Proficiency Tests
DLA
food
cosmetics
consumer goods
www.dla-lvu.de

Auswertungs-Bericht
Laborvergleichsuntersuchung

DLA 15/2017

Response PT Erdnuss:

5 prozessierte Proben Erdnuss (ungeröstet und geröstet), Erdnussbutter, Erdnusspaste und Extrudat (Erdnuss-Flips)

in Kartoffelpulver-Matrix

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-Scharf

Nachdruck, auch auszugsweise, nur mit schriftlicher Genehmigung von DLA-Ahrensburg

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

EP-Anbieter *PT-Provider*	**DLA - Dienstleistung Lebensmittel Analytik GbR** Gesellschafter: Dr. Gerhard Wichmann und Dr. Matthias Besler-Scharf Waldemar-Bonsels-Weg 170, 22926 Ahrensburg, Germany Tel. ++49-(0)4532-9183358 Mob. ++49(0)171-1954375 Fax. ++49(0)4102-9944976 eMail. proficiency-testing@dla-lvu.de
EP-Nummer *PT-Number*	DLA 15/2017
EP-Koordinator *PT-Coordinator*	Dr. Matthias Besler-Scharf
Status des EP-Bericht *Status of PT-Report*	Abschlussbericht / Final report (16. März 2018) 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.
EP-Bericht Freigabe *PT-Report Authorization*	Dr. Matthias Besler-Scharf (Technischer Leiter / Technical Manager) *- gezeichnet / signed M. Besler-Scharf* Dr. Gerhard Wichmann (QM-Beauftragter / Quality Manager) *- gezeichnet / signed G. Wichmann* Datum / Date: 16. März 2018
Unteraufträge *Subcontractors*	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.
Vertraulichkeit *Confidentiality*	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.

Nachdruck, auch auszugsweise, nur mit schriftlicher Genehmigung von DLA-Ahrensburg

Inhalt

1. Einleitung....4
2. Durchführung....5
2.1 Untersuchungsmaterial....5
2.1.1 Homogenität....7
2.1.2 Stabilität....7
2.2 Probenversand und Informationen zur Untersuchung....8
2.3 Ergebnisübermittlung....8
3. Auswertung....9
3.1 Qualitativer Score....10
3.2 Wiederfindungs-Score (WFR-Score)....10
3.2.1 Wiederfindungsraten eines Versuchs zur Präzision....11
3.2.2 Werte aus Erkenntnissen....13
4. Ergebnisse....14
4.1 Vergleichsuntersuchung prozessierte Erdnussprodukte....15
4.1.1 Qualitative Scores: ELISA-Methoden....15
4.1.2 Qualitative Scores: PCR-Methoden....16
4.1.4 Quantitativ: ELISA-Methoden Wiederfindungs-Scores (WFR-Scores)....17
4.1.5 Quantitativ: PCR-Methoden Wiederfindungs-Scores (WFR-Scores)....18
5. Dokumentation....21
5.1 Angaben der Teilnehmer....21
5.1.1 ELISA-Methoden....21
5.1.2 PCR-Methoden....23
5.2 Homogenität....24
5.2.1 Mischungshomogenität vor der Abfüllung....24
5.3 Informationen zur Eignungsprüfung (EP)....27
6. Verzeichnis der Teilnehmer in alphabetischer Reihenfolge....28
7. Verzeichnis relevanter Literatur....29

Nachdruck, auch auszugsweise, nur mit schriftlicher Genehmigung von DLA-Ahrensburg

1. Einleitung

Die Teilnahme an Laborvergleichsuntersuchungen (LVU) bzw. Eignungsprüfungen (EP, englisch Proficiency Test - 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].

Das vorliegende Eignungsprüfungs-Format **„Response PT - Allergene"** bietet die Möglichkeit anhand von jeweils 5 unterschiedlich prozessierten Produkten eines Allergens in einfacher Trägermatrix sowie einer „Nullprobe" nachzuweisen, dass mit der analytischen Bestimmungsmethode des teilnehmenden Labors die betreffenden prozessierten Allergene qualitativ erfasst werden können und quantitative Response-Faktoren für die jeweiligen prozessierten Produkte zu ermitteln.
Um eine Vergleichbarkeit der prozessierten Produkte zu gewährleisten werden die Allergen-Konzentrationen der PT-Probenreihe als Erdnuss-Gehalt auf ein annähernd gleiches Niveau eingestellt. Die Auswertung der PT-Ergebnisse erfolgt qualitativ in Scores von 1-5 (Score 5 = alle Prozessierungen erfolgreich erfasst). Quantitative Ergebnisse werden unter Angabe der erzielten Wiederfindungsrate informativ mit einem Wiederfindungs-Score im Bericht angegeben.

Nachdruck, auch auszugsweise, nur mit schriftlicher Genehmigung von DLA-Ahrensburg

2. Durchführung

2.1 Untersuchungsmaterial

Zur Untersuchung wurden 6 LVU-Proben für den qualitativen Nachweis und ggf. die quantitative Bestimmung von Erdnuss (Erdnussprotein) in ungerösteten und gerösteten Erdnüssen, Erdnussbutter, Erdnusspaste und Extrudat (Erdnuss-Flips) in Kartoffelpulver/Maltodextrin zur Verfügung gestellt.

Die jeweiligen Rohstoffe für die Probenreihe waren handelsübliche teils prozessierte Erdnussprodukte. Pro PT-Probe wurden jeweils 4-18 Produkte unterschiedlicher Herkunft verarbeitet. Die Erdnusspasten-Mischung wurde vor der weiteren Verwendung bei 60°C getrocknet.
Anschließend wurden Vormischungen mit Gehalten von ca. 1,6 - 5 % der betreffenden allergenen Zutaten hergestellt (s. Tab. 1). Hierzu wurden die Produkte ggf. vorzerkleinert, gravimetrisch mit weiteren Zutaten gemischt, mittels Kugelmühle zerkleinert oder Zentrifugalmühle zerkleinert und gesiebt (mesh 250 µm) und homogenisiert. Die Allergen-Vormischungen wurden anschließend zur Trägermatrix Kartoffelpulver / Maltodextrin (mesh < 500 µm) gegeben und homogenisiert. Ein Aliquot der Trägermatrix wurde als „Null"-Probe abgenommen.

Die 6 PT-Proben wurden zu Portionen von ca. 20 g in metallisierte PET-Folienbeutel abgefüllt.

Die Erdnuss-Gehalte der PT-Probenreihe lagen im Bereich von 26 bis 33 mg/kg (s. Tabelle 1).

Jeder zugewiesene Wert, hier die dotierten Allergen-Gehalte, sind mit einer Standardunsicherheit behaftet. Als Unsicherheiten wurden u.a. folgende Faktoren berücksichtigt: Proteingehalt des Dotierungsmaterials, Mischungshomogenität, Homogenität und Stabilität von Erdnussprotein.
Alle Unsicherheitsbeiträge wurden in Form von Standardabweichungen ausgedrückt und als Varianzen addiert. Die Wurzel aus der Summe der Gesamtvarianzen ergibt die kombinierte Unsicherheit "Uc", die mit dem Erweiterungsfaktor k=2 multipliziert die erweiterte Unsicherheit der zugewiesenen Werte "$U(X_{pt})$" ergibt [3, 13, 16 - 17].

Nachdruck, auch auszugsweise, nur mit schriftlicher Genehmigung von DLA-Ahrensburg

