01.18	positiv	7,31	negativ	<1	positiv	21,08	Erdnuss	Sure Food Allergen ID, R-Biopharm / Congen
SFA-Q	9	15.11.17	positiv	< BG	negativ		positiv	< BG	Erdnuss-DNA	Sure Food Allergen Quant, R-Biopharm / Congen
div	13		positiv		negativ		positiv		Erdnuss-DNA	

Meth. Abk.	Auswertenummer	Spezifität	Hinweise zur Methode (Extraktion und Bestimmung)	Methode akkr. nach ISO/IEC 17025	Sonstige Hinweise
		Target-Sequenz / -DNA	z.B. Extraktion / Enzyme / Clean-Up / Real Time PCR / Gelelektrophorese / Cyclen	ja/nein	
ASU	7	86bp langer Sequenzabschnitt des Gens für Ara h2	Dneasy <sup>®</sup> mericon Food Kit/ Proteinase K/ Real Time PCR/ 45 Zyklen	ja	
MS	2		Macherey Nagel Nucleo Spin Food mit Optimierungen: erhöhte Einwaage, Umpufferung (Waschschritt mit Lysis Buffer) RNase-Schritt, Chloroform-Schritt, 2xCQW; Real-Time PCR mit 45 Zyklen, Dekontaminationsschritt mit UNG; eigenes Thermoprofil; Inhibitionskontrolle	ja/nein	
SFA-ID	1	Erdnuss-DNA	nach Testkitanleitung	ja	
SFA-ID	3				
SFA-ID	11	nach Testkitanleitung	nach Testkitanleitung	ja	
SFA-Q	9			ja	LOD 1 mg/kg, LOQ 4 mg/kg, Artikelnr. S3203
div	13	ITS	Tris-Extraktion mit Säulen clean up, Endpunkt-PCR.	nein	Hausmethode

**5.1.4 PCR: Mollusken**

**Proben A, B und Dotierungsniveauprobe**

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	3	21.12.17	negativ	<0.4	negativ	<0.4	negativ	<0.4	Mollusken-DNA	SureFood® ALLERGEN Molluscs Art.-No. S3113 Congen
SFA-ID	9	15.11.17	negativ		negativ		negativ		Mollusken-DNA	Sure Food Allergen ID, R-Biopharm / Congen
SFA-ID	13		negativ		negativ		negativ		Mollusken-DNA	Sure Food Allergen ID, R-Biopharm / Congen
SFA-ID	14	08.12.17	positiv		negativ		positiv		Bitte auswählen!	Sure Food Allergen ID, R-Biopharm / Congen
div	10		positiv		negativ		positiv		Tintenfisch-DNA	Espineira et al 2010: Species authentication of octopus, bobtail and bottle squids (families <i>Octopodidae</i> , <i>Sepiidae</i> and <i>Sepiolidae</i> ) by FINS methodology in seafoods.

Meth. Abk.	Auswertenummer	Spezifität	Hinweise zur Methode (Extraktion und Bestimmung)	Methode akkr. nach ISO/IEC 17025	Sonstige Hinweise
		Target-Sequenz / -DNA	z.B. Extraktion / Enzyme / Clean-Up / Real Time PCR / Gelelektrophorese / Cyclen	ja/nein	
SFA-ID	3				
SFA-ID	9			ja	LOD 0,4 mg/kg, Artikelnr. S3113
SFA-ID	13	unbekannt	Tris-Extraktion mit Magnetic bead clean up	ja	DNA Ausbeute >200ng/ul aber keine Amplifikation.
SFA-ID	14				
div	10	cytB, 652 bp	DNA Reinigung mit Promega Wizard, zusätzlicher Amylase-Verdau, konventionelle PCR mit anschließender Sequenzierung	ja	Sequenzierung der positiven Proben ergab <i>Ilex argentinus</i>

Fortsetzung PCR Mollusken:

