

Proficiency Tests

DLA

food
cosmetics
consumer goods
www.dla-lvu.de

Auswertungs-Bericht

Laborvergleichsuntersuchung

DLA 17/2017

ALM Verification:

Gluten in Mais-Chips-Matrix

**5 Proben mit Weizenmehl
(Gluten-Gehalte: 2, 10, 20, 50 und 100 mg/kg)**

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

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 17/2017
<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 (27. Juli 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: 27. Juli 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.....	5
2.1 Untersuchungsmaterial.....	5
2.1.1 Charakterisierung der PT-Probenreihe.....	7
2.1.2 Homogenität.....	8
2.1.2 Stabilität.....	8
2.2 Probenversand und Informationen zur Untersuchung.....	9
2.3 Ergebnisübermittlung.....	9
3. Auswertung.....	10
3.1 Action Level Matrix Score (ALM-Score).....	11
3.2 Wiederfindungs-Score (WFR-Score).....	11
3.2.1 Wiederfindungsraten eines Versuchs zur Präzision	12
3.2.2 Werte aus Erkenntnissen	14
4. Ergebnisse.....	15
4.1 Vergleichsuntersuchung Gluten.....	16
4.1.1 Qualitativ: Action Level Matrix - Scores (ALM-Scores) .	16
4.1.2 Quantitativ: Wiederfindungs-Scores (WFR-Scores).....	17
5. Dokumentation.....	19
5.1 Angaben der Teilnehmer.....	19
5.1.1 Gluten.....	19
5.2 Homogenität.....	21
5.2.1 Mischungshomogenität vor der Abfüllung.....	21
5.3 Informationen zur Eignungsprüfung (EP).....	24
6. Verzeichnis der Teilnehmer in alphabetischer Reihenfolge.....	25
7. Verzeichnis relevanter Literatur.....	26

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].

Das vorliegende PT-Format „**Action Level Matrix - ALM Verification**“ bietet die Möglichkeit anhand einer Art Kalibrierreihe von 5 Proben eines Allergens in einer spezifischen Lebensmittelmatrix sowie einer „Nullprobe“ nachzuweisen, dass mit der analytischen Bestimmungsmethode des teilnehmenden Labors der für die Kennzeichnung des betreffenden Allergens relevante Gehalt sicher erfasst werden kann.

Dabei reichen die Allergen-Konzentrationen der PT-Probenreihe von 1/10 bis mindestens das 2-fache des Action Levels, der i.d.R. auf die Schwellenwertdosis (VITAL Konzept 2.0) bzw. Beurteilungswerte des ALTS/ALS zurückgeht (vgl. Tabelle 3). Die Auswertung der PT-Ergebnisse erfolgt qualitativ in Scores von 1-5 (Score 3 = Action Level erfolgreich erfasst). Quantitative Ergebnisse werden unter Angabe der erzielten Wiederfindungsrate informativ im Bericht angegeben.

2. Durchführung

2.1 Untersuchungsmaterial

Zur Untersuchung wurden 6 LVU-Proben für den qualitativen Nachweis und ggf. die quantitative Bestimmung von Gluten in der Lebensmittelmatrix Mais-Chips zur Verfügung gestellt. Die Gluten-Level der PT-Probenreihe lagen im Bereich von 2 mg/kg bis 100 mg/kg, der mittlere Wert stellt den „Action Level“ dar (s. Tabelle 1).

Bei der Lebensmittelmatrix des Untersuchungsmaterials handelt es sich um handelsübliche Mais-Chips (gekennzeichnet als glutenfrei). Die Grundzusammensetzung war für alle 6 Proben gleich (s. Tabelle 1).

Nach Zerkleinern und Sieben mittels Schlagmühle (mesh 3,0 mm) wurde die Grundmischung homogenisiert und ein Aliquot als Level „Null“-Probe abgenommen.

Zur Herstellung der glutenhaltigen Proben wurden zunächst Mais-Chips aus Maismehl unter Zusatz einer Weizenmehl-Mischung (weitere Angaben s.u.) gebacken (195°C, 15 min) und anschließend getrocknet (60°C, 3 h). Danach wurden die glutenhaltigen Mais-Chips mittels Zentrifugalmühle zerkleinert (mesh < 250 µm) und homogenisiert.

Anschließend wurde die Reihe der **dotierten Proben** folgendermaßen hergestellt: Nach Zerkleinerung und Homogenisierung wurden die glutenhaltigen gebackenen Mais-Chips zu einem Aliquot der Grundmatrix gegeben und die Mischung homogenisiert. Anschließend wurde portionsweise erneut Grundmatrix in 3-5 weiteren Schritten zugegeben und jeweils maschinell homogenisiert bis die Gesamtmenge erreicht war.

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

Zur Dotierung wurde eine Weizenmehl-Mischung aus insgesamt 21 Mehlen aus 12 Ländern (Deutschland, Frankreich, Italien, Kroatien, Österreich, Tschechien, UK, Russland, China, Indien, Thailand, USA) verwendet. Es handelt sich um handelsübliche Weichweizenmehle unterschiedlicher Ausmahlungsgrade. Die unprozessierte Weizenmehl-Mischung hat in den Dotierungsniveauproben der Eignungsprüfung DLA 03/2017 für Gluten mit der ELISA-Methode Ridascreen® Gliadin eine Wiederfindungsrate von 134 % ± 25 % (n=15) ergeben.

Tabelle 1: Zusammensetzung der DLA-Proben

PT-Probenreihe	Level 0 „Null“	Level 1 2 mg/kg	Level 2 10 mg/kg	Level 3 20 mg/kg	Level 4 50 mg/kg	Level 5 100 mg/kg
Zutaten	g/100 g	g/100g	g/100g	g/100g	g/100g	g/100g
Bio-Mais-Chips, glutenfrei Zutaten: Maismehl (77%), Sonnenblumenöl, Salz Nährwertangaben pro 100 g: Protein 6,7 g, Kohlenhydrate 63 g, Fett 22 g, Salz 0,8 g	100	100	100	99,9	99,8	99,5
Mais-Chips (gebacken 195°C, 15 min) Zutaten: Maismehl, Weizen- mehlmischung (25% i.Tr.), Wasser	-	0,0100	0,0500	0,100	0,249	0,498
Allergen-Gehalte	mg/kg	mg/kg	mg/kg	mg/kg	mg/kg	mg/kg
davon Weizen:	-					
- Weizenmehl*		25,1	126	251	623	1245
- mit 10% Gesamtprotein**		2,54	12,7	25,4	62,3	126
- davon Gluten ***	-	2,21	11,0	22,1	54,5	109
erweiterte kombinierte Unsicherheit (k=2) des Gluten- Gehalts (= ± 12 %)		± 0,26	± 1,3	± 2,6	± 6,5	± 13