Tabelle 1: Zusammensetzung der DLA-Proben

PT-Probenreihe	**Probe 1** Erdnüse, geröstet	**Probe 2** Erdnüsse, ungeröstet	**Probe 3** Erdnuss-butter	**Probe 4** Erdnuss-paste	**Probe 5** Erdnuss-Extrudat	**Probe 6** „Null"
Zutaten	**g/100 g**	**g/100g**	**g/100g**	**g/100g**	**g/100g**	**g/100g**
Kartoffelpulver Zutaten: Kartoffeln, E471, E304, E223, E100 Nährwertangaben pro 100 g: Protein 8,3 g, Kohlenhydrate 76 g, Fett 0,6 g, Salz 0,15 g	75	75	75	75	75	75
Maltodextrin	25	25	25	25	25	25
Allergen-Vormischungen Zutaten: Maltodextrin (75% - 90%), Natriumsulfat (< 5%), Siliciumdioxid (< 2,5%), prozessierte Allergenprodukte (je 1,6% - 5% Erdnuss Trockengewicht)	0,58	0,65	0,59	1,80	2,04	-
Allergen-Gehalte	mg/kg	mg/kg	mg/kg	mg/kg	mg/kg	mg/kg
*Erdnüsse, geröstet** Protein 23,2% ** (18 Produkte aus USA, Asien, Afrika, Südamerika)	29,0	-	-	-	-	-
*Erdnüsse, ungeröstet** Protein 23,1 % ** *(9 Produkte aus Afrika, Asien, Südamerika)*	-	32,2	-	-	-	-
*Erdnussbutter** *(90% Erdnuss und weitere Zutaten)* Protein 21,7 % ** *(6 Produkte aus USA oder amerikanischer Art)*	-	-	29,2	-	-	-
*Erdnusspaste** *(36% Erdnuss und weitere Zutaten)* Gesamtprotein 11,0 % ** *(5 Produkte Würzsaucen aus Asien oder asiatischer Art)*	-	-	-	90,8	-	-
*Erdnuss-Extrudat** *(32% Erdnuss und weitere Zutaten)* Gesamtprotein 11,2 % ** *(7 Produkte Erdnuss-Flips aus Europa und USA)*	-	-	-	-	102	-
- als Erdnuss	29,0	32,2	26,3	32,7	32,5	-
erweiterte kombinierte Unsicherheit (k=2) des Erdnuss-Gehalts (= ± 12 %)	± 3,48	± 3,86	± 3,16	± 3,92	± 3,90	-

*Allergen-Gehalte als „Lebensmittel" wie in Spalte „Zutaten" angegeben gemäß gravimetrischer Mischung
** Proteingehalt gemäß Laboranalyse der Rohstoffmischungen (Gesamtstickstoff nach Kjeldahl mit F=5,46 für Erdnussprotein)
Hinweis: *Die metrologische Rückführung von Temperatur, Masse und Volumen bei der Herstellung der LVU-Proben wird mittels DAkkS-kalibrierter Referenzmaterialien gewährleistet.*

Nachdruck, auch auszugsweise, nur mit schriftlicher Genehmigung von DLA-Ahrensburg

2.1.1 Homogenität

Die **Mischungshomogenität vor der Abfüllung** wurde in 8-fach Bestimmung mittels **Microtracer-Analyse** untersucht. Es handelt sich um eine normierte Methode, die Bestandteil des internationalen GMP-Zertifizierungssystems für Futtermittel ist [14]. Vor der Mischung werden mit Farbstoff beschichtete Eisenpartikel in µm-Größe zur Probe gegeben und die Partikelzahl wird nach der Homogenisierung in entnommenen Aliquoten bestimmt. Die Bewertung der Mischungshomogenität erfolgt auf Grundlage der Poissonverteilung anhand des chi-Quadrat-Tests. Eine Wahrscheinlichkeit von ≥ 5% ist gleichzusetzen mit einer guten homogenen Mischung und von ≥ 25% mit einer exzellenten Mischung [14, 15]. Die Microtracer-Analyse der vorliegenden LVU-Proben 1 bis 5 hat eine Wahrscheinlichkeit von 80%, 92%, 99%, 55% bzw. 79% 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 [18]. Es wurden HorRat-Werte von 0,77, 0,73, 0,45, 1,1 bzw. 0,79 erhalten. Die Ergebnisse der Microtracer-Analyse sind in der Dokumentation angegeben.

2.1.2 Stabilität

Die Erfahrungen mit diversen DLA-Referenzmaterialien zeigen bei vergleichbarer Matrix und Wasseraktivität (a_W-Wert < 0,5) eine gute Lagerstabilität bezüglich der Haltbarkeit der Proben (mikrobieller Verderb) und des Gehalts an dem EP-Parameter Erdnuss. Die Stabilität des Probenmaterials war somit während des Untersuchungszeitraums unter den angegebenen Lagerbedingungen gewährleistet.

Nachdruck, auch auszugsweise, nur mit schriftlicher Genehmigung von DLA-Ahrensburg

2.2 Probenversand und Informationen zur Untersuchung

An jeden Teilnehmer wurden in der 48. Kalenderwoche 2017 je eine Portion der Untersuchungsmaterialien Proben 1 bis 6 verschickt. Die Untersuchungsverfahren wurden freigestellt. Die Untersuchungen waren durchzuführen bis spätestens 26. Januar 2018.

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

Es handelt sich um fünf unterschiedliche Proben mit ähnlichen Gehalten an dem unterschiedlich prozessierten allergenen Parameter Erdnuss in einfacher Trägermatrix sowie eine „Null"-Probe (Trägermatrix).

- *Die Proben 1-5 sind in zufälliger Reihenfolge nummeriert und enthalten Erdnuss (ungeröstet), Erdnuss (geröstet), Erdnussbutter, Erdnusspaste ("asiatische" Würzsaucen) und Extrudat (Erdnuss-Flips) mit bekannten Gehalten an Erdnuss / Erdnussprotein als Grundlage für den Response-Vergleich der quantitativen Ergebnisse der Teilnehmer.*
- *Bitte geben Sie alle quantitativen Ergebnisse als Gesamt-Erdnuss, soweit möglich unter Angabe des zugrundeliegenden Gehalts an Gesamt-Protein in Erdnuss.*
- *Mögliche Umrechnungsfaktoren auf die prozessierten Erdnussprodukte werden separat in der Ergebnisabgabedatei abgefragt.*

Bitte beachten Sie die beiliegenden Informationen zur Eignungsprüfung.
(siehe Dokumentation unter Punkt 5.3 EP-Informationen)

2.3 Ergebnisübermittlung

Die Ergebnisabgabe erfolgte einheitlich mittels an die teilnehmenden Labore übergebenen Übermittlungstabellen (per eMail).
Zur Auswertung kamen einerseits die Ergebnisse als positiv/negativ Angaben und andererseits angegebene Gehalte an allergenen Zutaten in mg/kg z.B. als allergenes Lebensmittel oder Protein.
Abgefragt und dokumentiert wurden die o.g. Ergebnisse sowie Angaben zu den Testmethoden wie Spezifitäten, Bestimmungsgrenzen, Testkit-Hersteller und Stichpunkte zur Durchführung der Methoden.
Falls Teilnehmer mehrere Ergebnisse für denselben Parameter abgegeben haben, die mit unterschiedlichen Methoden erhalten wurden, wurden diese Ergebnisse mit derselben Auswertenummer mit einem Buchstaben als Suffix unter Angabe der jeweiligen Methode ausgewertet.

10 Teilnehmer haben fristgerecht Ergebnisse abgegeben.

Nachdruck, auch auszugsweise, nur mit schriftlicher Genehmigung von DLA-Ahrensburg

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 [26-29, 40]. Darüber hinaus können Matrix- und/oder Prozessierung die Nachweisbarkeit von Allergenen sowohl mittels ELISA- als auch mittels PCR-Verfahren stark beeinflussen.

In der vorliegenden LVU wurden von dem Allergen Erdnuss fünf verschiedenartig prozessierte Produkte, Erdnüsse (geröstet), Erdnüsse (ungeröstet), Erdnussbutter, Erdnusspaste und Erdnuss-Extrudat zur Verfügung gestellt, um die qualitative Nachweisbarkeit und die Response in der quantitativen Bestimmung der eingesetzten Methoden ermitteln zu können.

Die Teilnehmer-Ergebnisse werden *qualitativ* mit einem Score von 1-5 bewertet, der angibt wie viele prozessierte Produkte erfolgreich erfasst wurden.
Die quantitativen Teilnehmer-Ergebnisse werden mit einem Wiederfindungs--Score *(WFR-Score)* bewertet, der angibt wie viele Ergebnisse im Bereich einer Wiederfindungsrate von 50 - 150% des Dotierungs-Levels liegen.

Nachdruck, auch auszugsweise, nur mit schriftlicher Genehmigung von DLA-Ahrensburg

3.1 Qualitativer Score

Die qualitative Bewertung der Ergebnisse jedes Teilnehmers erfolgt mit Scores von 1 - 5 anhand der Anzahl der Übereinstimmungen der Angaben „positiv" oder „negativ" mit den **Dotierungen der LVU-Probenreihe** (siehe Tab. 2). Ein Score von 5 bedeutet, dass alle prozessierten Produkte erfolgreich erfasst wurden.
Die Ergebnisse der Matrixprobe 6 („Null"-Probe) werden nicht bewertet, sofern das betreffende Teilnehmerergebnis in Übereinstimmung mit ≥75% positiver oder negativer Ergebnisse der Teilnehmer steht (Konsenswert) oder das Ergebnis unterhalb der Bestimmungsgrenze der eingesetzten Methode liegt.

