

Proficiency Tests

DLA

food
cosmetics
consumer goods
www.dla-lvu.de

Auswertungs-Bericht

Laborvergleichsuntersuchung

DLA 10/2017

Allergene X:

Gluten in "glutenfreier" Sojasauce

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

proficiency-testing@dla-lvu.de www.dla-lvu.de

Koordinator der LVU:
Dr. Matthias Besler

1. Korrektur 23.11.2017:

In der Kopfzeile von Tabelle 1 (S. 5) ist ein Fehler bei der Bezeichnung der Proben in Klammern aufgetreten: Probe A enthält Weizen und Probe B enthält keinen Weizen. Dies wurde mit der vorliegenden Korrektur richtig gestellt: Probe A (mit Weizen) und Probe B (ohne Weizen).

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

<i>EP-Anbieter</i> <i>PT-Provider</i>	DLA - Dienstleistung Lebensmittel Analytik GbR Gesellschafter: Dr. Gerhard Wichmann und Dr. Matthias Besler Waldemar-Bonsels-Weg 170, 22926 Ahrensburg, Germany Tel. ++49(0)171-1954375 Fax. ++49(0)4102-9944976 eMail. proficiency-testing@dla-lvu.de
<i>EP-Nummer</i> <i>PT-Number</i>	DLA 10/2017
<i>EP-Koordinator</i> <i>PT-Coordinator</i>	Dr. Matthias Besler
<i>Status des EP-Bericht</i> <i>Status of PT-Report</i>	Abschlussbericht / Final report (22. November 2017) 1. Korrektur / 1st Correction (23. November 2017) Gültig ist die jeweils letzte Version/Korrektur des Berichts. Sie ersetzt alle vorangegangenen Versionen. Only the latest version/correction of the report is valid. It replaces all preceding versions.
<i>EP-Bericht Freigabe</i> <i>PT-Report Authorization</i>	Dr. Matthias Besler (Technischer Leiter / Technical Manager) - <i>gezeichnet / signed M. Besler</i> Dr. Gerhard Wichmann (QM-Beauftragter / Quality Manager) - <i>gezeichnet / signed G. Wichmann</i> Datum / Date: 23. November 2017
<i>Unteraufträge</i> <i>Subcontractors</i>	Die Prüfung der Gehalte, Homogenität und Stabilität von EP-Parametern wird von DLA im Unterauftrag vergeben. The analysis of the content, homogeneity and stability of PT-parameters are subcontracted by DLA.
<i>Vertraulichkeit</i> <i>Confidentiality</i>	Die Teilnehmerergebnisse sind im EP-Bericht in anonymisierter Form mit Auswertenummern benannt. Daten einzelner Teilnehmer werden ausschließlich nach vorheriger Zustimmung des Teilnehmers an Dritte weitergegeben. Participant result are named anonymously with evaluation numbers in the PT report. Data of individual participants will be passed on to third parties only with prior consent of the participant.

Inhalt

1. Einleitung.....	4
2. Durchführung.....	4
2.1 Untersuchungsmaterial.....	4
2.1.1 Homogenität.....	5
2.1.2 Stabilität.....	5
2.2 Probenversand und Informationen zur Untersuchung.....	6
2.3 Ergebnisübermittlung.....	7
3. Auswertung.....	8
3.1 Konsenswert der Teilnehmer (zugewiesener Wert).....	8
3.2 Robuste Standardabweichung.....	9
3.3 Ausschluss von Ergebnissen und Ausreißer.....	9
Ausschluss von Ergebnissen	9
3.4 Zielstandardabweichung (für die Eignungsbeurteilung).....	10
3.4.1 Allgemeines Modell nach Horwitz.....	10
3.4.2 Auswertung eines Versuchs zur Präzision	11
3.4.3 Werte aus Erkenntnissen	13
3.5 z-Score.....	14
3.6 z'-Score.....	15
3.7 Quotient S^*/opt	15
3.8 Standardunsicherheit des zugewiesenen Werts.....	15
3.9 Graphische Darstellung der Bezugswerte.....	16
4. Ergebnisse.....	17
4.1 Vergleichsuntersuchung Gluten.....	19
4.1.1 ELISA-Ergebnisse: Gluten.....	19
4.1.2 PCR-Ergebnisse: Weizen-DNA.....	26
5. Dokumentation.....	27
5.1 Angaben der Teilnehmer.....	27
5.1.1 ELISA: Gluten.....	27
5.1.2 PCR: Weizen-DNA.....	29
5.2 Informationen zur Eignungsprüfung (EP).....	30
6. Verzeichnis der Teilnehmer in alphabetischer Reihenfolge.....	31
7. Verzeichnis relevanter Literatur.....	32

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

Bei dem Untersuchungsmaterial handelt es sich um handelsübliche Sojasaucen. Die Sorten "glutenfreie" Sojasauce und Sojasauce mit Weizen sowie eine glutenhaltige Dotierungsprobe (Mischung von "glutenfreiem" Bier und Hefeweißbier) wurden wie in Tabelle 1 angegeben gemischt.

Die Proben wurden nach dem Homogenisieren zu Portionen von ca. 25 mL in PE-Flaschen mit Schraubdeckel abgefüllt.

Tabelle 1: Zusammensetzung der DLA-Proben

Zutaten	Probe A (mit Weizen)	Probe B (ohne Weizen)	Probe C (dotiert)
Sojasauce, würzig, glutenfrei Zutaten: Melasse, Wasser, Würze aus Soja und Mais, Salz, Glucose, Säuerungsmittel: Milchsäure, Konservierungsstoffe: Kaliumsorbat, Natriumbenzoat Nährwertangaben pro 100 ml: Eiweiß 7,8 g, Kohlenhydrate 44 g, Fett <0,5 g, Salz 13 g	67,8 g/100 g	100 g/100g	90 g/100g
Bio-Sojasauce mit Weizen gebraut Zutaten: Wasser, Sojamehl, Sojabohnen, Salz, Weizen 13% Nährwertangaben pro 100 ml: Eiweiß 10 g, Kohlenhydrate 5,0 g, Fett <0,5 g, Salz 18 g	32,3 g/100 g	-	-
- davon Weizen**	4,2 g/100 g		
Glutenhaltige Dotierungsprobe Zutaten: Mischung von "glutenfreiem" Pilsner Bier und Hefeweißbier mit Weizen- und Gerstenmalz (DLA 10-2016 Probe A)	-	-	10 g/100g
- davon Gluten*			25 mg/kg

*Gluten-Gehalt gemäß Auswertebereicht DLA 10-2016 Probe A: robuster Mittelwert 251 mg/kg, einfache Standardunsicherheit 17,2 mg/kg (Methode ELISA: R-Biopharm, Ridascreen Gliadin competitiv R7021)

** Gemäß Herstellerangaben berechnet.

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

Es standen keine geeigneten Methoden für die quantitative Bestimmung von hydrolysiertem Gluten in gebrauter Sojasauce mit Weizen zur Verfügung. Da es sich um flüssige Proben handelt (wässrige Lösungen), wurde die Homogenität als gewährleistet angesehen.

2.1.2 Stabilität

Bei den Proben handelt es sich um stabile handelsübliche Sojasaucen teils mit Konservierungsstoffen. Die Lagerstabilität bzw. Haltbarkeit der Proben (mikrobieller Verderb) ist somit erfahrungsgemäß während des Untersuchungszeitraums gewährleistet.

