

Proficiency Tests

**DLA**

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

## **Auswertungs-Bericht**

Laborvergleichsuntersuchung

**DLA 08/2017**

### **Allergene VIII:**

### **Macadamia und Paranuss**

### **in Getreidemüsli**

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 08/2017</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 (29. Mai 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: 29. Mai 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.....	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 des zugewiesenen Werts.....	18
3.9 Graphische Darstellung der Bezugswerte.....	19
3.10 Wiederfindungsraten: Dotierung.....	19
4. Ergebnisse.....	20
4.1 Vergleichsuntersuchung Macadamia.....	22
4.1.1 ELISA-Ergebnisse: Macadamia.....	22
4.1.2 PCR-Ergebnisse: Macadamia.....	30
4.2 Vergleichsuntersuchung Paranuss.....	32
4.2.1 ELISA-Ergebnisse: Paranuss.....	32
4.2.2 PCR-Ergebnisse: Paranuss.....	40
5. Dokumentation.....	44
5.1 Angaben der Teilnehmer.....	44
5.1.1 ELISA: Macadamia.....	44
5.1.2 ELISA: Paranuss.....	45
5.1.3 PCR: Macadamia.....	46
5.1.4 PCR: Paranuss.....	47
5.2 Homogenität.....	48
5.2.1 Mischungshomogenität vor der Abfüllung.....	48
5.3 Informationen zur Eignungsprüfung (EP).....	49
6. Verzeichnis der Teilnehmer in alphabetischer Reihenfolge.....	50
7. Verzeichnis relevanter Literatur.....	51

## 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 eine Mischung handelsüblicher Getreidemüslis. Die Grundzusammensetzung war für beide Proben A und B gleich (s. Tabelle 1).

Nach dem Sieben wurde die Grundmischung homogenisiert.

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

Die Dotierungsmaterialien, die die allergenen Zutaten Macadamia und Paranuss enthalten (gesiebt mesh 400 µm), wurden zu einem Aliquot der Grundmatrix gegeben und die Mischung homogenisiert. Anschließend wurde portionsweise erneut Grundmatrix in 3 weiteren Schritten zugegeben und jeweils homogenisiert bis die Gesamtmenge erreicht war.

Die **Dotierungsniveauprobe** wurde mit den oben genannten allergenhaltigen Dotierungsmaterialien (mesh 400 µm) unter mehrstufiger Zugabe von Kartoffelpulver und Homogenisierung hergestellt.

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

Tabelle 1: Zusammensetzung der DLA-Proben

Zutaten	Probe A	Probe B	Dotierungs-niveauprobe
Müsli Haferbrei Rote Beeren Zutaten: Hafervollkornflocken 69%, Rosinen, Reis gepufft, Datteln getrocknet, Beeren getrocknet (Himbeeren, Rote Johannisbeeren, Erdbeeren, Heidelbeeren), Chia-Samen, Amaranth gepufft, Reismehl Nährwertangaben pro 100 g: Eiweiß 11 g, Kohlenhydrate 60 g, Fett 6,3 g	50,1 g/100 g	49,9 g/100 g	-
Müsli Haferbrei Früchte Zutaten: Hafervollkornflocken 66%, Rosinen, Reis gepufft, Früchte getrocknet (Aprikosen, Datteln, Pflaumen, Äpfel), Reismehl, Zimt Nährwertangaben pro 100 g: Eiweiß 10 g, Kohlenhydrate 63 g, Fett 5,0 g	49,9 g/100 g	49,7 g/100 g	-
Kartoffelpulver Zutaten: Kartoffeln, E471, E304, E223, E100	-	-	99,6 g/100 g
Macadamia - als Macadamia* - davon 8,0% Gesamtprotein**	-	20,5 mg/kg 1,6 mg/kg	27,6 mg/kg 2,2 mg/kg
Paranuss - als Paranuss* - davon 12,9% Gesamtprotein**	-	27,1 mg/kg 3,5 mg/kg	22,5 mg/kg 2,9 mg/kg
weitere Zutaten: Maltodextrin, Natriumsulfat und Siliciumdioxid	-	<0,5 g/100 g	<0,5 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=5,30 für Macadamia und F=5,46 für Paranuss)

**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 hat eine Wahrscheinlichkeit von 81% für Probe B und eine Wahrscheinlichkeit von 77% für die Dotierungsniveauprobe 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 0,97 für Probe B und 0,97 für die Dotierungsniveauprobe erhalten. Die Ergebnisse der Microtracer-Analyse sind in der Dokumentation angegeben.

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

#### Durchführung der Homogenitätstests

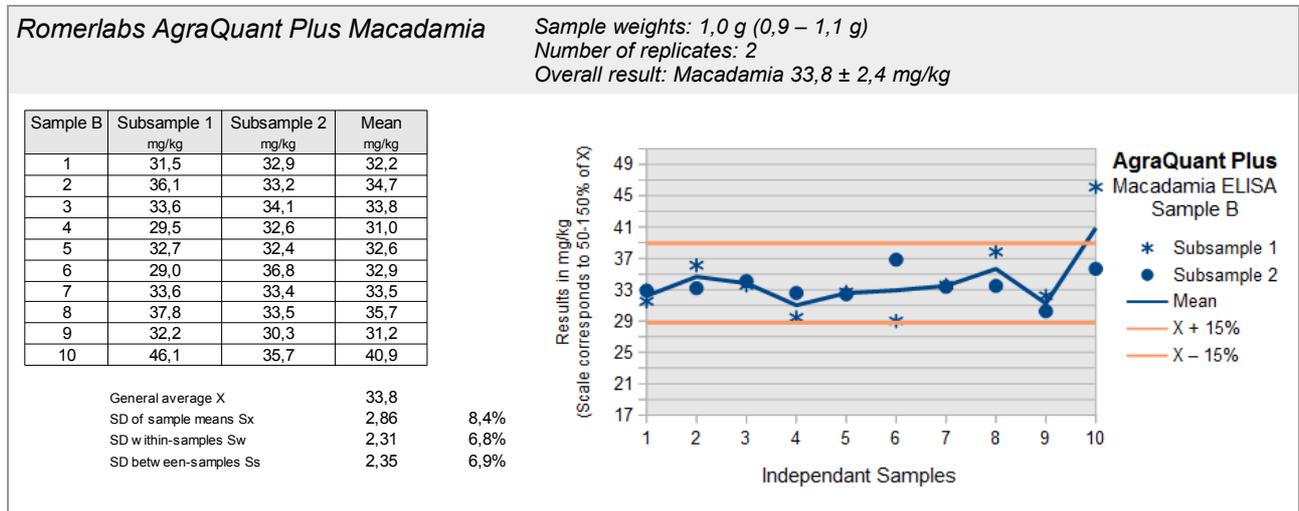
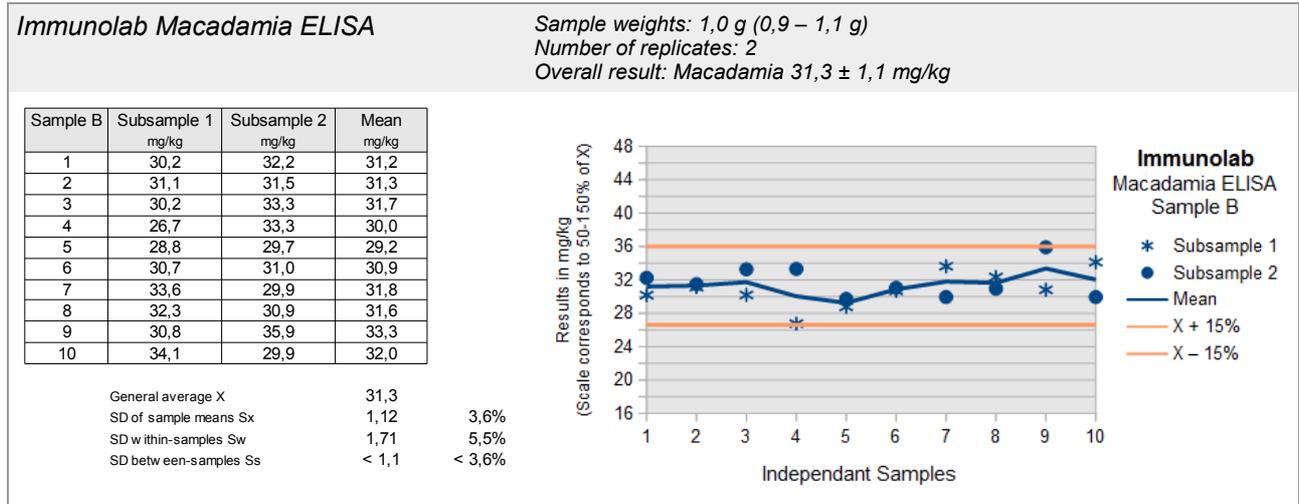
Die Homogenitätstests wurden in Kooperation mit den Labors der angegebenen Testkit-Anbieter durchgeführt. Von DLA wurden zufällig 10 Muster der abgefüllten dotierten Probe ausgewählt und davon jeweils 2 Teilproben in zuvor zufällig-coodierte Extraktionsbehälter eingewogen und anschließend den Labors 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