Tabelle 2: Bewertung der Ergebnisse anhand von qualitativen Scores

Probe 1 Erdnüsse geröstet	Probe 2 Erdnüsse ungeröstet	Probe 3 Erdnuss-butter	Probe 4 Erdnuss-paste	Probe 5 Erdnuss-Extrudat	Probe 6 „Null"	Score qualitativ	Eignung qualitativ
pos/neg	pos/neg	pos/neg	pos/neg	pos/neg	pos/neg	Anzahl erfasster Proben 1 - 5	
negativ	negativ	negativ	negativ	negativ	negativ	0 (0%)	nicht erfolgreich
negativ	negativ	negativ	negativ	positiv	negativ	1 (20%)	1 Produktgruppe
negativ	negativ	negativ	positiv	positiv	negativ	2 (40%)	2 Produktgruppen
negativ	negativ	positiv	positiv	positiv	negativ	3 (60%)	3 Produktgruppen
negativ	positiv	positiv	positiv	positiv	negativ	4 (80%)	4 Produktgruppen
positiv	positiv	positiv	positiv	positiv	negativ	5 (100%)	5 Produktgruppen

3.2 Wiederfindungs-Score (WFR-Score)

Die Bewertung der quantitativen Ergebnisse jedes Teilnehmers für die **dotierten LVU-Proben** erfolgt anhand der Anzahl von Wiederfingsraten im Akzeptanzbereich anhand von Wiederfindungs-Scores *(WFR-Scores)*. Die Angabe der WFR-Scores wird als Anzahl von Ergebnissen im Akzeptanzbereich (s.u.) pro Anzahl quantitativ bestimmter Proben vorgenommen. Dahinter wird in Klammern der entsprechende Prozentsatz angegeben.

Die Wiederfindungsraten werden in Bezug auf das jeweilige zugesetzte prozessierte Allergen (Zusatzniveau) berechnet. Die Bezugswerte ergeben sich aus den unter 2.1 Untersuchungsmaterial in Tabelle 1 angegebenen Gehalten der Proben 1 bis 5. Als Akzeptanzbereich AB für die Bewertung der Teilnehmerergebnisse wird der von der AOAC vorgeschlagene Bereich von 50 - 150% für die Wiederfindungsraten von Allergen-ELISAs herangezogen [21]. Für quantitative PCR-Bestimmungen sowie LC/MS wird ebenfalls dieser Akzeptanzbereich herangezogen.

Es werden nur exakte quantitative Angaben berücksichtigt. Einzelergebnisse die außerhalb des angegebenen Messbereiches liegen (z.B. mit der Angabe > 25 mg/kg oder < 2,5 mg/kg) oder die Angabe „0" werden nicht berücksichtigt.

Die angegebenen Wiederfindungsraten dienen u.a. einer Einschätzung von Prozessierungseinflüssen.

Nachdruck, auch auszugsweise, nur mit schriftlicher Genehmigung von DLA-Ahrensburg

3.2.1 Wiederfindungsraten eines Versuchs zur Präzision

In Ringversuchen der ASU §64 Methoden wurden abhängig von Matrix bzw. Prozessierung und Konzentrationsbereich Wiederfindungsraten im Bereich von 57 – 119% für die ELISA-Methoden und 48 – 145% für die PCR-Methoden erhalten (s. Tab. 3a und 3b). Die angegebenen Zielstandardabweichungen σ_{pt} wurden für eine Anzahl von m = 2 Wiederholmessungen berechnet.

Tabelle 3a: ELISA-Methoden - Wiederfindungsraten und Präzisionsdaten ausgewählter Auswertungen von Versuchen zur Präzision [31-32]

Parameter	**Matrix**	**Mittel-werte [mg/kg]**	**Wieder-findung**	**rob RSD_r**	**RSD_r**	**RSD_R**	**σpt**	**Methode / Literatur**
Erdnuss	Vollmilch-schokolade	173,7 33,8 5,9	87 % 85 % 59 %	- - -	8,8% 5,2% 7,8%	31% 20% 31%	30,4% 19,7% 30,5%	ELISA Herst. A ASU 00.00-69
Erdnuss	Vollmilch-schokolade	215,7 40,1 10,1	108 % 100 % 101 %	- - -	5,9% 7,2% 7,3%	32% 14% 16%	31,7% 13,0% 15,1%	ELISA Herst. B ASU 00.00-69
Erdnuss	Feinherb-schokolade	148,2 30,9 5,7	74 % 77 % 57 %	- - -	6,0% 13% 6,1%	22% 25% 33%	21,6% 23,2% 32,7%	ELISA Herst. A ASU 00.00-69
Haselnuss	Feinherb-schokolade	16,3 7,56 3,73 1,62	81 % 76 % 75 % 81 %	- - - -	4,7% 8,9% 13% 15%	12% 15% 24% 33%	11,5% 13,6% 22,2% 31,2%	ELISA Herst. A ASU 44.00-7
Haselnuss	Feinherb-schokolade	21,3 10,7 4,69 2,37	106 % 107 % 94 % 119 %	- - - -	7,1% 11% 11% 9,3%	14% 19% 17% 17%	13,1% 17,3% 15,1% 16,4%	ELISA Herst. B ASU 44.00-7

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 [25]. Es wurden 12 Lebensmittelproben mit Gliadingehalten 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 [25].

Das IRMM (Institute for Reference Materials and Measurements) hat in einem Ringversuch die Eignung fünf verschiedener ELISA-Test-Kits zur Bestimmung von Erdnuss getestet [28]. 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%.

Nachdruck, auch auszugsweise, nur mit schriftlicher Genehmigung von DLA-Ahrensburg

Tabelle 3b: PCR-Methoden - Relative Wiederholstandardabweichungen (RSD_r) und relative Vergleichsstandabweichungen (RSD_R) gemäß ausgewählter Auswertungen von Versuchen zur Präzision und die resultierende Zielstandardabweichung σ_{pt} [34-36]

Parameter	**Matrix**	**Mittelwerte [mg/kg]**	**Wiederfindung**	**rob RSD_r**	**RSD_r**	**RSD_R**	**σ_{pt}**	**Methode / Literatur**
Mandel	Reiskekse	105,2 18,0 10,5	105 % 90 % 105 %	-	19,3% 44,0% 32,0%	27,5% 49,1% 38,8%	23,9% 38,0% 31,5%	rt-PCR ASU 18.00-20
Mandel	Weizenkekse Soßenpulver	114,3 88,1	94,6 % 88,1 %	-	22,1% 43,9%	41,8% 43,1%	38,8% - %	rt-PCR ASU 18.00-20
Mandel	Reiskekse	109 21,3 12,3	109 % 107 % 121 %	-	17,6% 35,8% 32,0%	32,8% 45,0% 47,8%	30,3% 37,2% 42,1%	rt-PCR ASU 18.00-22
Mandel	Weizenkekse Soßenpulver	120,7 112	98,2 % 94,1 %	-	15,7% 36,2%	32,5% 42,8%	30,5% 34,3%	rt-PCR ASU 18.00-22
Paranuss	Reiskekse	89,1 17,3 9,8	89,1 % 86,5 % 98 %	-	34,1% 36,2% 40,2%	34,4% 38,2% 41,8%	24,5% 28,4% 30,6%	rt-PCR ASU 18.00-21
Paranuss	Weizenkekse Soßenpulver	80,8 42,6	65,7 % 42,6 %	-	25,6% 27,5%	36,4% 39,7%	31,6% 34,6%	rt-PCR ASU 18.00-21
Paranuss	Reiskekse	96,6 14,2	96,6 % 71 %	-	16,8% 54,2%	31,8% 56,5%	29,5% 41,5%	rt-PCR multiplex ASU 18.00-22
Paranuss	Weizenkekse Soßenpulver	76,5 48,4	62,2 % 48,4 %	-	15,6% 34,4%	35,8% 37,5%	34,1% 28,5%	rt-PCR multiplex ASU 18.00-22
Soja	Weizenmehl Maismehl	107 145	107 % 145 %	63 % 34 %	- -	31 % 24 %	- -	rt-PCR ASU 16.01-9

Nachdruck, auch auszugsweise, nur mit schriftlicher Genehmigung von DLA-Ahrensburg

3.2.2 Werte aus Erkenntnissen

Anforderungen an die Leistungsfähigkeit der Analysenmethoden zur quantitativen Bestimmung von Allergenen in Lebensmitteln sind u.a. vom Ministry of Health and Welfare (MHLW) in Japan [23], von der Arbeitsgruppe 12 „Lebensmittelallergene" des Technischen Komitees CEN/TC 275 [20-22], von einer internationalen "Food Allergen Working Group" unter der Leitung der AOAC Presidential Task Force on Food Allergens [24] und vom Codex Alimentarius Commitee (CAC/GL 74-2010) [19] erarbeitet worden.