*Allergen-Gehalte als „Lebensmittel“ wie in Spalte „Zutaten“ angegeben gemäß gravimetrischer Mischung

** Proteingehalt gemäß Laboranalyse des Rohstoffs: 10,1 ± 0,17 %, n=5 (Gesamtstickstoff nach Kjeldahl mit F=5,7 für Weizenprotein)

*** Proteingehalte gemäß Literaturangaben berechnet (ca. 8,7% Gluten in Weizenmehlen [39, 40, 41])

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

Jeder zugewiesene Wert, hier die dotierten Allergen-Gehalte, sind mit einer Standardunsicherheit behaftet. Als Unsicherheiten wurden u.a. folgende Faktoren berücksichtigt: Proteingehalt des Dotierungsmaterials, Glutengehalt in Weichweizensorten, Mischungshomogenität, Homogenität und Stabilität von Gluten.

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 - 18].

2.1.1 Charakterisierung der PT-Probenreihe

Die PT-Probenreihe wurde mittels ELISA-Bestimmung charakterisiert (Immunolab Gliadin/Gluten ELISA, n=3). Alle 5 dotierten Level wurden mit sehr guter Korrelation zwischen Dotierung (Spiking) und Mittelwert der Ergebnisse (Mean) erfasst (s. Abb. 1). Die relativen Standardabweichungen (RSD) lagen im Bereich von ca. 30% bis 4,4% und die Wiederfindungsraten (Recovery) bei 76% bis 86%.

Tabelle 2: Charakterisierung der PT-Probenreihe Gluten in Mais-Chips mittels ELISA-Bestimmung (Immunolab Gliadin/Gluten, n=3)

PT-Sample	Level 0	Level 1	Level 2	Level 3	Level 4	Level 5
	[mg/kg]	[mg/kg]	[mg/kg]	[mg/kg]	[mg/kg]	[mg/kg]
Spiking	0,0	2,2	11	22	55	109
Result 1	0,0	2,35	6,45	18,5	49,7	93,1
Result 2	0,0	1,58	9,17	19,9	43,2	92,2
Result 3	0,0	1,29	9,47	17,8	49,6	99,8
Mean	0,0	1,74	8,36	18,7	47,5	95,1
SD	-	0,55	1,66	1,08	3,71	4,16
RSD [%]	-	31,5	19,9	5,7	7,8	4,4
Recovery [%]	-	79,1	76,0	85,1	86,4	86,4

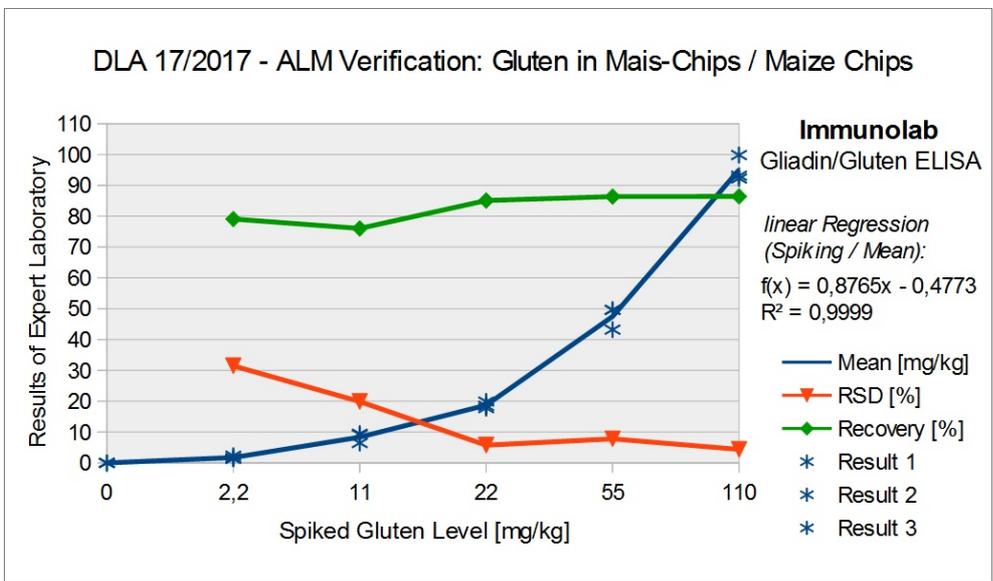


Abb./Fig. 1: Darstellung der ELISA-Ergebnisse der PT-Probenreihe Gluten in Mais-Chips (Immunolab Gliadin/Gluten, n=3), Anmerkung: die x-Achse ist zur besseren Erkennbarkeit der niedrigen Gehalte nicht linear dargestellt.

2.1.2 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 $\geq 5\%$ ist gleichzusetzen mit einer guten homogenen Mischung und von $\geq 25\%$ mit einer exzellenten Mischung [14, 15]. Die Microtracer-Analyse der vorliegenden LVU-Proben Level 1 bis 5 hat eine Wahrscheinlichkeit von 40%, 94%, 97%, 90% bzw. 91% ergeben. Die Partikel-Ergebnisse wurden zusätzlich in Konzentrationen umgerechnet, statistisch als Normalverteilung ausgewertet und mit der Standardabweichung nach Horwitz verglichen. Es wurden HorRat-Werte von 1,3, 0,68, 0,68, 0,75 bzw. 1,0 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 Gluten. Die Stabilität des Probenmaterials war somit während des Untersuchungszeitraums unter den angegebenen Lagerbedingungen gewährleistet.

2.2 Probenversand und Informationen zur Untersuchung

An jeden Teilnehmer wurden in der 13. Kalenderwoche 2017 je eine Portion der Untersuchungsmaterialien Sample 1 bis 6 verschickt. Die Untersuchungsverfahren wurden freigestellt. Die Untersuchungen waren durchzuführen bis spätestens 12. Mai 2017.

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

Die Eignungsprüfung Action Level Matrix (ALM) - Verification umfasst fünf unterschiedliche Proben mit definierten Gehalten an Gluten aus Weizenmehl sowie eine „Nullprobe“ in der Matrix Mais-Chips.