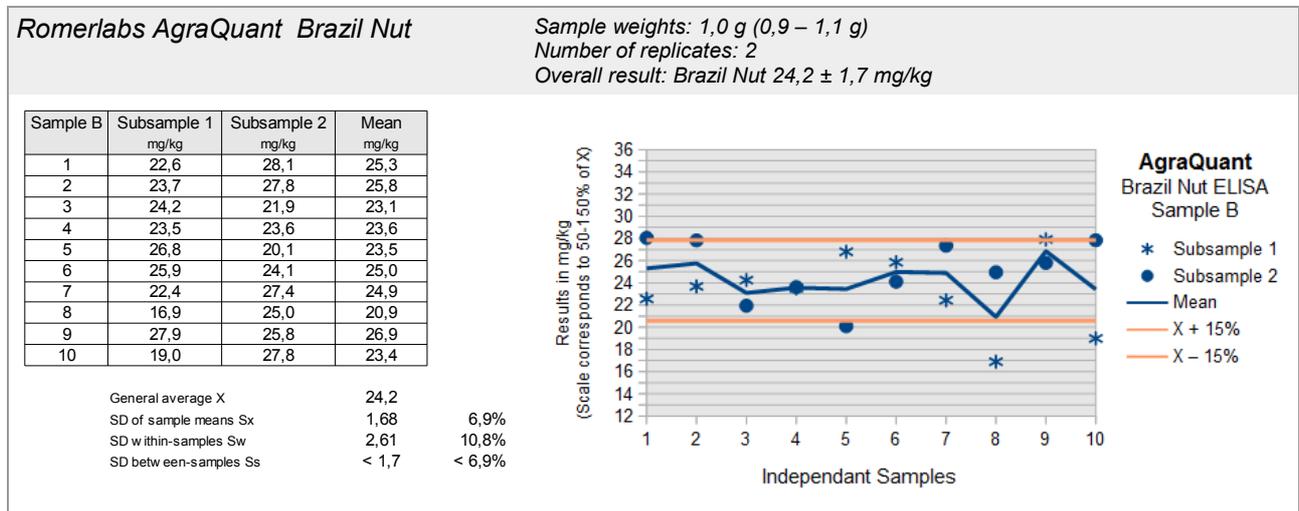
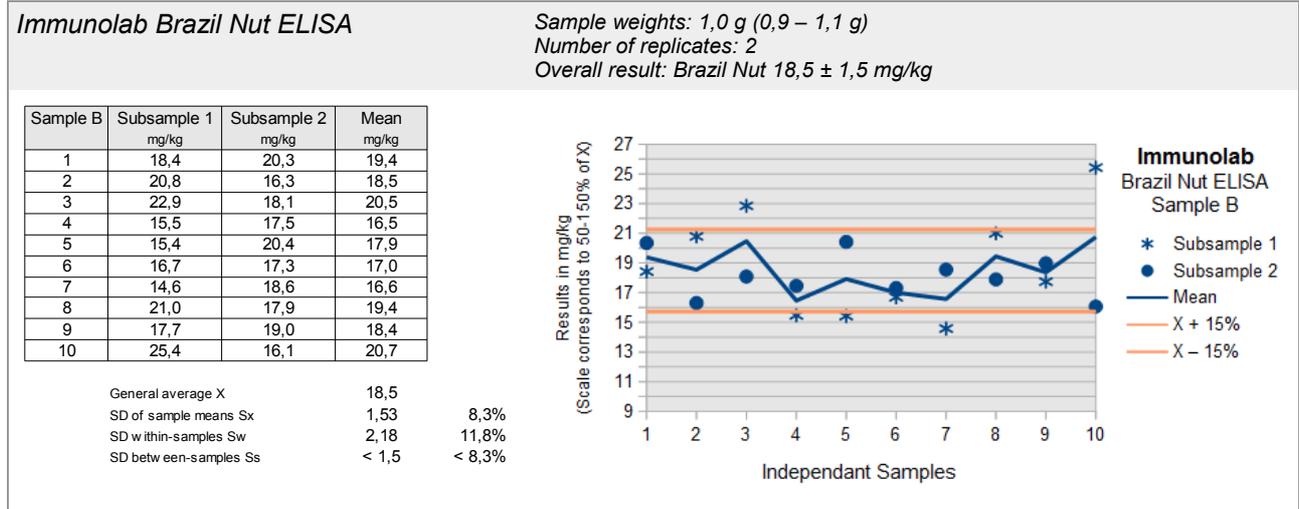
Die Homogenität wird mit einer Standardabweichung zwischen den Proben von  $S_s \leq 15\%$  („Heterogenitätsstandardabweichung“) als hinreichend gesichert angesehen. Dieses Kriterium wird für die untersuchte Probe B in allen ELISA-Tests sowohl für Macadamia (Immunolab, AgraQuant Plus) als auch für Paranuss (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 Macadamia / Homogeneity Macadamia**



**ELISA-Tests: Homogenität Paranuss / Homogeneity Brazil Nut**



### 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.  $0,48$  ( $21,4^\circ\text{C}$ ). 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 49. Kalenderwoche 2017 je eine Portion der Untersuchungsmaterialien A und B sowie eine Dotierungsniveauprobe verschickt. Die Untersuchungsverfahren wurden freigestellt. Die Untersuchungen waren durchzuführen bis spätestens 02. Februar 2018.

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 Macadamia und/oder Paranuss im mg/kg Bereich in der Matrix Getreidemüsli mit Früchten. 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.**

*Insbesondere soll die Gesamtmenge der Proben A und B vor der Analyse homogenisiert werden, da unterschiedliche Partikelgrößen in den Proben vorliegen.*

(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.

12 von 13 Teilnehmern haben fristgerecht Ergebnisse abgegeben. Ein Teilnehmer hat keine Ergebnisse eingereicht.

### 3. Auswertung

Verschiedene ELISA-Methoden zur quantitativen Bestimmung von Allergenen in Lebensmitteln können verschiedene Antikörper-Spezifitäten aufweisen, mit unterschiedlichem Referenzmaterial kalibriert worden sein und sich unterschiedlicher Extraktionsverfahren bedienen. Die verschiedenen ELISA-Methoden können daher zu einer unterschiedlichen Bewertung des Gehalts eines Analyten führen [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 werden.

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

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

Die in Tabelle 2a (ELISA) und Tabelle 2b (PCR) angegebenen relativen Wiederholstandardabweichungen ( $\text{RSD}_r$ ) 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<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 angegebenen Allergene 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<sub>r</sub>) und relative Vergleichsstandardabweichungen (RSD<sub>R</sub>) gemäß ausgewählter Auswertungen von Versuchen zur Präzision und die resultierende Zielstandardabweichung  $\sigma_{pt}$  [32-34]

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

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 werden 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 **Macadamia-** oder **Paranussprotein** angegeben wurden, sind mit dem experimentell bestimmten Proteingehalt der Rohstoffe auf das Gesamtlebensmittel (Macadamia, Paranuss) 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 $X_{pt_{ALL}}$	z-Score $X_{pt_{M i}}$	Methode	Hinweis
	pos/neg	[mg/kg]				

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

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

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

## 4.1 Vergleichsuntersuchung Macadamia

### 4.1.1 ELISA-Ergebnisse: Macadamia

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

Auswertenummer	Probe A	Probe A	Probe B	Probe B	Qualitative Bewertung	Methode	Hinweis
	pos/neg	[mg/kg]	pos/neg	[mg/kg]	Übereinstimmungen mit Konsenswerten		
1	negativ	0	positiv	12,6	2/2 (100%)	BF	
9	negativ	<4,2	positiv	35,0	2/2 (100%)	ET	Ergebnis umgerechnet °
12	negativ	<1	positiv	33,2	2/2 (100%)	IL	
2	negativ	<1	positiv	30,9	2/2 (100%)	RS-F	
3	negativ	<1	positiv	24,6	2/2 (100%)	RS-F	
8	negativ	<1	positiv	30,0	2/2 (100%)	RS-F	
10	negativ	<1	positiv	16,0	2/2 (100%)	RS-F	

° Umrechnung S. 20

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

#### Methoden:

BF = MonoTrace ELISA, BioFront Technologies

ET = Elution Technologies ELISA Kit

IL = Immunolab

RS-F= Ridascreen® Fast, R-Biopharm

#### Anmerkung:

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

**Quantitative Auswertung ELISA: Probe B**

Auswertenummer	Macadamia	z-Score Xpt <sub>ALL</sub>	Methode	Hinweis
	[mg/kg]			
1	12,6	-2,1	BF	
9	35,0	1,4	ET	Ergebnis umgerechnet °
12	33,2	1,1	IL	
2	30,9	0,7	RS-F	
3	24,6	-0,2	RS-F	
8	30,0	0,6	RS-F	
10	16,0	-1,5	RS-F	

