

Proficiency Tests

DLA

food
cosmetics
consumer goods
www.dla-lvu.de

Auswertungs-Bericht
Laborvergleichsuntersuchung

DLA 03/2018

Allergene III:

β-Lactoglobulin, Casein und Gluten

in Kindernahrung

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

2. Korrektur 25.07.2018:

In der Tabelle "Wiederfindungsraten ELISA für Gluten" auf S. 50 ist ein Fehler aufgetreten:

Die Bezugswerte von Gluten für Probe A und der Dotierungsniveauprobe von 37,7 mg/kg bzw. 36,1 mg/kg wurden bei der Berechnung der Wiederfindungsraten irrtümlich vertauscht. Dies wurde korrigiert.

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

| | |
|--|--|
| <i>EP-Anbieter</i> <i>PT-Provider</i> | <p>DLA - Dienstleistung Lebensmittel Analytik GbR Gesellschafter: Dr. Gerhard Wichmann und Dr. Matthias Besler-Scharf</p> <p>Waldemar-Bonsels-Weg 170, 22926 Ahrensburg, Germany</p> <p>Tel. ++49-(0)4532-9183358 Mob. ++49(0)171-1954375 Fax. ++49(0)4102-9944976 eMail. proficiency-testing@dla-lvu.de</p> |
| <i>EP-Nummer</i> <i>PT-Number</i> | DLA 03/2018 |
| <i>EP-Koordinator</i> <i>PT-Coordinator</i> | Dr. Matthias Besler-Scharf |
| <i>Status des EP-Bericht</i> <i>Status of PT-Report</i> | <p>Abschlussbericht / Final report (25. Juli 2018) 2. Korrektur / 2nd Correction Gültig ist die jeweils letzte Version/Korrektur des Berichts. Sie ersetzt alle vorangegangenen Versionen. Only the latest version/correction of the report is valid. It replaces all preceding versions.</p> |
| <i>EP-Bericht Freigabe</i> <i>PT-Report Authorization</i> | <p>Dr. Matthias Besler-Scharf (Technischer Leiter / Technical Manager) - <i>gezeichnet / signed M. Besler-Scharf</i> Dr. Gerhard Wichmann (QM-Beauftragter / Quality Manager) - <i>gezeichnet / signed G. Wichmann</i> Datum / Date: 25. Juli 2018</p> |
| <i>Unteraufträge</i> <i>Subcontractors</i> | <p>Falls im Rahmen der Eignungsprüfung eine Prüfung der Gehalte, Homogenität und Stabilität von EP-Parametern durchgeführt wurde, hat DLA diese im Unterauftrag vergeben. In case the analysis of the content, homogeneity and stability of PT-parameters was part of the proficiency test, the determinations were subcontracted by DLA.</p> |
| <i>Vertraulichkeit</i> <i>Confidentiality</i> | <p>Die Teilnehmerergebnisse sind im EP-Bericht in anonymisierter Form mit Auswertenummern benannt. Daten einzelner Teilnehmer werden ausschließlich nach vorheriger Zustimmung des Teilnehmers an Dritte weitergegeben. Participant result are named anonymously with evaluation numbers in the PT report. Data of individual participants will be passed on to third parties only with prior consent of the participant.</p> |

Inhalt

| | |
|--|----|
| 1. Einleitung..... | 4 |
| 2. Durchführung..... | 4 |
| 2.1 Untersuchungsmaterial..... | 4 |
| 2.1.1 Homogenität..... | 6 |
| 2.1.2 Stabilität..... | 10 |
| 2.2 Probenversand und Informationen zur Untersuchung..... | 10 |
| 2.3 Ergebnisübermittlung..... | 10 |
| 3. Auswertung..... | 11 |
| 3.1 Konsenswert der Teilnehmer (zugewiesener Wert)..... | 11 |
| 3.2 Robuste Standardabweichung..... | 12 |
| 3.3 Ausschluss von Ergebnissen und Ausreißer..... | 12 |
| 3.4 Zielstandardabweichung (für die Eignungsbeurteilung)..... | 13 |
| 3.4.1 Allgemeines Modell nach Horwitz..... | 13 |
| 3.4.2 Auswertung eines Versuchs zur Präzision..... | 13 |
| 3.4.3 Werte aus Erkenntnissen..... | 16 |
| 3.5 z-Score..... | 17 |
| 3.6 z'-Score..... | 18 |
| 3.7 Quotient S^*/σ_{pt} | 18 |
| 3.8 Standardunsicherheit und Rückführbarkeit..... | 18 |
| 3.9 Graphische Darstellung der Bezugswerte..... | 19 |
| 3.10 Wiederfindungsraten: Dotierung..... | 19 |
| 4. Ergebnisse..... | 20 |
| 4.1 Vergleichsuntersuchung β -Lactoglobulin..... | 22 |
| 4.1.1 ELISA-Ergebnisse: β -Lactoglobulin..... | 22 |
| 4.2 Vergleichsuntersuchung Casein / Milchprotein..... | 30 |
| 4.2.1 ELISA-Ergebnisse: Casein..... | 30 |
| 4.2.2 ELISA-Ergebnisse: Milch (als Milchprotein)..... | 38 |
| 4.3 Vergleichsuntersuchung Weizen (Gluten / Weizen)..... | 41 |
| 4.3.1 ELISA-Ergebnisse: Gluten..... | 41 |
| 4.3.2 PCR-Ergebnisse: Gluten-haltige Getreide (Weizen)..... | 51 |
| 5. Dokumentation..... | 52 |
| 5.1 Angaben der Teilnehmer..... | 52 |
| 5.1.1 ELISA: β -Lactoglobulin..... | 52 |
| 5.1.2 ELISA: Casein..... | 54 |
| 5.1.3 ELISA: Milchprotein..... | 55 |
| 5.1.4 ELISA: Gluten..... | 56 |
| 5.1.5 PCR: Gluten-haltige Getreide..... | 58 |
| 5.2 Homogenität..... | 59 |
| 5.2.1 Mischungshomogenität vor der Abfüllung..... | 59 |
| 5.4 Informationen zur Eignungsprüfung (EP)..... | 60 |
| 6. Verzeichnis der Teilnehmer in alphabetischer Reihenfolge..... | 61 |
| 7. Verzeichnis relevanter Literatur..... | 62 |

1. Einleitung

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

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

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

2. Durchführung

2.1 Untersuchungsmaterial

Zur Untersuchung wurden zwei verschiedene LVU-Proben mit gleicher Lebensmittelmatrix für den Nachweis und die quantitative Bestimmung der Allergene im mg/kg-Bereich und eine Dotierungsniveauprobe mit einfacher Matrix zur Verfügung gestellt. Einer der beiden LVU-Proben (dotierte Probe) sowie der Dotierungsniveauprobe wurden die betreffenden allergenen Zutaten in ähnlichem Konzentrationsbereich zugesetzt. Die Untersuchungsergebnisse der Dotierungsniveauprobe sollen im Vergleich zur dotierten LVU-Probe die Möglichkeit geben, die Nachweisbarkeit der Allergene ohne und mit Einfluss der Lebensmittelmatrix bzw. -prozessierung zu charakterisieren.

Bei dem Untersuchungsmaterial der Lebensmittelmatrixproben handelt es sich um eine Mischung handelsüblicher Kindernahrungsmittel "Getreide-Brei" ab dem 4. und 6. Monat (gekennzeichnet als milchfrei und glutenfrei). Die Grundzusammensetzung war für beide Proben A und B gleich (s. Tabelle 1).

Nach Zerkleinern und Sieben mittels Schlagmühle (mesh 1,5 mm) wurde die Grundmischung homogenisiert.

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

Die Dotierungsmaterialien, die die allergenen Zutaten Magermilchpulver und Weizenmehl enthalten, wurden mittels Zentrifugalmühle gesiebt (mesh 250 µm bzw. 500 µm), dann zu einem Aliquot der Grundmatrix gegeben und die Mischung homogenisiert. Anschließend wurde portionsweise erneut Grundmatrix in 3 weiteren Schritten zugegeben und jeweils homogenisiert bis die Gesamtmenge erreicht war.

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

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

Tabelle 1: Zusammensetzung der DLA-Proben

| Zutaten | Probe A | Probe B | Dotierungs- niveauprobe |
|--|--|------------|--|
| Bio-Getreidebrei-Mischung, Kinderbrei ab dem 4. u. 6. Monat Zutaten: Hirsevollkornmehl (68%), Naturreismehl (25%), Maisvollkornmehl (5,4%) und Buchweizenmehl (1,6%), Thiamin Nährwertangaben pro 100 g: Fett 3,6 g, Kohlenhydrate 77 g, Eiweiß 11 g | 99,7 g/100 g | 100 g/100g | - |
| Kartoffelpulver Zutaten: Kartoffeln, E471, E304, E223, E100 | - | - | 99,7 g/100 g |
| <i>Milch:</i> Magermilchpulver-Mischung (9 Produkte aus Europa, USA) - als Magermilchpulver* - davon 33,0% Gesamtprotein** - davon Casein*** - davon β -Lactoglobulin*** | 215 mg/kg 71,0 mg/kg 56,8 mg/kg 7,1 mg/kg | - | 236 mg/kg 77,9 mg/kg 62,3 mg/kg 7,8 mg/kg |
| <i>Weizen:</i> Weizenmehl-Mischung (21 Produkte aus Europa, Asien, USA) - als Weizenmehl* - davon 10,1% Gesamtprotein** - davon Gluten*** | 433 mg/kg 43,7 mg/kg 37,7 mg/kg | - | 415 mg/kg 41,9 mg/kg 36,1 mg/kg |
| <i>weitere Zutaten:</i> Maltodextrin, Natriumsulfat und Siliciumdioxid | <0,3 g/100 g | - | <0,3 g/100 g |

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

** Proteingehalte gemäß Laboranalyse des Rohstoffs (Gesamtstickstoff nach Kjeldahl mit $F=6,38$ für Milchprotein und $F=5,7$ für Weizenprotein)

*** Proteingehalte gemäß Literaturangaben berechnet (ca. 80% Caseine und ca. 10% β -Lactoglobulin in Gesamt-Milchprotein [36]; ca. 8,7% Gluten in Weizenmehlen [37, 38, 39])

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

2.1.1 Homogenität

Die **Mischungshomogenität vor der Abfüllung** wurde in 8-fach Bestimmung mittels **Microtracer-Analyse** untersucht. Es handelt sich um eine normierte Methode, die Bestandteil des internationalen GMP-Zertifizierungssystems für Futtermittel ist [14]. Vor der Mischung werden mit Farbstoff beschichtete Eisenpartikel in 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 A und Dotierungsniveauprobe hat eine Wahrscheinlichkeit von 92% bzw. 80% ergeben. Die Partikel-Ergebnisse wurden zusätzlich in Konzentrationen umgerechnet, statistisch als Normalverteilung ausgewertet und mit der Standardabweichung nach Horwitz verglichen. Für die Beurteilung sind HorRat-Werte zwischen 0,3 und 1,3 unter Wiederholbedingungen (Messungen innerhalb des Labors) zu akzeptieren [17]. Es wurden HorRat-Werte von 0,76 bzw. 0,84 erhalten. Die Ergebnisse der Microtracer-Analyse sind in der Dokumentation angegeben.

Homogenität der abgefüllten dotierten Probe A

Durchführung der Homogenitätstests

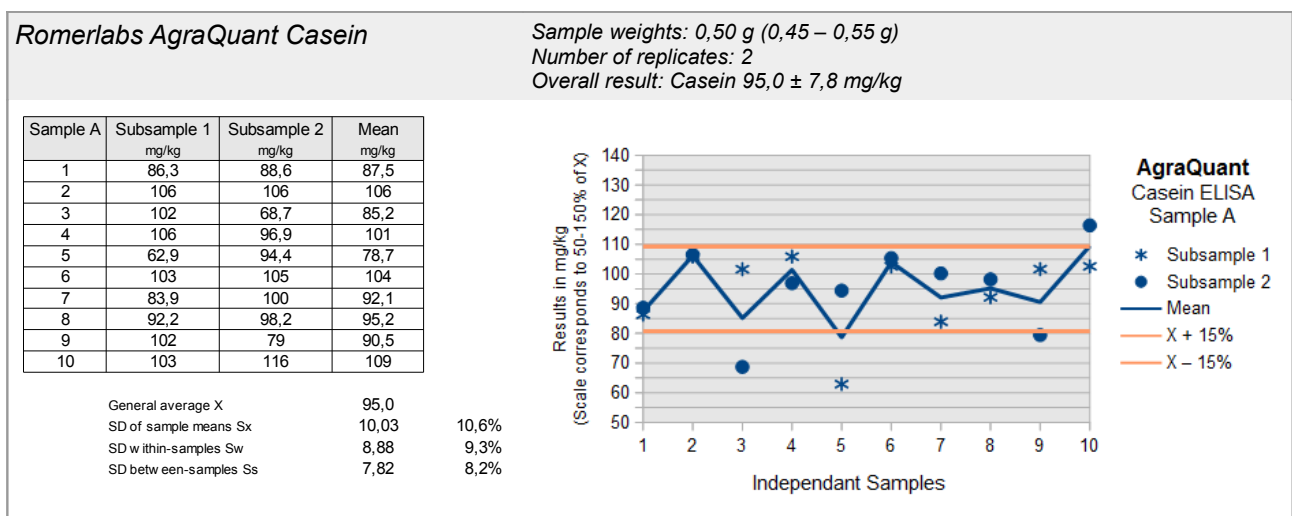
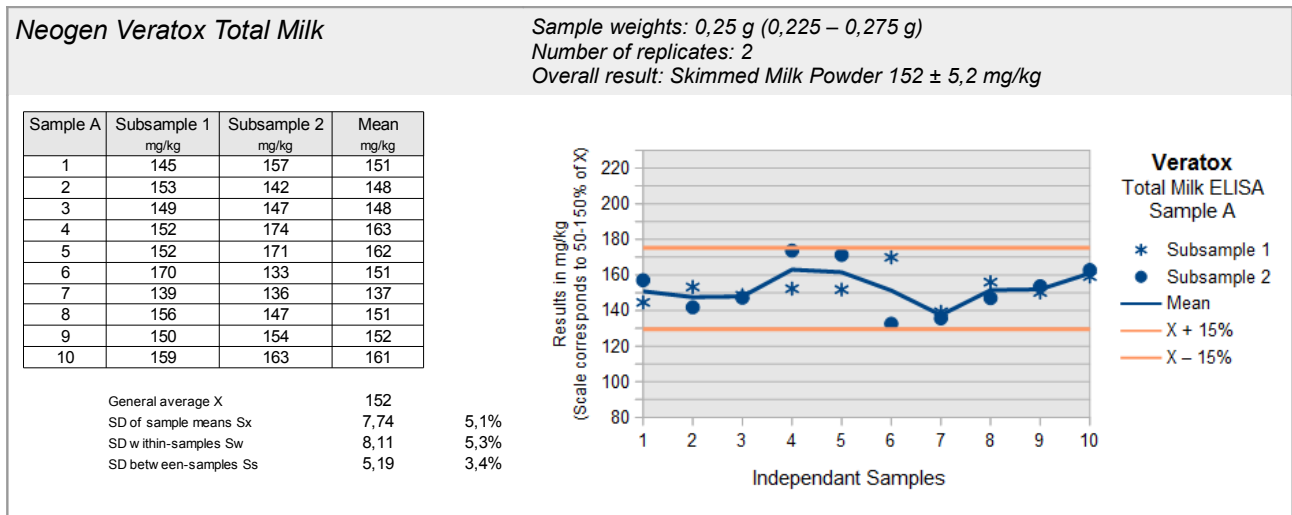
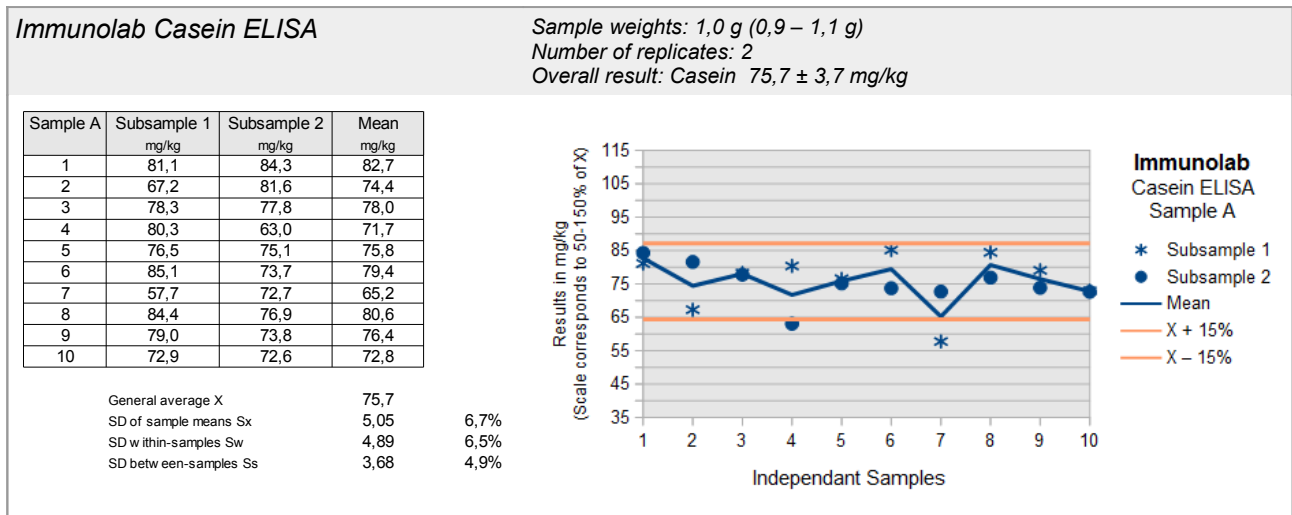
Die Homogenitätstests wurden in Kooperation mit den Labors der angegebenen Testkit-Anbieter durchgeführt. Von DLA wurden zufällig 10 Muster der abgefüllten dotierten Probe ausgewählt und davon jeweils 2 Teilproben in zuvor zufällig-codierte Extraktionsbehälter eingewogen und anschließend den Labors zur Analyse zugeschickt. Die Einwaagen wurden mit einer Abweichung von $\pm 10\%$ von der Soll-einwaage der Testkit-Anleitung vorgenommen und den Labors nicht mitgeteilt. Nach Übersendung der Analysenergebnisse durch die Labors wurden die gültigen Ergebnisse anhand der exakten Einwaagen von DLA berechnet und die statistische Berechnung gemäß ISO 13528:2015 Anhang B (ggf. inkl. Anmerkungen 1 u. 2) vorgenommen.