- *Die 6 Proben sind in zufälliger Reihenfolge nummeriert.*
- *Es soll qualitativ mit einer geeigneten Methode nachgewiesen werden, dass der sogenannte „Action Level“ von 20 mg/kg Gluten erfasst werden kann (= Action Level 1 (VITAL Konzept 2.0) bzw. Beurteilungswert des ALTS/ALS).*
- *Soweit möglich ist die Angabe quantitativer Ergebnisse erwünscht, um einen Vergleich zu den Zusatzniveaus darstellen zu können.*

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.

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 10 Teilnehmer haben Ergebnisse abgegeben. 2 Teilnehmer haben verspätet Ergebnisse eingereicht.

3. Auswertung

Verschiedene ELISA-Methoden zur quantitativen Bestimmung von Allergenen in Lebensmitteln können verschiedene Antikörper-Spezifitäten aufweisen, mit unterschiedlichem Referenzmaterial kalibriert worden sein und sich unterschiedlicher Extraktionsverfahren bedienen. Die verschiedenen ELISA-Methoden können daher zu einer unterschiedlichen Bewertung des Gehalts eines Analyten führen [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 wurde die allergene Zutat in einer speziell prozessierten Lebensmatrix in einer Art Kalibrierreihe mit Konzentrationen um den sogenannten Action Level herum zur Analyse zur Verfügung gestellt. Der hier als „Action Level“ bezeichnete Allergengehalt ist in Tabelle 3 farbig unterlegt.

Die Teilnehmer-Ergebnisse werden *qualitativ* mit einem Action Level Matrix Score (*ALM-Score*) bewertet, der angibt wie viele Konzentrations-Level 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.

Tabelle 3: Schwellenwerte, Beurteilungswerte und gesetzliche Höchstwerte (farbig unterlegt: Action Level in der vorliegenden LVU) [27, 42-44]

Allergen	Schwellenwert-dosis * (Vital Konzept 2.0)	Beurteilungswert ALTS/ALS	Gesetzliche Höchstwerte zur Kennzeichnung
	mg/kg	mg/kg	mg/kg
Gluten	100	> 80	20 **
Ei (als Volleipulver)	0,66	> 1	
Erdnuss	8	> 5	
Soja (als Sojamehl)	25	> 20	
Milch (als ent fettetes Milchpulver)	2,8	> 2,5	
Haselnuss	6,4	> 5	
Cashew	106	> 50	
Mandel, Walnuss, Pekannuss, Paranuss, Pistazie, Macadamia	-	> 20	
Sesam, ungeschält	11,8	> 10	
Lupine	100	> 50	
Selleriesaat	-	> 20	
Senfsaat	1,9	> 5	

* berechnet aus Schwellenwert bei Verzehr von 100 g Lebensmittel [42, 43, 44]

** Höchstwert zur Kennzeichnung als „glutenfrei“ gemäß EU-VO 828/2014 [39]

3.1 Action Level Matrix Score (ALM-Score)

Die qualitative Bewertung der Ergebnisse jedes Teilnehmers erfolgt mit sogenannten ALM-Scores von 1 - 5 anhand der Anzahl der Übereinstimmungen der Angaben „positiv“ oder „negativ“ mit den **Dotierungen der LVU-Probenreihe** (siehe Tab. 4). Ein ALM-Score von > 3 bedeutet, dass der Action Level erfolgreich erfasst wurde.

Die Ergebnisse der Matrixprobe Level 0 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 4: Bewertung der Ergebnisse anhand von ALM-Scores

Level 0 „Null“	Level 1 2 mg/kg	Level 2 10 mg/kg	Level 3 (Action Level) 20 mg/kg	Level 4 50 mg/kg	Level 5 100 mg/kg	ALM-Score qualitativ	Bestimmung Action Level
pos/neg	pos/neg	pos/neg	pos/neg	pos/neg	pos/neg	Anzahl erfasster Level 1 - 5	
negativ	negativ	negativ	negativ	negativ	positiv	1 (20%)	nicht erfolgreich
negativ	negativ	negativ	negativ	positiv	positiv	2 (40%)	nicht erfolgreich
negativ	negativ	negativ	positiv	positiv	positiv	3 (60%)	erfolgreich
negativ	negativ	positiv	positiv	positiv	positiv	4 (80%)	erfolgreich
negativ	positiv	positiv	positiv	positiv	positiv	5 (100%)	erfolgreich

3.2 Wiederfindungs-Score (WFR-Score)

Die Bewertung der quantitativen Ergebnisse jedes Teilnehmers für die **dotierten LVU-Proben** erfolgt anhand der Anzahl von Wiederfindungsraten 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 zugesetzte Allergen (Zusatzniveau) berechnet. Die Bezugswerte ergeben sich aus den unter 2.1 Untersuchungsmaterial in Tabelle 1 angegebenen Gehalten der Level 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 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 Matrix- und/oder Prozessierungseinflüssen.

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 11 - 145% für die PCR-Methoden erhalten (s. Tab. 5a und 5b). Die angegebenen Zielstandardabweichungen σ_{pt} wurden für eine Anzahl von $m = 2$ Wiederholmessungen berechnet.

Tabelle 5a: ELISA-Methoden - Wiederfindungsraten und Präzisionsdaten ausgewählter Auswertungen von Versuchen zur Präzision [31-32]

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

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 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 [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%.

Tabelle 5b: PCR-Methoden - Relative Wiederholstandardabweichungen (RSD_r) und relative Vergleichsstandardabweichungen (RSD_R) gemäß ausgewählter Auswertungen von Versuchen zur Präzision und die resultierende Zielstandardabweichung σ_{pt} [33-38]

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
Sesam	Reiskekse	94,6 15,7 9,8	95 % 79 % 98 %	-	22,5% 26,0% 20,9%	27,5% 39,5% 33,5%	22,4% 35,0% 30,0%	rt-PCR ASU 18.00-19
Sesam	Weizenkekse Soßenpulver	96,9 59,8	79 % 60 %	-	21,8% 22,2%	33,0% 43,2%	29,2% 40,2%	rt-PCR ASU 18.00-19
Sesam	Reiskekse	88,9 17,8 9,8	89 % 89 % 98 %	-	18,2% 34,2% 26,2%	30,5% 37,8% 37,0%	27,7% 29,1% 32,0%	rt-PCR ASU 18.00-22
Sesam	Weizenkekse Soßenpulver	115 58,5	93 % 59 %	-	16,7% 30,8%	41,1% 44,4%	39,4% 38,7%	rt-PCR ASU 18.00-22
Soja	Weizenmehl Maismehl	107 145	107 % 145 %	63 % 34 %	- -	31 % 24 %	- -	rt-PCR ASU 16.01-9
Weizen + Roggen	Brühwurst (100°C, 60 min)	96,1	120 %	-	21,3%	35,4%	32,0%	rt-PCR ASU 08.00-66
Weizen + Roggen	Wurst, autoklaviert	74,9	11,0 %	-	24,6%	32,7%	27,7%	rt-PCR ASU 08.00-66

3.2.2 Werte aus Erkenntnissen

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 [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 Committee (CAC/GL 74-2010) [19] erarbeitet worden.