2.2 Probenversand und Informationen zur Untersuchung

An jeden Teilnehmer wurden in der 19. Kalenderwoche 2017 je eine Portion der Untersuchungsmaterialien A und B verschickt. Aufgrund von Rückmeldungen von Teilnehmern über Schwierigkeiten bei der Detektion von Gluten/Weizen in kommerziell gebrauter Sojasauce in den Proben A und/oder B, wurde eine zusätzliche Probe C, die nach dem Brauprozess mit Gluten dotiert worden ist, zur Verfügung gestellt. In der 23. Kalenderwoche am 7. Juni wurde die Probe C verschickt.

Die Untersuchungsverfahren wurden freigestellt. Die Untersuchungen waren nach Versand der Probe C durchzuführen bis spätestens 14. August 2017.

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

Es handelt sich um zwei unterschiedliche Proben A und B mit möglichen Gehalten an dem allergenem Parameter Gluten im mg/kg bis g/kg Bereich in der Matrix Sojasauce. Eine der beiden Proben wurde mit der allergenen Zutat „Weizen“ hergestellt, die andere Probe ohne glutenhaltige Zutaten.

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

anbei erhalten Sie eine zusätzliche Probe C zu unserer Laborvergleichsuntersuchung (LVU) bzw. Eignungsprüfung (EP):

DLA 10/2017: Allergene X: Gluten in „glutenfreier“ Sojasauce

Somit handelt sich insgesamt um drei unterschiedliche Proben A, B und C mit möglichen Gehalten an dem allergenen Parameter Gluten im mg/kg bis g/kg Bereich in der Matrix Sojasauce. Eine der beiden Proben A und B wurde mit der allergenen Zutat „Weizen“ industriell unter Fermentierung hergestellt, die andere Probe ohne glutenhaltige Zutaten.

Bei Probe C handelt es sich um eine nachträglich mit Gluten dotierte Probe.

Bitte beachten Sie die beiliegenden Informationen zur Eignungsprüfung. (siehe Dokumentation unter Punkt 5.2 EP-Informationen (2. Anschreiben))

2.3 Ergebnisübermittlung

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

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

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

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

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

Alle 20 Teilnehmer haben fristgerecht Ergebnisse abgegeben. Für Probe C wurden teilweise Ergebnisse verspätet übermittelt.

3. Auswertung

Verschiedene ELISA-Methoden zur quantitativen Bestimmung von Allergenen in Lebensmitteln können verschiedene Antikörper-Spezifitäten aufweisen, mit unterschiedlichem Referenzmaterial kalibriert worden sein und sich unterschiedlicher Extraktionsverfahren bedienen. Die verschiedenen ELISA-Methoden können daher zu einer unterschiedlichen Bewertung des Gehalts eines Analyten führen [23, 24, 25, 26]. Aus diesem Grund werden die Ergebnisse, wenn möglich in der Auswertung verschiedenen Bezugswerten gegenübergestellt.

Dadurch soll jedes einzelne Ergebnis im Vergleich mit dem Mittelwert aller eingesandten Ergebnisse und/oder im Vergleich mit dem Mittelwert der Ergebnisse derselben Methode bewertet werden können. Zum Vergleich mit der rechnerisch zugesetzten Menge wurde das Zusatzniveau in den graphischen Darstellungen der Ergebnisse mit angegeben.

Für quantitative Ergebnisse der Dotierungsniveauprobe und der dotierten Probe wurden anhand der bekannten Zusammensetzung Wiederfindungsraten berechnet und zur Information angegeben. Hierbei erfolgte keine statistische Auswertung. Die angegebenen Wiederfindungsraten dienen ausschließlich einer Einschätzung von Matrix- und/oder Prozessierungseinflüssen.

Die ELISA- und PCR-Ergebnisse wurden qualitativ anhand des Prozentsatzes positiver bzw. negativer Ergebnisse bewertet. Sofern $\geq 75\%$ positive oder negative Ergebnisse vorlagen, wurde für die betreffende Probe ein Konsens-Ergebnis (positiv oder negativ) festgestellt.

3.1 Konsenswert der Teilnehmer (zugewiesener Wert)

Für die Auswertung wurde als zugewiesener Wert (X_{pt}) der **robuste Mittelwert** der eingesandten Ergebnisse verwendet („Konsenswert der Teilnehmer“). Die Berechnung erfolgt nach Algorithmus A gemäß Anhang C der ISO 13528 [3].

Voraussetzung ist, dass die Mehrzahl der Ergebnisse der teilnehmenden Laboratorien einer Normalverteilung unterliegen bzw. unimodal und symmetrisch verteilt sind. Hierzu erfolgt eine Prüfung der Verteilung u.a. anhand der Kern-Dichte-Schätzung [3, 12].

Falls Hinweise für Quellen von höherer Variabilität, wie z.B. eine bimodale Verteilung der Ergebnisse, vorliegen, werden Ursachen dafür gesucht. In Frage kommt häufig die Verwendung unterschiedlicher Untersuchungsmethoden. Ist dies der Fall, werden nach Möglichkeit getrennte Auswertungen mit eigenen zugewiesenen Werten (X_{pti}) vorgenommen.

Bei den ELISA-Methoden zur Bestimmung von Allergenen wird, wenn möglich, stets so vorgegangen:

- i) **Robuster Mittelwert aller Ergebnisse** - $X_{pt_{ALL}}$
- ii) **Robuster Mittelwert von Einzelmethoden** - $X_{pt_{METHOD\ i}}$
mit mindestens 5 quantitativen Ergebnisangaben.

Einzelergebnisse die außerhalb des angegebenen Messbereiches eines teilnehmenden Labors liegen (z.B. mit der Angabe > 25 mg/kg oder $< 2,5$ mg/kg)

oder die Angabe „0“ werden für die statistische Auswertung generell nicht berücksichtigt [3].

3.2 Robuste Standardabweichung

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

Folgende robuste Standardabweichungen werden herangezogen:

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

3.3 Ausschluss von Ergebnissen und Ausreißer

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

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

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

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

3.4 Zielstandardabweichung (für die Eignungsbeurteilung)

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

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

3.4.1 Allgemeines Modell nach Horwitz

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

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

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

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

3.4.2 Auswertung eines Versuchs zur Präzision

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

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

Die 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 [20]. 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 [20].

Insbesondere kann auch der Glutengehalt in fermentierten Getreideprodukten von verschiedenen ELISA-Methoden unterschiedlich bewertet werden: Eine Vergleichsstudie von 5 Sandwich-ELISAs und 2 kompetitiven ELISA-Methoden zur Bestimmung von Gluten in verschiedenen Stufen der Bierherstellung wurde von Panda et al. (2015) durchgeführt [26].

Von Colgrave et al. (2014) wurde eine LC-MS/MS-Methode zur Bestimmung von Gluten in hydrolysierten Form in Bier im Vergleich zu ELISA-Methoden vorgestellt [27].