**Probe M und Dotierungsniveauprobe M**

Meth. Abk.	Auswertenummer	Datum der Analyse	Ergebnis Probe M		Ergebnis Dotierungsprobe M		Quantitatives Ergebnis als	Methode
			qualitativ	mg/kg	qualitativ	mg/kg		
SFA-ID	3		Pos	>0.4	Pos	>0.4	Mollusken-DNA	SureFood® ALLERGEN Molluscs Art.-No. S3113 Congen
SFA-ID	9	05.01.18	positiv		positiv		Mollusken-DNA	Sure Food Allergen ID, R-Biopharm / Congen
SFA-ID	11	21.12.17	negativ	<1	negativ	<1	Mollusken, frisch	Sure Food Allergen ID, R-Biopharm / Congen
SFA-ID	13	26.01.18	negativ		negativ			Sure Food Allergen ID, R-Biopharm / Congen
div	10		positiv		positiv		Tintenfisch-DNA	Espineira et al 2010: Species authentication of octopus, bobtail and bottle squids (families <i>Octopodidae</i> , <i>Sepiidae</i> and <i>Sepiolidae</i> ) by FINS methodology in seafoods.

Meth. Abk.	Auswertenummer	Spezifität	Hinweise zur Methode (Extraktion und Bestimmung)	Methode akkr. nach ISO/IEC 17025	Sonstige Hinweise
		Target-Sequenz / -DNA	z.B. Extraktion / Enzyme / Clean-Up / Real Time PCR / Gelelektrophorese / Cyclen	ja/nein	
SFA-ID	3			ja	
SFA-ID	9			ja	LOD 0,4 mg/kg, Artikelnr. S3113
SFA-ID	11	nach Testkitanleitung	nach Testkitanleitung	ja	
SFA-ID	13		Bead beating DNA-Extraktion mit Magentic bead clean up, RTPCR mit PCR kit		Proben enthielten >200ng/ul extrahierte DNA, aber wenig bis keine Amplifizierung
div	10	cytB, 652 bp	DNA Reinigung mit Promega Wizard, zusätzlicher Amylase-Verdau, konventionelle PCR mit anschließender Sequenzierung	ja	Sequenzierung der positiven Proben ergab <i>Ilex argentinus</i>

## 5.2 Homogenität

### 5.2.1 Mischungshomogenität vor der Abfüllung

#### Microtracer Homogenitätstest

##### DLA 07-2017 Probe A

Gewicht Gesamtprobe	2,72	kg
Microtracer	FSS-rot lake	
Teilchengröße	75 – 300	µm
Gewicht pro Partikel	2,0	µg
Tracerzugabe	18,2	mg/kg

#### Analysenergebnisse:

Probe	Einwaage [g]	Partikel Anzahl	Partikel [mg/kg]
1	5,02	40	15,9
2	5,13	50	19,5
3	5,07	34	13,4
4	5,00	35	14,0
5	4,96	52	21,0
6	5,03	39	15,5
7	5,02	39	15,5
8	5,00	44	17,6

#### Poisson-Verteilung

Probenanzahl	8
Freiheitsgrad	7
Mittelwert	41,6 Partikel
Standardabweichung	6,59 Partikel
$\chi^2$ (CHI-Quadrat)	7,31
<b>Wahrscheinlichkeit</b>	<b>40</b> %
Wiederfindungsrate	91 %

#### Normalverteilung

Probenanzahl	8
Mittelwert	16,6 mg/kg
Standardabweichung	2,62 mg/kg
rel. Standardabweichung	15,8 %
Horwitz Standardabweichung	10,5 %
<b>HorRat-Wert</b>	<b>1,5</b>
Wiederfindungsrate	91 %

#### Microtracer Homogenitätstest

##### DLA 07-2017 Dotierungsniveauprobe

Gewicht Gesamtprobe	1,49	kg
Microtracer	FSS-rot lake	
Teilchengröße	75 – 300	µm
Gewicht pro Partikel	2,0	µg
Tracerzugabe	21,7	mg/kg

#### Analysenergebnisse:

Probe	Einwaage [g]	Partikel Anzahl	Partikel [mg/kg]
1	5,02	66	26,3
2	5,05	57	22,6
3	5,07	73	28,8
4	5,06	72	28,5
5	4,96	54	21,8
6	4,99	53	21,2
7	4,99	55	22,0
8	4,96	60	24,2