Die hier relevanten ELISA- bzw. PCR-Validierungskriterien der Gremien sind in den Tabellen 6 und 7 angegeben.

Tabelle 6: 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 7: 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.

4. Ergebnisse

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

Es erfolgte eine gemeinsame Auswertung von ELISA und PCR-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 unterschiedlichen Angaben (z.B. als Protein oder allergenes Lebensmittel) soweit möglich von DLA harmonisiert.

In der vorliegenden LVU wurden alle Ergebnisse als Gluten abgegeben, so dass keine Umrechnungen erforderlich waren.

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

Auswertenummer	Level 0	Level 1	Level 2	Level 3 (Action Level)	Level 4	Level 5	ALM-Score qualitativ	Methode	Hinweis
	„Null“	2 mg/kg	10 mg/kg	20 mg/kg	50 mg/kg	100 mg/kg			
	pos/neg	pos/neg	pos/neg	pos/neg	pos/neg	pos/neg	Anzahl erfasster Level 1 - 5		

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

Auswertenummer	Level 1 - 2 mg/kg		Level 2 - 10 mg/kg		Level 3 - 20 mg/kg (Action Level)		Level 4 - 50 mg/kg		Level 5 - 100 mg/kg		WFR-Score	Methode	Hinweis
	Ergebnis	WFR *	Ergebnis	WFR *	Ergebnis	WFR *	Ergebnis	WFR *	Ergebnis	WFR *			
	[mg/kg]	[%]	[mg/kg]	[%]	[mg/kg]	[%]	[mg/kg]	[%]	[mg/kg]	[%]	Anzahl im AB**		

4.1 Vergleichsuntersuchung Gluten

4.1.1 Qualitativ: Action Level Matrix - Scores (ALM-Scores)

Auswertenummer	Level 0	Level 1	Level 2	Level 3 (Action Level)	Level 4	Level 5	ALM-Score qualitativ	Methode	Hinweis
	„Null“	2 mg/kg	10 mg/kg	20 mg/kg	50 mg/kg	100 mg/kg			
	pos/neg	pos/neg	pos/neg	pos/neg	pos/neg	pos/neg	Anzahl erfasster Level 1 - 5		
2a	negativ	positiv	positiv	positiv	positiv	positiv	5 (100%)	AQ	
5	negativ	positiv	positiv	positiv	positiv	positiv	5 (100%)	IL	Mittelwert aus 3 Bestimmungen
1	negativ	negativ	positiv	positiv	positiv	positiv	4 (80%)	RS	
2b	negativ	positiv	positiv	positiv	positiv	positiv	5 (100%)	RS	
3	negativ	negativ	positiv	positiv	positiv	positiv	4 (80%)	RS	
4	positiv	positiv	positiv	positiv	positiv	positiv	5 (100%)	RS	Level 0 und 1: < 5 mg/kg
6	negativ	positiv	positiv	positiv	positiv	positiv	5 (100%)	RS	
7	negativ	negativ	positiv	positiv	positiv	positiv	4 (80%)	RS	
8	negativ	positiv	positiv	positiv	positiv	positiv	5 (100%)	RS-F	
9	positiv	positiv	positiv	positiv	positiv	positiv	5 (100%)	VT	Nullprobe: 0,48 mg/kg
10a	negativ	positiv	positiv	positiv	positiv	positiv	5 (100%)	VT	
10b	negativ	positiv	positiv	positiv	positiv	positiv	5 (100%)	div	PCR-Methode

	Level 0	Level 1	Level 2	Level 3	Level 4	Level 5
Anzahl positiv	2	9	12	12	12	12
Anzahl negativ	10	3	0	0	0	0
Prozent positiv	17	75	100	100	100	100
Prozent negativ	83	25	0	0	0	0
Konsenswert	negativ	positiv	positiv	positiv	positiv	positiv
Dotierung	negativ	positiv	positiv	positiv	positiv	positiv

Methoden:

AQ = AgraQuant, RomerLabs

IL = Immunolab

RS = Ridascree®, R-Biopharm

RS-F= Ridascree® Fast, R-Biopharm

VT = Veratox R5, Neogen

div = keine genaue Angabe / andere Methode

Anmerkung:

Alle Teilnehmer haben Level 2 und somit die Hälfte des Glutengehalts des Action Levels in der prozessierten Matrix Mais-Chips erfolgreich erfasst. Der niedrigste Gehalt von 2 mg/kg (1/10 des Action Levels) wurde noch von 75% der Teilnehmer nachgewiesen. Dieser Wert liegt im Bereich oder unter der Bestimmungsgrenzen der Methoden.

4.1.2 Quantitativ: Wiederfindungs-Scores (WFR-Scores)

Auswertenummer	Level 1 - 2 mg/kg		Level 2 - 10 mg/kg		Level 3 - 20 mg/kg (Action Level)		Level 4 - 50 mg/kg		Level 5 - 100 mg/kg		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**		
2a	4,80	217	10,0	91	38,0	172	120	220	240	220	1/5 (20%)	AQ	
5	1,74	79	8,36	76	18,7	85	47,5	87	95,1	87	5/5 (100%)	IL	Mittelwerte aus 3 Bestimmungen
1	<5		15,0	136	23,0	104	70,0	128	160	147	4/4 (100%)	RS	
2b	4,40	199	17,0	155	30,0	136	78,0	143	160	147	3/5 (60%)	RS	
3	< 5		15,9	145	28,2	128	98,1	180	151	139	3/5 (60%)	RS	
4	< 5		16,5	150	40,3	182	70,5	129	179	164	2/4 (50%)	RS	
6	3,76	170	14,5	132	29,4	133	89,3	164	180	165	2/5 (40%)	RS	
7	<3		17,0	155	37,0	167	118	217	268	246	0/4 (0%)	RS	
8	5,30	240	12,5	114	33,0	149	61,0	112	199	183	3/5 (60%)	RS-F	
9	6,09	276	13,7	125	25,9	117	57,6	106	108	99	4/5 (80%)	VT	
10a	<5		22,0	200	40,0	181	90,0	165	196	180	0/4 (0%)	VT	
10b	2,80	127	15,0	136	23,0	104	54,0	99	100	92	5/5 (100%)	div	PCR-Methode