° Umrechnung S. 20

**Methoden:**

BF = MonoTrace ELISA, BioFront Technologies

ET = Elution Technologies ELISA Kit

IL = Immunolab

RS-F= Ridascreen® Fast, R-Biopharm

**Anmerkung:**

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

Kenndaten: Quantitative Auswertung ELISA Macadamia

**Probe B**

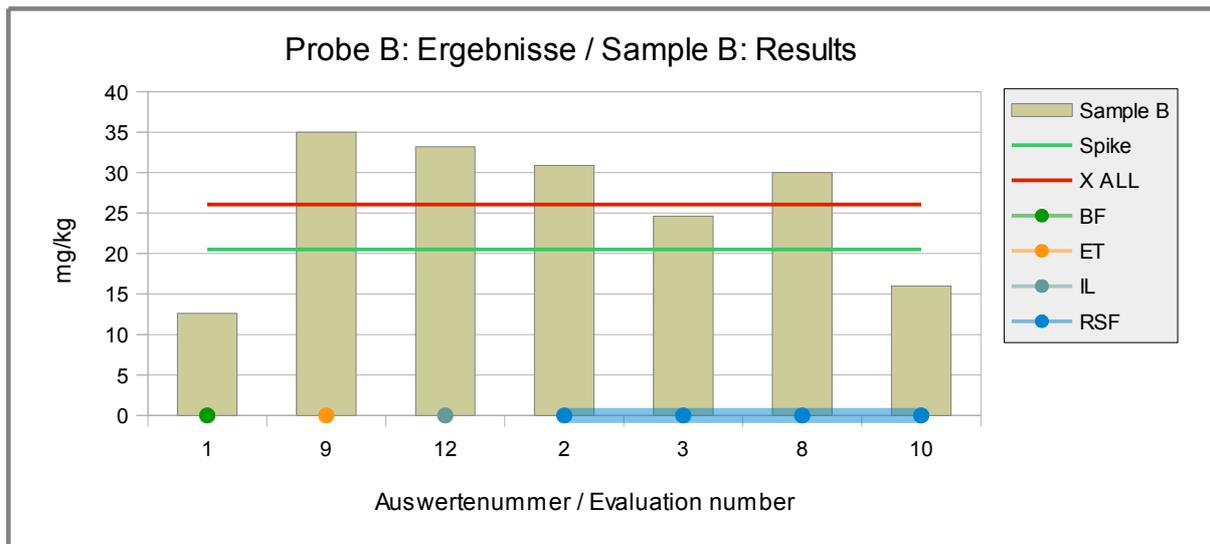
<b>Kenndaten</b>	<b>Alle Ergebnisse</b> [mg/kg]
Zugewiesener Wert ( $X_{pt}$ )	<b><math>X_{pt}_{ALL}</math></b>
Anzahl der Messergebnisse	7
Anzahl der Ausreißer	0
Mittelwert	26,0
Median	30,0
<b>Robuster Mittelwert (<math>X_{pt}</math>)</b>	<b>26,0</b>
<b>Robuste Standardabweichung (<math>S^*</math>)</b>	<b>9,87</b>
<i>Zielkenndaten:</i>	
<b>Zielstandardabweichung <math>\sigma_{pt}</math></b>	<b>6,51</b>
<b>Untere Grenze des Zielbereichs</b>	<b>13,0</b>
<b>Obere Grenze des Zielbereichs</b>	<b>39,1</b>
Quotient $S^*/\sigma_{pt}$	1,5
Standardunsicherheit $U(X_{pt})$	4,66
Quotient $U(X_{pt})/\sigma_{pt}$	0,72
Ergebnisse im Zielbereich	6
Prozent im Zielbereich	86

Anmerkungen zu den Kenndaten und Vergleich der Bezugswerte:

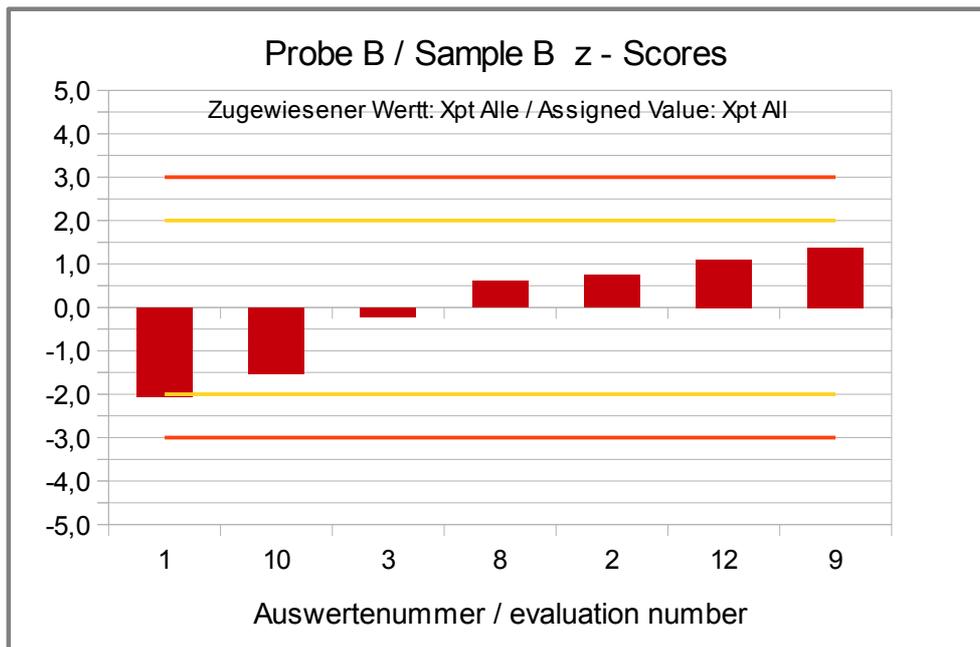
Eine Kerndichte-Schätzung wurde aufgrund der geringen Anzahl von Ergebnissen nicht vorgenommen.

Die Auswertung der Ergebnisse aller Methoden zeigte eine normale Variabilität der Ergebnisse. Der Quotient  $S^*/\sigma_{pt}$  lag unter 2,0. Die robuste Standardabweichung befand sich leicht oberhalb des Bereichs 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 für die methodenübergreifende Auswertung nur eingeschränkt gegeben, da für einige Methoden nur wenige Ergebnisse vorlagen.

Der zugewiesene Wert  $X_{pt}$  der Auswertung lag mit 127% vom Zusatzniveau von Macadamia bei Probe B im Bereich der relevanten Anforderungen für die eingesetzten Methoden (s. 3.4.3 und "Wiederfindungsraten für Macadamia" S.29).



**Abb./Fig. 1:** ELISA-Ergebnisse Macadamia  
 grüne Linie = Zusatzniveau (Spike)  
 rote Linie = robuster Mittelwert aller Ergebnisse  
 runde Symbole = Zuordnung der Methoden (s. Legende)



**Abb./Fig. 2:**  
 z-Scores (ELISA-Ergebnisse als Macadamia)  
 Zugewiesener Wert: robuster Mittelwert aller Ergebnisse

**Quantitative Auswertung ELISA: Dotierungsniveauprobe**

Auswertenummer	Macadamia [mg/kg]	z-Score X <sub>pt,ALL</sub>	Methode	Hinweis
1	15,2	-2,8	BF	
9	77,5	2,3	ET	Ergebnis umgerechnet °
12	48,6	-0,1	IL	
2	53,0	0,3	RS-F	
3	48,5	-0,1	RS-F	
8	48,0	-0,1	RS-F	
10	>27		RS-F	