Bewertung der Homogenität

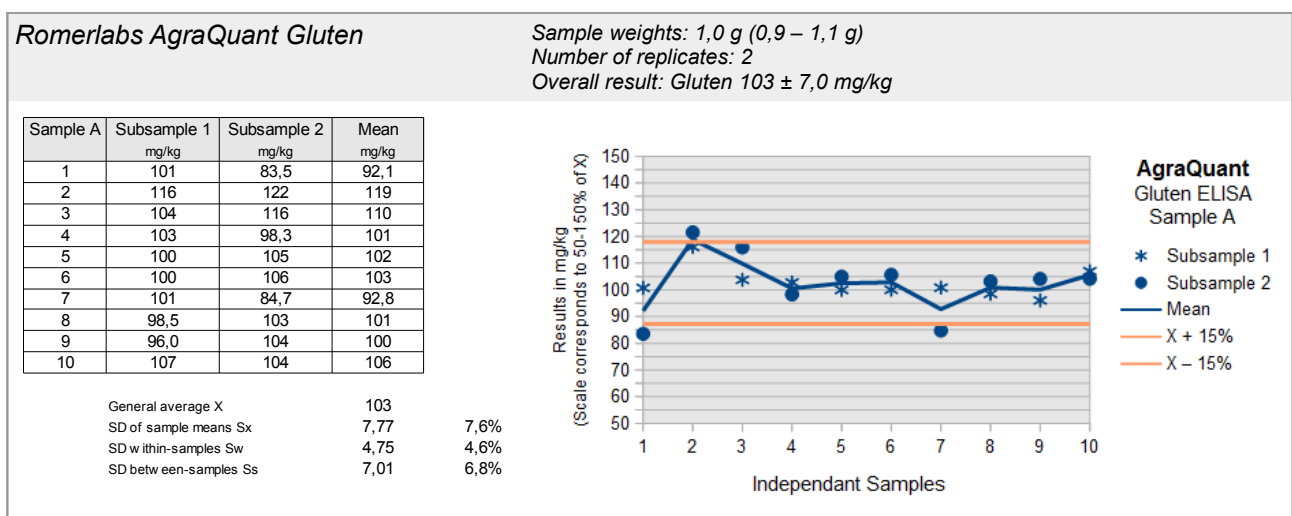
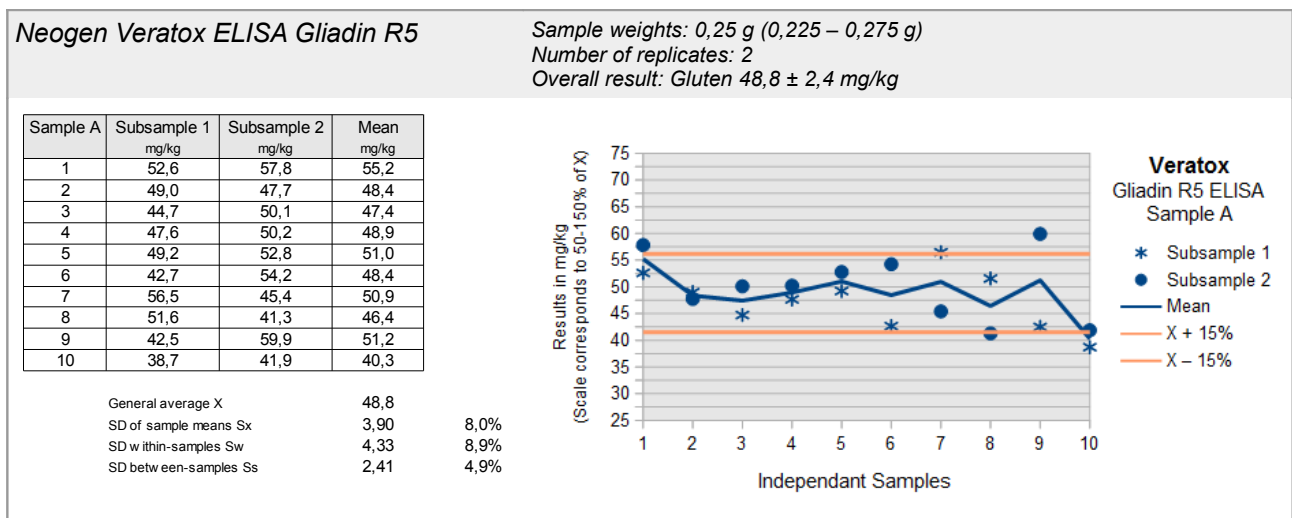
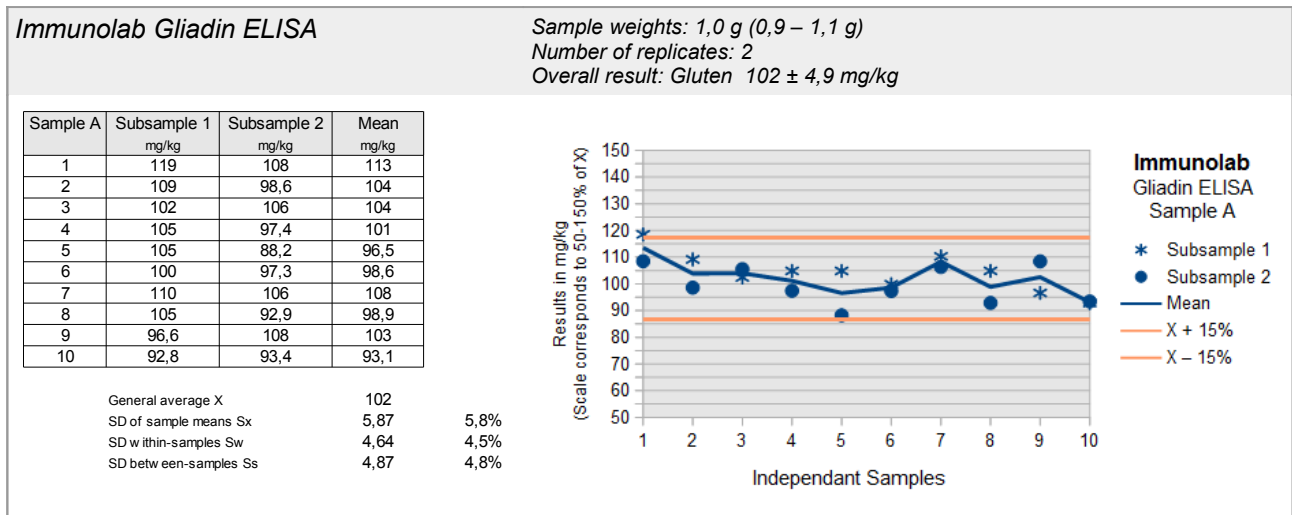
Die Homogenität wird mit einer Standardabweichung zwischen den Proben von $S_s \leq 15\%$ („Heterogenitätsstandardabweichung“) als hinreichend gesichert angesehen. Dieses Kriterium wird für die untersuchte Probe A in allen ELISA-Tests für Gluten (Immunolab, Veratox, AgraQuant und AgraQuant G12) und Milch/Casein (Immunolab, Veratox und AgraQuant) erfüllt (s. Seite 7-9). Die Anforderung an Wiederholstandardabweichungen von ELISA- und PCR-Verfahren ist üblicherweise $\leq 25\%$ [18, 19, 22, 23].

Falls die Kriterien für eine ausreichende Homogenität des Probenmaterials bezüglich eines Parameters nicht erfüllt sind, werden die Auswirkungen auf die Zielstandardabweichung geprüft. Ggf. erfolgt die Bewertung der Ergebnisse der Teilnehmer unter Berücksichtigung der Standardunsicherheit des zugewiesenen Wertes anhand von z'-Scores (s. 3.6 und 3.8) [3].

ELISA-Tests: Homogenität Milch / Homogeneity Milk



ELISA-Tests: Homogenität Gluten / Homogeneity Gluten

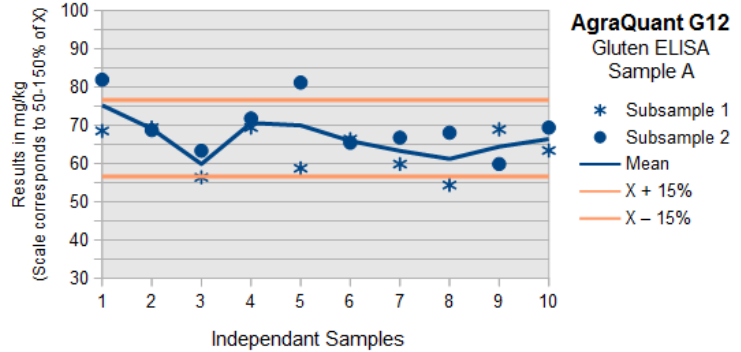


Romerlabs AgraQuant Gluten G12

Sample weights: 1,0 g (0,9 – 1,1 g)
 Number of replicates: 2
 Overall result: Gluten 66,6 ± 2,9 mg/kg

| Sample A | Subsample 1 mg/kg | Subsample 2 mg/kg | Mean mg/kg |
|----------|----------------------|----------------------|---------------|
| 1 | 68,5 | 81,9 | 75,2 |
| 2 | 69,4 | 68,7 | 69,1 |
| 3 | 56,4 | 63,3 | 59,8 |
| 4 | 69,4 | 71,8 | 70,6 |
| 5 | 58,7 | 81,1 | 69,9 |
| 6 | 66,4 | 65,4 | 65,9 |
| 7 | 59,8 | 66,7 | 63,3 |
| 8 | 54,3 | 68,0 | 61,2 |
| 9 | 68,9 | 59,8 | 64,4 |
| 10 | 63,4 | 69,4 | 66,4 |

| | | |
|-----------------------|------|------|
| General average X | 66,6 | |
| SD of sample means Sx | 4,69 | 7,1% |
| SD within-samples Sw | 5,22 | 7,8% |
| SD between-samples Ss | 2,90 | 4,4% |



2.1.2 Stabilität

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

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

Der a_w -Wert der EP-Proben lag bei ca. $0,28$ ($24,5^\circ\text{C}$). Die Stabilität des Probenmaterials war somit während des Untersuchungszeitraums unter den angegebenen Lagerbedingungen gewährleistet.

2.2 Probenversand und Informationen zur Untersuchung

An jeden Teilnehmer wurden in der 11. Kalenderwoche 2018 je eine Portion der Untersuchungsmaterialien A und B sowie eine Dotierungsmaterialprobe verschickt. Die Untersuchungsverfahren wurden freigestellt. Die Untersuchungen waren durchzuführen bis spätestens 27. April 2018.

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

Es handelt sich um zwei unterschiedliche Proben A und B mit möglichen Gehalten an den allergenen Parametern β -Lactoglobulin, Casein und/oder Gluten im mg/kg Bereich in der Matrix Kindernahrung (Breipulver mit Hirse, Reis, Mais und Buchweizen). Eine der beiden Proben sowie die "Dotierungsniveauprobe" wurden mit den allergenen Zutaten hergestellt. Die "Dotierungsniveauprobe" enthält die Allergene in einfacher Matrix mit ähnlichen Gehalten ohne weitere Prozessierung. Die Dotierungsniveauprobe soll wie eine normale Probe untersucht werden.

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

2.3 Ergebnisübermittlung

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

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

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

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

Alle 18 Teilnehmer haben fristgerecht Ergebnisse abgegeben.

3. Auswertung

Verschiedene ELISA-Methoden zur quantitativen Bestimmung von Allergenen in Lebensmitteln können verschiedene Antikörper-Spezifitäten aufweisen, mit unterschiedlichem Referenzmaterial kalibriert worden sein und sich unterschiedlicher Extraktionsverfahren bedienen. Die verschiedenen ELISA-Methoden können daher zu einer unterschiedlichen Bewertung des Gehalts eines Analyten führen [25, 26, 27, 28]. Aus diesem Grund werden die Ergebnisse, wenn möglich in der Auswertung verschiedenen Bezugswerten gegenübergestellt.

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

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

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

3.1 Konsenswert der Teilnehmer (zugewiesener Wert)

Für die Auswertung wurde als zugewiesener Wert (X_{pt}) der **robuste Mittelwert** der eingesandten Ergebnisse verwendet („Konsenswert der Teilnehmer“). Die Berechnung erfolgt nach Algorithmus A gemäß Anhang C der ISO 13528 [3]. Liegen < 12 quantitative Ergebnisse und eine erhöhte Differenz zwischen robustem Mittelwert und Median vor, ist ggf. der **Median** als zugewiesener Wert zu verwenden (Kriterium: Δ Median - rob. Mittelwert $> 0,3 \sigma_{pt}$) [3].

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

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

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

- i) **Zugewiesener Wert aller Ergebnisse** - X_{ptALL}
- ii) **Zugewiesener Wert von Einzelmethode** - $X_{ptMETHOD i}$
mit mindestens 5 quantitativen Ergebnisangaben.

Einzelerggebnisse die außerhalb des angegebenen Messbereiches eines teilnehmenden Labors liegen (z.B. mit der Angabe > 25 mg/kg oder $< 2,5$ mg/kg) oder die Angabe „0“ werden für die statistische Auswertung generell nicht berücksichtigt [3].

3.2 Robuste Standardabweichung

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

Folgende robuste Standardabweichungen werden herangezogen:

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

3.3 Ausschluss von Ergebnissen und Ausreißer

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

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

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

Auf Ausreißer wird mittels robuster Statistik (Algorithmus A) geprüft: Ergebnisse, die um mehr als das Dreifache der robusten Standardabweichung vom robusten Mittelwert abweichen, können danach als Ausreißer eingestuft werden [3]. Aufgrund der Anwendung der robusten Statistik werden Ausreißer i.d.R. nicht von der Auswertung ausgeschlossen, sofern keine anderen Gründe vorliegen (s.o.) [3]. Ermittelte Ausreißer werden im Ergebnisteil nur genannt, wenn sie von der statistischen Auswertung ausgeschlossen wurden.

3.4 Zielstandardabweichung (für die Eignungsbeurteilung)

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

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

3.4.1 Allgemeines Modell nach Horwitz

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

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

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

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

3.4.2 Auswertung eines Versuchs zur Präzision

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

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

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

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

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

Aus den Präzisionsdaten der ASU §64 Methoden ergeben sich abhängig von Matrix bzw. Prozessierung und Konzentrationsbereich relative Zielstandardabweichungen im Bereich von 11 - 32% für die ELISA-Methoden und 18 - 38% für die PCR-Methoden (s. Tab. 2a und 2b).

Die Working Group on Prolamin Analysis and Toxicity (WGPAT) hat Ringversuche zur Validierung von zwei kommerziellen ELISA-Test-Kits zur Gluten-Bestimmung mittels monoklonalem R5 Antikörper durchgeführt [24]. Es wurden 12 Lebensmittelproben mit Gliadinegehalten im Bereich von 0 - 168 mg/kg von 20 Laboratorien untersucht. Die Wiederfindungsraten lagen zwischen 65 und 110%, die relativen Wiederholstandardabweichungen lagen bei 13 - 25% (1. Methode) bzw. 11 - 22% (2. Methode) und die relativen Vergleichsstandardabweichungen bei 23 - 47% (1. Methode) bzw. 25 - 33% (2. Methode). Laut den Autoren erfüllten beide ELISA-Test-Kits damit die Validierungskriterien für ELISA Methoden [24].

Das IRMM (Institute for Reference Materials and Measurements) hat in einem Ringversuch die Eignung fünf verschiedener ELISA-Test-Kits zur Bestimmung von Erdnuss getestet [27]. Die Mittelwerte lagen im Konzentrationsbereich von 0,3 - 16,1 mg/kg bzw. 1,2 - 20,4 mg/kg. Die jeweils niedrigsten relativen Vergleichsstandardabweichungen der fünf Test-Kits lagen für die Matrix Bitterschokolade bei 20 - 42% und für Kekse bei 23 - 61%.