Die hier relevanten ELISA- bzw. PCR-Validierungskriterien der Gremien sind in den Tabellen 4 und 5 angegeben.

Tabelle 4: ELISA-Validierungskriterien

Literatur [19-25]	**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 5: PCR-Validierungskriterien

Literatur [19]	**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 i.d.R. eine relative Zielstandardabweichung σ_{pt} Wert von 25% und für die Wiederfindungsrate entsprechend 50-150% fest.

Nachdruck, auch auszugsweise, nur mit schriftlicher Genehmigung von DLA-Ahrensburg

4. Ergebnisse

Alle folgenden Tabellen sind anonymisiert. Den teilnehmenden Laboratorien wird mit dem Versand dieser Auswertung ihre individuelle Auswertenummer mitgeteilt.
Es erfolgte eine getrennte Auswertung von ELISA-, PCR- und LC/MS-Methoden.

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 abweichenden Angaben (z.B. als allergenes Lebensmittel) soweit möglich von DLA harmonisiert und in den Erdnuss-Gehalt umgerechnet.

In der vorliegenden LVU wurde ein Ergebnis als Erdnussprotein angegeben und mit dem experimentell bestimmten Proteingehalt der Rohstoffe für geröstete und ungeröstete Erdnüsse von 23% in das Gesamtlebensmittel Erdnuss umgerechnet (vgl. Tab. 1, S.5). Alle anderen ELISA- und PCR-Ergebnisse wurden als Erdnuss abgegeben, sodass keine Umrechnungen erforderlich waren.

Die qualitativen Ergebnisse und deren Bewertung werden in tabellarischer Form folgendermaßen aufgeführt:

Auswerte-nummer	Probe 1	Probe 2	Probe 3	Probe 4	Probe 5	Probe 6 „Null“	Score qualitativ	Methode	Hinweis
	pos/neg	pos/neg	pos/neg	pos/neg	pos/neg	pos/neg	Anzahl erfasster Proben 1 - 5		

Die quantitativen Ergebnisse und deren Bewertung werden in tabellarischer Form folgendermaßen aufgeführt:

Auswerte-nummer	Probe 1		Probe 2		Probe 3		Probe 4		Probe 5		WFR-Score	Methode	Hinweis
	Ergebnis	WFR *	Ergebnis	WFR *	Ergebnis	WFR *	Ergebnis	WFR *	Ergebnis	WFR *	WFR *		
	[mg/kg]	[%]	[mg/kg]	[%]	[mg/kg]	[%]	[mg/kg]	[%]	[mg/kg]	[%]	Anzahl im AB**		

* Wiederfindungsrate

Nachdruck, auch auszugsweise, nur mit schriftlicher Genehmigung von DLA-Ahrensburg

4.1 Vergleichsuntersuchung prozessierte Erdnussprodukte

4.1.1 Qualitative Scores: ELISA-Methoden

Auswerte-nummer	Probe 1 Erdnüsse geröstet	Probe 2 Erdnüsse ungeröstet	Probe 3 Erdnuss-butter	Probe 4 Erdnuss-paste	Probe 5 Erdnuss-Extrudat	Probe 6 „Null“	Score qualitativ	Methode	Hinweis
	pos/neg	pos/neg	pos/neg	pos/neg	pos/neg	pos/neg	Anzahl erfasster Proben 1 - 5		
1	positiv	positiv	positiv	positiv	positiv	negativ	5 (100%)	BF	
7b	positiv	positiv	positiv	positiv	positiv	negativ	5 (100%)	EF	
10	positiv	positiv	positiv	positiv	positiv	negativ	5 (100%)	IL	
7a	positiv	positiv	positiv	positiv	positiv	negativ	5 (100%)	MI	
2	positiv	positiv	positiv	positiv	positiv	negativ	5 (100%)	RS-F	
3	positiv	positiv	positiv	positiv	positiv	negativ	5 (100%)	RS-F	
5	positiv	positiv	positiv	positiv	positiv	negativ	5 (100%)	RS-F	
6	positiv	positiv	positiv	positiv	positiv	negativ	5 (100%)	RS-F	
9	positiv	positiv	positiv	positiv	positiv	negativ	5 (100%)	RS-F	
8	positiv	positiv	positiv	positiv	positiv	negativ	5 (100%)	VT	

	Probe 1	Probe 2	Probe 3	Probe 4	Probe 5	Probe 6
Anzahl positiv	10	10	10	10	10	0
Anzahl negativ	0	0	0	0	0	10
Prozent positiv	100	100	100	100	100	0
Prozent negativ	0	0	0	0	0	100
Konsenswert	positiv	positiv	positiv	positiv	positiv	negativ
Dotierung	positiv	positiv	positiv	positiv	positiv	negativ

Methoden:

BF = MonoTrace ELISA, BioFront Technologies

EF = Eurofins SensiSpec

IL = Immunolab

MI = Morinaga Institute ELISA

RS-F= Ridascreen® Fast, R-Biopharm

VT = Veratox, Neogen

Anmerkung:

Für alle prozessierten Produkte (Proben 1 bis 5) wurden mittels ELISA-Methoden Konsenswerte von 100% positiven Ergebnissen erhalten.

Nachdruck, auch auszugsweise, nur mit schriftlicher Genehmigung von DLA-Ahrensburg

4.1.2 Qualitative Scores: PCR-Methoden

Auswerte-nummer	Probe 1 Erdnüsse geröstet	Probe 2 Erdnüsse ungeröstet	Probe 3 Erdnuss-Butter	Probe 4 Erdnuss-Paste	Probe 5 Erdnuss-Extrudat	Probe 6 „Null“	Score qualitativ	Methode	Hinweis
	pos/neg	pos/neg	pos/neg	pos/neg	pos/neg	pos/neg	Anzahl erfasster Proben 1 - 5		
3	positiv	positiv	positiv	positiv	positiv	negativ	5 (100%)	SFA-ID	
4	positiv	positiv	positiv	positiv	positiv	positiv	5/6 (83%)	SFA-ID	„Null“-Probe w urde positiv bew ertet
9	positiv	positiv	positiv	positiv	positiv	negativ	5 (100%)	SFA-ID	
6	positiv	positiv	positiv	positiv	positiv	negativ	5 (100%)	SFA-Q	
5	positiv	positiv	positiv	negativ	negativ	negativ	3 (60%)	div	

	Probe 1	Probe 2	Probe 3	Probe 4	Probe 5	Probe 6
Anzahl positiv	5	5	5	4	4	1
Anzahl negativ	0	0	0	1	1	4
Prozent positiv	100	100	100	80	80	20
Prozent negativ	0	0	0	20	20	80
Konsenswert	positiv	positiv	positiv	positiv	positiv	negativ
Dotierung	positiv	positiv	positiv	positiv	positiv	negativ

Methoden:

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

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

div = keine genaue Angabe / andere Methode

Anmerkung:

Für die prozessierten Produkte der Proben 1 bis 3 wurden Konsenswerte von 100% positiven Ergebnissen erhalten. Für Probe 4 (Erdnusspaste) und Probe 5 (Erdnuss-Extrudat) wurde je ein negatives Ergebnis mit einer Hausmethode erhalten, der Konsenswert lag entsprechend bei 80% positiven Ergebnissen. Ein Teilnehmer bewertete die „Null“-Probe als positiv.