AB**	50-150 %								
Anzahl im AB	2	Anzahl im AB	9	Anzahl im AB	8	Anzahl im AB	7	Anzahl im AB	6
Prozent im AB	29	Prozent im AB	75	Prozent im AB	67	Prozent im AB	58	Prozent im AB	50

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

** Akzeptanzbereich der AOAC für Allergen-ELISAs

Methoden:

AQ = AgraQuant, RomerLabs

IL = Immunolab

RS = Ridascreen®, R-Biopharm

RS-F= Ridascreen® Fast, R-Biopharm

VT = Veratox R5, Neogen

div = keine genaue Angabe / andere Methode

Anmerkung:

Für die Level 2 bis 5 lagen 50% bis 75% der Wiederfindungsraten der Teilnehmerergebnisse im Akzeptanzbereich von 50-150%.

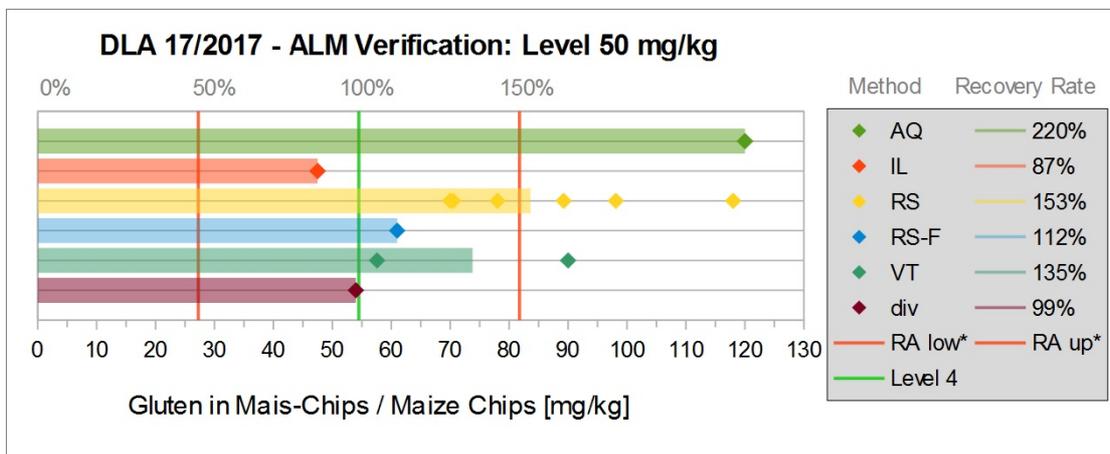
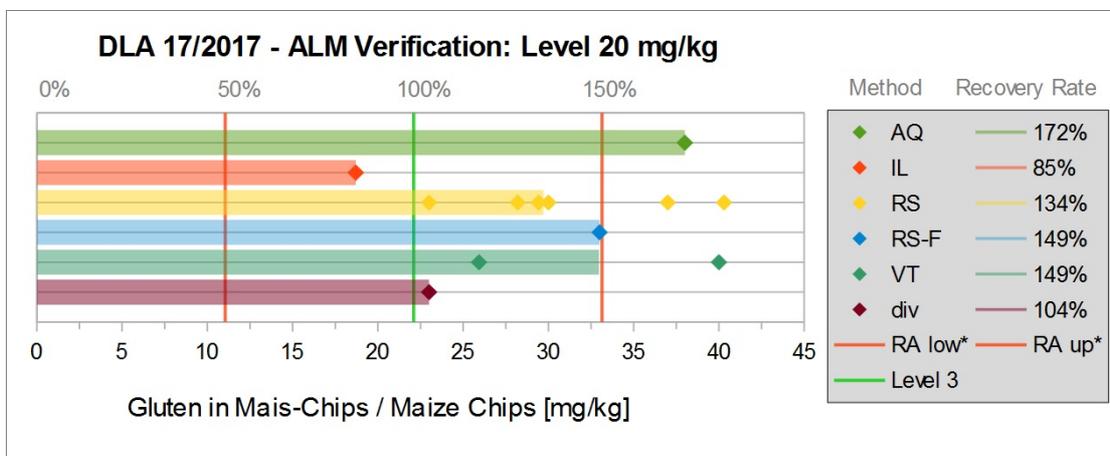
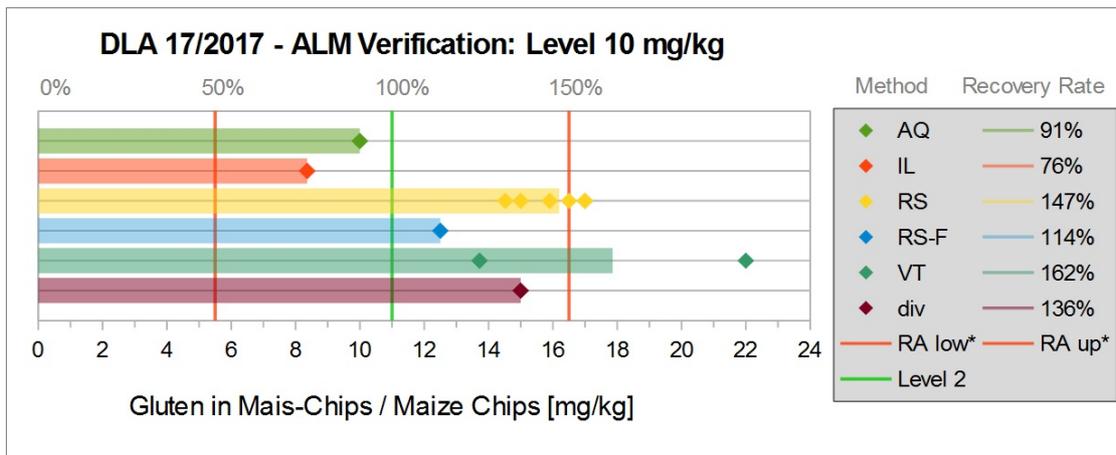


Abb./Fig. 2: Darstellung der Einzelergebnisse (Level 2-4) getrennt nach Methoden mit Angabe der durchschnittlichen Wiederfindungsrate (Recovery Rate), untere Skala Glutengehalt in mg/kg, obere Skala % Wiederfindungsrate in % mit * Akzeptanzbereich von 50% - 150% (* range of acceptance: RA lower limit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