Tabelle 2b: PCR-Methoden - Relative Wiederholstandardabweichungen (RSD_r) und relative Vergleichsstandardabweichungen (RSD_R) gemäß ausgewählter Auswertungen von Versuchen zur Präzision und die resultierende Zielstandardabweichung σ_{pt} [32-35]

| Parameter | Matrix | Mittelwerte [mg/kg] | Wiederfindung | rob RSD_r | RSD_r | RSD_R | σ_{pt} | Methode / Literatur |
|-----------------|---------------------------|---------------------|----------------|-------------|----------------|----------------|----------------|------------------------|
| Soja | Weizenmehl | 107 | 107 % | 63 % | - | 31 % | - | rt-PCR ASU 16.01-9 |
| | Maismehl | 145 | 145 % | 34 % | - | 24 % | - | |
| Sojamehl | Brühwurst (100°C, 60 min) | 114,1 64,4 | 114 % 161 % | - | 14,7% 27,7% | 22,2% 41,4% | 19,6% 36,5% | rt-PCR ASU 08.00-65 |
| Sojamehl | Wurst, autoklaviert | 33,1 | 33,1 % | - | 21,5% | 30,8 | 26,8% | rt-PCR ASU 08.00-65 |
| Sojamehl | Brühwurst (100°C, 60 min) | 82,0 | 82 % | - | 17,3% | 24,1% | 20,8% | rt-PCR ASU 08.00-59 |
| | | 39,6 | 99 % | | 22,9% | 31,8% | 27,4% | |
| | | 19,6 | 98 % | | 22,9% | 24,0% | 17,7% | |
| | | 9,3 | 93 % | | 31,1% | 30,2% | - | |
| 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 |

3.4.3 Werte aus Erkenntnissen

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

Anforderungen an die Leistungsfähigkeit der Analysemethoden zur quantitativen Bestimmung von Allergenen in Lebensmitteln sind u.a. vom Ministry of Health and Welfare (MHLW) in Japan [22], von der Arbeitsgruppe 12 „Lebensmittelallergene“ des Technischen Komitees CEN/TC 275 [19-21], von einer internationalen "Food Allergen Working Group" unter der Leitung der AOAC Presidential Task Force on Food Allergens [22] und vom Codex Alimentarius Committee (CAC/GL 74-2010) [18] erarbeitet worden.

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

Tabelle 3: ELISA-Validierungskriterien

| Literatur [18-24] | Wiederfindungsrate | Wiederholstandard- abweichung | Vergleichsstandard- abweichung |
|----------------------|--------------------|----------------------------------|-----------------------------------|
| MHLW 2006 | 50 - 150% | | ≤ 25% |
| CEN 2009 | | ≤ 20% | |
| AOAC 2010 | 50 - 150% | 6,9 - 34,4% ^(a) | 19,5 - 57,2% ^(a) |
| CAC 2010 | 70 - 120% | ≤ 25% | ≤ 35% |

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

Tabelle 4: PCR-Validierungskriterien

| Literatur [18] | Wiederfindungsrate | Wiederholstandard- abweichung | Vergleichsstandard- abweichung |
|-------------------|----------------------|----------------------------------|-----------------------------------|
| CAC 2010 | ± 25% ^(a) | ≤ 25% | ≤ 35% |

(a) = Trueness / Richtigkeit

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

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

3.5 z-Score

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

Die Berechnung erfolgt nach:

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

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

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

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

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

3.5.1 Warn- und Eingriffssignale

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

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

3.6 z'-Score

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

Die Berechnung erfolgt nach:

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

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

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

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

Zu Warn- und Eingriffssignalen siehe 3.5.1.

3.7 Quotient S^*/σ_{pt}

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

3.8 Standardunsicherheit und Rückführbarkeit

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

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

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

gering für die Standardunsicherheit des zugewiesenen Wertes gewählt wurde.

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

3.9 Graphische Darstellung der Bezugswerte

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

3.10 Wiederfindungsraten: Dotierung

Für die Ergebnisse von Dotierungsniveauprobe und dotierter Probe werden Wiederfindungsraten in Bezug auf die zugesetzten Allergene (Zusatzniveau) berechnet. Die Bezugswerte ergeben sich aus den unter 2.1 Untersuchungsmaterial in Tabelle 1 angegebenen Gehalten. Als Akzeptanzbereich AB für die Bewertung der Teilnehmerergebnisse wird der von der AOAC vorgeschlagene Bereich von 50 - 150% für die Wiederfindungsraten von Allergen-ELISAs herangezogen [23]. Für quantitative PCR- oder LC/MS-Bestimmungen wird ebenfalls dieser Akzeptanzbereich herangezogen.

4. Ergebnisse

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

Die Auswertung erfolgte getrennt nach ELISA und PCR-Methoden. Die Ergebnisse wurden in den entsprechenden Kapiteln nach durchgeführten Methoden (Testkits) zusammengefasst und die Auswertenummern innerhalb der Gruppen aufsteigend sortiert.

Die folgenden Ergebnisseiten sind für die allergenen Bestandteile jeweils gleich aufgebaut. Es werden zunächst die Ergebnisse aller ELISA- bzw. PCR-Methoden zu einem Parameter für die Proben A und B (qualitativ und ggf. quantitativ) und danach für die Dotierungsniveauprobe (nur quantitativ) angegeben. Die Wiederfindungsraten der Ergebnisse für die Dotierungsniveauprobe und die dotierte Probe A oder B werden anschließend behandelt.

Im Ergebnisteil werden alle quantitativen Teilnehmerergebnisse auf 3 signifikante Stellen (gültige Ziffern) formatiert dargestellt. Im Dokumentationsteil sind die Ergebnisse so angegeben wie sie von den Teilnehmern übermittelt wurden.

Um die **Vergleichbarkeit von quantitativen Ergebnissen** zu gewährleisten, wurden Teilnehmerergebnisse mit unterschiedlichen Angaben (z.B. als Protein oder allergenes Lebensmittel) soweit möglich von DLA harmonisiert.

β -Lactoglobulin-spezifische ELISA-Ergebnisse, die als **Gesamt-Milchprotein** angegeben wurden, sind mit Literaturangaben [36] auf den **β -Lactoglobulin**-gehalt (ca. 10 % in Gesamt-Milchprotein, vgl. S.5) umgerechnet worden (Morinaga ELISA).

Casein-spezifische ELISA-Ergebnisse, die als **Magermilchpulver** angegeben wurden, sind in **Casein** umgerechnet worden. Es wurden dazu die Vorgaben des betreffenden Testkit-Herstellers für den Gehalt an Casein in Magermilchpulver berücksichtigt (ELISA-Systems Test-Kit Manual: 25,6%, Neogen Allergen-Handbuch: 28,8%).

Milchprotein-spezifische ELISA-Ergebnisse, die als **Magermilchpulver** angegeben wurden, wurden mit dem experimentell bestimmten Proteingehalt des Rohstoffs (s. S.5) in **Gesamt-Milchprotein** umgerechnet worden.

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

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

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

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

| Auswertenummer | Ergebnis | Ergebnis | z-Score $X_{pt_{ALL}}$ | z-Score $X_{pt_{M i}}$ | Methode | Hinweis |
|----------------|----------|----------|------------------------|------------------------|---------|---------|
| | pos/neg | [mg/kg] | | | | |
| | | | | | | |

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

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

^o Zielbereich berechnet mit z-Score oder z'-Score

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

4.1 Vergleichsuntersuchung β -Lactoglobulin

4.1.1 ELISA-Ergebnisse: β -Lactoglobulin

Qualitative Auswertung der Ergebnisse: Proben A und B

| Auswertenummer | Probe A | Probe A | Probe B | Probe B | Qualitative Bewertung | Methode | Hinweis |
|----------------|---------|---------|---------|---------|-------------------------------------|---------|-------------------------------|
| | pos/neg | [mg/kg] | pos/neg | [mg/kg] | Übereinstimmungen mit Konsenswerten | | |
| 9 | positiv | >0,4 | positiv | 0,01 | 1/2 (50%) | AQ | |
| 6 | positiv | 14,8 | negativ | | 2/2 (100%) | BK | |
| 1a | positiv | 8,00 | negativ | N/A | 2/2 (100%) | ES | |
| 7 | positiv | 19,6 | negativ | <0,1 | 2/2 (100%) | ES | |
| 12 | positiv | >1 | negativ | <0,1 | 2/2 (100%) | ES | |
| 1b | positiv | 3,66 | negativ | N/A | 2/2 (100%) | MI | Ergebnis umgerechnet ° |
| 15 | positiv | 4,20 | negativ | <0,031 | 2/2 (100%) | MI | |
| 3 | positiv | 1,80 | negativ | | 2/2 (100%) | NL | |
| 4 | positiv | 3,28 | negativ | <2,63 | 2/2 (100%) | RS | |
| 16 | negativ | <5 | negativ | <5 | 1/2 (50%) | RS | keine Positivprobe detektiert |
| 5 | positiv | 7,10 | negativ | <0,167 | 2/2 (100%) | RS-F | |
| 10 | positiv | 1,66 | negativ | | 2/2 (100%) | RS-F | |
| 13 | positiv | 5,00 | negativ | < 0,5 | 2/2 (100%) | RS-F | |
| 14 | positiv | 2,24 | negativ | <0,5 | 2/2 (100%) | RS-F | |
| 2 | positiv | >0,5 | positiv | 0,08 | 1/2 (50%) | ZL | |

° Umrechnung S. 20

| | Probe A | Probe B |
|-----------------|---------|---------|
| Anzahl positiv | 14 | 2 |
| Anzahl negativ | 1 | 13 |
| Prozent positiv | 93 | 13 |
| Prozent negativ | 7 | 87 |
| Konsenswert | positiv | negativ |

Methoden:

AQ = AgraQuant, RomerLabs
 BK = BioKits, Neogen
 ES = ELISA-Systems
 MI = Morinaga Institute ELISA Kit II
 NL = nutriLinia® Allergen-ELISA
 RS = Ridascreen®, R-Biopharm
 RS-F= Ridascreen® Fast, R-Biopharm
 ZL = Proteon ELISA, Zeulab

Anmerkung:

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

Ein negatives Ergebnis für Probe A wurde mit einer Bestimmungsgrenze, die über dem Median der übrigen Ergebnisse lag, erhalten. Für Probe B wurden zwei positive Ergebnisse angegeben, die Gehalte lagen jeweils <0,1 mg/kg.

Quantitative Auswertung ELISA: Probe A

| Auswertenummer | β -Lactoglobulin [mg/kg] | z'-Score $X_{pt,ALL}$ | Methode | Hinweis |
|----------------|-----------------------------------|--------------------------|---------|------------------------|
| 9 | >0,4 | | AQ | |
| 6 | 14,8 | 5,6 | BK | |
| 1a | 8,00 | 2,0 | ES | |
| 7 | 19,6 | 8,1 | ES | |
| 12 | >1 | | ES | |
| 1b | 3,66 | -0,28 | MI | Ergebnis umgerechnet ° |
| 15 | 4,20 | 0,00 | MI | |
| 3 | 1,80 | -1,3 | NL | |
| 4 | 3,28 | -0,48 | RS | |
| 16 | <5 | | RS | |
| 5 | 7,10 | 1,5 | RS-F | |
| 10 | 1,66 | -1,3 | RS-F | |
| 13 | 5,00 | 0,42 | RS-F | |
| 14 | 2,24 | -1,0 | RS-F | |
| 2 | >0,5 | | ZL | |

° Umrechnung S. 20

Methoden:

- AQ = AgraQuant, RomerLabs
- BK = BioKits, Neogen
- ES = ELISA-Systems
- MI = Morinaga Institute ELISA Kit II
- NL = nutriLinia® Allergen-ELISA
- RS = Ridascreen®, R-Biopharm
- RS-F= Ridascreen® Fast, R-Biopharm
- ZL = Proteon ELISA, Zeulab

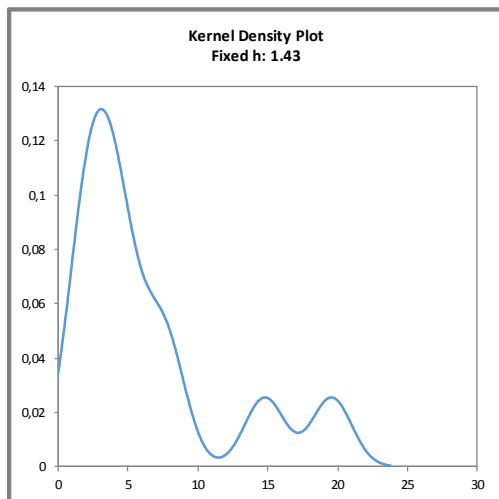


Abb. / Fig. 1:

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

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

Anmerkung:

Die Kerndichte-Schätzung zeigt annähernd eine symmetrische Verteilung der Ergebnisse mit einer leichten Schulter und zwei Nebenpeaks bei ca. 15 mg/kg (Methode BK) und ca. 20 mg/kg (Methode ES).

Kenndaten: Quantitative Auswertung ELISA: β -Lactoglobulin

Probe A

| Kenndaten | Alle Ergebnisse [mg/kg] |
|---|-----------------------------------|
| Zugewiesener Wert (X_{pt}) | X_{pt_ALL} |
| Anzahl der Messergebnisse | 11 |
| Anzahl der Ausreißer | - |
| Mittelwert | 6,49 |
| Median (X_{pt}) | 4,20 |
| Robuster Mittelwert | 5,51 |
| Robuste Standardabweichung (S^*) | 4,22 |
| Zielkenndaten: | |
| Zielstandardabweichung σ_{pt}' | 1,91 |
| Untere Grenze des Zielbereichs | 0,39 |
| Obere Grenze des Zielbereichs | 8,01 |
| Quotient S^*/σ_{pt}' | 2,2 |
| Standardunsicherheit $U_{(X_{pt})}$ | 1,59 |
| Ergebnisse im Zielbereich | 9 |
| Prozent im Zielbereich | 82 |

Anmerkungen zu den Kenndaten und Vergleich der Bezugswerte:

Die Kerndichte-Schätzung zeigte annähernd eine symmetrische Verteilung ohne eindeutige methodenabhängige Unterschiede.

Als zugewiesener Wert wurde der Median verwendet (vgl. 3.1).

Die Ergebnisse zeigten eine erhöhte Variabilität, daher wurde unter Berücksichtigung der Standardunsicherheit mittels z'-Score ausgewertet (vgl. 3.6 u. 3.8). Der Quotient S^*/σ_{pt}' liegt bei 2,2. Die robuste Standardabweichung ist erhöht und liegt oberhalb von etablierten Werten für die Wiederhol- und Vergleichsstandardabweichung der eingesetzten Bestimmungsmethoden (vgl. 3.4.2 Auswertung eines Versuchs zur Präzision und 3.4.3 Werte aus Erkenntnissen). Die Vergleichbarkeit der Ergebnisse ist für die methodenübergreifende Auswertung nur eingeschränkt gültig, da für einige Methoden nur wenige Ergebnisse vorlagen.

Der zugewiesene Wert (Median) der Auswertung der Ergebnisse alle Methoden lag mit 59% vom Zusatzniveau von β -Lactoglobulin zu Probe A innerhalb der relevanten Anforderungen für die eingesetzten Methoden (s. 3.4.3 und "Wiederfindungsraten für β -Lactoglobulin" S.29).