Nachdruck, auch auszugsweise, nur mit schriftlicher Genehmigung von DLA-Ahrensburg

4.1.4 Quantitativ: ELISA-Methoden Wiederfindungs-Scores (WFR-Scores)

Auswerte-nummer	Probe 1 Erdnüsse geröstet		Probe 2 Erdnüsse ungeröstet		Probe 3 Erdnussbutter		Probe 4 Erdnusspaste		Probe 5 Erdnuss-Extrudat		WFR-Score	Methode	Hinweis
	Ergebnis	WFR *	Ergebnis	WFR *	Ergebnis	WFR *	Ergebnis	WFR *	Ergebnis	WFR *	WFR *		
	[mg/kg]	[%]	[mg/kg]	[%]	[mg/kg]	[%]	[mg/kg]	[%]	[mg/kg]	[%]	Anzahl im AB**		
1	88,9	307	183	568	56,0	213	7,50	23	23,6	**73**	1/5 (20%)	BF	
7b	74,0	255	150	466	57,0	217	19,0	**58**	21,0	**65**	2/5 (40%)	EF	
10	59,2	204	98,0	304	44,5	169	14,4	44	14,6	45	0/5 (0%)	IL	
7a	10,4	36	13,2	41,0	7,60	29	3,20	10	6,40	20	0/5 (0%)	MI	
2	69,9	241	173	537,3	50,3	191	17,7	**54**	13,6	42	1/5 (20%)	RS-F	
3	79,0	272	160	496,9	48,0	183	19,0	**58**	18,0	**55**	2/5 (40%)	RS-F	
5	60,0	207	147	456,5	49,0	186	27,0	**83**	19,0	**58**	2/5 (40%)	RS-F	
6	465 (107)	(369)	782 (180)	(559)	217 (50,0)	(190)	117 (27,0)	(83)	65,2 (15,0)	(46)	0/5 (0%)	RS-F	Ergebnis umgerechnet ° (in Klammern Angabe als Erdnussprotein)
9	81,6	281	190	589,8	51,0	194	20,6	**63**	17,2	**53**	2/5 (40%)	RS-F	
8	78,0	269	158	490,7	63,0	240	20,0	**61**	22,0	**68**	2/5 (40%)	VT	

° Umrechnung S. 14

AB**	50-150 %	AB**	50-150 %	AB**	50-150 %	AB**	50-150 %	AB**	50-150 %
Anzahl im AB	**0**	Anzahl im AB	**0**	Anzahl im AB	**0**	Anzahl im AB	**6**	Anzahl im AB	**6**
Prozent im AB	**0**	Prozent im AB	**0**	Prozent im AB	**0**	Prozent im AB	**67**	Prozent im AB	**67**

* Wiederfindungsrate 100% Bezugsgröße: Erdnuss, s. Seite 6

** Akzeptanzbereich der AOAC für Allergen-ELISAs

Methoden:

BF = MonoTrace ELISA, BioFront Technologies

EF = Eurofins Sensispec

IL = Immunolab

MI = Morinaga Institute ELISA

RS-F= Ridascreen® Fast, R-Biopharm

VT = Veratox, Neogen

Anmerkung:

Für die Proben 1 (Erdnüsse, geröstet), 2 (Erdnüsse, ungeröstet) und 3 (Erdnussbutter) lag keine der Wiederfindungsraten der Teilnehmerergebnisse im Akzeptanzbereich von 50-150%. Es wurden deutlich höhere Werte erhalten, mit Ausnahme des Ergebnisses der Methode MI, hier lagen die Wiederfindungsraten unterhalb des Akzeptanzbereichs.

Für die Proben 4 (Erdnusspaste) und 5 (Erdnuss-Extrudat) lagen 67% der Wiederfindungsraten der Teilnehmerergebnisse im Akzeptanzbereich von 50-150%. Die übrigen Wiederfindungen lagen unterhalb von 50%.

Nachdruck, auch auszugsweise, nur mit schriftlicher Genehmigung von DLA-Ahrensburg

4.1.5 Quantitativ: PCR-Methoden Wiederfindungs-Scores (WFR-Scores)

Auswerte-nummer	Probe 1 Erdnüsse geröstet		Probe 2 Erdnüsse ungeröstet		Probe 3 Erdnuss-Butter		Probe 4 Erdnuss-Paste		Probe 5 Erdnuss-Extrudat		WFR-Score	Methode	Hinweis
	Ergebnis	WFR *	Ergebnis	WFR *	Ergebnis	WFR *	Ergebnis	WFR *	Ergebnis	WFR *	WFR *		
	[mg/kg]	[%]	[mg/kg]	[%]	[mg/kg]	[%]	[mg/kg]	[%]	[mg/kg]	[%]	Anzahl im AB**		
3	>1		>1		>1		>1		>1			SFA-ID	
4	120	414	40,0	**124**	12,0	46	1,00	3,1	5,80	18	1/5 (20%)	SFA-ID	Nullprobe positiv: 2,9 mg/kg
9												SFA-ID	
6	<4		<4		<4		<4		<4			SFA-Q	
5												div	
	AB**	50-150 %	AB**	50-150 %	AB**	50-150 %	AB**	50-150 %	AB**	50-150 %			
	Anzahl im AB	0	Anzahl im AB	1	Anzahl im AB	0	Anzahl im AB	0	Anzahl im AB	0			
	Prozent im AB	0	Prozent im AB	100	Prozent im AB	0	Prozent im AB	0	Prozent im AB	0			

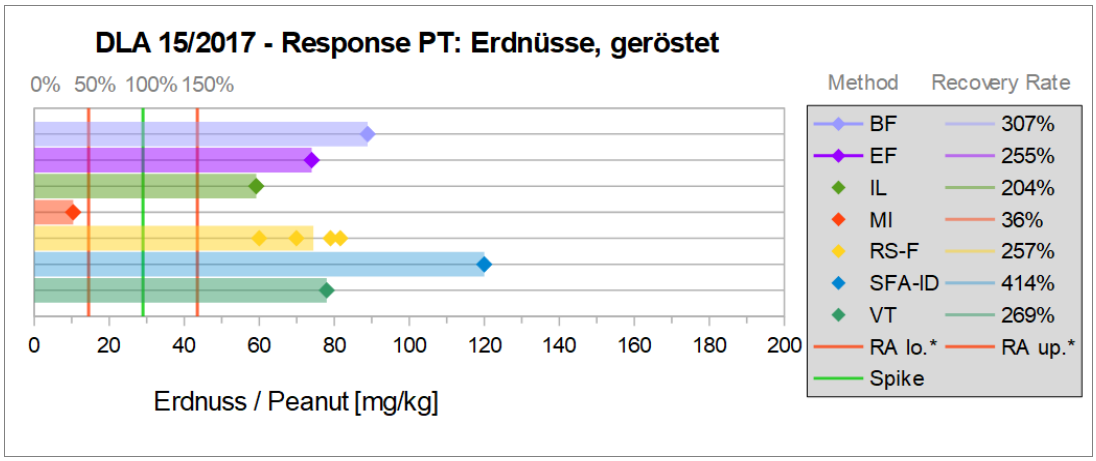
Methoden:
SFA-ID = Sure Food Allergen ID, R-Biopharm / Congen
SFA-Q = Sure Food Allergen Quant, R-Biopharm / Congen
div = keine genaue Angabe / andere Methode
div = not indicated / other method

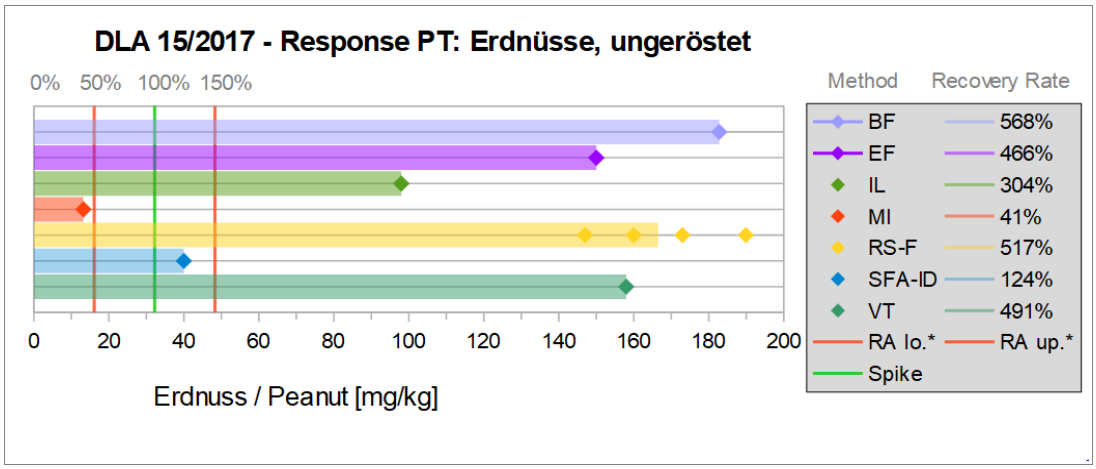
* Wiederfindungsrate 100% Bezugsgröße: Erdnuss, s. Seite 6

** Akzeptanzbereich der AOAC für Allergen-ELISAs

Anmerkung:
Nur ein Teilnehmer hat quantitative Ergebnisse mittels PCR-Methode angegeben. Dabei lag die Wiederfindungsrate für Probe 2 (Erdnüsse, ungeröstet) im Akzeptanzbereich von 50 – 150%.