#### Poisson-Verteilung

Probenanzahl	8
Freiheitsgrad	7
Mittelwert	61,2 Partikel
Standardabweichung	7,65 Partikel
$\chi^2$ (CHI-Quadrat)	6,69
<b>Wahrscheinlichkeit</b>	<b>46</b> %
Wiederfindungsrate	113 %

#### Normalverteilung

Probenanzahl	8
Mittelwert	24,4 mg/kg
Standardabweichung	3,05 mg/kg
rel. Standardabweichung	12,5 %
Horwitz Standardabweichung	9,89 %
<b>HorRat-Wert</b>	<b>1,3</b>
Wiederfindungsrate	113 %

**Microtracer Homogenitätstest**

**DLA 07-2017 Probe M**

Gewicht Gesamtprobe	0,54	kg
Microtracer	FSS-rot lake	
Teilchengröße	75 – 300	µm
Gewicht pro Partikel	2,0	µg
Tracerzugabe	36,6	mg/kg

**Analysenergebnisse:**

Probe	Einwaage [g]	Partikel Anzahl	Partikel [mg/kg]
1	3,32	68	41,0
2	3,36	69	41,1
3	3,45	74	42,9
4	3,50	67	38,3
5	3,50	75	42,9
6	3,60	78	43,3
7	3,55	68	38,3
8	3,26	62	38,0

<b>Poisson-Verteilung</b>			
Probenanzahl	8		
Freiheitsgrad	7		
Mittelwert	70,1	Partikel	
Standardabweichung	3,86	Partikel	
χ <sup>2</sup> (CHI-Quadrat)	1,49		
<b>Wahrscheinlichkeit</b>	<b>98</b>	%	
Wiederfindungsrate	111	%	

<b>Normalverteilung</b>			
Probenanzahl	8		
Mittelwert	40,7	mg/kg	
Standardabweichung	2,24	mg/kg	
rel. Standardabweichung	5,51	%	
Horwitz Standardabweichung	9,16	%	
<b>HorRat-Wert</b>	<b>0,60</b>		
Wiederfindungsrate	111	%	

**Microtracer Homogenitätstest**

**DLA 07-2017 Dotierungsniveauprobe M**

Gewicht Gesamtprobe	0,34	kg
Microtracer	FSS-rot lake	
Teilchengröße	75 – 300	µm
Gewicht pro Partikel	2,0	µg
Tracerzugabe	41,7	mg/kg

**Analysenergebnisse:**

Probe	Einwaage [g]	Partikel Anzahl	Partikel [mg/kg]
1	3,38	69	40,8
2	3,04	67	44,1
3	2,80	56	40,0
4	2,55	55	43,1
5	3,20	66	41,3
6	3,23	70	43,3
7	3,15	73	46,3
8	2,75	65	47,3

<b>Poisson-Verteilung</b>			
Probenanzahl	8		
Freiheitsgrad	7		
Mittelwert	65,2	Partikel	
Standardabweichung	3,90	Partikel	
χ <sup>2</sup> (CHI-Quadrat)	1,63		
<b>Wahrscheinlichkeit</b>	<b>98</b>	%	
Wiederfindungsrate	104	%	

<b>Normalverteilung</b>			
Probenanzahl	8		
Mittelwert	43,3	mg/kg	
Standardabweichung	2,59	mg/kg	
rel. Standardabweichung	5,98	%	
Horwitz Standardabweichung	9,07	%	
<b>HorRat-Wert</b>	<b>0,66</b>		
Wiederfindungsrate	104	%	

**5.3 Informationen zur Eignungsprüfung (EP)**

Vor der LVU wurden den Teilnehmern im Proben-Anschreiben folgende Informationen mitgeteilt (1. Anschreiben):