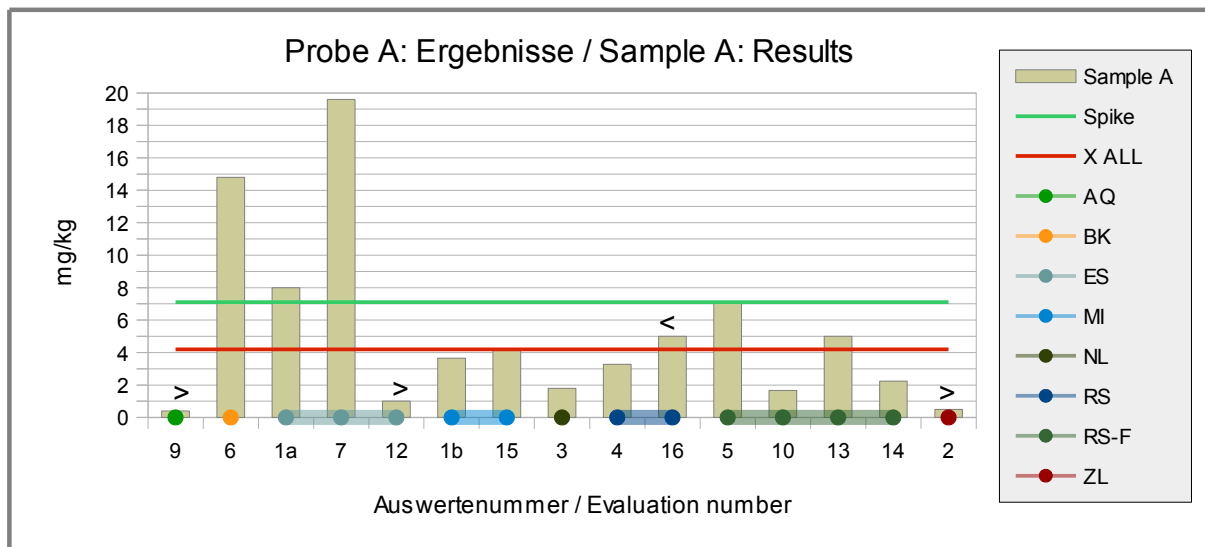


Abb./Fig. 2: ELISA-Ergebnisse β -Lactoglobulin
 grüne Linie = Zusatzniveau (Spike)
 rote Linie = Median aller Ergebnisse
 runde Symbole = Zuordnung der Methoden (s. Legende)

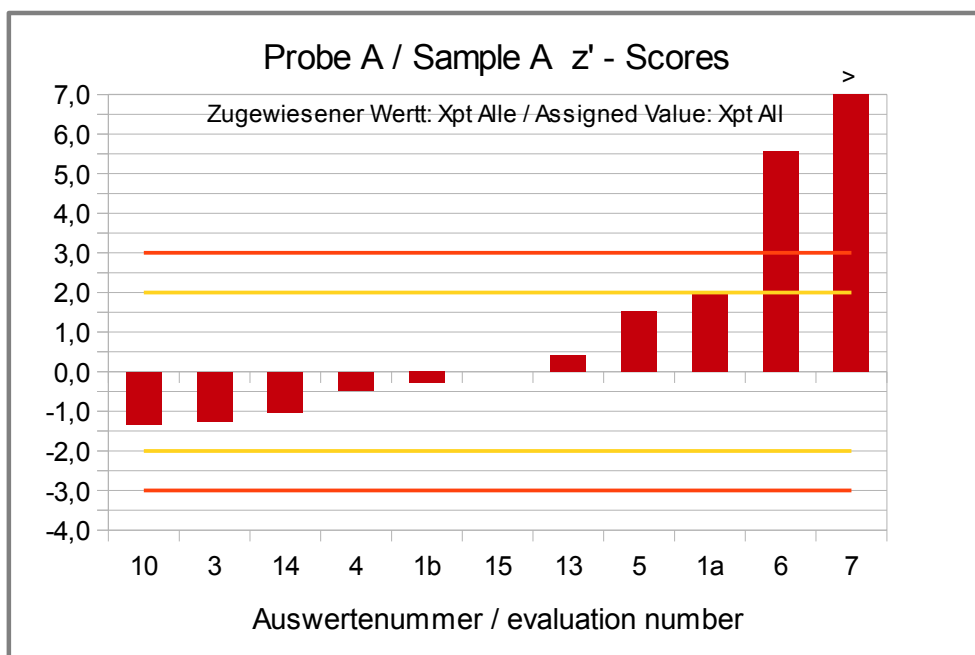


Abb./Fig. 3:
 z-Scores (ELISA-Ergebnisse β -Lactoglobulin)
 Zugewiesener Wert: Median aller Ergebnisse

Quantitative Auswertung ELISA: Dotierungsniveauprobe

| Auswertenummer | β -Lactoglobulin [mg/kg] | z'-Score $X_{pt_{ALL}}$ | Methode | Hinweis |
|----------------|-----------------------------------|----------------------------|---------|-------------------------------|
| 9 | >0,4 | | AQ | |
| 6 | 18,0 | 5,6 | BK | |
| 1a | 9,30 | 1,9 | ES | |
| 7 | 21,5 | 7,1 | ES | |
| 12 | >1 | | ES | |
| 1b | 4,83 | -0,06 | MI | Ergebnis umgerechnet ° |
| 15 | 4,70 | -0,11 | MI | |
| 3 | 1,90 | -1,3 | NL | |
| 4 | 3,70 | -0,55 | RS | |
| 16 | <5 | | RS | keine Positivprobe detektiert |
| 5 | 5,68 | 0,31 | RS-F | |
| 10 | 2,95 | -0,87 | RS-F | |
| 13 | 5,10 | 0,06 | RS-F | |
| 14 | | | RS-F | |
| 2 | >0,5 | | ZL | |

° Umrechnung S. 20

Methoden:

- AQ = AgraQuant, RomerLabs
- BK = BioKits, Neogen
- ES = ELISA-Systems
- MI = Morinaga Institute ELISA Kit II
- NL = nutriLinia® Allergen-ELISA
- RS = Ridascreen®, R-Biopharm
- RS-F= Ridascreen® Fast, R-Biopharm
- ZL = Proteon ELISA, Zeulab

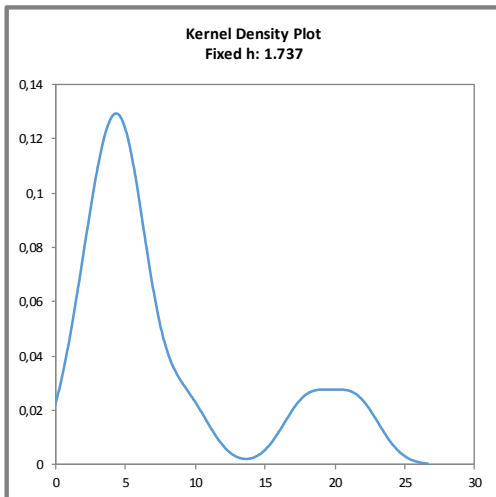


Abb. / Fig. 4:

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

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

Anmerkung:

Die Kerndichte-Schätzung zeigt annähernd eine symmetrische Verteilung der Ergebnisse mit einer leichten Schulter und zwei in einander übergehende Nebenpeaks bei ca. 18 mg/kg (Methode BK) und ca. 21,5 mg/kg (Methode ES).

Kenndaten: Quantitative Auswertung ELISA β -Lactoglobulin**Dotierungsniveauprobe**

| Kenndaten | Alle Ergebnisse [mg/kg] |
|---|-----------------------------------|
| Zugewiesener Wert (X_{pt}) | $X_{pt_{ALL}}$ |
| Anzahl der Messergebnisse | 10 |
| Anzahl der Ausreißer | - |
| Mittelwert | 7,77 |
| Median (X_{pt}) | 4,97 |
| Robuster Mittelwert | 6,62 |
| Robuste Standardabweichung (S^*) | 4,95 |
| <i>Zielkenndaten:</i> | |
| Zielstandardabweichung σ_{pt}' | 2,32 |
| Untere Grenze des Zielbereichs | 0,334 |
| Obere Grenze des Zielbereichs | 9,60 |
| <i>Quotient S^*/σ_{pt}'</i> | 2,1 |
| <i>Standardunsicherheit $U(X_{pt})$</i> | 1,95 |
| <i>Ergebnisse im Zielbereich</i> | 8 |
| <i>Prozent im Zielbereich</i> | 80 |

Anmerkungen zu den Kenndaten und Vergleich der Bezugswerte:

Die Kerndichte-Schätzung zeigte annähernd eine symmetrische Verteilung ohne eindeutige methodenabhängige Unterschiede.

Als zugewiesener Wert wurde der Median verwendet (vgl. 3.1).

Die Ergebnisse zeigten eine erhöhte Variabilität, daher wurde unter Berücksichtigung der Standardunsicherheit mittels z' -Score ausgewertet (vgl. 3.6 u. 3.8). Der Quotient S^*/σ_{pt}' liegt bei 2,1. Die robuste Standardabweichung ist erhöht und liegt oberhalb von etablierten Werten für die Wiederhol- und Vergleichsstandardabweichung der eingesetzten Bestimmungsmethoden (vgl. 3.4.2 Auswertung eines Versuchs zur Präzision und 3.4.3 Werte aus Erkenntnissen). Die Vergleichbarkeit der Ergebnisse ist für die methodenübergreifende Auswertung nur eingeschränkt gültig, da für einige Methoden nur wenige Ergebnisse vorlagen.

Der zugewiesene Wert (Median) der Auswertung der Ergebnisse aller Methoden lag mit 64% vom Zusatzniveau von β -Lactoglobulin zur Dotierungsniveauprobe innerhalb der relevanten Anforderungen für die eingesetzten Methoden (s. 3.4.3 und "Wiederfindungsraten für β -Lactoglobulin" S.29).

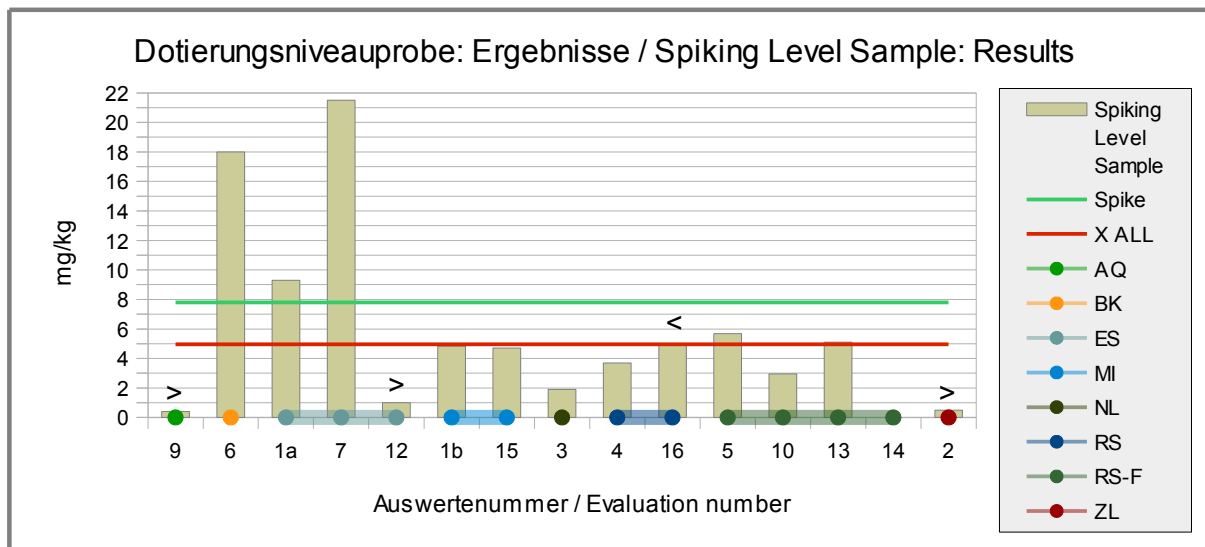


Abb./Fig. 5: ELISA-Ergebnisse β -Lactoglobulin
 grüne Linie = Zusatzniveau (Spike)
 rote Linie = Median aller Ergebnisse
 runde Symbole = Zuordnung der Methoden (s. Legende)

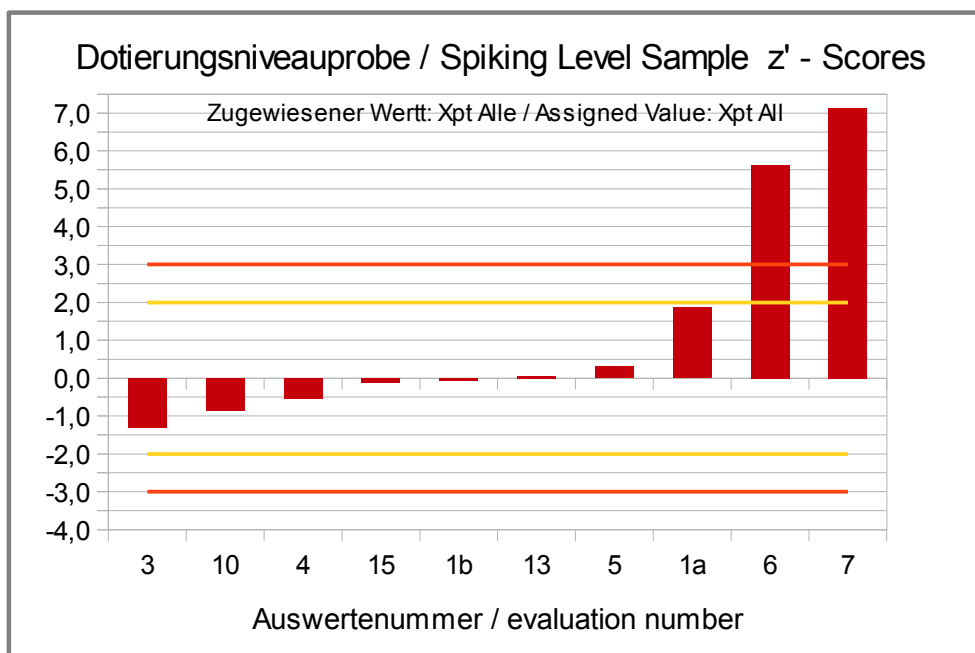


Abb./Fig. 6:
 z'-Scores (ELISA-Ergebnisse β -Lactoglobulin)
 Zugewiesener Wert: Median aller Ergebnisse

**Wiederfindungsraten ELISA für β -Lactoglobulin:
Dotierungsniveauprobe und Probe A**

| Auswertenummer | Dotierungsniveauprobe | Wiederfindungsrate* | Probe A | Wiederfindungsrate* | Methode | Hinweis |
|----------------|-----------------------|---------------------|---------|---------------------|---------|------------------------|
| | [mg/kg] | [%] | [mg/kg] | [%] | | |
| 9 | >0,4 | | >0,4 | | AQ | |
| 6 | 18,0 | 231 | 14,8 | 208 | BK | |
| 1a | 9,30 | 119 | 8,00 | 113 | ES | |
| 7 | 21,5 | 276 | 19,6 | 276 | ES | |
| 12 | >1 | | >1 | | ES | |
| 1b | 4,83 | 62 | 3,66 | 52 | MI | Ergebnis umgerechnet ° |
| 15 | 4,70 | 60 | 4,20 | 59 | MI | |
| 3 | 1,90 | 24 | 1,80 | 25 | NL | |
| 4 | 3,70 | 47 | 3,28 | 46 | RS | |
| 16 | <5 | | <5 | | RS | |
| 5 | 5,68 | 73 | 7,10 | 100 | RS-F | |
| 10 | 2,95 | 38 | 1,66 | 23 | RS-F | |
| 13 | 5,10 | 65 | 5,00 | 70 | RS-F | |
| 14 | | | 2,24 | 32 | RS-F | |
| 2 | >0,5 | | >0,5 | | ZL | |

° Umrechnung S. 20

| AB** | 50-150 % | AB** | 50-150 % |
|---------------|-----------|---------------|-----------|
| Anzahl im AB | 5 | Anzahl im AB | 5 |
| Prozent im AB | 50 | Prozent im AB | 45 |

* Wiederfindungsrate 100% Bezugsgröße: beta-Lactoglobulin, s. Seite 5

** Akzeptanzbereich der AOAC für Allergen-ELISAs

Methoden:

AQ = AgraQuant, RomerLabs
 BK = BioKits, Neogen
 ES = ELISA-Systeme
 MI = Morinaga Institute ELISA Kit II
 NL = nutrilinia® Allergen-ELISA
 RS = Ridascreen®, R-Biopharm
 RS-F= Ridascreen® Fast, R-Biopharm
 ZL = Proteon ELISA, Zeulab

Anmerkung:

50% (5) der Teilnehmer haben mit der Dotierungsniveauprobe mittels ELISA eine Wiederfindungsrate im Bereich der AOAC-Anforderung von 50-150% erhalten. Für die dotierte Lebensmittelmatrix-Probe A lagen 45% (5) der Wiederfindungsraten in diesem Akzeptanzbereich.

4.2 Vergleichsuntersuchung Casein / Milchprotein

4.2.1 ELISA-Ergebnisse: Casein

Qualitative Auswertung der Ergebnisse: Proben A und B

| Auswertenummer | Probe A | Probe A | Probe B | Probe B | Qualitative Bewertung | Methode | Hinweis |
|----------------|---------|---------|---------|---------|-------------------------------------|---------|------------------------|
| | pos/neg | [mg/kg] | pos/neg | [mg/kg] | Übereinstimmungen mit Konsenswerten | | |
| 6 | positiv | 61,0 | negativ | | 2/2 (100%) | AQ | |
| 12 | positiv | >2,6 | negativ | <0,26 | 2/2 (100%) | ES | Ergebnis umgerechnet ° |
| 1a | positiv | 33,3 | negativ | N/A | 2/2 (100%) | ES | Ergebnis umgerechnet ° |
| 9 | positiv | >6,0 | negativ | 0 | 2/2 (100%) | IL | |
| 18 | positiv | 87,0 | negativ | < 0.01 | 2/2 (100%) | IL | |
| 1b | positiv | 45,2 | negativ | N/A | 2/2 (100%) | MI | Ergebnis umgerechnet ° |
| 3 | positiv | 59,5 | negativ | | 2/2 (100%) | NL | |
| 5 | positiv | 38,4 | negativ | <2.5 | 2/2 (100%) | RS-F | |
| 10 | positiv | 114 | negativ | | 2/2 (100%) | RS-F | |
| 13 | positiv | 75,0 | negativ | < 0,5 | 2/2 (100%) | RS-F | |
| 14 | positiv | >13,5 | negativ | <0,5 | 2/2 (100%) | RS-F | |
| 7 | positiv | 190 | negativ | <2,5 | 2/2 (100%) | VT | |
| 15 | positiv | 56,0 | negativ | <0,25 | 2/2 (100%) | div | |

° Umrechnung S. 20

| | Probe A | Probe B |
|-----------------|---------|---------|
| Anzahl positiv | 13 | 0 |
| Anzahl negativ | 0 | 13 |
| Prozent positiv | 100 | 0 |
| Prozent negativ | 0 | 100 |
| Konsenswert | positiv | negativ |

Methoden:

AQ = AgraQuant, RomerLabs

ES = ELISA-Systems

IL = Immunolab

MI = Morinaga Institute ELISA

NL = nutriLinia® Allergen-ELISA

RS-F= Ridascreeen® Fast, R-Biopharm

VT = Veratox, Neogen

div = keine genaue Angabe / andere Methode

div = not indicated / other method

Anmerkung:

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

Quantitative Auswertung ELISA: Probe A

| Auswertenummer | Casein [mg/kg] | z-Score $X_{pt_{ALL}}$ | Methode | Hinweis |
|----------------|-------------------|---------------------------|---------|--------------------------|
| 6 | 61,0 | -0,04 | AQ | |
| 12 | >2,6 | | ES | Ergebnis umgerechnet ° |
| 1a | 33,3 | -1,8 | ES | Ergebnis umgerechnet ° |
| 9 | >6,0 | | IL | |
| 18 | 87,0 | 1,6 | IL | |
| 1b | 45,2 | -1,1 | MI | Ergebnis umgerechnet ° |
| 3 | 59,5 | -0,14 | NL | |
| 5 | 38,4 | -1,5 | RS-F | |
| 10 | 114 | 3,4 | RS-F | |
| 13 | 75,0 | 0,87 | RS-F | |
| 14 | >13,5 | | RS-F | |
| 7 | 190 | 8,3 | VT | Ausreißer ausgeschlossen |
| 15 | 56,0 | -0,36 | div | |

° Umrechnung S. 20

Methoden:

- AQ = AgraQuant, RomerLabs
- ES = ELISA-Systems
- IL = Immunolab
- MI = Morinaga Institute ELISA
- NL = nutrilinia® Allergen-ELISA
- RS-F= Ridascreen® Fast, R-Biopharm
- VT = Veratox, Neogen
- div = keine genaue Angabe / andere Methode
- div = not indicated / other method

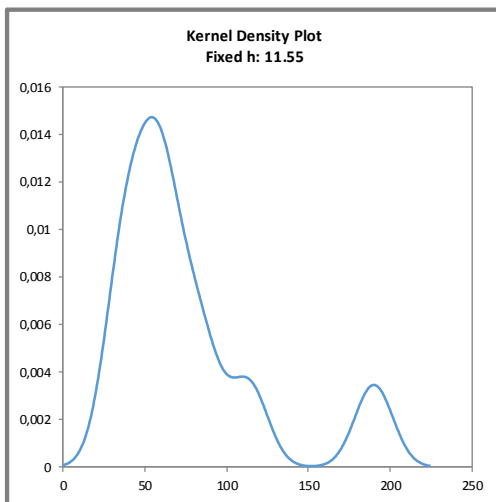


Abb. / Fig. 7:

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

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

Anmerkung:

Die Kerndichte-Schätzung zeigt annähernd eine symmetrische Verteilung der Ergebnisse mit einer Schulter bei 114 mg/kg (Methode RS-F) und einem Nebenpeak bei 190 mg/kg (Methode VT), der auf ein Ausreißer-Ergebnis zurückgeht (ggf. wurde das Ergebnis irrtümlich als Casein angegeben, laut Testkit-Anleitung wird mit Magermilchpulver kalibriert).