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 Gluten

Meth. Abk.	Auswertenummer	Datum der Analyse	Ergebnis Probe 6 Nullprobe		Ergebnis Probe 1 2 mg/kg Level		Ergebnis Probe 4 10 mg/kg Level		Ergebnis Probe 2 20 mg/kg Level		Ergebnis Probe 5 50 mg/kg Level		Ergebnis Probe 3 100 mg/kg Level		NWG / LOD *	BG / LOQ *	Angabe als
			qualitativ	mg/kg	qualitativ	mg/kg	qualitativ	mg/kg	qualitativ	mg/kg	qualitativ	mg/kg	qualitativ	mg/kg	mg/kg	mg/kg	
AQ	2a	03.05.17	negativ	< 4	positiv	4,8	positiv	10	positiv	38	positiv	120	positiv	240	2	4	Gluten
IL	5	04.03.17	negativ	0	positiv	1,74	positiv	8,36	positiv	18,7	positiv	47,5	positiv	95,1	0,6	4	Gluten
RS	1	13.4.	negativ	<5	negativ	<5	positiv	15	positiv	23	positiv	70	positiv	160	3	5	Gluten
RS	2b	03.05.17	negativ	< 5	positiv	4,4	positiv	17	positiv	30	positiv	78	positiv	160	1	5	Gluten
RS	3	27./28.04.	negativ	< 5	negativ	< 5	positiv	15,9	positiv	28,2	positiv	98,1	positiv	151,4	5	5	Gluten
RS	4	20.04.17	positiv	< 5	positiv	< 5	positiv	16,5	positiv	40,3	positiv	70,5	positiv	179,3	1	5	Gluten
RS	6a	19.04.17	negativ		positiv		positiv		positiv		positiv		positiv		1	5	Gluten
RS	6b	19.04.17	-	< LOD	-	3,76	-	14,52	-	29,42	-	89,25	-	179,75	1	5	Gluten
RS	7	11.05.17	negativ	<3	negativ	<3	positiv	17	positiv	37	positiv	118	positiv	268	3	5	Gluten
RS-F	8	10.05.17	negativ		positiv	5,3	positiv	12,5	positiv	33	positiv	61	positiv	199	3	5	Gluten
VT	9	19.04.	-	0,48	-	6,09	-	13,72	-	25,93	-	57,58	-	107,71			Gluten
VT	10a	19.4./15.5.17	negativ	<2	positiv	<5	positiv	22	positiv	40	positiv	90	positiv	196	2	5	Gluten
div	10b	10.05.17	negativ	<2	positiv	2,8	positiv	15	positiv	23	positiv	54	positiv	100	2	2	Gluten

Fortsetzung Angaben der Teilnehmer:

Meth. Abk.	Auswertenummer	Methode	Spezifität	Hinweise zur Methode (Extraktion und Bestimmung)	Methode akkreditiert	Sonstige Hinweise
		Test-Kit + Anbieter	Antikörper	z.B. Extraktionslösung / Zeit / Temperatur	ja/nein	
AQ	2a	AgraQuant ELISA Gluten G12 COKAL0200, RomerLabs		nach Herstelleranleitung	nein	
IL	5	Immunolab Gliadin/Gluten ELISA	polyklonal	Jede Probe wurde [...] 3x extrahiert und die Extrakte jeweils in Doppelbestimmung mit einer aktuellen Charge (GLI-143) des Immunolab Gliadin ELISA bestimmt. Die Ergebnisse sind bereits in Gluten umgerechnet. Die Rohdaten (c=Gliadin) liegen bei.		Mittelwert aus 3 Bestimmungen
RS	1	Ridascreen® Gliadin R7001, R-Biopharm	R5 Mendez, erkennt Prolamine aus Weizen/Roggen/ Gerste	lt. Herstellerangaben (Cocktailaufarbeitung)	ja	von Kithersteller angegebene NWG von 1 ppm konnten wir nicht bestätigen, daher geben wir 3 ppm als NWG an; Ergebnis Probe 1: <5ppm, Spuren im Bereich der NWG detektierbar; Ergebnis Probe 6: <3ppm
RS	2b	Ridascreen® Gliadin R7001, R-Biopharm		nach Herstelleranleitung mit Cocktaillösung R7016	ja	Standard 2 (5ppb) 2x 1:2 verdünnt, um Konzentration 2 mg/kg erfassen zu können!
RS	3	Ridascreen® Gliadin R7001, R-Biopharm	R5	nach Arbeitsanleitung	ja	
RS	4	Ridascreen® Gliadin R7001, R-Biopharm	R5	Cocktail (R7006/R7016) entsprechend Anleitung	nein	
RS	6a	Ridascreen® Gliadin R7001, R-Biopharm	R5-Antikörper	Cocktail patented, offizielle R5-Mendez-Methode	nein	siehe separate E-Mail*
RS	6b	Ridascreen® Gliadin R7001, R-Biopharm	R5-Antikörper	Cocktail patented, offizielle R5-Mendez-Methode	nein	siehe separate E-Mail*
RS	7	Ridascreen® Gliadin R7001, R-Biopharm			yes	
RS-F	8	Ridascreen® FAST Gliadin R7002, R-Biopharm	R5	nach Testkitanleitung	ja	
VT	9	Veratox Gliadin R5, Neogen				
VT	10a	Veratox Gliadin R5, Neogen	Gliadin R5	gemäss Veratox Gliadin R5, Neogen	ja	
div	10b	eigene PCR-Methode	gamma-Gliadin aus Weizen	NucleoSpin Food (Macherey-Nagel) / Real Time PCR	qualitativer Nachweis	Analyt Weizen-DNA

* die E-Mail enthält Fragen zum Probenmaterial, die betreffenden Angaben sind in dem vorliegenden Auswertebereich enthalten

5.2 Homogenität

5.2.1 Mischungshomogenität vor der Abfüllung

Microtracer Homogenitätstest

DLA 17-2017 Probe 2 mg/kg

Gewicht Gesamtprobe	0,74	kg
Microtracer	FSS-rot lake	
Teilchengröße	75 – 300	µm
Gewicht pro Partikel	2,0	µg
Tracerzugabe	29,3	mg/kg

Analysenergebnisse:

Probe	Einwaage [g]	Partikel Anzahl	Partikel [mg/kg]
1	5,17	75	29,0
2	5,10	75	29,4
3	5,03	54	21,5
4	5,16	69	26,7
5	5,10	66	25,9
6	5,12	52	20,3
7	5,07	63	24,9
8	5,06	64	25,3

Poisson-Verteilung

Probenanzahl	8	
Freiheitsgrad	7	
Mittelwert	64,7	Partikel
Standardabweichung	8,23	Partikel
χ^2 (CHI-Quadrat)	7,32	
Wahrscheinlichkeit	40	%
Wiederfindungsrate	87	%

Normalverteilung

Probenanzahl	8	
Mittelwert	25,4	mg/kg
Standardabweichung	3,23	mg/kg
rel. Standardabweichung	12,7	%
Horwitz Standardabweichung	9,8	%
HorRat-Wert	1,3	
Wiederfindungsrate	87	%

Microtracer Homogenitätstest

DLA 17-2017 Probe 10 mg/kg

Gewicht Gesamtprobe	0,75	kg
Microtracer	FSS-rot lake	
Teilchengröße	75 – 300	µm
Gewicht pro Partikel	2,0	µg
Tracerzugabe	38,1	mg/kg

Analysenergebnisse:

Probe	Einwaage [g]	Partikel Anzahl	Partikel [mg/kg]
1	5,18	78	30,1
2	5,09	86	33,8
3	4,97	74	29,8
4	5,07	80	31,6
5	5,11	84	32,9
6	4,96	86	34,7
7	5,15	83	32,2
8	5,01	72	28,7

Poisson-Verteilung

Probenanzahl	8	
Freiheitsgrad	7	
Mittelwert	80,4	Partikel
Standardabweichung	5,23	Partikel
χ^2 (CHI-Quadrat)	2,39	
Wahrscheinlichkeit	94	%
Wiederfindungsrate	83	%

Normalverteilung

Probenanzahl	8	
Mittelwert	31,7	mg/kg
Standardabweichung	2,07	mg/kg
rel. Standardabweichung	6,51	%
Horwitz Standardabweichung	9,51	%
HorRat-Wert	0,68	
Wiederfindungsrate	83	%

Microtracer Homogenitätstest

DLA 17-2017 Probe 20 mg/kg

Gewicht Gesamtprobe	1,25	kg
Microtracer	FSS-rot lake	
Teilchengröße	75 – 300	µm
Gewicht pro Partikel	2,0	µg
Tracerzugabe	27,3	mg/kg

Analysenergebnisse:

Probe	Einwaage [g]	Partikel Anzahl	Partikel [mg/kg]
1	5,02	58	23,1
2	5,08	61	24,0
3	5,05	53	21,0
4	5,00	50	20,0
5	5,16	51	19,8
6	5,03	54	21,5
7	5,00	52	20,8
8	5,09	53	20,8

Poisson-Verteilung		
Probenanzahl	8	
Freiheitsgrad	7	
Mittelwert	54,0	Partikel
Standardabweichung	3,73	Partikel
χ^2 (CHI-Quadrat)	1,80	
Wahrscheinlichkeit	97	%
Wiederfindungsrate	78	%

Normalverteilung		
Probenanzahl	8	
Mittelwert	21,4	mg/kg
Standardabweichung	1,48	mg/kg
rel. Standardabweichung	6,90	%
Horwitz Standardabweichung	10,1	%
HorRat-Wert	0,68	
Wiederfindungsrate	78	%

Microtracer Homogenitätstest

DLA 17-2017 Probe 50 mg/kg

Gewicht Gesamtprobe	0,75	kg
Microtracer	FSS-rot lake	
Teilchengröße	75 – 300	µm
Gewicht pro Partikel	2,0	µg
Tracerzugabe	36,4	mg/kg

Analysenergebnisse:

Probe	Einwaage [g]	Partikel Anzahl	Partikel [mg/kg]
1	5,05	80	31,7
2	4,96	86	34,7
3	5,02	76	30,3
4	5,15	74	28,7
5	4,96	84	33,9
6	5,11	76	29,7
7	5,01	78	31,1
8	5,09	73	28,7

Poisson-Verteilung		
Probenanzahl	8	
Freiheitsgrad	7	
Mittelwert	78,4	Partikel
Standardabweichung	5,62	Partikel
χ^2 (CHI-Quadrat)	2,82	
Wahrscheinlichkeit	90	%
Wiederfindungsrate	85	%

Normalverteilung		
Probenanzahl	8	
Mittelwert	31,1	mg/kg
Standardabweichung	2,23	mg/kg
rel. Standardabweichung	7,16	%
Horwitz Standardabweichung	9,54	%
HorRat-Wert	0,75	
Wiederfindungsrate	85	%

Microtracer Homogenitätstest**DLA 17-2017 Probe 100 mg/kg**

Gewicht Gesamtprobe	1,15	kg
Microtracer	FSS-rot lake	
Teilchengröße	75 – 300	µm
Gewicht pro Partikel	2,0	µg
Tracerzugabe	23,4	mg/kg

Analysenergebnisse:

Probe	Einwaage [g]	Partikel Anzahl	Partikel [mg/kg]
1	5,02	29	11,6
2	5,05	34	13,5
3	4,97	30	12,1
4	5,11	28	11,0
5	5,03	35	13,9
6	4,97	38	15,3
7	5,09	31	12,2
8	5,07	34	13,4

Poisson-Verteilung

Probenanzahl	8	
Freiheitsgrad	7	
Mittelwert	32,4	Partikel
Standardabweichung	3,58	Partikel
χ^2 (CHI-Quadrat)	2,76	
Wahrscheinlichkeit	91	%
Wiederfindungsrate	55	%

Normalverteilung

Probenanzahl	8	
Mittelwert	12,9	mg/kg
Standardabweichung	1,42	mg/kg
rel. Standardabweichung	11,0	%
Horwitz Standardabweichung	10,9	%
HorRat-Wert	1,0	
Wiederfindungsrate	55	%