Zur Bestimmung von Gluten in Sojasaucen liegen z.Zt. noch keine Präzisionsdaten vor. Nach Cao et al. (2017) ist Gluten mittels kommerziellen ELISA-Methoden, Lateral Flow und Immunoblotting nicht in traditionell mit Weizen gebrauter Sojasauce nachweisbar [30]. Die Nachweisbarkeit ging nach der sogenannten Moromi-Fermentation verloren. In der Folge stellten Panda et al. (2017) einen kompetitiven Multiplex-ELISA vor, der 9 kommerziell genutzte Gluten-Antikörper (u.a. G12, R5, 2D4, MIOBS und Skerrit) in einem Assay-Format mit anschließender Cluster-Analyse verwendet. Es wurden u.a. 15 Sojasaucen untersucht und unterschiedliche Glutengehalte ("apparent gluten contents") waren messbar (Bereich 20 bis 100000 µg/ml) [31].

Die in Tabelle 2 aufgeführten Präzisionsdaten wurden in Ringversuchen mittels eines kommerziellen ELISAs zur Bestimmung von Gluten in fermentierten getreidehaltigen Produkten erhalten (AOAC-Methode AACCI 38-55.02) [25]. Es wurden "glutenfreies" Bier auf Hirse-Basis sowie mit Hordein-Verdau (Gerste) dotierte Hirsebiere untersucht.

Tabelle 2: Relative Wiederholstandardabweichungen (RSD_r) und relative Vergleichsstandardabweichungen (RSD_R) gemäß Auswertungen von Versuchen zur Präzision [25]

Parameter	Matrix	Mittelwerte	RSD_r	RSD_R	Methode / Literatur
Gluten	"glutenfreies" Bier (Hirse-Bier)	2,36 mg/kg	98,0 %	126,1 %	ELISA [25]
Gluten	"glutenfreies" Bier (Hirse-Bier), ge-spiked	26,2 mg/kg	30,2 %	36,8 %	ELISA [25]
Gluten	"glutenfreies" Bier (Hirse-Bier), ge-spiked	119,5 mg/kg	31,2 %	31,2 %	ELISA [25]
Gluten	"glutenfreier" Stärkesirup	1,29 mg/kg	157,3 %	236,1 %	ELISA [25]
Gluten	Stärkesirup	10,6 mg/kg	16,3 %	34,4 %	ELISA [25]
Gluten	Sauerteig	48,4 mg/kg	23,1 %	25,9 %	ELISA [25]
Gluten	Sauerteig	145,6 mg/kg	19,5 %	27,5 %	ELISA [25]

3.4.3 Werte aus Erkenntnissen

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

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

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

Tabelle 3: ELISA-Validierungskriterien

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

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

Tabelle 4: PCR-Validierungskriterien

Literatur [16]	Wiederfindungsrate	Wiederholstandard- abweichung	Vergleichsstandard- abweichung
CAC 2010	± 25% ^(a)	≤ 25%	≤ 35%

(a) = Trueness / Richtigkeit

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

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

Gesetzliche Regelungen und Höchstwert-Empfehlungen

Die Kennzeichnung von Allergenen ist in der Lebensmittel-Informations-VO (EU 1169/2011) geregelt. Für die Kennzeichnung von Gluten bzw. glutenhaltigen Getreiden gilt gemäß EU-Verordnung 828/2014: Lebensmittel mit einem

Glutengehalt <20 mg/kg dürfen als "glutenfrei" und mit Gehalten von maximal 100 mg/kg als mit dem Hinweis "sehr geringer Glutengehalt" bezeichnet werden.

3.5 z-Score

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

Die Berechnung erfolgt nach:

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

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

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

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

- i) **z-Score** - z_{ALL} (bezogen auf alle Ergebnisse)
- ii) **z-Score** - $z_{METHOD i}$ (bezogen auf Einzelmethoden)

3.5.1 Warn- und Eingriffssignale

Gemäß der ISO 13528 für statistische Verfahren für Eignungsprüfungen wird empfohlen, dass ein Ergebnis, das einen z-Wert $> 3,0$ oder $< -3,0$ ergibt, als „Eingriffssignal“ zu werten ist [3]. Gleichmaßen ist ein z-Wert $> 2,0$ oder $< -2,0$ als „Warnsignal“ zu beurteilen. Ein einzelnes „Eingriffssignal“ oder aber „Warnsignale“ bei zwei aufeinander folgenden LVU-Runden sind als Beleg dafür zu werten, dass eine Anomalie aufgetreten ist, die untersucht werden muss. Eine Fehler- bzw. Ursachenanalyse kann durch Prüfung des Analysenablaufs inkl. Verständnis und Umsetzung der Messung durch das Personal, Einzelheiten des Messablaufs, Kalibrierung von Geräten und Zusammensetzung von Reagenzien, Übertragungs- bzw. Berechnungsfehler, Richtigkeit und Präzision sowie Einsatz von Referenzmaterial durchgeführt werden. Falls notwendig, muss auf die Probleme durch angemessene Korrekturmaßnahmen reagiert werden [3].

DLA stellt in den z-Score-Abbildungen die Grenzen für die Warn- und Eingriffssignale als gelbe bzw. rote Linien dar. Die jeweiligen Werte haben gemäß ISO 13528 nur Gültigkeit sofern ≥ 10 Ergebnisse vorliegen [3].

3.6 z'-Score

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

Die Berechnung erfolgt nach:

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

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

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

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

Zu Warn- und Eingriffssignalen siehe 3.5.1.

3.7 Quotient S^*/σ_{pt}

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

3.8 Standardunsicherheit des zugewiesenen Werts

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

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

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

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

3.9 Graphische Darstellung der Bezugswerte

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

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 die Ergebnisse aller ELISA- bzw. PCR-Methoden zu einem Parameter für die Proben A, B und C (qualitativ und ggf. quantitativ) angegeben.

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, werden Teilnehmerergebnisse mit unterschiedlichen Angaben (z.B. als Protein oder allergenes Lebensmittel) soweit möglich von DLA harmonisiert.

In der vorliegenden LVU wurden alle ELISA-Ergebnisse einheitlich als Gluten angegeben, sodass keine Umrechnungen vorgenommen wurden.

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

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

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

Auswertenummer	Ergebnis	Ergebnis	z-Score X_{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 σ_{pt}		
untere Grenze des Zielbereichs ($X_{pt} - 2\sigma_{pt}$)		
obere Grenze des Zielbereichs ($X_{pt} + 2\sigma_{pt}$)		
Quotient S^*/σ_{pt}		
Standardunsicherheit $U(X_{pt})$		
Quotient $U(X_{pt})/\sigma_{pt}$		
Ergebnisse im Zielbereich		
Prozent im Zielbereich		