Kenndaten: Quantitative Auswertung ELISA Casein**Probe A**

| Kenndaten | Alle Ergebnisse [mg/kg] |
|--|-----------------------------------|
| Zugewiesener Wert (X_{pt}) | X_{pt_ALL} |
| Anzahl der Messergebnisse [°] | 9 |
| Anzahl der Ausreißer | 1 |
| Mittelwert | 63,2 |
| Median | 59,5 |
| Robuster Mittelwert (X_{pt}) | 61,6 |
| Robuste Standardabweichung (S^*) | 24,9 |
| <i>Zielkenndaten:</i> | |
| Zielstandardabweichung σ_{pt} | 15,4 |
| Untere Grenze des Zielbereichs | 30,8 |
| Obere Grenze des Zielbereichs | 92,4 |
| Quotient S^*/σ_{pt} | 1,6 |
| Standardunsicherheit $U(X_{pt})$ | 10,4 |
| Ergebnisse im Zielbereich | 8 |
| Prozent im Zielbereich | 89 |

[°] ohne Ergebnis Nr. 7 (als Ausreißer ausgeschlossen)

Anmerkungen zu den Kenndaten und Vergleich der Bezugswerte:

Die Kerndichte-Schätzung zeigte annähernd eine symmetrische Verteilung mit einem Nebenpeak. Ein Ausreißer wurde vorab von der statistischen Auswertung ausgeschlossen.

Die Auswertungen der Ergebnisse aller Methoden zeigte eine normale Variabilität der Ergebnisse. Der Quotient S^*/σ_{pt} lag unter 2,0. Die robuste Standardabweichung liegt im Bereich von etablierten Werten für die Wiederhol- und Vergleichsstandardabweichung der eingesetzten Bestimmungsmethoden (vgl. 3.4.2 Auswertung eines Versuchs zur Präzision und 3.4.3 Werte aus Erkenntnissen). Die Vergleichbarkeit der Ergebnisse ist gegeben. Diese Aussage ist für die methodenübergreifende Auswertung nur eingeschränkt gültig, da für einige Methoden nur wenige Ergebnisse vorlagen.

Der zugewiesene Wert (robuster Mittelwert) der Auswertung der Ergebnisse aller Methoden lag mit 108% vom Zusatzniveau von Casein zu Probe A innerhalb der relevanten Anforderungen für die eingesetzten Methoden (s. 3.4.3 und "Wiederfindungsraten für Casein" S.37).

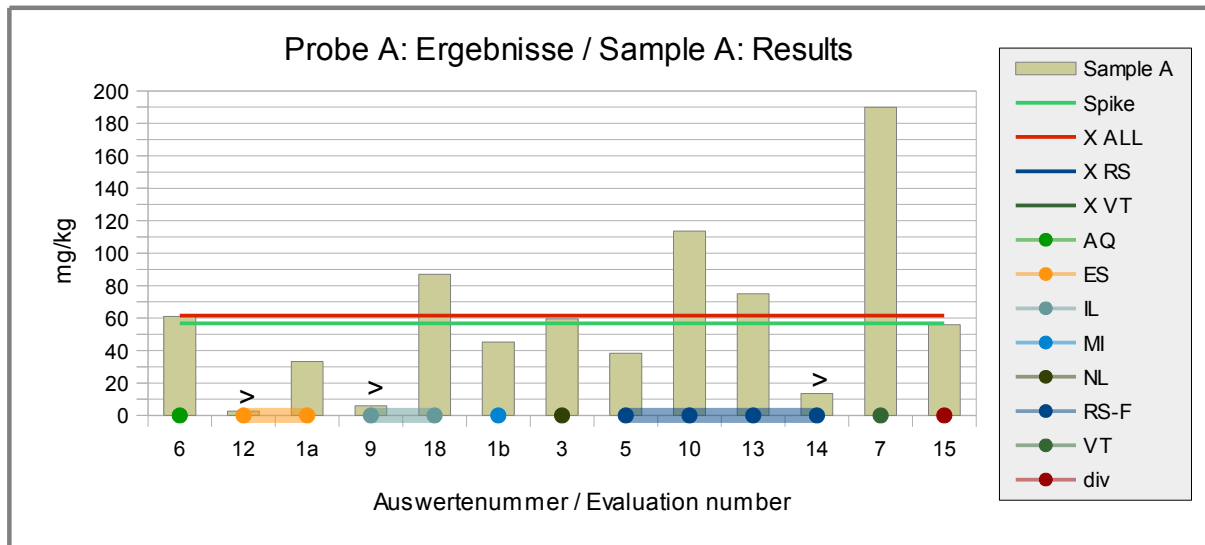


Abb./Fig. 8: ELISA-Ergebnisse Casein
 grüne Linie = Zusatzniveau (Spike)
 rote Linie = robuster Mittelwert aller Ergebnisse
 runde Symbole = Zuordnung der Methoden (s. Legende)

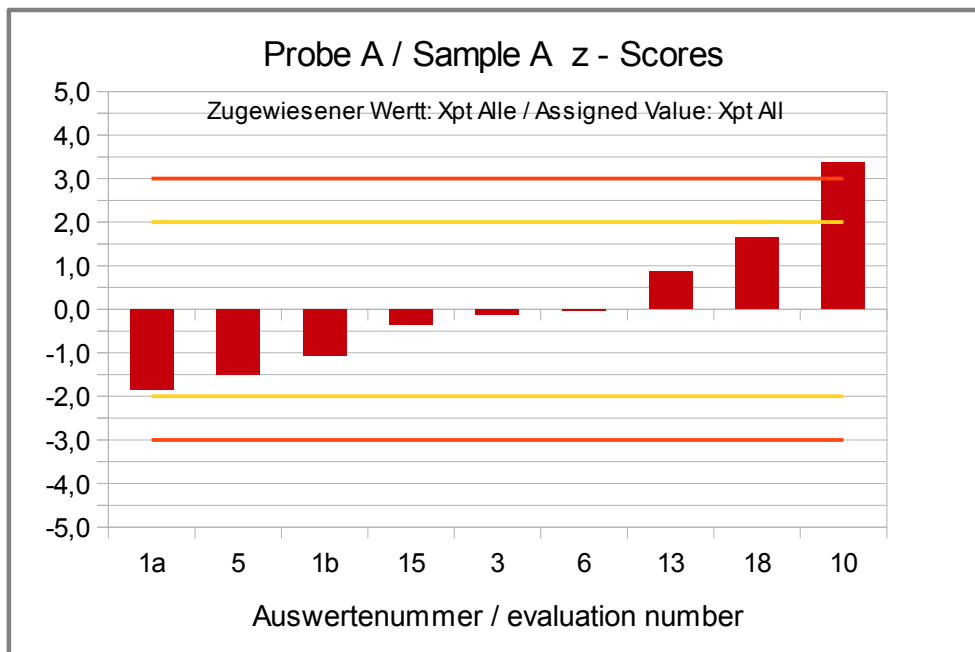


Abb./Fig. 9: z-Scores (ELISA-Ergebnisse Casein) Zugewiesener Wert: robuster Mittelwert aller Ergebnisse

Quantitative Auswertung ELISA: Dotierungsniveauprobe

| Auswertenummer | Casein [mg/kg] | z-Score X _{pt} ^{ALL} | Methode | Hinweis |
|----------------|-------------------|---|---------|--------------------------|
| 6 | 63,3 | -0,21 | AQ | |
| 12 | >2,6 | | ES | Ergebnis umgerechnet ° |
| 1a | 19,4 | -2,8 | ES | Ergebnis umgerechnet ° |
| 9 | >6,0 | | IL | |
| 18 | 75,0 | 0,50 | IL | |
| 1b | 85,4 | 1,1 | MI | Ergebnis umgerechnet ° |
| 3 | 60,5 | -0,37 | NL | |
| 5 | 35,1 | -1,9 | RS-F | |
| 10 | 87,3 | 1,2 | RS-F | |
| 13 | 103 | 2,2 | RS-F | |
| 14 | | | RS-F | |
| 7 | 207 | 8,4 | VT | Ausreißer ausgeschlossen |
| 15 | 67,0 | 0,02 | div | |

° Umrechnung S. 20

Methoden:

- AQ = AgraQuant, RomerLabs
- ES = ELISA-Systems
- IL = Immunolab
- MI = Morinaga Institute ELISA
- NL = nutriLinia® Allergen-ELISA
- RS-F= Ridascreen® Fast, R-Biopharm
- VT = Veratox, Neogen
- div = keine genaue Angabe / andere Methode
- div = not indicated / other method

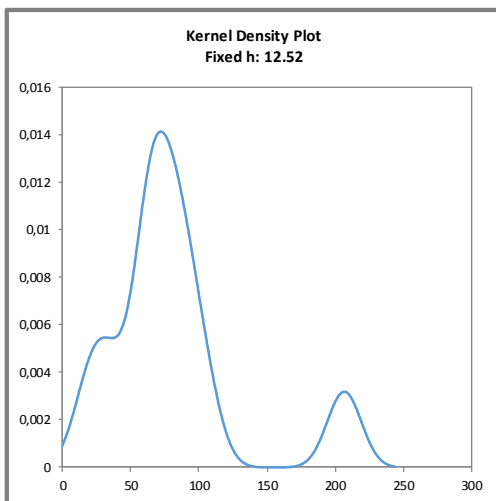


Abb. / Fig. 10:

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

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

Anmerkung:

Die Kerndichte-Schätzung zeigt annähernd eine symmetrische Verteilung der Ergebnisse mit einer Schulter bei ca. 20 mg/kg (Methode ES) und einem Nebenpeak bei 207 mg/kg (Methode VT), der auf ein Ausreißer-Ergebnis zurückgeht (ggf. wurde das Ergebnis irrtümlich als Casein angegeben, laut Testkit-Anleitung wird mit Magermilchpulver kalibriert).

Kenndaten: Quantitative Auswertung ELISA Casein**Dotierungsniveauprobe**

| Kenndaten | Alle Ergebnisse [mg/kg] |
|--|-----------------------------------|
| Zugewiesener Wert (X_{pt}) | X_{pt_ALL} |
| Anzahl der Messergebnisse [°] | 9 |
| Anzahl der Ausreißer | 1 |
| Mittelwert | 66,2 |
| Median | 67,0 |
| Robuster Mittelwert (X_{pt}) | 66,7 |
| Robuste Standardabweichung (S^*) | 28,4 |
| <i>Zielkenndaten:</i> | |
| Zielstandardabweichung σ_{pt} | 16,7 |
| Untere Grenze des Zielbereichs | 33,4 |
| Obere Grenze des Zielbereichs | 100 |
| Quotient S^*/σ_{pt} | 1,7 |
| Standardunsicherheit $U(X_{pt})$ | 11,8 |
| Ergebnisse im Zielbereich | 7 |
| Prozent im Zielbereich | 78 |

[°] ohne Ergebnis Nr. 7 (als Ausreißer ausgeschlossen)

Anmerkungen zu den Kenndaten und Vergleich der Bezugswerte:

Die Kerndichte-Schätzung zeigte annähernd eine symmetrische Verteilung mit einem Nebenpeak. Ein Ausreißer wurde vorab von der statistischen Auswertung ausgeschlossen.

Die Auswertungen der Ergebnisse aller Methoden zeigte eine normale Variabilität der Ergebnisse. Der Quotient S^*/σ_{pt} lag unter 2,0. Die robuste Standardabweichung liegt im Bereich von etablierten Werten für die Wiederhol- und Vergleichsstandardabweichung der eingesetzten Bestimmungsmethoden (vgl. 3.4.2 Auswertung eines Versuchs zur Präzision und 3.4.3 Werte aus Erkenntnissen). Die Vergleichbarkeit der Ergebnisse ist gegeben. Diese Aussage ist für die methodenübergreifende Auswertung nur eingeschränkt gültig, da für einige Methoden nur wenige Ergebnisse vorlagen.

Der zugewiesene Wert (robuster Mittelwert) der Auswertung der Ergebnisse aller Methoden lag mit 107% vom Zusatzniveau von Casein zur Dotierungsniveauprobe innerhalb der relevanten Anforderungen für die eingesetzten Methoden (s. 3.4.3 und "Wiederfindungsraten für Casein" S.37).

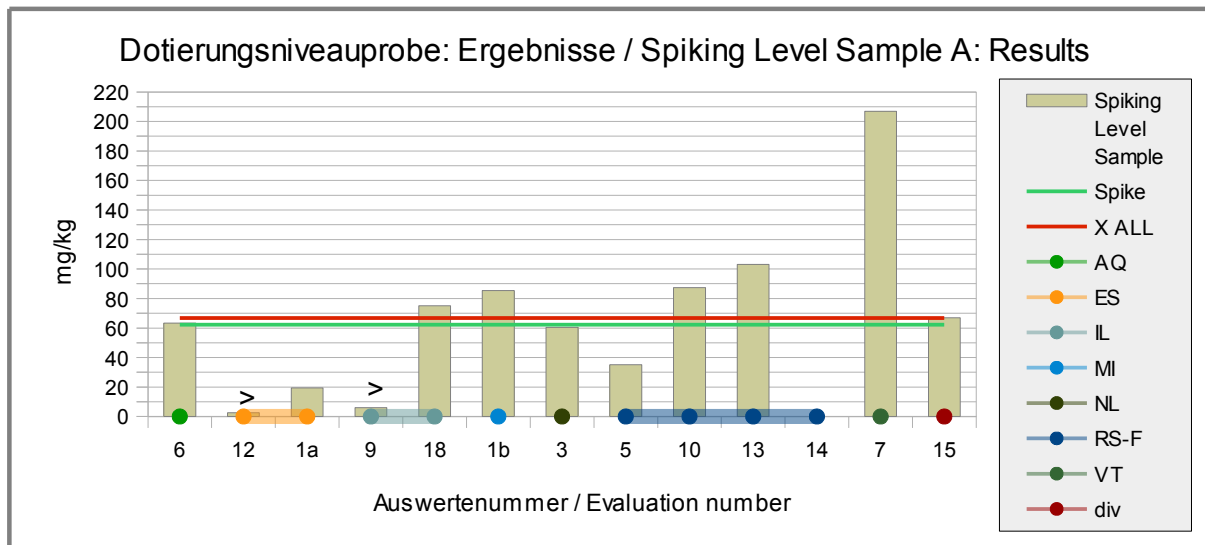


Abb./Fig. 11: ELISA-Ergebnisse Casein
 grüne Linie = Zusatzniveau (Spike)
 rote Linie = robuster Mittelwert aller Ergebnisse
 runde Symbole = Zuordnung der Methoden (s. Legende)