° Umrechnung S. 20

**Methoden:**

BF = MonoTrace ELISA, BioFront Technologies

ET = Elution Technologies ELISA Kit

IL = Immunolab

RS-F= Ridascreen® Fast, R-Biopharm

**Anmerkung:**

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

Kenndaten: Quantitative Auswertung ELISA Macadamia

**Dotierungsniveauprobe**

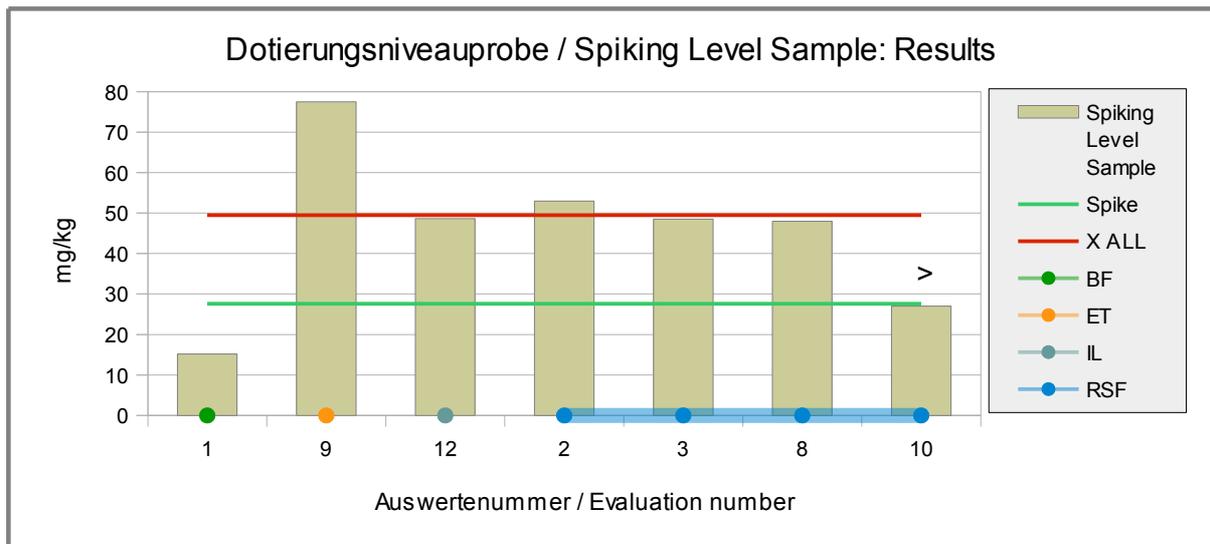
Kenndaten	Alle Ergebnisse [mg/kg]
Zugewiesener Wert ( $X_{pt}$ )	<b><math>X_{pt}_{ALL}</math></b>
Anzahl der Messergebnisse	6
Anzahl der Ausreißer	0
Mittelwert	48,5
Median	48,6
<b>Robuster Mittelwert (<math>X_{pt}</math>)</b>	<b>49,5</b>
<b>Robuste Standardabweichung (<math>S^*</math>)</b>	<b>11,1</b>
<i>Zielkenndaten:</i>	
<b>Zielstandardabweichung <math>\sigma_{pt}</math></b>	<b>12,4</b>
<b>Untere Grenze des Zielbereichs</b>	<b>24,8</b>
<b>Obere Grenze des Zielbereichs</b>	<b>74,3</b>
Quotient $S^*/\sigma_{pt}$	0,90
Standardunsicherheit $U(X_{pt})$	5,68
Quotient $U(X_{pt})/\sigma_{pt}$	0,46
Ergebnisse im Zielbereich	4
Prozent im Zielbereich	67

Anmerkungen zu den Kenndaten und Vergleich der Bezugswerte:

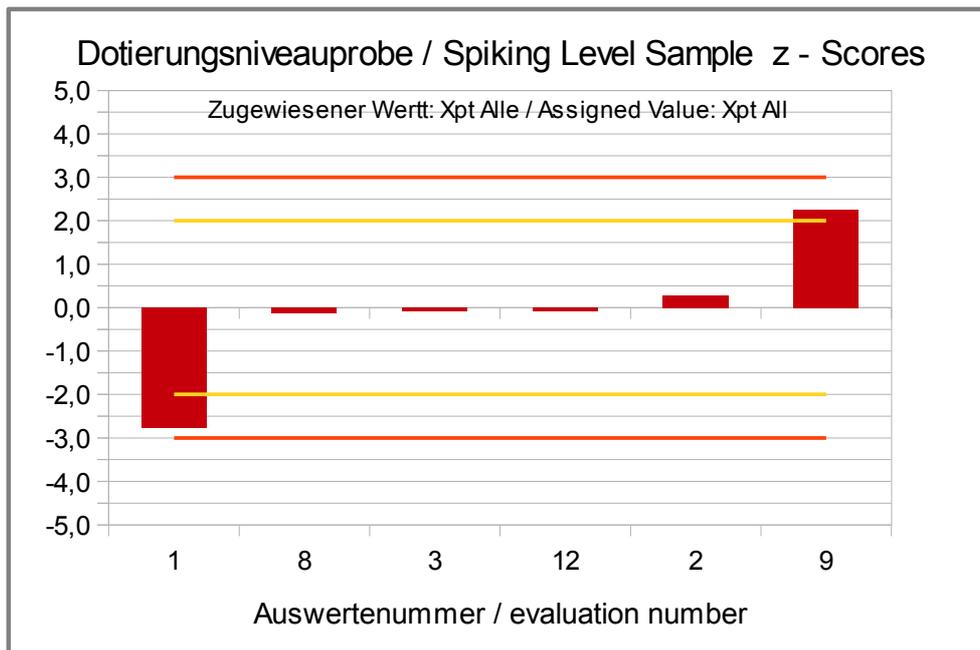
Eine Kerndichte-Schätzung wurde aufgrund der geringen Anzahl von Ergebnissen nicht vorgenommen.

Die Auswertung der Ergebnisse aller Methoden zeigte eine geringe Variabilität der Ergebnisse. Der Quotient  $S^*/\sigma_{pt}$  lag unter 1,0. 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 für die methodenübergreifende Auswertung nur eingeschränkt gegeben, da für einige Methoden nur wenige Ergebnisse vorlagen.

Der zugewiesene Wert  $X_{pt}$  der Auswertung lag mit 179 % vom Zusatzniveau von Macadamia bei der Dotierungsniveauprobe oberhalb des Bereichs der relevanten Anforderungen für die eingesetzten Methoden (s. 3.4.3 und "Wiederfindungsraten für Macadamia" S.29).



**Abb./Fig. 3:** ELISA-Ergebnisse Macadamia  
 grüne Linie = Zusatzniveau (Spike)  
 rote Linie = robuster Mittelwert aller Ergebnisse  
 runde Symbole = Zuordnung der Methoden (s. Legende)



**Abb./Fig. 4:**  
 z-Scores (ELISA-Ergebnisse als Macadamia)  
 Zugewiesener Wert: robuster Mittelwert aller Ergebnisse

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

Auswertenummer	Dotierungsniveauprobe	Wiederfindungsrate*	Probe B	Wiederfindungsrate*	Methode	Hinweis
	[mg/kg]	[%]	[mg/kg]	[%]		
1	15,2	55	12,6	61	BF	
9	77,5	281	35,0	171	ET	Ergebnis umgerechnet °
12	48,6	176	33,2	162	IL	
2	53,0	192	30,9	151	RS-F	
3	48,5	176	24,6	120	RS-F	
8	48,0	174	30,0	146	RS-F	
10	>27		16,0	78	RS-F	

° Umrechnung S. 20

AB**	50-150 %	AB**	50-150 %
Anzahl im AB	1	Anzahl im AB	4
Prozent im AB	17	Prozent im AB	57

**Methoden:**

BF = MonoTrace ELISA, BioFront Technologies  
 ET = Elution Technologies ELISA Kit  
 IL = Immunolab  
 RS-F= Ridascreen® Fast, R-Biopharm

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

\*\* Akzeptanzbereich der AOAC für Allergen-ELISAs

Anmerkung:

57% (4) der Teilnehmer haben für die dotierte Lebensmittelmatrix-Probe B mittels ELISA eine Wiederfindungsrate im Bereich der AOAC-Anforderung von 50-150% erhalten. Für die Dotierungsniveauprobe lag nur eine der Wiederfindungsraten in diesem Akzeptanzbereich. Hier lagen die Wiederfindungsraten im allgemeinen in einem deutlich höheren Bereich.

**4.1.2 PCR-Ergebnisse: Macadamia**

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

Auswertenummer	Probe A	Probe A	Probe B	Probe B	Qualitative Bewertung	Methode	Hinweis
	pos/neg	[mg/kg]	pos/neg	[mg/kg]	Übereinstimmungen mit Konsenswerten		
7	negativ		positiv		2/2 (100%)	SFA-ID	
4	negativ		positiv		2/2 (100%)	div	
11	negativ		positiv		2/2 (100%)	div	

	Probe A	Probe B
Anzahl positiv	0	3
Anzahl negativ	3	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 keine quantitative Ergebnisse angegeben wurden.

**(Quantitative) Auswertung PCR: Dotierungsniveauprobe**

Eine Auswertung der quantitativen Ergebnisse erfolgte nicht, weil keine quantitativen Ergebnisse vorlagen.

Auswertenummer	Macadamia	Macadamia	z-Score Xpt <sub>ALL</sub>	Methode	Hinweis
	pos/neg	[mg/kg]			
7	positiv			SFA-ID	
4	-			div	
11	positiv			div	

Anzahl positiv	2	
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 ausschließlich positive Ergebnisse erhalten.