4.1 Vergleichsuntersuchung Gluten

4.1.1 ELISA-Ergebnisse: Gluten

Qualitative Auswertung der Ergebnisse: Proben A, B und C

Auswertenummer	Probe A	Probe A	Probe B	Probe B	Probe C	Probe C	Qualitative Bewertung	Methode	Hinweis
	pos/neg	[mg/kg]	pos/neg	[mg/kg]	pos/neg	[mg/kg]			
4a	negativ	< 4,0	negativ	< 4,0	positiv	7,21	3/3 (100%)	AQ	
19	negativ	<LOD	negativ	<LOD	positiv	12,2	3/3 (100%)	AQ	
10	negativ	< LOQ	negativ	< LOQ	positiv	15,7	3/3 (100%)	IL	
13	negativ	0,12	negativ	-0,45	positiv	4,87	3/3 (100%)	NL-E	Mittelwerte von DLA berechnet
1	negativ	0	negativ	0	positiv	12,2	3/3 (100%)	RS	
3	negativ	2,86	negativ	2,9	positiv	4,05	3/3 (100%)	RS	
4b	negativ	< 5,0	negativ	< 5,0	positiv	14,2	3/3 (100%)	RS	
5	-		-		positiv	12,2	1/1 (100%)	RS	
6	negativ	<LOQ	negativ	<LOQ	positiv	20,8	3/3 (100%)	RS	
8	negativ	<10	negativ	<10	positiv	<10	3/3 (100%)	RS	
14	negativ	<5	negativ	<5	positiv	9	3/3 (100%)	RS	
17	negativ		negativ		positiv	10,1	3/3 (100%)	RS	
2	positiv	11,29	negativ	< 10,0	positiv	34,8	2/3 (67%)	RS-C	
5	negativ	< 10	negativ	< 10	positiv	16,6	3/3 (100%)	RS-C	
9	negativ	<10	negativ	<10	positiv	44	3/3 (100%)	RS-C	
11	negativ	<10	positiv	10,2	positiv	43	2/3 (67%)	RS-C	
15	negativ	<10	negativ	<10	positiv	25	3/3 (100%)	RS-C	
16	negativ	<10	negativ	<10	positiv	20,55	3/3 (100%)	RS-C	
18	negativ		negativ		positiv	19,9	3/3 (100%)	RS-C	
20	negativ	<10	negativ	<10	positiv	15,9	3/3 (100%)	RS-C	
7	negativ	n.n.	negativ	n.n.	positiv	13,76	3/3 (100%)	RS-F	
12	negativ	<4,00	negativ	<4,00	positiv	7,83	3/3 (100%)	RS-F	

	Probe A	Probe B	Probe C
Anzahl positiv	1	1	22
Anzahl negativ	20	20	0
Prozent positiv	5	5	100
Prozent negativ	95	95	0
Konsenswert	negativ	negativ	positiv

Methoden:

AQ = AgraQuant, RomerLabs
 IL = Immunolab
 NL-E = nutriLinia®E Allergen-ELISA
 RS = Ridascreen®, R-Biopharm
 RS-C = Ridascreen® competitive, R-Biopharm
 RS-F = Ridascreen® Fast, R-Biopharm

Anmerkung:

Die Konsenswerte stehen in qualitativer Übereinstimmung mit der Dotierung von Probe C (Zusatz von Gluten aus fermentiertem Produkt Bier). Für Probe A (Sojasauce mit Weizen gebraut) und für Probe B (Sojasauce ohne Weizen) wurden negative Konsenswerte erhalten. Je ein positives Ergebnis nahe der angegebenen Bestimmungsgrenzen wurde für Probe A und B angegeben.

Quantitative Auswertung ELISA: Probe C

Die Bewertung der Ergebnisse erfolgte anhand von z-Scores für alle nicht-kompetitiven ELISA-Methoden (AQ, NL-E, IL, RS und RS-F) gemeinsam sowie einzeln für die Methoden RS (nicht-kompetitiv) und RS-C (kompetitiv), für die jeweils mindestens 5 Einzelergebnisse vorlagen.

Auswertenummer	Gluten	z-Score Xpt _{ALL.nc}	z-Score Xpt _{RS}	z-Score Xpt _{RS-C}	Methode	Hinweis
	[mg/kg]					
4a	7,21	-1,3			AQ	
19	12,2	0,5			AQ	
10	15,7	1,8			IL	
13	4,87	-2,2			NL-E	Mittelwerte von DLA berechnet
1	12,2	0,5	0,19		RS	
3	4,05	-2,5	-2,6		RS	
4b	14,2	1,2	0,88		RS	
5	12,2	0,5	0,19		RS	
6	20,8	3,7	3,1		RS	
8	<10				RS	
14	9	-0,7	-0,91		RS	
17	10,1	-0,3	-0,53		RS	
2	34,8			1,1	RS-C	
5	16,6			-1,6	RS-C	
9	44			2,4	RS-C	
11	43			2,3	RS-C	
15	25			-0,36	RS-C	
16	20,55			-1,0	RS-C	
18	19,9			-1,1	RS-C	
20	15,9			-1,7	RS-C	
7	13,76	1,1			RS-F	
12	7,83	-1,1			RS-F	

Methoden:

AQ = AgraQuant, RomerLabs

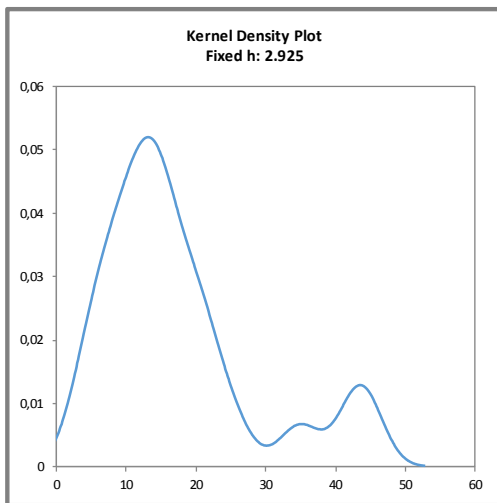
IL = Immunolab

NL-E = nutriLinia®E Allergen-ELISA

RS = Ridascreen®, R-Biopharm

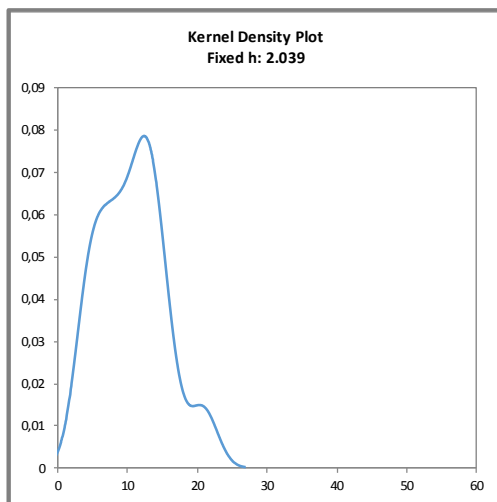
RS-C = Ridascreen® competitive, R-Biopharm

RS-F = Ridascreen® Fast, R-Biopharm

**Abb. / Fig. 1:**

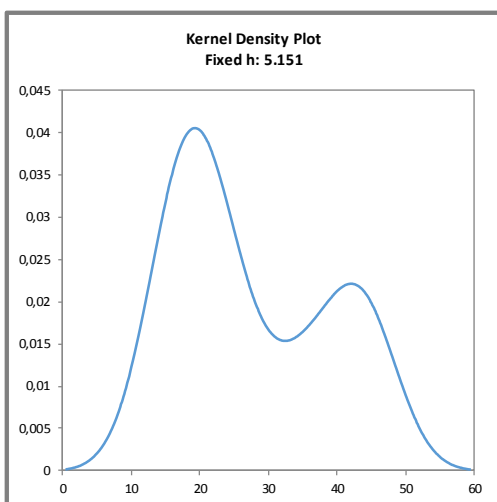
Kerndichte-Schätzung aller ELISA-Ergebnisse (mit $h = 0,75 \times \sigma_{pt}$ von X_{ptALL})

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

**Abb. / Fig. 2:**

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

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

**Abb. / Fig. 3:**

Kerndichte-Schätzung der kompetitiven ELISA-Ergebnisse Methode RS-C (mit $h = 0,75 \times \sigma_{pt}$ von X_{ptALL})

Kernel density plot of competitive ELISA results method RS-C (with $h = 0,75 \times \sigma_{pt}$ of X_{ptALL})

Anmerkung: Die Kerndichte-Schätzung aller Methoden (nicht-kompetitiv und kompetitiv) zeigt ein Maximum bei ca. 15 mg/kg mit zwei kleineren Neben-Peaks, die auf die kompetitive Methode RS-C zurückgehen (Abb. 1).