Nachdruck, auch auszugsweise, nur mit schriftlicher Genehmigung von DLA-Ahrensburg





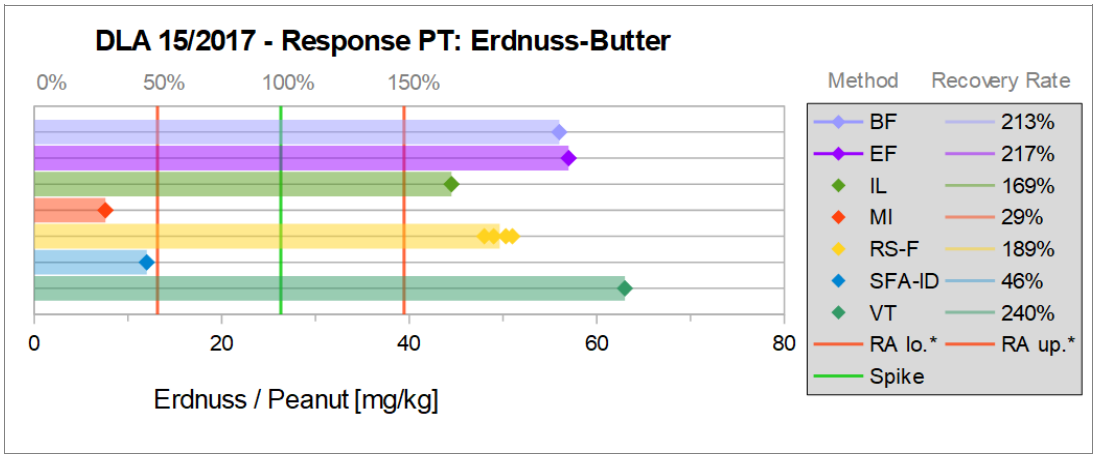
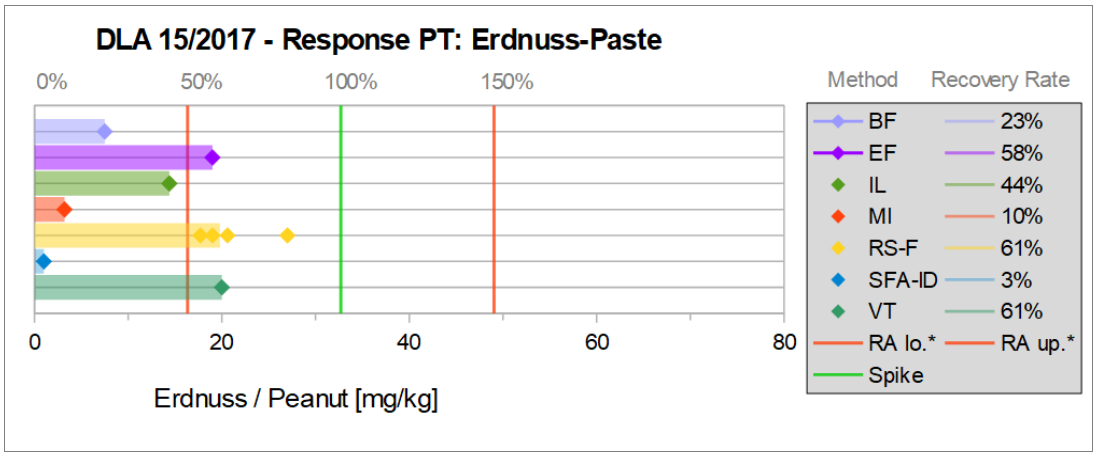


Abb./Fig. 1: Darstellung der Einzelergebnisse (Proben 1-3) getrennt nach Methoden mit Angabe der durchschnittlichen Wiederfindungsrate (Recovery Rate), untere Skala Erdnuss in mg/kg, obere Skala % Wiederfindungsrate in % mit * Akzeptanzbereich von 50% - 150% (* range of acceptance: RA lower limit bis RA upper limit)

Nachdruck, auch auszugsweise, nur mit schriftlicher Genehmigung von DLA-Ahrensburg



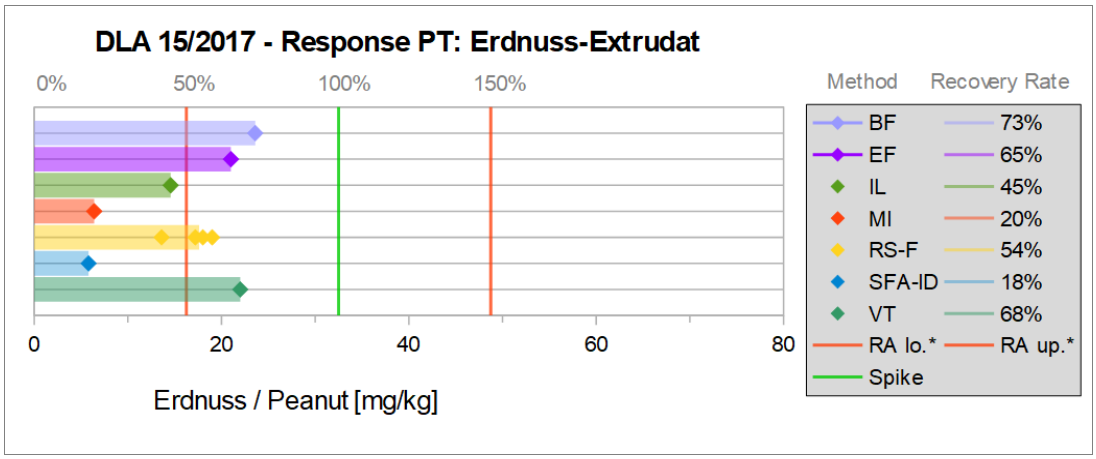


Abb./Fig. 2: Darstellung der Einzelergebnisse (Proben 4 und 5) getrennt nach Methoden mit Angabe der durchschnittlichen Wiederfindungsrate (Recovery Rate), untere Skala Erdnuss in mg/kg, obere Skala % Wiederfindungsrate in % mit * Akzeptanzbereich von 50% - 150% (* range of acceptance: RA lower limit bis RA upper limit)

Nachdruck, auch auszugsweise, nur mit schriftlicher Genehmigung von DLA-Ahrensburg

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-Methoden

Methode	Auswerte-nummer	Datum der Analyse	Ergebnis Probe 1		Ergebnis Probe 2		Ergebnis Probe 3		Ergebnis Probe 4		Ergebnis Probe 5		Ergebnis Probe 6		NWG / LOD	BG / LOQ	Angabe quantitatives Ergebnis als
		Tag/Monat	qualitativ	mg/kg	qualitativ	mg/kg	qualitativ	mg/kg	qualitativ	mg/kg	qualitativ	mg/kg	qualitativ	mg/kg	mg/kg	mg/kg	bevorzugt als Erdnuss
BF	1	26.01.18	positiv	88,9	positiv	182,8	positiv	56	positiv	7,5	positiv	23,6	negativ	0	0,24	1	Erdnuss
EF	7b	10.01.18	positiv	74	positiv	150	positiv	57	positiv	19	positiv	21	negativ	<1	0,1	1	Erdnuss
IL	10	05.12.17	positiv	59,2175	positiv	97,98	positiv	44,5075	positiv	14,397	positiv	14,57075	negativ	0	0,1	1	Erdnuss
MI	7a	13.12.17	positiv	10,4	positiv	13,2	positiv	7,6	positiv	3,2	positiv	6,4	negativ	<1,2	0,48	1,2	Erdnuss
RS-F	2	10.01.18	positiv	69,9	positiv	173	positiv	50,3	positiv	17,7	positiv	13,6	negativ	< 2,5	0,13	< 2,5	Erdnuss
RS-F	3	19.01.18	positiv	79	positiv	160	positiv	48	positiv	19	positiv	18	negativ	<1.5	1,5	2,5	Erdnuss
RS-F	5	12.12.17	positiv	60	positiv	147	positiv	49	positiv	27	positiv	19	negativ	<2,5	2,5		Erdnuss
RS-F	6	09.01.18	positiv	107	positiv	180	positiv	50	positiv	27	positiv	15	negativ	-	1,5	2,5	Erdnussprotein
RS-F	9		positiv	81,6	positiv	189,9	positiv	51	positiv	20,6	positiv	17,2	negativ		0,13	2,5	Erdnuss
VT	8	09.01.18	-	78	-	158	-	63	-	20	-	22	-	<2.5	2,5	2,5	Erdnuss

Nachdruck, auch auszugsweise, nur mit schriftlicher Genehmigung von DLA-Ahrensburg