## 4.2 Vergleichsuntersuchung Paranuss

### 4.2.1 ELISA-Ergebnisse: Paranuss

Qualitative Auswertung der Ergebnisse: Proben A und B

Auswertenummer	Probe A	Probe A	Probe B	Probe B	Qualitative Bewertung	Methode	Hinweis
	pos/neg	[mg/kg]	pos/neg	[mg/kg]	Übereinstimmungen mit Konsenswerten		
1	negativ	0	positiv	26,3	2/2 (100%)	BF	
3	negativ	<2	positiv	18,8	2/2 (100%)	BF	
10	negativ	<2	positiv	24,0	2/2 (100%)	BF	
2	negativ	<7,8	positiv	19,8	2/2 (100%)	ET	Ergebnis umgerechnet °
6	negativ	nd	positiv	25,6	2/2 (100%)	ET	Ergebnis umgerechnet °
9	negativ	<7,8	positiv	21,7	2/2 (100%)	ET	Ergebnis umgerechnet °
12	negativ	<1	positiv	19,3	2/2 (100%)	IL	

° Umrechnung S. 20

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

**Methoden:**

BF = MonoTrace ELISA, BioFront Technologies

ET = Elution Technologies ELISA Kit

IL = Immunolab

Anmerkung:

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

**Quantitative Auswertung ELISA: Probe B**

Auswertenummer	Paranuss [mg/kg]	z-Score Xpt <sub>ALL</sub>	Methode	Hinweis
1	26,3	0,7	BF	
3	18,8	-0,6	BF	
10	24,0	0,3	BF	
2	19,8	-0,4	ET	Ergebnis umgerechnet °
6	25,6	0,6	ET	Ergebnis umgerechnet °
9	21,7	-0,1	ET	Ergebnis umgerechnet °
12	19,3	-0,5	IL	

° Umrechnung S. 20

**Methoden:**

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 Paranuss

**Probe B**

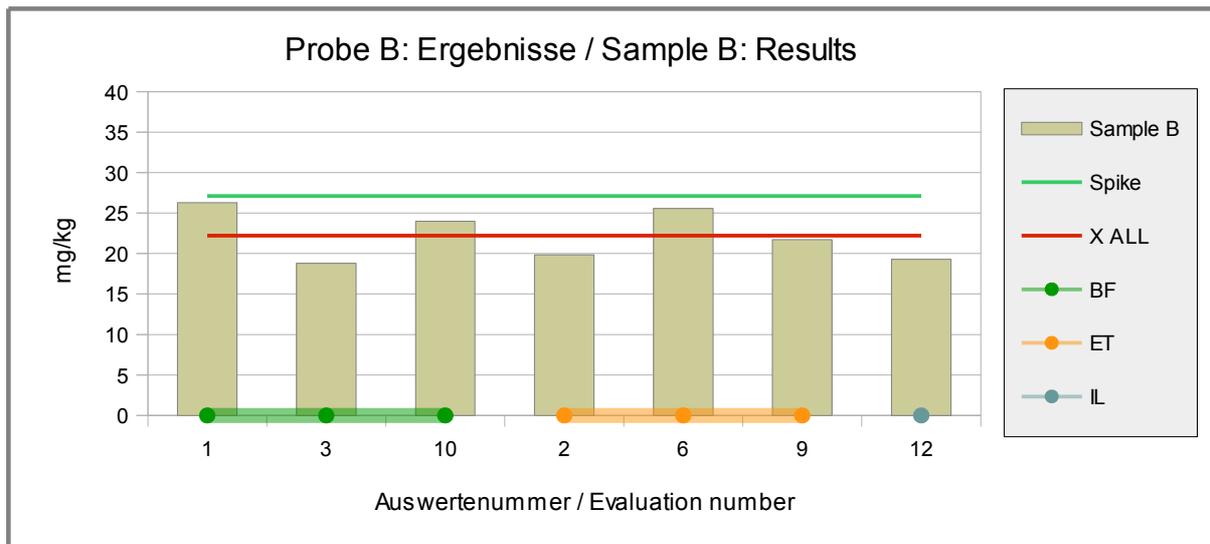
<b>Kenndaten</b>	<b>Alle Ergebnisse</b> [mg/kg]
Zugewiesener Wert ( $X_{pt}$ )	<b><math>X_{pt}_{ALL}</math></b>
Anzahl der Messergebnisse	7
Anzahl der Ausreißer	0
Mittelwert	22,2
Median	21,7
<b>Robuster Mittelwert (<math>X_{pt}</math>)</b>	<b>22,2</b>
<b>Robuste Standardabweichung (<math>S^*</math>)</b>	<b>3,50</b>
<i>Zielkenndaten:</i>	
<b>Zielstandardabweichung <math>\sigma_{pt}</math></b>	<b>5,55</b>
<b>Untere Grenze des Zielbereichs</b>	<b>11,1</b>
<b>Obere Grenze des Zielbereichs</b>	<b>33,3</b>
Quotient $S^*/\sigma_{pt}$	0,63
Standardunsicherheit $U(X_{pt})$	1,65
Quotient $U(X_{pt})/\sigma_{pt}$	0,30
Ergebnisse im Zielbereich	7
Prozent im Zielbereich	100

Anmerkungen zu den Kenndaten und Vergleich der Bezugswerte:

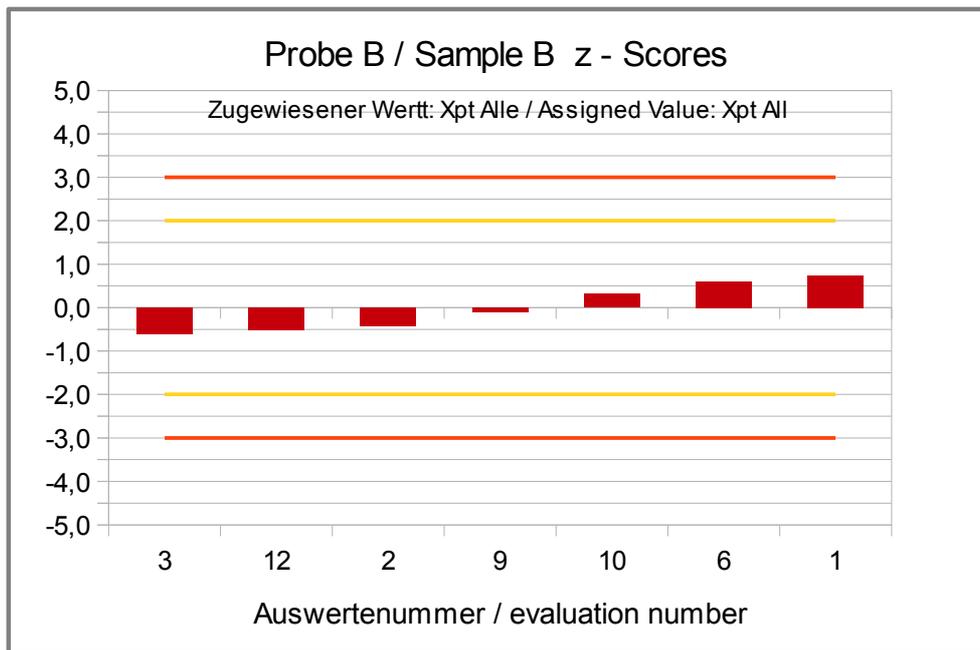
Eine Kerndichte-Schätzung wurde aufgrund der geringen Anzahl von Ergebnissen nicht vorgenommen.

Die Auswertung der Ergebnisse aller Methoden zeigte eine geringe Variabilität der Ergebnisse. Der Quotient  $S^*/\sigma_{pt}$  lag deutlich unter 1,0. Die robuste Standardabweichung liegt im unteren 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 für die einzelnen Methoden nur wenige Ergebnisse vorlagen.

Der zugewiesene Wert  $X_{pt}$  der Auswertung lag mit 108% vom Zusatzniveau von Paranuss zu Probe B innerhalb der relevanten Anforderungen für die eingesetzten Methoden (s. 3.4.3 und "Wiederfindungsraten für Paranuss" S.39).