Nicht-kompetitive und kompetitive Methoden weisen unterschiedliche Maxima auf (Abb. 2 u. 3). Das Hauptmaximum der RS-C Ergebnisse bei ca. 25 mg/kg wird komplett überlagert (Abb. 1 u. 3), während die nicht-kompetitiven Methoden zwei ineinander übergehende Maxima bei 5-15 mg/kg aufweisen.

Kenndaten: Quantitative Auswertung ELISA Gluten**Probe C**

Kenndaten	Alle Ergebnisse (nc) [mg/kg]	Methode RS [mg/kg]	Methode RS-C [mg/kg]
Zugewiesener Wert (X_{pt})	$X_{pt}_{ALL\ nc}$	$X_{pt}_{METHOD\ RS}$	$X_{pt}_{METHOD\ RS-C}$
Anzahl der Messergebnisse	13	7	8
Anzahl der Ausreißer	0	0	0
Mittelwert	11,1	11,8	27,5
Median	12,2	12,2	22,8
Robuster Mittelwert (X_{pt})	10,9	11,6	27,5
Robuste Standardabweichung (S^*)	4,71	5,49	13,1
<i>Zielkenndaten:</i>			
Zielstandardabweichung σ_{pt}	2,72	2,9	6,87
Zielstandardabweichung (zur Information)	3,17	3,9	8,98
Untere Grenze des Zielbereichs	5,43	5,8	13,7
Obere Grenze des Zielbereichs	16,3	17	41,2
Quotient S^*/σ_{pt}	1,7	1,9	1,9
Standardunsicherheit $U(X_{pt})$	1,6	2,6	5,8
Quotient $U(X_{pt})/\sigma_{pt}$	0,60	0,89	0,84
Ergebnisse im Zielbereich	10	5	6
Prozent im Zielbereich	77	71	75

Methoden:

Alle Ergebnisse(nc) = nicht-kompetitive Methoden (AQ, NL-E, IL, RS, RS-F)

RS = R-Biopharm, Ridascreen®

RS-C = R-Biopharm, Ridascreen® Gliadin kompetitiv R7021

Anmerkungen zu den Kenndaten und Vergleich der Bezugswerte:

Die Kerndichte-Schätzungen zeigen deutlich methodenabhängige Unterschiede für die nicht-kompetitiven und kompetitiven ELISA-Methoden (Abb. 1-3). Auch die robusten Mittelwerte spiegeln dies wider, sie liegen um mehr als den Faktor 2 auseinander. Eine gemeinsame Auswertung der Ergebnisse aller Methoden wurde daher nicht vorgenommen. Gemeinsam ausgewertet wurden die Ergebnisse der nicht-kompetitiven ELISAs (AQ, NL-E, IL, RS und RS-F), sowie Ergebnisse der Methoden RS (nicht-kompetitiv) und RS-C (kompetitiv), für die jeweils mindestens 5 Einzelergebnisse vorlagen. Die Ergebnisse von Methode RS-C wurden trotz des Auftretens eines Nebenmaximums in der Kerndichte-Schätzung ausgewertet, da die Kenndaten insgesamt unauffällig waren und keine Ausreißer auftraten.

Die Verteilungen der Ergebnisse aller nicht-kompetitiven Methoden sowie der Einzelmethode RS und RS-C zeigen eine normale Variabilität mit Quotienten S^*/σ_{pt} von $< 2,0$. Die robusten Standardabweichungen liegen im Bereich von etablierten Werten für die Wiederhol- und Vergleichsstandardabweichung der eingesetzten Bestimmungsmethoden (vgl. 3.4.2 Auswertung

eines Versuchs zur Präzision und 3.4.3 Werte aus Erkenntnissen). Die Vergleichbarkeit der Ergebnisse innerhalb der jeweiligen Auswertungen ist gegeben.

Diese Aussage ist für die methodenübergreifende Auswertung nur eingeschränkt gültig, da für einige Methoden nur wenige Ergebnisse vorlagen.

Die robusten Mittelwerte der Auswertungen aller nicht-kompetitiven ELISAs und der nicht-kompetitiven Methode RS lagen bei 44% bzw. 46% vom zugegebenen Glutengehalt zu Probe C, während der robuste Mittelwert von Methode RS-C bei 110% lag. Zu beachten ist, dass der zugegebene Gehalt rechnerisch auf Ergebnisse der kompetitiven ELISA-Methode RS-C für die Dotierungslösung (Bier) zurückgeht (vgl. S. 5).

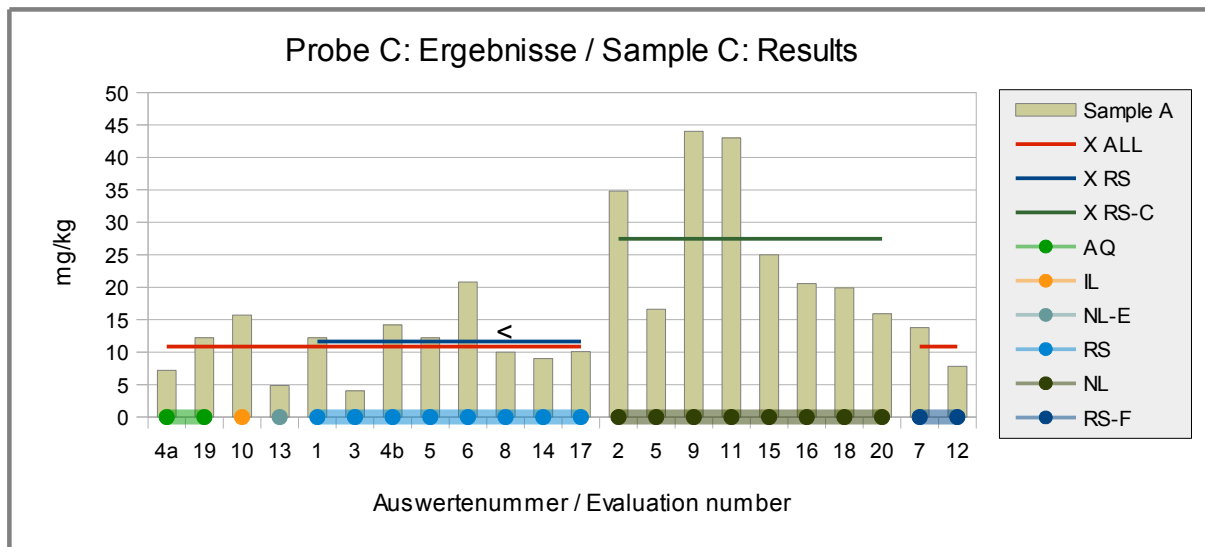


Abb./Fig. 4: ELISA-Ergebnisse Gluten
 rote Linie = robuster Mittelwert aller nicht kompetitiven Methoden
 blaue Linie = robuster Mittelwert Ergebnisse Methode RS
 dunkelgüne Linie = robuster Mittelwert Ergebnisse Methode RS-C
 runde Symbole = Zuordnung der Methoden (s. Legende)