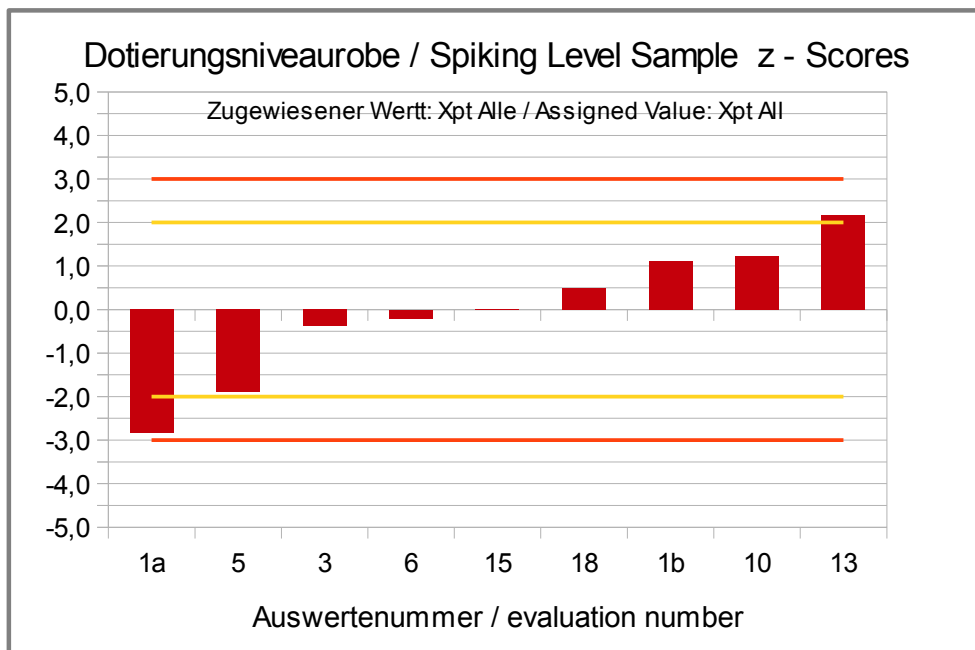


Abb./Fig. 12: z-Scores (ELISA-Ergebnisse Casein) Zugewiesener Wert: robuster Mittelwert aller Ergebnisse

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

| Auswertenummer | Dotierungsniveauprobe | Wiederfindungsrate* | Probe A | Wiederfindungsrate* | Methode | Hinweis |
|----------------|-----------------------|---------------------|---------|---------------------|---------|------------------------|
| | [mg/kg] | [%] | [mg/kg] | [%] | | |
| 6 | 63,3 | 102 | 61,0 | 107 | AQ | |
| 12 | >2,6 | | >2,6 | | ES | Ergebnis umgerechnet ° |
| 1a | 19,4 | 31 | 33,3 | 59 | ES | Ergebnis umgerechnet ° |
| 9 | >6,0 | | >6,0 | | IL | |
| 18 | 75,0 | 120 | 87,0 | 153 | IL | |
| 1b | 85,4 | 137 | 45,2 | 80 | MI | Ergebnis umgerechnet ° |
| 3 | 60,5 | 97 | 59,5 | 105 | NL | |
| 5 | 35,1 | 56 | 38,4 | 68 | RS-F | |
| 10 | 87,3 | 140 | 114 | 200 | RS-F | |
| 13 | 103 | 165 | 75,0 | 132 | RS-F | |
| 14 | | | >13,5 | | RS-F | |
| 7 | 207 | 332 | 190 | 334 | VT | |
| 15 | 67,0 | 108 | 56,0 | 99 | div | |

° Umrechnung S. 20

| AB** | 50-150 % | AB** | 50-150 % |
|---------------|-----------|---------------|-----------|
| Anzahl im AB | 7 | Anzahl im AB | 7 |
| Prozent im AB | 70 | Prozent im AB | 70 |

* Wiederfindungsrate 100% Bezugsgröße: Casein, s. Seite 5

** Akzeptanzbereich der AOAC für Allergen-ELISAs

Methoden:

- AQ = AgraQuant, RomerLabs
- ES = ELISA-Systeme
- IL = Immunolab
- MI = Morinaga Institute ELISA
- NL = nutriLinia® Allergen-ELISA
- RS-F= Ridascreen® Fast, R-Biopharm
- VT = Veratox, Neogen
- div = keine genaue Angabe / andere Methode

Anmerkung:

70% (7) der Teilnehmer haben mit der Dotierungsniveauprobe mittels ELISA eine Wiederfindungsrate im Bereich der AOAC-Anforderung von 50-150% erhalten. Für die dotierte Lebensmittelmatrix-Probe A lagen ebenfalls 70% (7) der Wiederfindungsraten in diesem Akzeptanzbereich.

4.2.2 ELISA-Ergebnisse: Milch (als Milchprotein)

Qualitative Auswertung der Ergebnisse: Proben A und B

| Auswertenummer | Probe A | Probe A | Probe B | Probe B | Qualitative Bewertung | Methode | Hinweis |
|----------------|---------|---------|---------|---------|-------------------------------------|---------|------------------------|
| | pos/neg | [mg/kg] | pos/neg | [mg/kg] | Übereinstimmungen mit Konsenswerten | | |
| 9 | positiv | >10 | negativ | 0 | 1/1 (100%) | AQ | |
| 17 | positiv | 18,0 | positiv | 2,00 | 1/1 (100%) | RS-F | |
| 12 | positiv | >8,3 | negativ | <0,83 | 1/1 (100%) | VT | Ergebnis umgerechnet ° |

° Umrechnung S. 20

| | Probe A | Probe B |
|-----------------|---------|---------|
| Anzahl positiv | 3 | 1 |
| Anzahl negativ | 0 | 2 |
| Prozent positiv | 100 | 33 |
| Prozent negativ | 0 | 67 |
| Konsenswert | positiv | keiner |

Methoden:

AQ = AgraQuant, RomerLabs
 RS-F= Ridascreen® Fast, R-Biopharm
 VT = Veratox, Neogen

Anmerkung:

Der Konsenswert für Probe A steht in qualitativer Übereinstimmung mit der Dotierung von Probe A. Für Probe B wurde ein positive Ergebnis erhalten.

Quantitative Auswertung ELISA: Probe A

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

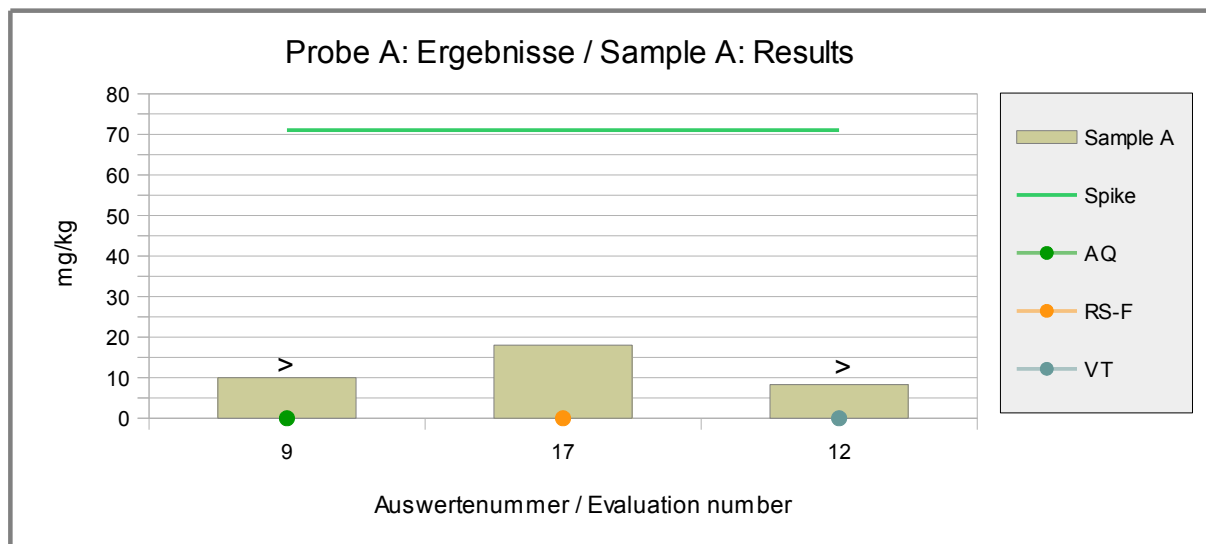


Abb./Fig. 13: ELISA-Ergebnisse Milch (als Milchprotein)
 grüne Linie = Zusatzniveau (Spike)
 runde Symbole = Zuordnung der Methoden (s. Legende)

Quantitative Auswertung der Ergebnisse: Dotierungsniveauprobe

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

| Auswertenummer | Milchprotein pos/neg | Milchprotein [mg/kg] | z-Score X _{pt} ^{ALL} | Methode | Hinweis |
|----------------|-------------------------|-------------------------|---|---------|------------------------|
| 9 | positiv | >10 | | AQ | |
| 17 | positiv | 71 | | RS-F | |
| 12 | positiv | >8,3 | | VT | Ergebnis umgerechnet ° |

° Umrechnung S. 20

| | |
|-----------------|---------|
| Anzahl positiv | 3 |
| Anzahl negativ | 0 |
| Prozent positiv | 100 |
| Prozent negativ | 0 |
| Konsenswert | positiv |

Methoden:

AQ = AgraQuant, RomerLabs
 RS-F= Ridascreen® Fast, R-Biopharm
 VT = Veratox, Neogen

Anmerkung:

Es wurden ausschließlich positive Ergebnisse für die Dotierungsniveauprobe erhalten.

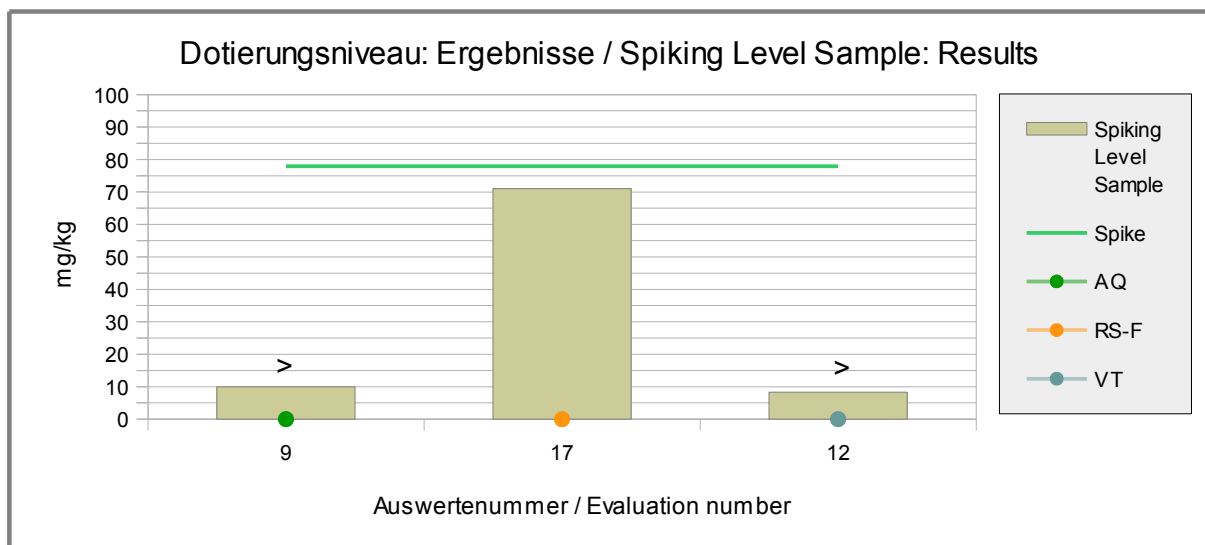


Abb./Fig. 14: ELISA-Ergebnisse Milch (als Milchprotein)
 grüne Linie = Zusatzniveau (Spike)
 runde Symbole = Zuordnung der Methoden (s. Legende)

**Wiederfindungsraten ELISA für Milch (als Milchprotein):
Dotierungsniveauprobe und Probe A**

| Auswertenummer | Dotierungsniveauprobe | Wiederfindungsrate* | Probe A | Wiederfindungsrate* | Methode | Hinweis |
|----------------|-----------------------|---------------------|---------|---------------------|---------|------------------------|
| | [mg/kg] | [%] | [mg/kg] | [%] | | |
| 9 | >10 | | >10 | | AQ | |
| 17 | 71 | 91 | 18 | 25 | RS-F | |
| 12 | >8,3 | | >8,3 | | VT | Ergebnis umgerechnet ° |

° Umrechnung S. 20

| AB** | 50-150 % | AB** | 50-150 % |
|---------------|----------|---------------|----------|
| Anzahl im AB | 1 | Anzahl im AB | 0 |
| Prozent im AB | 100 | Prozent im AB | 0 |

Methoden:

AQ = AgraQuant, RomerLabs

RS-F= Ridascreen® Fast, R-Biopharm

VT = Veratox, Neogen

* Wiederfindungsrate 100% Bezugsgröße: Milchprotein, s. Seite 5

** Akzeptanzbereich der AOAC für Allergen-ELISAs

Anmerkung:

Ein Teilnehmer hat quantitative Ergebnisse mittels ELISA eingereicht und mit der Dotierungsniveauprobe eine Wiederfindungsrate im Bereich der AOAC-Anforderung von 50-150% erhalten. Für die dotierte Lebensmittelmatrix-Probe A lag die Wiederfindungsrate unterhalb des Akzeptanzbereichs.

4.3 Vergleichsuntersuchung Weizen (Gluten / Weizen)

4.3.1 ELISA-Ergebnisse: Gluten

Qualitative Auswertung der Ergebnisse: Proben A und B

| Auswertenummer | Probe A | Probe A | Probe B | Probe B | Qualitative Bewertung | Methode | Hinweis |
|----------------|---------|---------|---------|---------|-----------------------|---------|---------|
| | pos/neg | [mg/kg] | pos/neg | [mg/kg] | | | |
| 15a | positiv | 60,0 | negativ | <3,12 | 2/2 (100%) | EF-Q | |
| 15b | positiv | 60,0 | positiv | 3,70 | 1/2 (50%) | EF-R5 | |
| 18 | positiv | 114 | negativ | < 0.6 | 2/2 (100%) | IL | |
| 1 | positiv | 42,7 | negativ | N/A | 2/2 (100%) | RS | |
| 2 | positiv | 73,7 | positiv | 7,00 | 1/2 (50%) | RS | |
| 3 | positiv | 62,6 | negativ | | 2/2 (100%) | RS | |
| 5 | positiv | 43,1 | negativ | <5 | 2/2 (100%) | RS | |
| 6 | positiv | 79,8 | negativ | | 2/2 (100%) | RS | |
| 7 | positiv | 57,5 | negativ | <5 | 2/2 (100%) | RS | |
| 8 | positiv | | negativ | | 2/2 (100%) | RS | |
| 10 | positiv | 51,6 | negativ | | 2/2 (100%) | RS | |
| 11 | positiv | 50,7 | negativ | < 5,0 | 2/2 (100%) | RS | |
| 12 | positiv | 67,0 | negativ | <5 | 2/2 (100%) | RS | |
| 14 | positiv | 43,3 | negativ | <5 | 2/2 (100%) | RS | |
| 16 | positiv | 62,6 | positiv | 5,85 | 1/2 (50%) | RS | |
| 17 | positiv | 19,0 | negativ | 0 | 2/2 (100%) | RS | |
| 15c | positiv | 51,0 | positiv | <5 | 1/2 (50%) | RS | |
| 9 | positiv | 27,2 | negativ | 0 | 2/2 (100%) | VT-R5 | |
| 13 | positiv | 64,0 | negativ | < 5 | 2/2 (100%) | div | |

| | Probe A | Probe B |
|-----------------|---------|---------|
| Anzahl positiv | 19 | 4 |
| Anzahl negativ | 0 | 15 |
| Prozent positiv | 100 | 21 |
| Prozent negativ | 0 | 79 |
| Konsenswert | positiv | negativ |

Methoden:

EF-Q = SensiSpec Ingezim Gluten R5 Quick, Eurofins

EF-R5 = SensiSpec Ingezim Gluten R5, Eurofins

IL = Immunolab

RS = Ridascreeen®, R-Biopharm

VT-R5 = Veratox, Neogen

div = keine genaue Angabe / andere Methode

div = not indicated / other method

Anmerkung:

Die Konsenswerte stehen in qualitativer Übereinstimmung mit der Dotierung von Probe A. Vier positive Ergebnisse, jeweils < 10 mg/kg oder unterhalb der Bestimmungsgrenze, wurden für Probe B erhalten.