EP-Nummer	<b>DLA 07-2017</b>
EP-Name	<b>Allergene VII: Erdnuss und Mollusken in Suppenpulver</b>
Probenmatrix	<b>Proben A + B: Tomatencremesuppe (Pulver)/ Zutaten: Tomatenpulver, Zucker, Weizenmehl, Salz, Würze, Maltodextrin, Hefeextrakt, Palmfett, Zwiebeln, Knoblauch, Säuerungsmittel: Citronensäure, Verdickungsmittel: Guarkernmehl, Sellerie, Kräuter / Kartoffelpulver, weitere Zusatzstoffe und Allergene Lebensmittel <u>Erdnuss geröstet</u> und <u>Tintenfisch getrocknet</u> (eine der beiden Proben) <b>Dotierungsniveauprobe: Kartoffelpulver, weitere Zusatzstoffe und Allergene Lebensmittel (Erdnuss geröstet und Tintenfisch getrocknet)</b></b>
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: Erdnuss (Erdnussprotein, DNA), Mollusken (Tintenfischpulver) (Mollusken-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 Dezimalstellen	mindestens 2 signifikante Stellen
Ergebnisabgabe	Die Ergebnisabgabe-Datei wird per eMail übermittelt an: <b>pt@dla-lvu.de</b>
Abgabetermin	<b>spätestens 22. Dezember 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.

## 2. Anschreiben - Informationen zur Eignungsprüfung (EP)

EP-Nummer	<b>DLA 07-2017</b>
EP-Name	<b>Allergene VII: Erdnuss und Mollusken in Suppenpulver</b>
Probenmatrix (Prozessierung)	<b>Probe M:</b> Tomatencremesuppe (Pulver)/ Zutaten: Tomatenpulver, Zucker, Weizenmehl, Salz, Würze, Maltodextrin, Hefeextrakt, Palmfett, Zwiebeln, Knoblauch, Säuerungsmittel: Citronensäure, Verdickungsmittel: Guarkernmehl, Sellerie, Kräuter / Kartoffelpulver, weitere Zusatzstoffe und Allergenes Lebensmittel <u>Tintenfisch getrocknet</u> <b>Dotierungsniveauprobe M:</b> Kartoffelpulver, weitere Zusatzstoffe und Allergenes Lebensmittel ( <u>Tintenfisch getrocknet</u> )
Probenzahl und Probenmenge	1 Probe M: 25 g + 1 Dotierungsniveauprobe M: 15 g
Lagerungsinformation	Probe M: gekühlt 2 - 10 °C (Langzeit < -18°C) Dotierungsniveauprobe M: Raumtemperatur
Verwendungszweck	Ausschließlich für Laboruntersuchungen (Qualitätskontrollproben)
Parameter	qualitativ + quantitativ: Mollusken (Tintenfischpulver) (Mollusken-Protein, DNA) Probe M: < 500 mg/kg Dotierungsniveauprobe M: < 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 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 26. Januar 2018</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 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. Homogeneity and stability of reference materials; Linsinger et al.; Accred Qual Assur, 6, 20-25 (2001)
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 excelsa) in Reis- und Weizenkeksen sowie in Soßenpulver mittels real-time PCR (2014) [Foodstuffs, detection and determination of brazil nut (Bertholletia excelsa) 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 07/2017 - Allergene VII**

Alle 14 Teilnehmer haben mindestens ein Ergebnis eingereicht. Die Auswertung erfolgte für ELISA-Methoden hinsichtlich des Parameters Erdnuss qualitativ und quantitativ und für Mollusken (Tintenfisch) aufgrund der wenigen Ergebnisse nur qualitativ. Die PCR-Methoden wurden für beide Parameter ebenfalls qualitativ bewertet. Zusätzlich wurden für jeden Teilnehmer Wiederfindungsraten für die Dotierungsmaterialprobe und die dotierte Probe ermittelt. Details zu den einzelnen Parametern inklusive separater Auswertung nach Testkit-Herstellern sind dem Auswertebereich zu entnehmen.

7 Teilnehmer hatten ihren Sitz im Europäischen Ausland (Georgien, Großbritannien, Italien, Österreich, Schweiz, Spanien) und je ein Teilnehmer in Israel und Kanada.