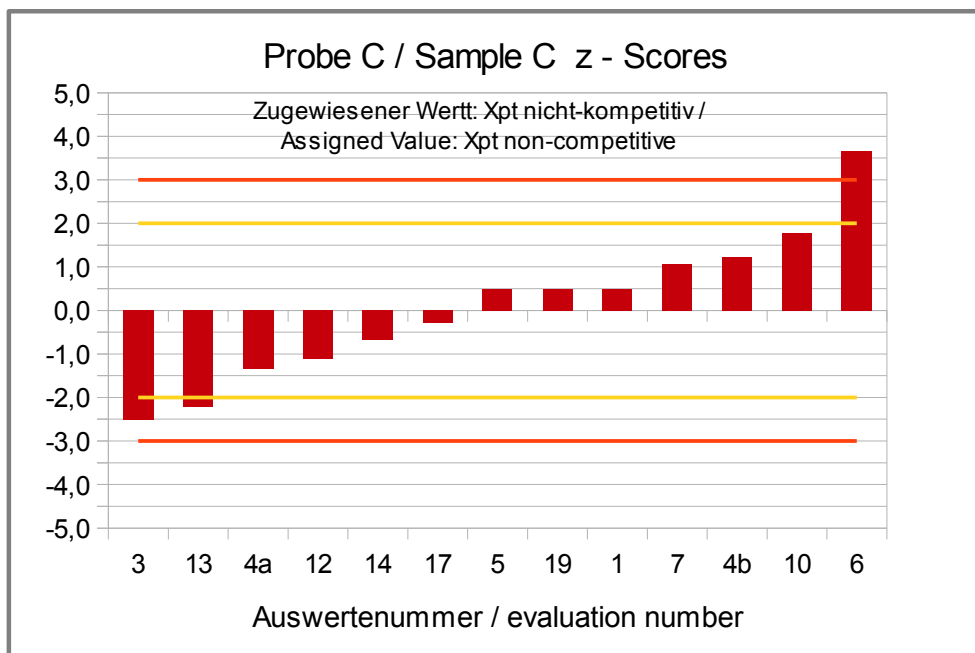


Abb./Fig. 5:
 z-Scores (ELISA-Ergebnisse Gluten)
 Zugewiesener Wert: robuster Mittelwert Ergebnisse aller nicht-kompetitiven Methoden

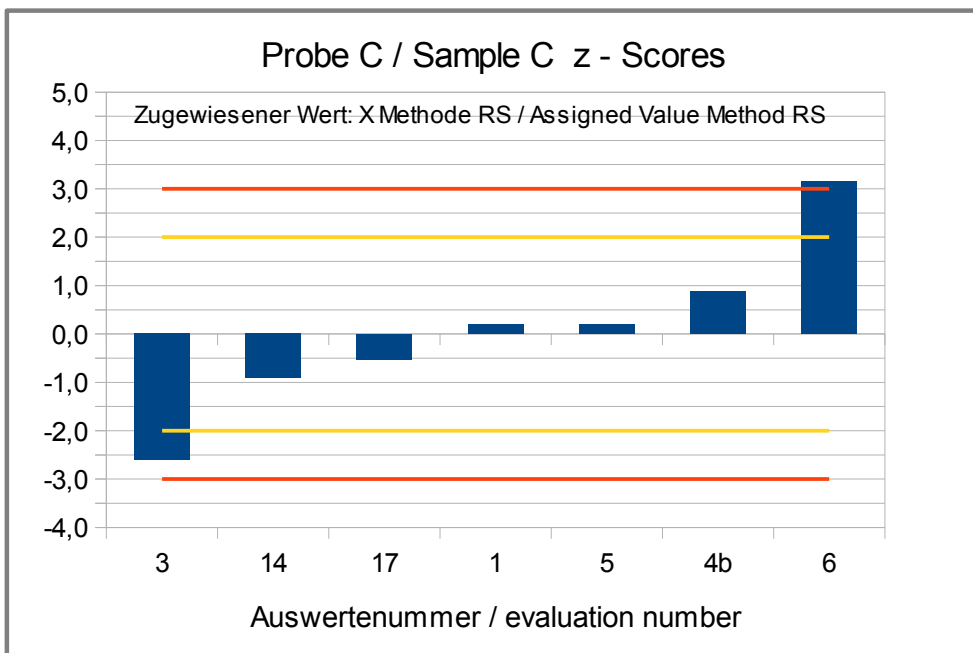


Abb./Fig. 6:

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

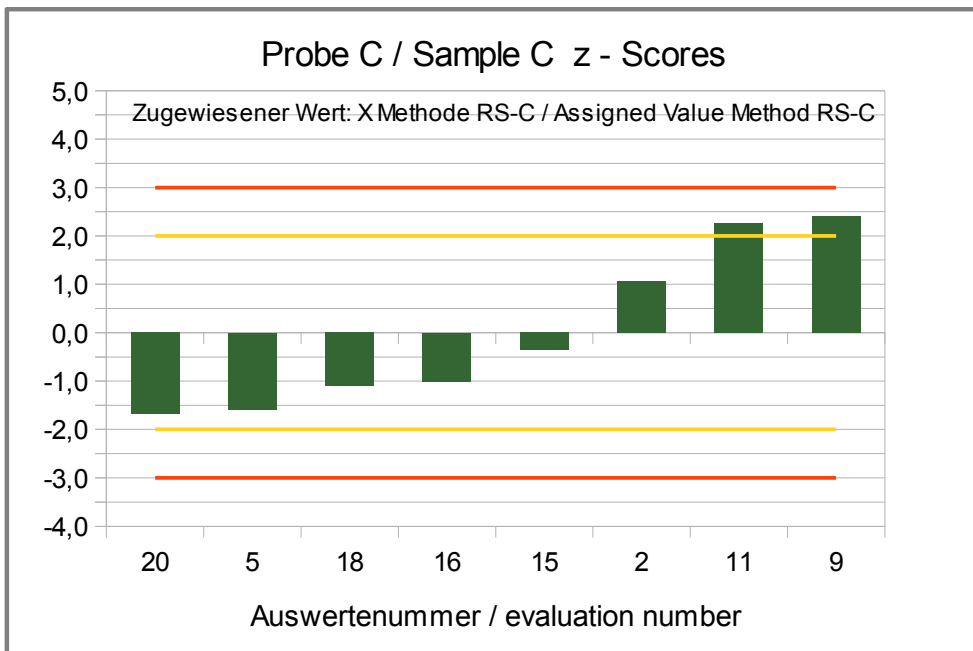


Abb./Fig. 7:

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

4.1.2 PCR-Ergebnisse: Weizen-DNA**Qualitative Auswertung der Ergebnisse: Proben A, B und C**

Auswertenummer	Probe A	Probe A	Probe B	Probe B	Probe C	Probe C	Qualitative Bewertung	Methode	Hinweis
	pos/neg	[mg/kg]	pos/neg	[mg/kg]	pos/neg	[mg/kg]	Übereinstimmungen mit Konsenswerten		
18	negativ		negativ		negativ			div	

Methoden:

div = keine genaue Angabe / andere Methode

Anmerkung:

Ein Teilnehmer hat die Proben A, B und C mittels PCR getestet und sowohl in der Sojasauce mit Weizen (Probe A) und als auch in der mit Gluten dotierten Probe C kein positives Ergebnis erhalten.