**Abb./Fig. 5:** ELISA-Ergebnisse Paranuss  
 grüne Linie = Zusatzniveau (Spike)  
 rote Linie = zugewiesener Wert Median aller Ergebnisse  
 runde Symbole = Zuordnung der Methoden (s. Legende)



**Abb./Fig. 6:**  
 z-Scores (ELISA-Ergebnisse als Paranuss)  
 Zugewiesener Wert: Median aller Ergebnisse

**Quantitative Auswertung ELISA: Dotierungsniveauprobe**

Auswertenummer	Paranuss [mg/kg]	z-Score $X_{pt_{ALL}}$	Methode	Hinweis
1	29,9	0,5	BF	
3	33,2	0,9	BF	
10	34,0	1,1	BF	
2	19,7	-1,1	ET	Ergebnis umgerechnet °
6	24,0	-0,4	ET	Ergebnis umgerechnet °
9	20,9	-0,9	ET	Ergebnis umgerechnet °
12	26,3	-0,1	IL	

° Umrechnung S. 20

**Methoden:**

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 Paranuss

**Dotierungsniveauprobe**

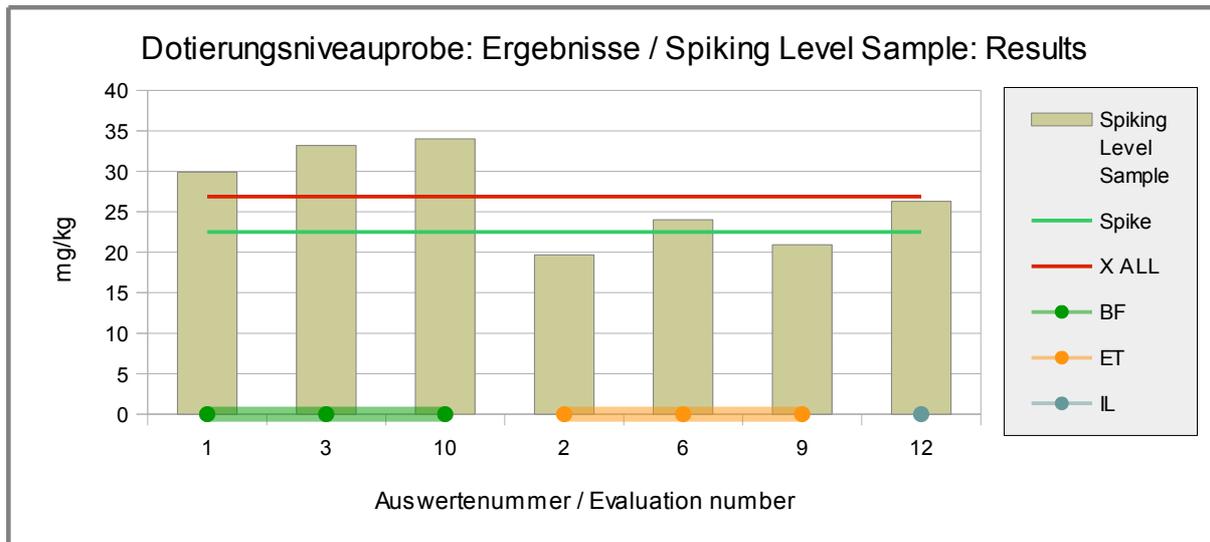
<b>Kenndaten</b>	<b>Alle Ergebnisse</b> [mg/kg]
Zugewiesener Wert ( $X_{pt}$ )	<b><math>X_{pt_{ALL}}</math></b>
Anzahl der Messergebnisse	7
Anzahl der Ausreißer	0
Mittelwert	26,9
Median	26,3
<b>Robuster Mittelwert (<math>X_{pt}</math>)</b>	<b>26,9</b>
<b>Robuste Standardabweichung (<math>S^*</math>)</b>	<b>6,47</b>
<i>Zielkenndaten:</i>	
<b>Zielstandardabweichung <math>\sigma_{pt}</math></b>	<b>6,72</b>
<b>Untere Grenze des Zielbereichs</b>	<b>13,4</b>
<b>Obere Grenze des Zielbereichs</b>	<b>40,3</b>
Quotient $S^*/\sigma_{pt}$	1,0
Standardunsicherheit $U(X_{pt})$	3,06
Quotient $U(X_{pt})/\sigma_{pt}$	0,46
Ergebnisse im Zielbereich	7
Prozent im Zielbereich	100

Anmerkungen zu den Kenndaten und Vergleich der Bezugswerte:

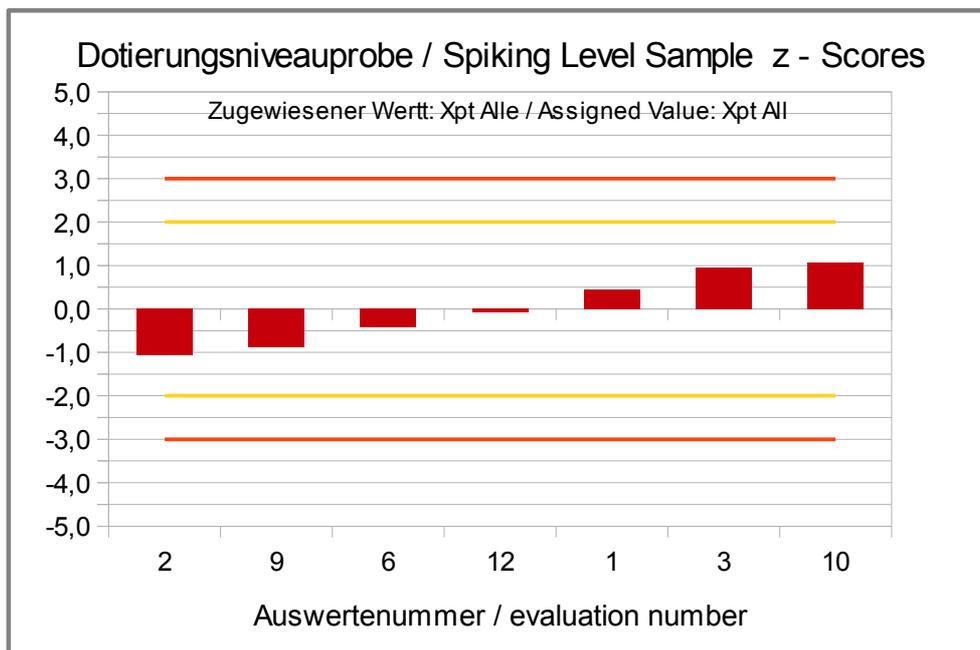
Eine Kerndichte-Schätzung wurde aufgrund der geringen Anzahl von Ergebnissen nicht vorgenommen.

Die Auswertung der Ergebnisse aller Methoden zeigte eine geringe Variabilität der Ergebnisse. Der Quotient  $S^*/\sigma_{pt}$  lag bei 1,0. 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  $X_{pt}$  der Auswertung lag mit 119% vom Zusatzniveau von Paranuss für die Dotierungsniveauprobe innerhalb des Bereichs der relevanten Anforderungen für die eingesetzten Methoden (s. 3.4.3 und "Wiederfindungsraten für Paranuss" S.39).



**Abb./Fig. 7:** ELISA-Ergebnisse Paranuss  
 grüne Linie = Zusatzniveau (Spike)  
 rote Linie = robuster Mittelwert aller Ergebnisse  
 runde Symbole = Zuordnung der Methoden (s. Legende)



**Abb./Fig. 8:**  
 z-Scores (ELISA-Ergebnisse als Paranuss)  
 Zugewiesener Wert: robuster Mittelwert aller Ergebnisse

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

Auswertenummer	Dotierungsniveauprobe	Wiederfindungsrate*	Probe B	Wiederfindungsrate*	Methode	Hinweis
	[mg/kg]	[%]	[mg/kg]	[%]		
1	29,9	<b>133</b>	26,3	<b>97</b>	BF	
3	33,2	<b>148</b>	18,8	<b>69</b>	BF	
10	34,0	151	24,0	<b>89</b>	BF	
2	19,7	<b>88</b>	19,8	<b>73</b>	ET	Ergebnis umgerechnet °
6	24,0	<b>107</b>	25,6	<b>94</b>	ET	Ergebnis umgerechnet °
9	20,9	<b>93</b>	21,7	<b>80</b>	ET	Ergebnis umgerechnet °
12	26,3	<b>117</b>	19,3	<b>71</b>	IL	

° Umrechnung S. 20

AB**	50-150 %	AB**	50-150 %
Anzahl im AB	<b>6</b>	Anzahl im AB	<b>7</b>
Prozent im AB	<b>86</b>	Prozent im AB	<b>100</b>

**Methoden:**

BF = MonoTrace ELISA, BioFront Technologies  
 ET = Elution Technologies ELISA Kit  
 IL = Immunolab

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

\*\* Akzeptanzbereich der AOAC für Allergen-ELISAs

Anmerkung:

Mit einer Ausnahme lagen alle Wiederfindungsraten für die Dotierungsniveauprobe mittels ELISA innerhalb des Bereiches der AOAC-Anforderung von 50-150%.

Für die dotierte Lebensmittelmatrix-Probe B lagen 100% der Wiederfindungsraten im Akzeptanzbereich.

**4.2.2 PCR-Ergebnisse: Paranuss**

**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		
8	negativ		negativ		1/2 (50%)	ASU	
5	negativ		positiv		2/2 (100%)	MS	
2	negativ	<1	positiv	18,5	2/2 (100%)	SFA-ID	
7	negativ		positiv		2/2 (100%)	SFA-ID	
4	negativ		positiv		2/2 (100%)	div	
11	negativ		positiv		2/2 (100%)	div	

	Probe A	Probe B
Anzahl positiv	0	5
Anzahl negativ	6	1
Prozent positiv	0	83
Prozent negativ	100	17
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 quantitativen Ergebnisse vorlagen.