Quantitative Auswertung ELISA: Probe A

| Auswertenummer | Gluten [mg/kg] | z-Score X _{ptALL} | z-Score X _{ptRS} | Methode | Hinweis |
|----------------|-------------------|-------------------------------|------------------------------|---------|---------|
| 15a | 60,0 | 0,26 | | EF-Q | |
| 15b | 60,0 | 0,26 | | EF-R5 | |
| 18 | 114 | 4,1 | | IL | |
| 1 | 42,7 | -1,0 | -0,90 | RS | |
| 2 | 73,7 | 1,2 | 1,4 | RS | |
| 3 | 62,6 | 0,45 | 0,55 | RS | |
| 5 | 43,1 | -0,94 | -0,87 | RS | |
| 6 | 79,8 | 1,7 | 1,8 | RS | |
| 7 | 57,5 | 0,08 | 0,18 | RS | |
| 8 | | | | RS | |
| 10 | 51,6 | -0,34 | -0,25 | RS | |
| 11 | 50,7 | -0,40 | -0,32 | RS | |
| 12 | 67,0 | 0,76 | 0,87 | RS | |
| 14 | 43,3 | -0,93 | -0,86 | RS | |
| 16 | 62,6 | 0,44 | 0,55 | RS | |
| 17 | 19,0 | -2,7 | -2,6 | RS | |
| 15c | 51,0 | -0,38 | -0,29 | RS | |
| 9 | 27,2 | -2,1 | | VT-R5 | |
| 13 | 64,0 | 0,55 | | div | |

Methoden:

EF-Q = SensiSpec Ingezim Gluten R5 Quick, Eurofins

EF-R5 = SensiSpec Ingezim Gluten R5, Eurofins

IL = Immunolab

RS = Ridascreen®, R-Biopharm

VT-R5 = Veratox, Neogen

div = keine genaue Angabe / andere Methode

div = not indicated / other method

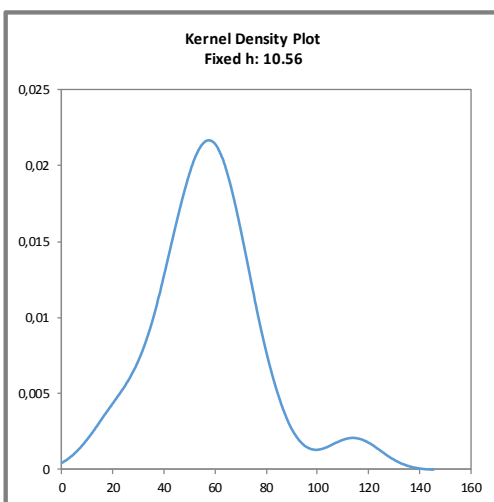


Abb. / Fig. 15:

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

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

Anmerkung:

Die Kerndichte-Schätzung zeigt annähernd eine symmetrische Verteilung der Ergebnisse mit einem Nebenpeak bei 114 mg/kg, der auf ein Einzelergebnis (Methode IL) zurückgeht.

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

| Kenndaten | Alle Ergebnisse [mg/kg] | Methode RS [mg/kg] |
|--|-----------------------------------|------------------------------|
| Zugewiesener Wert (X_{pt}) | X_{pt}_{ALL} | $X_{pt}_{METHOD RS}$ |
| Anzahl der Messergebnisse | 18 | 13 |
| Anzahl der Ausreißer | - | 0 |
| Mittelwert | 57,2 | 54,2 |
| Median | 58,8 | 51,6 |
| Robuster Mittelwert (X_{pt}) | 56,3 | 55,1 |
| Robuste Standardabweichung (S^*) | 16,4 | 15,0 |
| <i>Zielkenndaten:</i> | | |
| Zielstandardabweichung σ_{pt} | 14,1 | 13,8 |
| Untere Grenze des Zielbereichs | 28,2 | 27,5 |
| Obere Grenze des Zielbereichs | 84,5 | 82,6 |
| Quotient S^*/σ_{pt} | 1,2 | 1,1 |
| Standardunsicherheit $U(X_{pt})$ | 4,84 | 5,21 |
| Ergebnisse im Zielbereich | 15 | 12 |
| Prozent im Zielbereich | 83 | 92 |

Methode:

RS = R-Biopharm, Ridascreen®

Anmerkungen zu den Kenndaten und Vergleich der Bezugswerte:

Die Kerndichte-Schätzung zeigte annähernd eine symmetrische Verteilung ohne eindeutige methodenabhängige Unterschiede.

Die Auswertungen der Ergebnisse aller Methoden und von Methode RS zeigten eine normale bis geringe Variabilität der Ergebnisse. Die Quotienten S^*/σ_{pt} lagen jeweils unter 2,0. Die robuste Standardabweichung liegt im Bereich von etablierten Werten für die Wiederhol- und Vergleichsstandardabweichung der eingesetzten Bestimmungsmethoden (vgl. 3.4.2 Auswertung eines Versuchs zur Präzision und 3.4.3 Werte aus Erkenntnissen). Die Vergleichbarkeit der Ergebnisse ist gegeben. Diese Aussage ist für die methodenübergreifende Auswertung nur eingeschränkt gültig, da für einige Methoden nur wenige Ergebnisse vorlagen.

Die zugewiesenen Werte (robuster Mittelwerte) der Auswertungen lagen mit 149% bzw. 146% vom Zusatzniveau von Gluten zu Probe A, innerhalb der relevanten Anforderungen für die eingesetzten Methoden (s. 3.4.3 und "Wiederfindungsraten für Gluten", S.50).

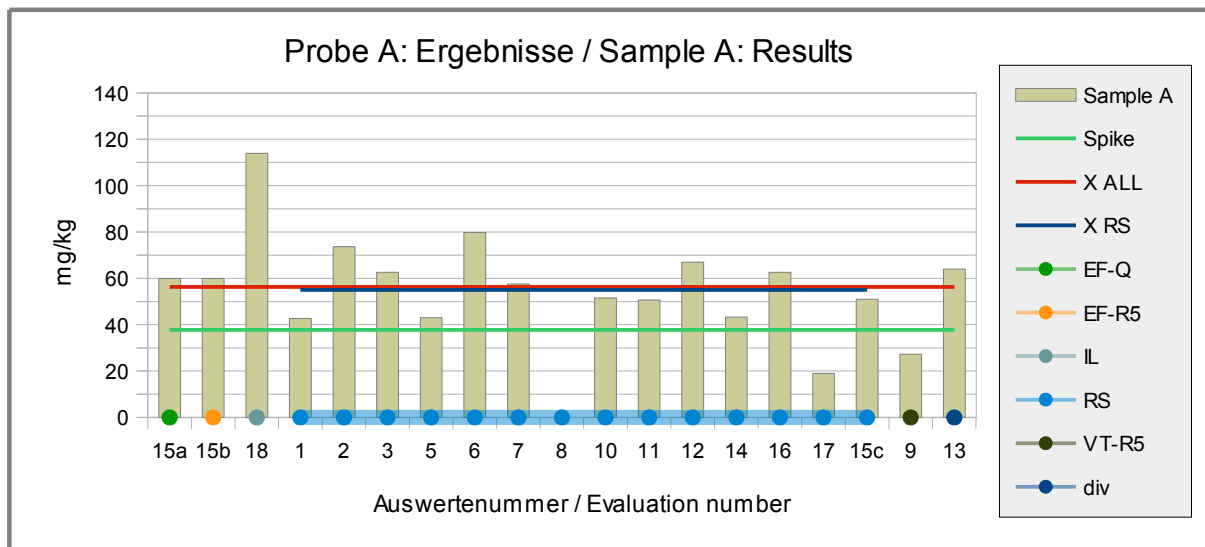


Abb./Fig. 16: ELISA-Ergebnisse Gluten
 grüne Linie = Zusatzniveau (Spike)
 rote Linie = robuster Mittelwert aller Ergebnisse
 blaue Linie = robuster Mittelwert Ergebnisse Methode RS
 runde Symbole = Zuordnung der Methoden (s. Legende)

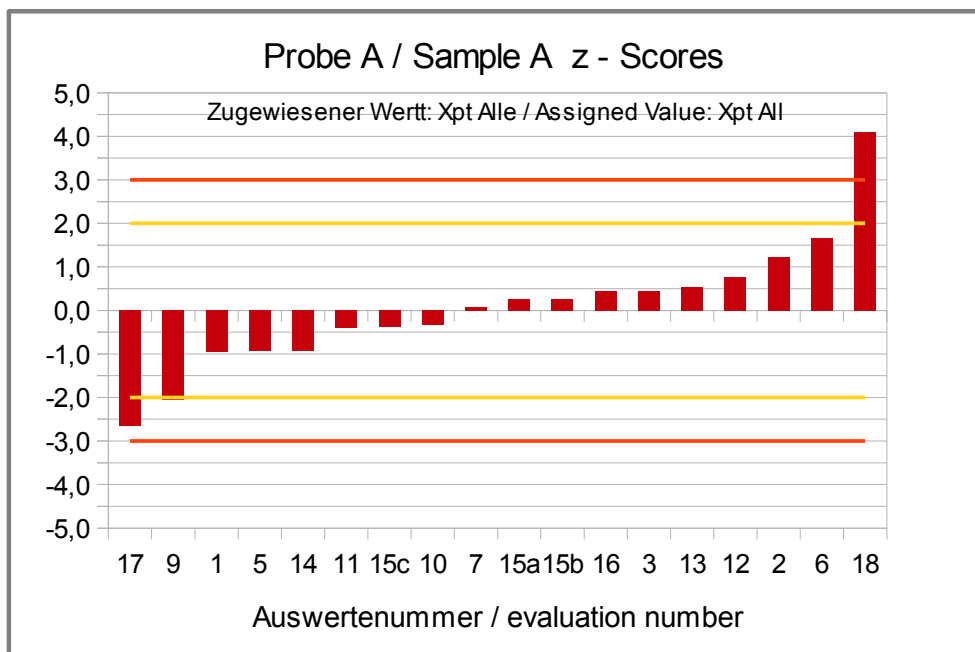


Abb./Fig. 17:
 z-Scores (ELISA-Ergebnisse Gluten)
 Zugewiesener Wert: robuster Mittelwert aller Ergebnisse

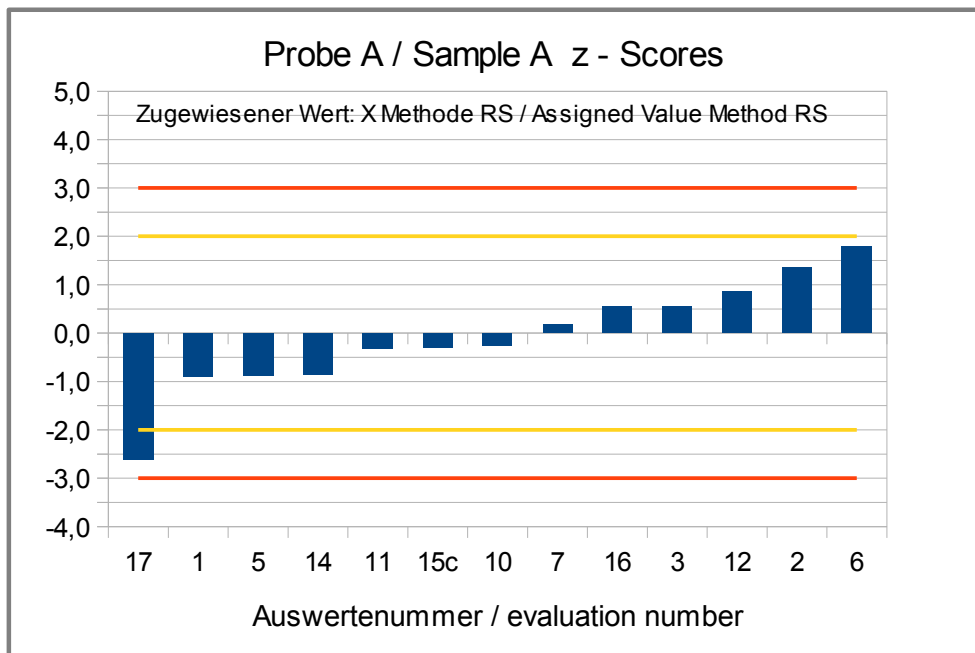


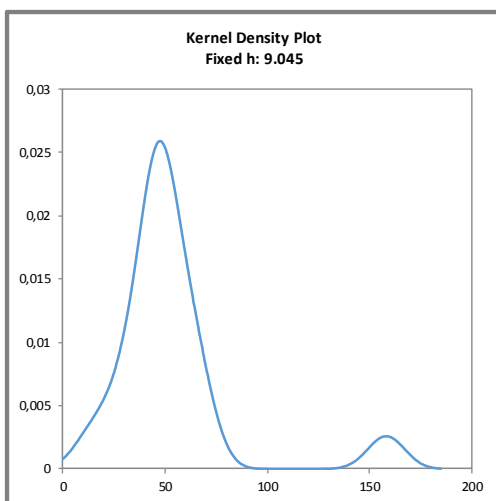
Abb./Fig. 18:

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

Quantitative Auswertung ELISA: Dotierungsniveauprobe

| Auswertenummer | Dotierungsniveauprobe [mg/kg] | z-Score X _{pt,ALL} | z-Score X _{pt,RS} | Methode | Hinweis |
|----------------|----------------------------------|--------------------------------|-------------------------------|---------|---------|
| 15a | 63,0 | 1,2 | | EF-Q | |
| 15b | 48,0 | -0,02 | | EF-R5 | |
| 18 | 158 | 9,1 | | IL | |
| 1 | 49,0 | 0,06 | 0,31 | RS | |
| 2 | 55,7 | 0,62 | 0,91 | RS | |
| 3 | 49,8 | 0,13 | 0,38 | RS | |
| 5 | 31,3 | -1,4 | -1,2 | RS | |
| 6 | 67,5 | 1,6 | 1,9 | RS | |
| 7 | 46,6 | -0,14 | 0,10 | RS | |
| 8 | | -4,0 | | RS | |
| 10 | 45,3 | -0,24 | -0,01 | RS | |
| 11 | 46,8 | -0,12 | 0,12 | RS | |
| 12 | 43,0 | -0,44 | -0,21 | RS | |
| 14 | | -4,0 | -4,0 | RS | |
| 16 | 39,8 | -0,70 | -0,50 | RS | |
| 17 | 14,0 | -2,8 | -2,8 | RS | |
| 15c | 47,0 | -0,10 | 0,14 | RS | |
| 9 | 28,0 | -1,7 | | VT-R5 | |
| 13 | 63,0 | 1,2 | | div | |

° Umrechnung S. 20



Methoden:

- EF-Q = SensiSpec Ingezim Gluten R5 Quick, Eurofins
- EF-R5 = SensiSpec Ingezim Gluten R5, Eurofins
- IL = Immunolab
- RS = Ridascreen®, R-Biopharm
- VT-R5 = Veratox, Neogen
- div = keine genaue Angabe / andere Methode
- div = not indicated / other method

Abb. / Fig. 19:

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

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

Anmerkung:

Die Kerndichte-Schätzung zeigt annähernd eine symmetrische Verteilung der Ergebnisse mit einem Nebenpeak bei 158 mg/kg, der auf ein Einzelergebnis (Methode IL) zurückgeht.

Kenndaten: Quantitative Auswertung ELISA Gluten**Dotierungsniveauprobe**

| Kenndaten | Alle Ergebnisse [mg/kg] | Methode RS [mg/kg] |
|--|-----------------------------------|------------------------------|
| Zugewiesener Wert (X_{pt}) | X_{pt}_{ALL} | $X_{pt}_{METHOD RS}$ |
| Anzahl der Messergebnisse | 17 | 12 |
| Anzahl der Ausreißer | - | - |
| Mittelwert | 52,7 | 44,7 |
| Median | 47,0 | 46,7 |
| Robuster Mittelwert (X_{pt}) | 48,3 | 45,4 |
| Robuste Standardabweichung (S^*) | 14,5 | 9,71 |
| <i>Zielkenndaten:</i> | | |
| Zielstandardabweichung σ_{pt} | 12,1 | 11,4 |
| Untere Grenze des Zielbereichs | 24,1 | 22,7 |
| Obere Grenze des Zielbereichs | 72,4 | 68,1 |
| Quotient S^*/σ_{pt} | 1,2 | 0,86 |
| Standardunsicherheit $U(X_{pt})$ | 4,41 | 3,50 |
| Ergebnisse im Zielbereich | 15 | 11 |
| Prozent im Zielbereich | 88 | 92 |

Methoden:

RS= R-Biopharm, Ridascreen®

Anmerkungen zu den Kenndaten und Vergleich der Bezugswerte:

Die Kerndichte-Schätzung zeigte annähernd eine symmetrische Verteilung ohne eindeutige methodenabhängige Unterschiede.

Die Verteilung der Ergebnisse aller Methoden sowie für Methode RS zeigten jeweils eine normale Variabilität. Die Quotienten S^*/σ_{pt} lagen deutlich unter 2,0. Die robusten Standardabweichungen liegen im Bereich von etablierten Werten für die Wiederhol- und Vergleichsstandardabweichung der eingesetzten Bestimmungsmethoden (vgl. 3.4.2 Auswertung eines Versuchs zur Präzision und 3.4.3 Werte aus Erkenntnissen). Die Vergleichbarkeit der Ergebnisse ist gegeben. Diese Aussage ist für die methodenübergreifende Auswertung nur eingeschränkt gültig, da für einige Methoden nur wenige Ergebnisse vorlagen.

Die robusten Mittelwerte der Auswertungen lagen mit 134% bzw. 126% vom Zusatzniveau von Gluten zur Dotierungsniveauprobe innerhalb der relevanten Anforderungen für die eingesetzten Methoden (s. 3.4.3 und "Wiederfindungsraten für Gluten", S.50).