Fortsetzung Angaben der TeilnUmrechnung für prozessie
ehmer: ELISA-Methoden

Methode	Auswerte-nummer	Methode	Spezifität	Gehalt Gesamt-Protein in Erdnuss (Gemäß Methodenvorschrift)	Umrechnung für prozessierte Erdnuss (Beispiel: Response für rohe oder geröstete Erdnüsse gemäß Methodenvorschrift)	Hinweise zur Methode (Extraktion und Bestimmung)	Methode akkreditiert nach ISO/IEC 17025	Sonstige Hinweise
		Test-Kit + Anbieter	Antikörper	%	Umrechnung von X in Y (Faktor oder %)	z.B. Extraktionslösung / Zeit / Temperatur	ja/nein	
BF	1	MonoTrace Peanut ELISA kit, BioFront Technologies	Ara h 3	N/A	N/A	Extraktion für 10min bei 60°C	Nein	
EF	7b	Eurofins SensiSpec Peanut ELISA Kit	Erdnussproteine	25		lt. Herstellerangaben	nein	
IL	10	Immunolab Peanut ELISA	polyklonal	25% (USDA Data)	-			
MI	7a	Peanut ELISA Kit-II, Morinaga	Erdnussproteine	25	3,4	lt. Herstellerangaben	ja	
RS-F	2	RIDASCREEN Fast Peanut (R6201), R-Biopharm				nach Herstelleranleitung , mit Magermilchpulver	ja	
RS-F	3	R6202 Ridascreen Fast Peanut						
RS-F	5	Ridascreen Fast Peanut (R6202), r-Biopharm				gemäß Handbuch ohne Magermilchpulver	ja	Referenzmaterial NIST SRM 2387 Erdnussbutter
RS-F	6	Ridascreen Fast Peanut (R6202), r-Biopharm					ja	
RS-F	9	Ridascreen Fast Peanut (R6202), r-Biopharm				Allergenextraktionspuffer / 10 min / 60°C	nein	
VT	8	Veratox Peanut, Neogen					Nein	

Nachdruck, auch auszugsweise, nur mit schriftlicher Genehmigung von DLA-Ahrensburg

5.1.2 PCR-Methoden

Methoden	Auswerte-nummer	Datum der Analyse	Ergebnis Probe 1		Ergebnis Probe 2		Ergebnis Probe 3		Ergebnis Probe 4		Ergebnis Probe 5		Ergebnis Probe 6		NWG / LOD	BG / LOQ	Angabe quantitatives Ergebnis als
			qualitativ	mg/kg	qualitativ	mg/kg	qualitativ	mg/kg	qualitativ	mg/kg	qualitativ	mg/kg	qualitativ	mg/kg	mg/kg	mg/kg	bevorzugt als Erdnuss
SFA-ID	3	19.01.18	positiv	>1	positiv	>1	positiv	>1	positiv	>1	positiv	>1	negativ	<1	1		Erdnuss - DNA
SFA-ID	4	16.01.18	positiv	120	positiv	40	positiv	12	positiv	1	positiv	5,8	positiv	2,9	< 1mg/kg		Erdnuss
SFA-ID	9		positiv		positiv		positiv		positiv		positiv		negativ		1		Erdnuss-DNA
SFA-Q	6	05.12.17	positiv	<4	positiv	<4	positiv	<4	positiv	<4	positiv	<4	negativ	-	1	4	Erdnuss
div	5	10.01.18	positiv		positiv		positiv		negativ		negativ		negativ				Erdnuss DNA

Methoden	Auswerte-nummer	Methode	Spezifität	Gehalt Gesamt-Protein in Erdnuss (Gemäß Methodenvorschrift)	Umrechnung für prozessierte Erdnuss (Beispiel: Response für rohe oder geröstete Erdnüsse gemäß Methodenvorschrift)	Hinweise zur Methode (Extraktion und Bestimmung)	Methode akkreditiert nach ISO/IEC 17025	Sonstige Hinweise
		Test-Kit + Anbieter	Target-Sequenz / -DNA			z.B. Extraktion / Enzyme / Clean-Up / Real Time PCR / Gelelektrophorese / Cyclen	ja/nein	
SFA-ID	3	SureFood® ALLERGEN Peanut Art.-No. S3103 Congen						
SFA-ID	4	Sure Food Allergen ID, R-Biopharm / Congen				CTAB / Qiaquick	ja	Quantifizierung durch Standardadditio n nach Eugster
SFA-ID	9	Sure Food Allergen ID, R-Biopharm / Congen					nein	
SFA-Q	6	Sure Food Allergen Quant, R-Biopharm / Congen				Sure Food ® Allergen Quant Peanut (S3202)	nein	
div	5	Auswahl PCR-Methoden	Ara h 2 L77197			ASU 44.00-11 (01/2013) als Multiplex / Extraktion von 2 g Material mit Maxwell	ja	NWG: 0,01 ng/µl DNA im PCR Ansatz

Nachdruck, auch auszugsweise, nur mit schriftlicher Genehmigung von DLA-Ahrensburg

5.2 Homogenität

5.2.1 Mischungshomogenität vor der Abfüllung

Microtracer Homogenitätstest
DLA 15-2017 Probe 1

Gewicht Gesamtprobe	1,00	kg
Microtracer	FSS-rot lake	
Teilchengröße	75 – 300	µm
Gewicht pro Partikel	2,0	µg
Tracerzugabe	40,5	mg/kg

Analysenergebnisse:

Probe	Einwaage [g]	Partikel Anzahl	Partikel [mg/kg]
1	5,09	102	40,1
2	5,07	103	40,6
3	5,10	110	43,1
4	5,05	119	47,1
5	5,02	116	46,2
6	5,03	123	48,9
7	4,99	114	45,7
8	5,03	113	44,9

Poisson-Verteilung		
Probenanzahl	8	
Freiheitsgrad	7	
Mittelwert	113	Partikel
Standardabweichung	7,82	Partikel
χ^2 (CHI-Quadrat)	3,80	
Wahrscheinlichkeit	**80**	%
Wiederfindungsrate	110	%

Normalverteilung		
Probenanzahl	8	
Mittelwert	44,6	mg/kg
Standardabweichung	3,10	mg/kg
rel. Standardabweichung	6,95	%
Horwitz Standardabweichung	9,03	%
HorRat-Wert	**0,77**	
Wiederfindungsrate	110	%

Microtracer Homogenitätstest
DLA 15-2017 Probe 2

Gewicht Gesamtprobe	1,00	kg
Microtracer	FSS-rot lake	
Teilchengröße	75 – 300	µm
Gewicht pro Partikel	2,0	µg
Tracerzugabe	31,4	mg/kg

Analysenergebnisse:

Probe	Einwaage [g]	Partikel Anzahl	Partikel [mg/kg]
1	5,00	72	28,8
2	4,97	73	29,4
3	4,98	81	32,5
4	5,06	77	30,4
5	4,96	76	30,6
6	4,94	85	34,4
7	5,03	74	29,4
8	5,03	70	27,8

Poisson-Verteilung		
Probenanzahl	8	
Freiheitsgrad	7	
Mittelwert	76,0	Partikel
Standardabweichung	5,33	Partikel
χ^2 (CHI-Quadrat)	2,61	
Wahrscheinlichkeit	**92**	%
Wiederfindungsrate	97	%

Normalverteilung		
Probenanzahl	8	
Mittelwert	30,4	mg/kg
Standardabweichung	2,13	mg/kg
rel. Standardabweichung	7,01	%
Horwitz Standardabweichung	9,57	%
HorRat-Wert	**0,73**	
Wiederfindungsrate	97	%

Nachdruck, auch auszugsweise, nur mit schriftlicher Genehmigung von DLA-Ahrensburg

Microtracer Homogenitätstest
DLA 15-2017 Probe 3

Gewicht Gesamtprobe	1,01	kg
Microtracer	FSS-rot lake	
Teilchengröße	75 – 300	µm
Gewicht pro Partikel	2,0	µg
Tracerzugabe	32,4	mg/kg

Analysenergebnisse:

Probe	Einwaage [g]	Partikel Anzahl	Partikel [mg/kg]
1	5,01	92	36,7
2	5,07	83	32,7
3	5,00	84	33,6
4	5,05	81	32,1
5	5,06	85	33,6
6	5,00	82	32,8
7	5,02	83	33,1
8	4,99	86	34,5

Poisson-Verteilung		
Probenanzahl	8	
Freiheitsgrad	7	
Mittelwert	84,5	Partikel
Standardabweichung	3,62	Partikel
χ^2 (CHI-Quadrat)	1,08	
Wahrscheinlichkeit	**99**	%
Wiederfindungsrate	104	%

Normalverteilung		
Probenanzahl	8	
Mittelwert	33,6	mg/kg
Standardabweichung	1,44	mg/kg
rel. Standardabweichung	4,28	%
Horwitz Standardabweichung	9,43	%
HorRat-Wert	**0,45**	
Wiederfindungsrate	104	%