**(Quantitative) Auswertung PCR: Dotierungsniveauprobe**

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

Auswertenummer	Paranuss	Paranuss	Methode	Hinweis
	pos/neg	[mg/kg]		
8	positiv		ASU	
5	positiv		MS	
2	positiv	8,87	SFA-ID	
7	positiv		SFA-ID	
4	-		div	
11	positiv		div	

Anzahl positiv	5
Anzahl negativ	0
Prozent positiv	100
Prozent negativ	0
Konsenswert	positiv

**Methoden:**

ASU = ASU §64 Methode/method

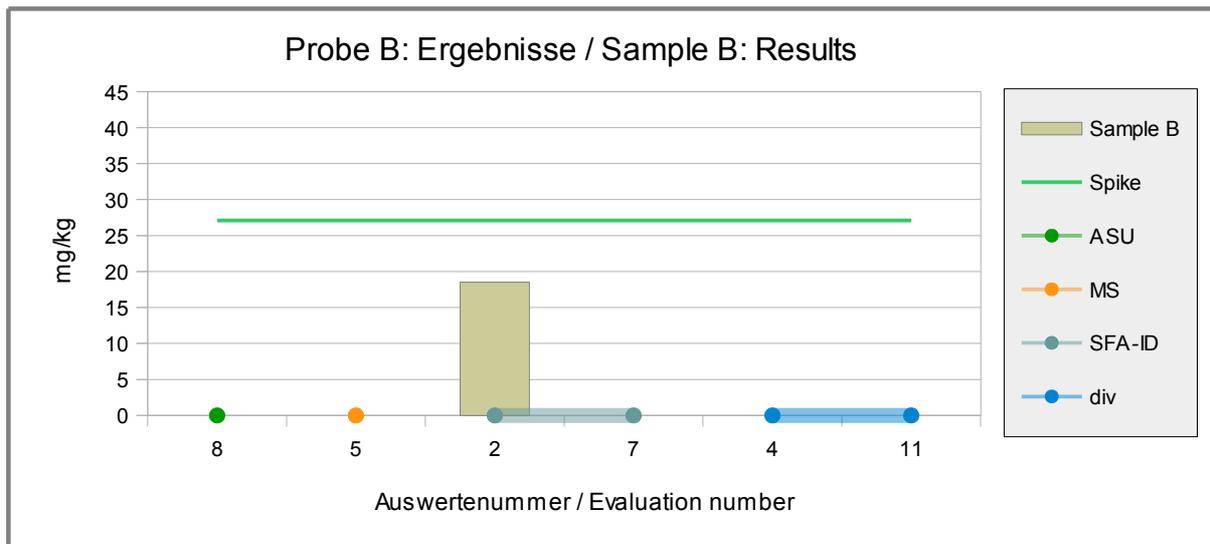
MS = Microsynth

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

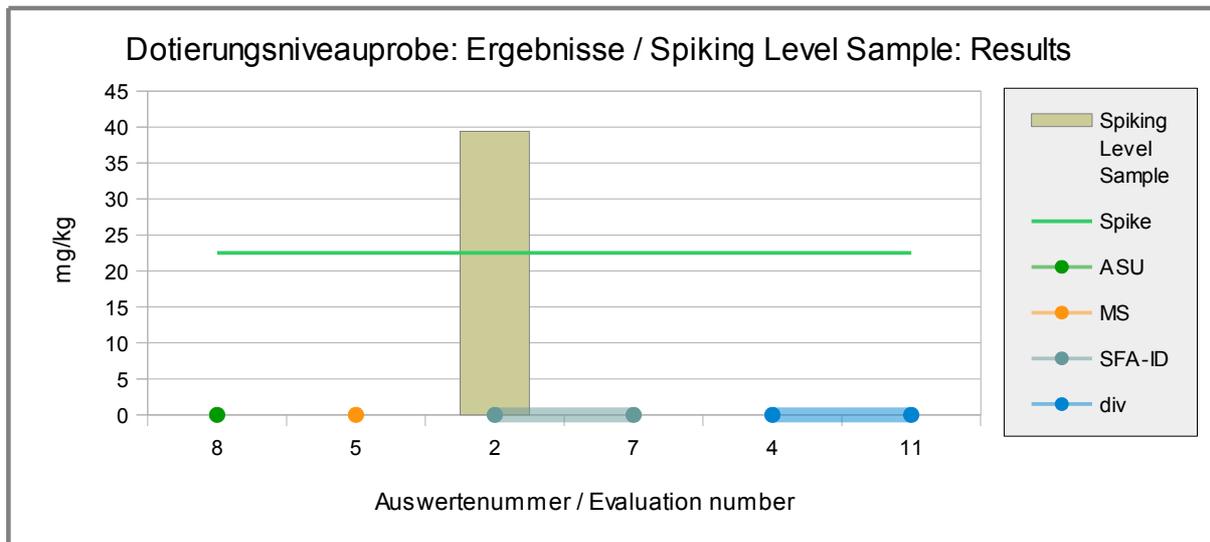
div = keine genaue Angabe / andere Methode

Anmerkung:

Für die Dotierungsniveauprobe wurden 100% positive Ergebnisse erhalten.



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



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

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

Auswertenummer	Dotierungsniveauprobe	Wiederfindungsrate*	Probe B	Wiederfindungsrate*	Methode	Hinweis
	[mg/kg]	[%]	[mg/kg]	[%]		
8					ASU	
5					MS	
2	8,87	39	18,5	<b>68</b>	SFA-ID	
7					SFA-ID	
4					div	
11					div	

AB**	50-150 %	AB**	50-150 %
Anzahl im AB	<b>0</b>	Anzahl im AB	<b>1</b>
Prozent im AB	<b>0</b>	Prozent im AB	<b>100</b>

**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: Paranuss, s. Seite 5

\*\* Akzeptanzbereich der AOAC für Allergen-ELISAs

Anmerkung:

Ein Teilnehmer hat quantitative Ergebnisse mittels PCR angegeben. Für die Dotierungsniveauprobe lag die Wiederfindungsrate unterhalb des Bereichs der AOAC-Anforderung von 50-150%. Die Wiederfindungsrate für die dotierte Lebensmittelmatrix-Probe B lag innerhalb der AOAC-Anforderung.

## 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: Macadamia

Meth. Abk.	Auswertenummer	Ergebnis Probe A		Ergebnis Probe B		Ergebnis Dotierungsprobe		Angabe quantitatives Ergebnis als z.B. Lebensmittel / Protein	Methode Test-Kit + Anbieter
		qualitativ	mg/kg	qualitativ	mg/kg	qualitativ	mg/kg		
BF	1	negativ	0	positiv	12,6	positiv	15,2	Macadamia	MonoTrace Macadamia ELISA kit, BioFront Technologies
ET	9	negativ	<0.333	positiv	2,80	positiv	6,2	Macadamia Protein	Elution Technologies ELISA Kit Macadamia Protein E-75MCD
IL	12	negativ	<1	positiv	33,2	positiv	48,6	Macadamia	Immunolab Macadamia ELISA
RS-F	2	negativ	<1ppm	positiv	30,9	positiv	52,98	Macadamia	
RS-F	3	negativ	<1	positiv	24,6	positiv	48,5	Macadamia	RidascreenFast Macadamia R6852, r-Biopharm
RS-F	8	negativ	<1mg/kg	positiv	30	positiv	48	Macadamia	RIDASCREEN®FAST Macadamia
RS-F	10	negativ	<1	positiv	16	positiv	>27	Macadamia	Ridascreen Fast Macadamia ref. R6852

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	
BF	1	Monoclonal antibody	Extraktion für 10 Minuten bei 60°C	nein	
ET	9			ja	
IL	12				
RS-F	2	gemäß Testkit Anleitung	gemäß Testkit Anleitung	ja	R-Biopharm FAST Macadamia R6852
RS-F	3				
RS-F	8		gemäß Testkit Anleitung	ja	
RS-F	10			nein	

**5.1.2 ELISA: Paranuss**

Meth. Abk.	Auswertenummer	Ergebnis Probe A		Ergebnis Probe B		Ergebnis Dotierungsprobe		Angabe quantitatives Ergebnis als	Methode
		qualitativ	mg/kg	qualitativ	mg/kg	qualitativ	mg/kg		
									Test-Kit + Anbieter
BF	1	negativ	0	positiv	26,3	positiv	29,9	Paranuss	MonoTrace Brazil Nut ELISA kit, BioFront Technologies
BF	3	negativ	<2	positiv	18,8	positiv	33,2	Paranuss	MonoTrace Brazil Nut ELISA kit, BioFront Technologies
BF	10	negativ	<2	positiv	24	positiv	34	Paranuss	MonoTrace Brazil Nut ELISA kit, BioFront Technologies
ET	2	negativ	<1ppm	positiv	2,56	positiv	2,54	Paranuss Protein	Elution Technologies ELISA Kit Brazil Nut Protein E-75BZL
ET	6	negativ	nd	positiv	3,3	positiv	3,1	Paranuss Protein	Elution Technologies ELISA Kit Brazil Nut Protein E-75BZL
ET	9	negativ	<1.0	positiv	2,8	positiv	2,7	Paranuss Protein	Elution Technologies ELISA Kit Brazil Nut Protein E-75BZL
IL	12	negativ	< 1	positiv	19,3	positiv	26,3	Paranuss	Immunolab Brazil Nut 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	
BF	1	Monoclonal antibody	Extraktion für 10 min bei 60°C	nein	
BF	3				
BF	10			nein	
ET	2	Nach Kit-Anleitung	Nach Kit-Anleitung	nein	
ET	6		nach Methode; Extraktion für 25 min bei 60°C in einem schüttelnden Wasserbad	ja	Einzelergebnisse
ET	9			ja	
IL	12				