5. Dokumentation

5.1 Angaben der Teilnehmer

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

5.1.1 ELISA: Gluten

Meth. Abk.	Auswertenummer	Datum der Analyse	Ergebnis Probe A		Ergebnis Probe B		Ergebnis Probe C		Quantitatives Ergebnis als	Methode
			qualitativ	mg/kg	qualitativ	mg/kg	qualitativ	mg/kg		
AQ	4a	12.06.	negativ	< 4,0	negativ	< 4,0	positiv	7,21	Gluten	AgraQuant ELISA Gluten G12 COKAL 0200, RomerLabs
AQ	19	20.06.17	negativ	<LOD	negativ	<LOD	positiv	12,2	Gluten	AgraQuant ELISA Gluten G12 COKAL0200, RomerLabs
IL	10	12.06.17	negativ	< LOQ	negativ	< LOQ	positiv	15,7	Gluten	Immunolab Gliadin/Gluten ELISA
NL-E	13	14.07.17.	negativ	0,09	negativ	-0,45	positiv	4,5	Gluten	nutriLinia® Allergen-ELISA Gluten-E NC-6080
NL-E	13	17.07.17	negativ	0,14	negativ	-0,44	positiv	5,24	Gluten	nutriLinia® Allergen-ELISA Gluten-E NC-6080
RS	1	23.06.17	negativ	0	negativ	0	positiv	12,2	Gluten	Ridascreen® Gliadin R7001, R-Biopharm
RS	3	06.07.17	negativ	2,855	negativ	2,895	negativ	4,049	Gluten	Ridascreen® Gliadin R7001, R-Biopharm
RS	4b	12.06.	negativ	< 5,0	negativ	< 5,0	positiv	14,2	Gluten	Ridascreen® Gliadin R7001, R-Biopharm
RS	5	28.06.17	-		-		-	12,2	Gluten	Ridascreen® Gliadin R7001, R-Biopharm
RS	6	12.06.17	-	<LOQ	-	<LOQ	-	20,8	Gluten	Ridascreen® Gliadin R7001, R-Biopharm
RS	8	23.06.17	NEG	<10	NEG	<10	positiv	<10	protein	Ridascreen® Gliadin R7001, R-Biopharm
RS	14	21.07.17	negativ	<5	negativ	<5	positiv	9	Gluten	Ridascreen® Gliadin R7001, R-Biopharm
RS	17		negativ		negativ		positiv	10,1	Gluten	Ridascreen® Gliadin R7001, R-Biopharm
RS-C	2	30 May / 28 Jun	positiv	11,29	negativ	< 10,0	positiv	34,8	Hydrolyzed Gluten	Ridascreen® Gliadin competitive R7021, R-Biopharm
RS-C	5	19.6.	-	< 10	-	< 10	-	16,6	Gluten	Ridascreen® Gliadin competitive R7021, R-Biopharm
RS-C	9	09.06.17	negativ	<10	negativ	<10	positiv	44	Gluten	Ridascreen® Gliadin competitive R7021, R-Biopharm
RS-C	11	30.05.17	negativ	<10	positiv	10,2	positiv	43	Gluten	Ridascreen® Gliadin competitive R7021, R-Biopharm
RS-C	15		negativ	<10	negativ	<10	positiv	25	Gluten	Ridascreen® Gliadin competitive R7021, R-Biopharm
RS-C	16	12.06.17	negativ	<10	negativ	<10	positiv	20,55	Gluten	Ridascreen® Gliadin competitive R7021, R-Biopharm
RS-C	18	21.06.	negativ		negativ		positiv	19,9	Gluten	Ridascreen® Gliadin competitive R7021, R-Biopharm
RS-C	20	07.05.17	negativ	<10	negativ	<10	positiv	15,9	Gluten	Ridascreen® Gliadin competitive R7021, R-Biopharm
RS-F	7	20.06.17	-	n.n.	-	n.n.	-	13,76	Gluten	Risa Screen Fast Gliadin R7002
RS-F	12	05.24-06-26	negativ	<4,00	negativ	<4,00	positiv	7,83	Gluten	Ridascreen® FAST Gliadin R7002, R-Biopharm

Fortsetzung ELISA Gluten:

Meth. Abk.	Auswertenummer	Spezifität	Hinweise zur Methode (Extraktion und Bestimmung)	Methode akkr. n. ISO/IEC 17025	Sonstige Hinweise
		Antikörper	z.B. Extraktionslösung / Zeit / Temperatur	ja/nein	
AQ	4a		nach Herstelleranleitung	nein	
AQ	19	Gluten	Extraktion mit Extraktionslösung aus dem Kit, 50°C / 40 min und nach Ethanolzugabe weitere 60 min schütteln bei Raumtemperatur	nein	AOAC OMA 2014.03
IL	10	polyclonal			
NL-E	13	Gluten	Temperatur 23°C	nein	
NL-E	13	Gluten	Temperatur 21,7°C	nein	
RS	1	R5 Antikörper gegen Gliadine	Extraktion mit Cocktail-Lösung (patentiert) R7006 und Ethanollosung (80%) /40 min/50°C	Ja	Bestimmungsgrenze 5 mg/kg
RS	3	Monoklonaler Antikörper R5	Cocktail (patentiert) / 40 min / 50°C. Ethanollosung (80%) / 1h /20-25°C		
RS	4b		nach Herstelleranleitung	ja	
RS	5			nein	
RS	6	Gluten	Cocktail (patented), laut Testkitbeschreibung vom Hersteller	AOAC	
RS	8			Ja	
RS	14		Extraktion mit Cocktail-Lösung, R7016	ja	
RS	17		nach Kit-Anleitung mit Cocktail Solution; doppelte Einwaage; Zugabe von Milchpulver;	ja	Probe C: Mittelwert aus zwei Bestimmungen
RS-C	2		60% Ethanol + Fischgelatine / 20 min / Raumtemperatur	Ja	LAB_AR Ergebnis
RS-C	5			nein	
RS-C	9	R5	nach Anleitung	ja	
RS-C	11	ja	der kleinste mitgeführte Standard entspricht 10ppm		
RS-C	15	R5		nein	
RS-C	16	R5 Monoklonaler Antikörper	nach Testkit-Anleitung	nein	
RS-C	18	R5 (monoklonal)	Ethanol 60% / 10 Minuten / 20°C bis 25°C	nein	
RS-C	20				
RS-F	7		nach Anleitung	Ja	NWG: 1 mg/kg Gluten
RS-F	12		Coctail Patent/40 min/50C	Ja	