Microtracer Homogenitätstest
DLA 15-2017 Probe 4

Gewicht Gesamtprobe	1,01	kg
Microtracer	FSS-rot lake	
Teilchengröße	75 – 300	µm
Gewicht pro Partikel	2,0	µg
Tracerzugabe	25,6	mg/kg

Analysenergebnisse:

Probe	Einwaage [g]	Partikel Anzahl	Partikel [mg/kg]
1	5,01	81	32,3
2	4,99	90	36,1
3	5,00	77	30,8
4	4,97	80	32,2
5	4,96	73	29,4
6	4,99	67	26,9
7	5,03	73	29,1
8	4,99	90	36,1

Poisson-Verteilung		
Probenanzahl	8	
Freiheitsgrad	7	
Mittelwert	78,9	Partikel
Standardabweichung	8,18	Partikel
χ^2 (CHI-Quadrat)	5,94	
Wahrscheinlichkeit	**55**	%
Wiederfindungsrate	123	%

Normalverteilung		
Probenanzahl	8	
Mittelwert	31,6	mg/kg
Standardabweichung	3,28	mg/kg
rel. Standardabweichung	10,4	%
Horwitz Standardabweichung	9,51	%
HorRat-Wert	**1,1**	
Wiederfindungsrate	123	%

Nachdruck, auch auszugsweise, nur mit schriftlicher Genehmigung von DLA-Ahrensburg

Microtracer Homogenitätstest
DLA 15-2017 Probe 5

Gewicht Gesamtprobe	1,01	kg
Microtracer	FSS-rot lake	
Teilchengröße	75 – 300	µm
Gewicht pro Partikel	2,0	µg
Tracerzugabe	37,2	mg/kg

Analysenergebnisse:

Probe	Einwaage [g]	Partikel Anzahl	Partikel [mg/kg]
1	4,97	113	45,5
2	4,99	101	40,5
3	4,99	111	44,5
4	5,05	123	48,7
5	5,06	108	42,7
6	5,07	118	46,5
7	5,06	101	39,9
8	5,06	119	47,0

Poisson-Verteilung		
Probenanzahl	8	
Freiheitsgrad	7	
Mittelwert	111,7	Partikel
Standardabweichung	7,94	Partikel
χ^2 (CHI-Quadrat)	3,95	
Wahrscheinlichkeit	**79**	%
Wiederfindungsrate	119	%

Normalverteilung		
Probenanzahl	8	
Mittelwert	44,4	mg/kg
Standardabweichung	3,15	mg/kg
rel. Standardabweichung	7,10	%
Horwitz Standardabweichung	9,04	%
HorRat-Wert	**0,79**	
Wiederfindungsrate	119	%

Nachdruck, auch auszugsweise, nur mit schriftlicher Genehmigung von DLA-Ahrensburg

5.3 Informationen zur Eignungsprüfung (EP)

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

EP-Nummer	***DLA 15-2017***
EP-Name	***Response PT Erdnuss: Prozessierte Proben Erdnuss (ungeröstet), Erdnuss (geröstet), Erdnussbutter, Erdnusspaste und Extrudat (Erdnuss-Flips)*** *in Kartoffelpulver-Matrix (Gehalte: 25 - 150 mg/kg)*
Probenmatrix	***Proben 1-6:*** *Trägermatrix / Zutaten: Kartoffelpulver (ca. 75%), Maltodextrin (ca. 25%) sowie weitere Zusatzstoffe und Allergene Lebensmittel (nur in Proben 1-5)*
Probenzahl und Probenmenge	*5 unterschiedliche Proben: je 20 g* *+ 1 „ Null-Probe“ : 20g*
Lagerungsinformation	*Proben 1-6: Raumtemperatur (Langzeit gekühlt 2 - 10 °C)*
Verwendungszweck	*Ausschließlich für Laboruntersuchungen (Qualitätskontrollproben)*
Parameter	*qualitativ + quantitativ: Erdnuss / Erdnussprotein* *aus Erdnuss (ungeröstet), Erdnuss (geröstet), Erdnussbutter, Erdnusspaste und Extrudat (Erdnuss-Flips) in Proben 1-5: ca. 25 - 150 mg/kg (als Gesamt-Erdnuss)*
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. Vorzugsweise ist die Gesamtmenge zu homogenisieren.*
Ergebnisangabe	*Es werden für jede Probe 1 - 6 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 26. Januar 2018***
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 Mischungshomogentität wird von DLA durchgeführt. Die Prüfung der Gehalte, Homogenität und Stabilität von EP-Parametern wird von DLA im Unterauftrag vergeben.*

Nachdruck, auch auszugsweise, nur mit schriftlicher Genehmigung von DLA-Ahrensburg

6. Verzeichnis der Teilnehmer in alphabetischer Reihenfolge

Teilnehmer / Participant	Ort / Town	Land / Country

[Die Adressdaten der Teilnehmer wurden für die allgemeine Veröffentlichung des Auswerte-Berichts nicht angegeben.]

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

Nachdruck, auch auszugsweise, nur mit schriftlicher Genehmigung von DLA-Ahrensburg

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 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 Anan-lytical 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. EN ISO/IEC 17034:2016; Konformitätsbewertung - Allgemeine Anforderungen an die Kompetenz von Referenzmaterialherstellern / General requirements for the competence of reference material producers
17. ISO Guide 35:2017; Reference materials - Guidance and characterization and assessment of homogeneity and stability
18. AOAC Official Methods of Analysis: Guidelines for Standard Method Performance Requirements, Appendix F, p. 2, AOAC Int (2016)
19. Codex Alimentarius Commission (2010) - Guidelines on performance criteria and validation of methods for detection, identification and quantification of specific DNA sequences and specific protiens in foods, CAC/GL 74-2010
20. 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

Nachdruck, auch auszugsweise, nur mit schriftlicher Genehmigung von DLA-Ahrensburg

21. 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
22. 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
23. Ministry of Health and Welfare, JSM, Japan 2006
24. 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)
25. 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)
26. 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)
27. 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
28. 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
29. 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
30. 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]
31. ASU §64 LFGB L 00.00-69 Bestimmung von Erdnuss-Kontaminationen in Lebensmitteln mittels ELISA im Mikrotiterplattensystem (2003) [Foodstuffs, determination of peanut contamintions in foodstuffs by ELISA in microtiterplates]
32. ASU §64 LFGB L 44.00-7 Bestimmung von Haselnuss-Kontaminationen in Schokolade und Schokoladenwaren mittels ELISA im Mikrotiterplattensystem (2006) [Foodstuffs, determination of hazelnut contamintions in chocolate and chocolate products by ELISA in microtiterplates]
33. ASU §64 LFGB L 16.01-9 Untersuchung von Lebenmitteln - Bestimmung von Soja (Glycine max) in Getreidemehl mittels real-time PCR (2016) [Foodstuffs, determination of soya (Glycine max) in cereal flour by real-time PCR]
34. ASU §64 LFGB L 18.00-20 Untersuchung von Lebenmitteln - 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]
35. ASU §64 LFGB L 18.00-21 Untersuchung von Lebenmitteln - Nachweis und Bestimmung von Paranuss (Bertholletia exceisa) in Reis- und Weizenkeksen sowe 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]
36. ASU §64 LFGB L 18.00-22 Untersuchung von Lebenmitteln - 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]

Nachdruck, auch auszugsweise, nur mit schriftlicher Genehmigung von DLA-Ahrensburg

DLA 15/2017 - Response PT: Erdnuss

Alle 10 Teilnehmer haben Ergebnisse eingereicht. Es wurden 6 LVU-Proben für den qualitativen Nachweis und die quantitative Bestimmung von Erdnuss (geröstet und ungeröstet), Erdnussbutter, Erdnusspaste und Erdnuss-Extrudat (Erdnussflips) in einer Trägermatrix sowie eine „Null"-Probe zur Verfügung gestellt. Die Teilnehmer-Ergebnisse wurden *qualitativ* mit einem Score von 1-5 bewertet, der angibt wie viele prozessierte Produkte erfolgreich erfasst wurden. Die quantitativen Ergebnisse wurden mit einem Wiederfindungs-Score *(WFR-Score)* bewertet, der angibt wie viele Ergebnisse im Bereich einer Wiederfindungsrate von 50 - 150% des Dotierungs-Levels liegen. Die Auswertung erfolgte getrennt nach ELISA- und PCR-Methoden. Details sind dem Auswertebericht zu entnehmen.
2 Teilnehmer hatten ihren Sitz im Europäischen Ausland (Schweiz, Italien) und 1 Teilnehmer außerhalb Europas (USA).

Nachdruck, auch auszugsweise, nur mit schriftlicher Genehmigung von DLA-Ahrensburg