5.3 Informationen zur Eignungsprüfung (EP)

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

EP-Nummer	DLA 17-2017
EP-Name	ALM-Verification Gluten: 5 Proben mit Weizenmehl in Mais-Chips-Matrix (und eine "Null-Probe")
Probenmatrix (Prozessierung)	Proben 1-6: Mais-Chips (glutenhaltige Proben: 195°C, 15 min) / Zutaten: Maismehl, Sonnenblumenöl, Salz und Allergenes Lebensmittel Weizenmehl (nur in glutenhaltigen Proben)
Probenzahl und Probenmenge	5 unterschiedliche Proben je 20 g + 1 „ Null-Probe“ 20 g
Lagerungsinformation	Proben : Raumtemperatur (Langzeit 2 - 10°C)
Verwendungszweck	Ausschließlich für Laboruntersuchungen (Qualitätskontrollproben)
Parameter	qualitativ (optional: quantitativ) Gluten / glutenhaltige Getreide Gehalte: 0, 2, 10, 20, 50 und 100 mg/kg
Untersuchungsmethoden	Methode ist freigestellt
Hinweis zur Analyse	Die Untersuchung der Eignungsprüfung soll entsprechend einer laborüblichen Routineanalyse vorgenommen werden. Generell empfehlen wir vor der Analyse, insbesondere bei kleinen Analyseneinwaagen, eine repräsentative Probenmenge entsprechend guter Laborpraxis zu homogenisieren. Vorzugsweise ist die Gesamtmenge zu homogenisieren.
Ergebnisangabe	Je ein qualitatives Ergebnis (und optional quantitativ) wird für die Proben 1-6 ermittelt. Die Einzelergebnisse sind in die Ergebnisabgabe-Datei einzutragen.
Einheiten	positiv / negativ (optional: mg/kg)
Anzahl von Stellen	mindestens 2 signifikante Stellen
Ergebnisabgabe	Die Ergebnisabgabe-Datei wird per eMail übermittelt an: pt@dla-lvu.de
Abgabetermin	spätestens 12. Mai 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
		Deutschland
		SCHWEIZ
		Deutschland
		ITALIEN
		ÖSTERREICH
		Deutschland

[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. 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 34:2000; General requirements for the competence of reference material producers
18. DAkkS 71 SD 1/4 016; Ermittlung und Angabe der Messunsicherheit nach Forderungen der DIN EN ISO/IEC 17025 (2011) [Estimation and indication of the measurement uncertainty]
19. 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
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
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)
 31. ASU §64 LFGB L 00.00-69 Bestimmung von Erdnuss-Kontaminationen in Lebensmitteln mittels ELISA im Mikrotiterplattensystem (2003)
 32. ASU §64 LFGB L 44.00-7 Bestimmung von Haselnuss-Kontaminationen in Schokolade und Schokoladenwaren mittels ELISA im Mikrotiterplattensystem (2006)
 33. ASU §64 LFGB L 16.01-9 Untersuchung von Lebensmitteln - Bestimmung von Soja (Glycine max) in Getreidemehl mittels real-time PCR (2016)
 34. ASU §64 LFGB L 18.00-19 Untersuchung von Lebensmitteln - Nachweis und Bestimmung von Sesam (Sesamum indicum) in Reis- und Weizenkeksen sowie in Soßenpulver mittels real-time PCR (2014)
 35. ASU §64 LFGB L 18.00-20 Untersuchung von Lebensmitteln - Nachweis und Bestimmung von Mandel (Prunus dulcis) in Reis- und Weizenkeksen sowie in Soßenpulver mittels real-time PCR (2014)
 36. ASU §64 LFGB L 18.00-22 Untersuchung von Lebensmitteln - Simultaner Nachweis und Bestimmung von Lupine, Mandel, Paranuss und Sesam in Reis- und Weizenkeksen sowie Soßenpulver mittels real-time PCR (2014)
 37. ASU §64 LFGB L 08.00-59 Untersuchung von Lebensmitteln - Nachweis und Bestimmung von Senf (Sinapis alba) sowie Soja (Glycine max) in Brühwürsten mittels real-time PCR (2013)
 38. ASU §64 LFGB L 08.00-66 Untersuchung von Lebensmitteln - Nachweis und Bestimmung von Weizen (Triticum L.) und Roggen (Secale cereale) in Brühwurst mittels real-time PCR (2016)
 39. Durchführungsverordnung der Kommission/ Commission Implementing Regulation EU 828/2014; über die Anforderungen an die Bereitstellung von Informationen für Verbraucher über das Nichtvorhandensein oder das reduzierte Vorhandensein von Gluten in Lebensmitteln / on the requirements for the pro-

- vision of information to consumers on the absence or reduced presence of gluten in food
40. Bruins-Slot et al. (2015) Evaluating the performance of gluten ELISA test kits: The numbers do not tell the tale, *Cereal Chem* 92(5):513-521
 41. Köhler & Andersen (2014) Analyse von Glutengehalten in Getreide und getreidehaltigen Produkten, Tabellenwerk zum Nährstoffgehalt von Lebensmitteln 3.1.5.1, Deutsche Forschungsanstalt für Lebensmittelchemie Leibniz Institut Jahresbericht 2014 [Analysis of gluten contents in cereals and cereal products, nutrient tables of foods]
 42. Allen et al. (2014) Allergen reference doses for precautionary labeling (VITAL 2.0): clinical implications, *J Allergy Clin Immunol* 133:156-164
 43. Taylor et al. (2014) Establishment of reference doses for residues of allergenic foods: report of the VITAL Expert Panel, *Food Chem Toxicol* 63: 9-17
 44. Demmel et al. (2015) Kap. 4.1 Existierende Aktionswerte, in: *Allergene in Lebensmitteln*, Behr's Verlag, Hamburg [Chapter 4.1 Existing Action Levels, in *Allergens in Foods*]

DLA 17/2017 - ALM Verification: Gluten

Alle 10 Teilnehmer haben Ergebnisse eingereicht. Es wurden 5 Proben mit unterschiedlichen Glutengehalten von 2 bis 100 mg/kg in der Matrix Mais-Chips sowie eine Matrix-„Nullprobe“ überwiegend mit ELISA-Methoden untersucht. Als „Action Level“ wurde ein Glutengehalt von 20 mg/kg gewählt. Das Dotierungsmaterial bestand aus einer Weizenmehlmischung aus 12 Ländern (Europa, Asien, USA) und wurde in Maismehl zu Chips verarbeitet (Backbedingungen 195°C, 15 min).

Alle Teilnehmer haben die „Action Level“-Probe als „positiv“ erfasst und eine Bewertung in Form von ALM-Scores (1-5) erhalten. Zusätzlich wurden für jeden Teilnehmer Wiederfindungsraten für alle quantitativen Ergebnisse ermittelt (WFR-Scores). Weitere Details sind dem Auswertebereich zu entnehmen.

3 Teilnehmer hatten ihren Sitz im Europäischen Ausland (Italien, Österreich, Schweiz).