5.1.2 PCR: Weizen-DNA

Meth. Abk.	Auswertenummer	Datum der Analyse	Ergebnis Probe A		Ergebnis Probe B		Ergebnis Probe C		Quantitatives Ergebnis als	Methode
			qualitativ	mg/kg	qualitativ	mg/kg	qualitativ	mg/kg		
div	18	21.06.	negativ		negativ		negativ		z.B. Lebensmittel / Protein Bitte auswählen!	Test-Kit + Anbieter Auswahl PCR-Methoden

Meth. Abk.	Auswertenummer	Spezifität	Hinweise zur Methode (Extraktion und Bestimmung)		Methode akkr. n. ISO/IEC 17025	Sonstige Hinweise
			z.B. Extraktion / Enzyme / Clean-Up / Real Time PCR / Gelelektrophorese / Cyclen			
		Target-Sequenz / -DNA			ja/nein	
div	18		Alary et al. 2002. Quantification of common wheat adulteration of durum wheat pasta using real-time quantitative Polymerase chain reaction. Cereal Chem 79 (4) 553-558		nein	

5.2 Informationen zur Eignungsprüfung (EP)

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

EP-Nummer	DLA 10-2017
EP-Name	Allergene X: Gluten in „glutenfreier“ Sojasauce
Probenmatrix (Prozessierung)	Proben A , B, C: Sojasauce(n)/ Zutaten: Melasse, Wasser, Würze aus Soja und Mais, Sojamehl, Sojabohnen, Salz, Glucose, Säuerungsmittel: Milchsäure, Konservierungsstoffe: Kaliumsorbat und Natriumbenzoat und Weizen/Gerste (nur eine Probe A oder B bzw. dotierte Probe C).
Probenzahl und Probenmenge	3 unterschiedliche Proben A, B, C: je 25 g
Lagerungsinformation	Proben A, B, C: Raumtemperatur (Langzeit gekühlt 2 - 10 °C)
Verwendungszweck	Ausschließlich für Laboruntersuchungen (Qualitätskontrollproben)
Parameter	qualitativ + quantitativ: Gluten / Weizen
Untersuchungsmethoden	Methode ist freigestellt
Hinweis zur Analyse	Die Untersuchung der Eignungsprüfung soll entsprechend einer laborüblichen Routineanalyse vorgenommen werden. Generell empfehlen wir vor der Analyse, insbesondere bei kleinen Analyseneinwaagen, eine repräsentative Probenmenge entsprechend guter Laborpraxis zu homogenisieren.
Ergebnisangabe	Es werden für jede Probe A , B und C je ein Ergebnis ermittelt. Die Einzelergebnisse sind in die Ergebnisabgabe-Datei einzutragen, bei Mehrfachbestimmungen der Mittelwert.
Einheiten	mg/kg
Anzahl von Stellen	mindestens 2 signifikante Stellen
Ergebnisabgabe	Die Ergebnisabgabe-Datei wird per eMail übermittelt an: pt@dla-lvu.de
Abgabetermin	spätestens 14. August 2017
Auswertebericht	Der Auswertebericht wird voraussichtlich 6 Wochen nach Abgabetermin der Ergebnisse fertiggestellt und per eMail als PDF-Datei zugesandt.
Koordinator und Ansprechpartner der EP	Dr. Matthias Besler

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

6. Verzeichnis der Teilnehmer in alphabetischer Reihenfolge

Teilnehmer / Participant	Ort / Town	Land / Country
		SCHWEIZ
		Deutschland
		ITALIEN
		SCHWEIZ
		SPANIEN
		Deutschland
		FRANKREICH
		ÖSTERREICH
		Deutschland
		Deutschland
		ITALIEN
		ÖSTERREICH
		UNGARN
		GROSSBRITANNIEN
		POLEN
		Deutschland
		HUNGARY
		Deutschland
		KANADA
		SPANIEN

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

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

7. Verzeichnis relevanter Literatur

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

- methods
20. Ministry of Health and Welfare, JSM, Japan 2006
 21. Working Group Food Allergens, Abbott et al., Validation Procedures for Quantitative Food Allergen ELISA Methods: Community Guidance and Best Practices JAOAC Int. 93:442-50 (2010)
 22. Working Group on Prolamin Analysis and Toxicity (WGPAT): Méndez et al. Report of a collaborative trial to investigate the performance of the R5 enzyme linked immunoassay to determine gliadin in gluten-free food. Eur J Gastroenterol Hepatol. 17:1053-63 (2005)
 23. DLA Publikation: Performance of ELISA and PCR methods for the determination of allergens in food: an evaluation of six years of proficiency testing for soy (*Glycine max* L.) and wheat gluten (*Triticum aestivum* L.); Scharf et al.; J Agric Food Chem. 61(43):10261-72 (2013)
 24. EFSA (2014) Scientific Opinion on the evaluation of allergenic foods and food ingredients for labelling purposes¹, EFSA Panel on Dietetic Products, Nutrition and Allergies (NDA), European Food Safety Authority (EFSA), Parma, Italy, EFSA Journal 2014;12(11):3894
 25. IRMM, Poms et al.; Inter-laboratory validation study of five different commercial ELISA test kits for determination of peanut residues in cookie and dark chocolate; European Commission, Joint Research Centre, Belgium; GE/R/FSQ/D08/05/2004
 26. Jayasena et al. (2015) Comparison of six commercial ELISA kits for their specificity and sensitivity in detecting different major peanut allergens. J Agric Food Chem. 2015 Feb 18;63(6):1849-55
 27. Lacorn & Weiss (2015) Partially Hydrolyzed Gluten in Fermented Cereal-Based Products by R5 Competitive ELISA: Collaborative Study, First Action 2015.05. J AOAC Int 98(5):1346-54.
 28. Panda et al. (2015) Detection and Quantification of Gluten during the Brewing and Fermentation of Beer Using Antibody-Based Technologies. J Food Prot. 78(6):1167-77.
 29. Colgrave et al. (2014) Using mass spectrometry to detect hydrolysed gluten in beer that is responsible for false negatives by ELISA. J Chromatogr A 1370:105-14.
 30. Cao et al. (2017) Detection of Gluten during the Fermentation Process To Produce Soy Sauce. J Food Protect 80:799-808
 31. Panda et al. (2017) A multiplex competitive ELISA for the detection and characterization of gluten in fermented-hydrolyzed foods. Anal Bioanal Chem doi: 10.1007/s00216-017-0677-z. [Epub ahead of print]

DLA 10/2017 - Allergene X

Alle 20 Teilnehmer haben mindestens ein Ergebnis eingereicht. Die Auswertung erfolgte hinsichtlich des Parameters Gluten in 3 unterschiedlichen Proben Sojasauce: Probe A mit Soja und Weizen gebraut, Probe B ohne Weizen und Probe C mit Gluten (aus Bier) dotiert. Die Ergebnisse wurden qualitativ und für Probe C auch quantitativ ausgewertet. Für die Proben A und B waren die Konsenswerte der Teilnehmerergebnisse negativ. Details zu den einzelnen Parametern inklusive separater Auswertung nach Testkit-Herstellern sind dem Auswertebereich zu entnehmen.

13 Teilnehmer hatten ihren Sitz im Europäischen Ausland (Frankreich, Großbritannien, Italien, Österreich, Polen, Schweiz, Spanien, Ungarn) und ein Teilnehmer in Kanada.