**5.1.3 PCR: Macadamia**

Meth. Abk.	Auswertenummer	Ergebnis Probe A		Ergebnis Probe B		Ergebnis Dotierungsprobe		Angabe quantitatives Ergebnis als	Methode
		positiv / negativ	mg/kg	positiv / negativ	mg/kg	positiv / negativ	mg/kg		
SFA-ID	7	negativ		positiv		positiv		Macadamia-DNA	Sure Food Allergen ID, R-Biopharm / Congen
div	4	negativ		positiv		-		Macadamia-DNA	
div	11	negativ		positiv		positiv			Hausmethode

Meth. Abk.	Auswertenummer	Spezifität	Hinweise zur Methode (Extraktion und Bestimmung)	Methode akkreditiert nach ISO/IEC 17025	Sonstige Hinweise
		Target-Sequenz / -DNA	z.B. Extraktion / Enzyme / Clean-Up / Real Time PCR / Gelelektrophorese / Cyclen	ja/nein	
SFA-ID	7			ja	LOD 0,4 ppm, Artikelnr.: S3116
div	4			nein	
div	11		Silica-Säulchen	nein	

**5.1.4 PCR: Paranuss**

Meth. Abk.	Auswertenummer	Ergebnis Probe A		Ergebnis Probe B		Ergebnis Dotierungsprobe		Angabe quantitatives Ergebnis als	Methode
		positiv / negativ	mg/kg	positiv / negativ	mg/kg	positiv / negativ	mg/kg		
								Lebensmittel / Protein	Test-Kit + Anbieter
ASU	8	negativ		negativ		positiv		Paranuss-DNA	ASU §64 Methode/method
MS	5	negativ		positiv		positiv		Paranuss-DNA	Microsynth
SFA-ID	2	negativ	<1ppm	positiv	18,5	positiv	8,87	Paranuss	Sure Food Allergen ID, R-Biopharm / Congen
SFA-ID	7	negativ		positiv		positiv		Paranuss-DNA	Sure Food Allergen ID, R-Biopharm / Congen
div	4	negativ		positiv		-		Paranuss-DNA	
div	11	negativ		positiv		positiv			Hausmethode

Meth. Abk.	Auswertenummer	Spezifität	Hinweise zur Methode (Extraktion und Bestimmung)	Methode akkreditiert nach ISO/IEC 17025	Sonstige Hinweise
		Target-Sequenz / -DNA	z.B. Extraktion / Enzyme / Clean-Up / Real Time PCR / Gelelektrophorese / Cyclen	ja/nein	
ASU	8	Paranuss 2S albumin Gen	2 g Einwaage, Maxwell Extraktion	ja	
MS	5		Macherey Nagel Nucleo Spin Food mit Optimierungen: erhöhte Einwaage, Umpufferung (Waschschritt mit Lysis Buffer) RNase-Schritt, Chloroform-Schritt, 2xCQW; RealTime PCR mit 45 Zyklen, Dekontaminationsschritt mit UNG; eigenes Thermoprofil; Inhibitionskontrolle	ja	NWG bei 0,005% DNA
SFA-ID	2	gemäß Kit-Anleitung	gemäß Kit-Anleitung	nein	
SFA-ID	7			ja	LOD 0,4 ppm, Artikelnr.: S3117
div	4			ja	
div	11		Silica-Säulchen	nein	

**5.2 Homogenität**

**5.2.1 Mischungshomogenität vor der Abfüllung**

**Microtracer Homogenitätstest**

**DLA 08-2017 Probe B**

Gewicht Gesamtprobe 2,80 kg  
 Microtracer FSS-rot lake  
 Teilchengröße 75 – 300 µm  
 Gewicht pro Partikel 2,0 µg  
 Tracerzugabe 22,5 mg/kg

**Analysenergebnisse:**

Probe	Einwaage [g]	Partikel Anzahl	Partikel [mg/kg]
1	4,99	61	24,4
3	4,96	64	25,8
4	5,02	55	21,9
5	5,00	52	20,8
7	5,02	48	19,1
8	5,15	55	21,4
9	5,04	55	21,8
10	5,02	52	20,7

Poisson-Verteilung		
Probenanzahl	8	
Freiheitsgrad	7	
Mittelwert	55,3	Partikel
Standardabweichung	5,40	Partikel
$\chi^2$ (CHI-Quadrat)	3,69	
<b>Wahrscheinlichkeit</b>	<b>81</b>	%
Wiederfindungsrate	98	%

Normalverteilung		
Probenanzahl	8	
Mittelwert	22,0	mg/kg
Standardabweichung	2,15	mg/kg
rel. Standardabweichung	9,76	%
Horwitz Standardabweichung	10,0	%
<b>HorRat-Wert</b>	<b>0,97</b>	
Wiederfindungsrate	98	%

**Microtracer Homogenitätstest**

**DLA 08-2017 Dotierungsneiveauprobe**

Gewicht Gesamtprobe 1,48 kg  
 Microtracer FSS-rot lake  
 Teilchengröße 75 – 300 µm  
 Gewicht pro Partikel 2,0 µg  
 Tracerzugabe 21,8 mg/kg

**Analysenergebnisse:**

Probe	Einwaage [g]	Partikel Anzahl	Partikel [mg/kg]
1	5,07	53	20,9
2	5,00	62	24,8
3	4,97	65	26,2
4	5,02	72	28,7
7	4,96	59	23,8
8	5,05	68	26,9
9	5,07	69	27,2
10	4,94	60	24,3

Poisson-Verteilung		
Probenanzahl	8	
Freiheitsgrad	7	
Mittelwert	63,5	Partikel
Standardabweichung	6,09	Partikel
$\chi^2$ (CHI-Quadrat)	4,09	
<b>Wahrscheinlichkeit</b>	<b>77</b>	%
Wiederfindungsrate	116	%

Normalverteilung		
Probenanzahl	8	
Mittelwert	25,3	mg/kg
Standardabweichung	2,43	mg/kg
rel. Standardabweichung	9,59	%
Horwitz Standardabweichung	9,84	%
<b>HorRat-Wert</b>	<b>0,97</b>	
Wiederfindungsrate	116	%

**5.3 Informationen zur Eignungsprüfung (EP)**

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

EP-Nummer	<b>DLA 08-2017</b>
EP-Name	<b>Allergene VIII: Macadamia und Paranuss in Getreidemüsli mit „Dotierungsniveauprobe“</b>
Probenmatrix (Prozessierung)	<b>Proben A + B:</b> Müsli mit Früchen / Zutaten: Hafervollkornflocken, Rosinen, Reis gepufft, Trockenfrüchte (Aprikosen, Datteln, Pflaumen, Äpfel, Himbeeren, Rote Johannisbeeren, Erdbeeren, Heidelbeeren) , Chia-Samen, Amaranth, Reismehl, Sonnenblumenöl, Zimt und Kartoffelpulver, 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: 25 g
Lagerungsinformation	Proben A + B: gekühlt 2 - 10 °C (Langzeit < -18°C) Dotierungsniveauprobe: Raumtemperatur
Verwendungszweck	Ausschließlich für Laboruntersuchungen (Qualitätskontrollproben)
Parameter	qualitativ + quantitativ: Macadamia, Paranuss (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. Von den <b>Proben A + B</b> soll die <b>Gesamtmenge homogenisiert</b> werden.
Ergebnisangabe	Es werden für jede Probe A , B und Dotierungsniveauprobe je ein Ergebnis ermittelt. Die Einzelergebnisse sind in die Ergebnisabgabe-Datei einzutragen.
Einheiten	mg/kg
Anzahl von Stellen	mindestens 2 signifikante Stellen
Ergebnisabgabe	Die Ergebnisabgabe-Datei wird per eMail übermittelt an: <b>pt@dla-lvu.de</b>
Abgabetermin	<b>spätestens 02. Februar 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 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. 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 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 08/2017 - Allergene VIII**

12 von 13 Teilnehmer haben mindestens ein Ergebnis eingereicht. Die Auswertung hinsichtlich der Parameter Macadamia und Paranuss 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 Dotierungsniveauprobe und die dotierte Probe ermittelt. Details zu den einzelnen Parametern inklusive separater Auswertung nach Testkit-Herstellern sind dem Auswertebereicht zu entnehmen.

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