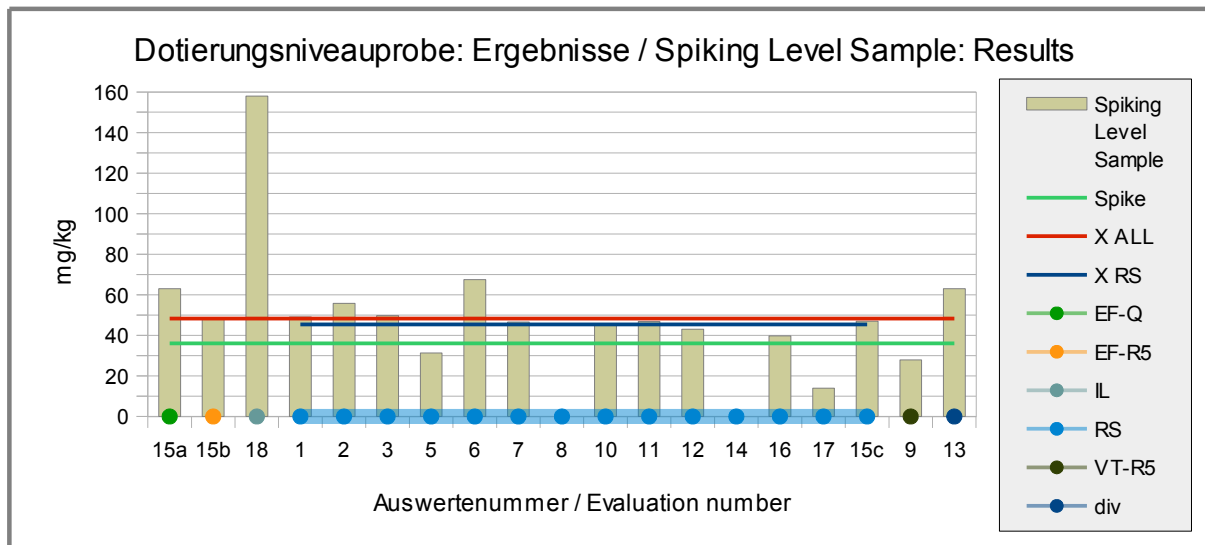


Abb./Fig. 20: ELISA-Ergebnisse Gluten
 grüne Linie = Zusatzniveau (Spike)
 rote Linie = robuster Mittelwert aller Ergebnisse
 blaue Linie = robuster Mittelwert Ergebnisse Methode RS
 runde Symbole = Zuordnung der Methoden (s. Legende)

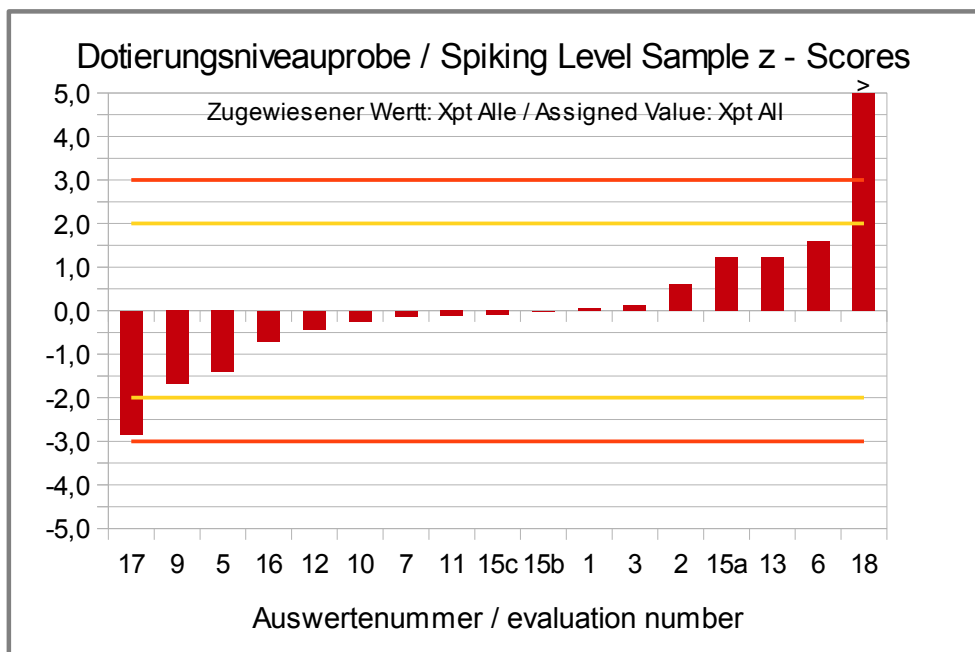


Abb./Fig. 21: z-Scores (ELISA-Ergebnisse Gluten) Zugewiesener Wert: robuster Mittelwert aller Ergebnisse

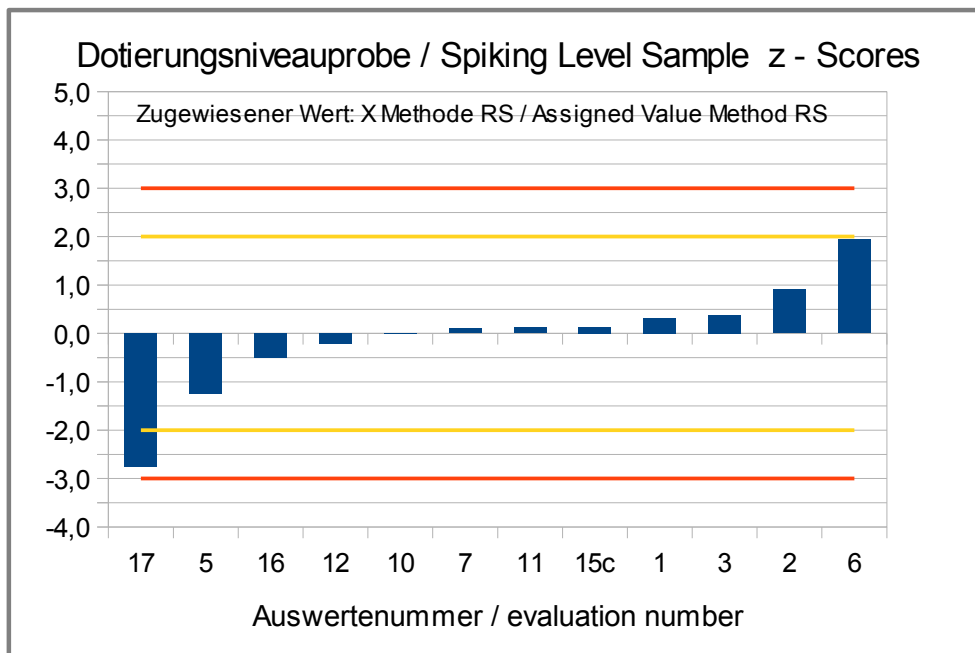


Abb./Fig. 22:

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

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

| Auswertenummer | Dotierungsniveauprobe | Wiederfindungsrate* | Probe A | Wiederfindungsrate* | Methode | Hinweis |
|----------------|-----------------------|---------------------|---------|---------------------|---------|---------|
| | [mg/kg] | [%] | [mg/kg] | [%] | | |
| 15a | 63,0 | 175 | 60,0 | 159 | EF-Q | |
| 15b | 48,0 | 133 | 60,0 | 159 | EF-R5 | |
| 18 | 158 | 438 | 114 | 302 | IL | |
| 1 | 49,0 | 136 | 42,7 | 113 | RS | |
| 2 | 55,7 | 154 | 73,7 | 195 | RS | |
| 3 | 49,8 | 138 | 62,6 | 166 | RS | |
| 5 | 31,3 | 87 | 43,1 | 114 | RS | |
| 6 | 67,5 | 187 | 79,8 | 212 | RS | |
| 7 | 46,6 | 129 | 57,5 | 153 | RS | |
| 8 | | | | | RS | |
| 10 | 45,3 | 125 | 51,6 | 137 | RS | |
| 11 | 46,8 | 130 | 50,7 | 134 | RS | |
| 12 | 43,0 | 119 | 67,0 | 178 | RS | |
| 14 | | | 43,3 | 115 | RS | |
| 16 | 39,8 | 110 | 62,6 | 166 | RS | |
| 17 | 14,0 | 39 | 19,0 | 50 | RS | |
| 15c | 47,0 | 130 | 51,0 | 135 | RS | |
| 9 | 28,0 | 77 | 27,2 | 72 | VT-R5 | |
| 13 | 63,0 | 175 | 64,0 | 170 | div | |

| AB** | 50-150 % | AB** | 50-150 % |
|---------------|-----------|---------------|-----------|
| Anzahl im AB | 11 | Anzahl im AB | 8 |
| Prozent im AB | 65 | Prozent im AB | 44 |

* Wiederfindungsrate 100% Bezugsgröße: Gluten, s. Seite 5

** Akzeptanzbereich der AOAC für Allergen-ELISAs

Methoden:

EF-Q = SensiSpec Ingezim Gluten R5 Quick, Eurofins

EF-R5 = SensiSpec Ingezim Gluten R5, Eurofins

IL = Immunolab

RS = Ridascreen®, R-Biopharm

VT-R5 = Veratox, Neogen

div = keine genaue Angabe / andere Methode

div = not indicated / other method

Anmerkung:

65% (11) der Teilnehmer haben mit der Dotierungsniveauprobe mittels ELISA eine Wiederfindungsrate im Bereich der AOAC-Anforderung von 50-150% erhalten. Für dotierte Lebensmittelmatrix-Probe A lagen 44% (8) der Wiederfindungsraten in diesem Akzeptanzbereich.

4.3.2 PCR-Ergebnisse: Gluten-haltige Getreide (Weizen)

Qualitative Auswertung der Ergebnisse: Proben A und B

| Auswertenummer | Probe A | Probe A | Probe B | Probe B | Qualitative Bewertung | Methode | Hinweis |
|----------------|---------|---------|---------|---------|-------------------------------------|---------|---------|
| | pos/neg | [mg/kg] | pos/neg | [mg/kg] | Übereinstimmungen mit Konsenswerten | | |
| 9 | positiv | | positiv | | - | 4L | |
| 15 | positiv | | positiv | | - | div | |

° Umrechnung S. 20

| | Probe A | Probe B |
|-----------------|---------|---------|
| Anzahl positiv | 2 | 2 |
| Anzahl negativ | 0 | 0 |
| Prozent positiv | 100 | 100 |
| Prozent negativ | 0 | 0 |
| Konsenswert | positiv | positiv |

Methoden:

4L = 4LAB Diagnostics
 div = keine genaue Angabe / andere Methode
 div = not indicated / other method

Anmerkung:

Der Konsenswert für Probe A steht in qualitativer Übereinstimmung mit der Dotierung von Probe A. Für die undotierte Probe B wurden ebenfalls positive Ergebnisse erhalten. Zum Vergleich: Mittels ELISA wurden für Probe B einige positive Ergebnisse mit Gluten-Gehalten von < 10 mg/kg ermittelt.

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: β -Lactoglobulin

| Meth. Abk. | Auswertenummer | Datum der Analyse | Ergebnis Probe A | | Ergebnis Probe B | | Ergebnis Dotierungsprobe | | NWG / LOD * | BG / LOQ * | MU* | Quantitatives Ergebnis als | Methode |
|------------|----------------|-------------------|------------------|--------|------------------|--------|--------------------------|--------|-------------|------------|------|----------------------------|--|
| | | | qualitativ | mg/kg | qualitativ | mg/kg | qualitativ | mg/kg | mg/kg | mg/kg | % | | |
| | | Tag/Monat | | | | | | | | | | | Test-Kit + Anbieter |
| AQ | 9 | 06.04.18 | positiv | >0,4 | positiv | 0,0087 | positiv | >0,4 | 0,0015 | 0,01 | 0,15 | beta-Lactoglobulin | AgraQuant ELISA β -Lactoglobulin COLAL 1048, RomerLabs |
| BK | 6 | 29.03.18 | positiv | 14,8 | negativ | | positiv | 18 | 2,5 | 2,5 | 20 | beta-Lactoglobulin | BioKits BLG Assay Kit, Neogen |
| ES | 1a | 09.04.17 | positiv | 8 | negativ | N/A | positiv | 9,3 | | 0,1 | 31,2 | beta-Lactoglobulin | ELISA Systems Beta-Lactoglobulin ESMRDLG-48 |
| ES | 7 | 21.03. | positiv | 19,6 | negativ | <0,1 | positiv | 21,5 | 0,05 | 0,1 | 16,8 | beta-Lactoglobulin | ELISA Systems Beta-Lactoglobulin ESMRDLG-48 |
| ES | 12 | | positiv | >1 | negativ | <0,1 | positiv | >1 | | 0,1 | | beta-Lactoglobulin | ELISA Systems Beta-Lactoglobulin ESMRDLG-48 |
| MI | 1b | 20.04.17 | positiv | 36,6MP | negativ | N/A | positiv | 48,3MP | | 0,312 | 50,6 | Milchproteine | Morinaga BLG ELISA Kit |
| Mi | 15 | 20.3. | positiv | 4,2 | negativ | <0,031 | positiv | 4,7 | 0,031 | 0,031 | | beta-Lactoglobulin | Morinaga β Lac ELISA Kit II M2112 |
| NL | 3 | 27.04.18 | - | 1,8 | negativ | | - | 1,9 | 0,0015 | 0,01 | | beta-Lactoglobulin | nutriLinia® Allergen-ELISA BLG-E NC6035 |
| RS | 4 | 08.03.18 | positiv | 3,28 | negativ | <2,63 | positiv | 3,7 | 0,79 | 2,63 | 31 | beta-Lactoglobulin | Ridascreen® β -Lactoglobulin R4901, R-Biopharm |
| RS | 16 | 23.03.18 | - | <5 | - | <5 | - | <5 | | | | Bitte auswählen! | r-biopharm RIDASCREEN β -Lactoglobulin |
| RS-F | 5 | 12.04.18 | positiv | 7,1 | negativ | <0,167 | positiv | 5,68 | 0,167 | 0,167 | 33,7 | beta-Lactoglobulin | Ridascreen® FAST β -Lactoglobulin R4902, R-Biopharm |
| RS-F | 10 | 21.03.-25.04. | positiv | 1,66 | negativ | | positiv | 2,95 | 0,07 | 0,2 | | Protein | Ridascreen® FAST β -Lactoglobulin R4902, R-Biopharm |
| RS-F | 13 | 20.03.18 | nachweisbar | 5 | negativ | < 0,5 | nachweisbar | 5,1 | | | | Protein | r-biopharm, beta-LG-Fast |
| RS-F | 14 | | positiv | 2,24 | negativ | <0,5 | - | | 0,19 | 0,5 | | beta-Lactoglobulin | Ridascreen® FAST β -Lactoglobulin R4902, R-Biopharm |
| ZL | 2 | 11.04.18 | positiv | >0,5 | positiv | 0,08 | positiv | >0,5 | 0,05 | 0,5 | 20 | beta-Lactoglobulin | other: ZEULAB - PROTEON MILK |

* NWG Nachweisgrenze / BG Bestimmungsgrenze

* LOD limit of detection / LOQ limit of quantitation

* MU Messunsicherheit / MU measurement uncertainty

Fortsetzung ELISA β -Lactoglobulin:

| Meth. Abk. | Auswertenummer | Spezifität | Hinweise zur Methode (Extraktion und Bestimmung) | Methode akkreditiert ISO/IEC 17025 | Sonstige Hinweise |
|------------|----------------|-------------------------|--|------------------------------------|---|
| | | Antikörper | z.B. Extraktionslösung / Zeit / Temperatur | ja/nein | |
| AQ | 9 | anti-beta-Lactoglobulin | | ja | Messbereich: 10 -400 ppb Kreuzreaktivität zu:: Schafmilch 0,2%, Ziegenmilch 0,002%, Casein 0,02%. |
| BK | 6 | beta-Lactoglobulin | | nein | |
| ES | 1a | β -Lactoglobulin | Testkit-Extraktionslösung / 15 min / 60°C | ja | |
| ES | 7 | | nach Herstellerangaben | ja | Quellende Probe wurde zeitweise fest während der Extraktion |
| ES | 12 | | | nein | |
| MI | 1b | β -Lactoglobulin | Extraktion 100 °C/10 mins | ja | |
| Mi | 15 | β Lactoglobulin | lt. Herstellerangaben | ja | β Lactoglobulin |
| NL | 3 | | | ja | |
| RS | 4 | Anti-BLG | Waschpuffer, 10 min., 50°C | nein | |
| RS | 16 | | | | R4901 |
| RS-F | 5 | nach Testkit-Anleitung | nach Testkit-Anleitung | ja | Proben wurden bei Reagenzienzugabe fest |
| RS-F | 10 | | | ja | NEU: Ridascreen® FAST β -Lactoglobulin R4912, R-Biopharm |
| RS-F | 13 | | | nein | |
| RS-F | 14 | | | ja | |
| ZL | 2 | | | | |

5.1.2 ELISA: Casein

| Meth. Abk. | Auswertenummer | Datum der Analyse | Ergebnis Probe A | | Ergebnis Probe B | | Ergebnis Dotierungsprobe | | NWG / LOD * | BG / LOQ * | MU* | Quantitatives Ergebnis als | Methode |
|------------|----------------|-------------------|------------------|-------|------------------|--------|--------------------------|-------|-------------|------------|-------|----------------------------|---|
| | | | qualitativ | mg/kg | qualitativ | mg/kg | qualitativ | mg/kg | mg/kg | mg/kg | % | | |
| | | Tag/Monat | | | | | | | | | | | Test-Kit + Anbieter |
| AQ | 6 | 21.03.18 | positiv | 61 | negativ | | positiv | 63,3 | 1 | 1 | 40 | Casein | AgraQuant Casein CO-KAL 1200, RomerLabs |
| ES | 12 | | positiv | >10 | negativ | <1 | positiv | >10 | | 1 | | Magermilchpulver | ELISA Systems Casein ES-CASPRD-48 |
| ES | 1a | 09.04.17 | positiv | 130 | negativ | N/A | positiv | 75,6 | | 1 | 30,7 | Magermilchpulver | ELISA Systems Casein ES-CASPRD-48 |
| IL | 9 | 09.04.18 | positiv | >6,0 | negativ | 0 | positiv | >6,0 | 0,04 | 0,2 | 0,15 | Casein | Immunolab Casein ELISA |
| IL | 18 | 19.03.18 | positiv | 87 | negativ | < 0.01 | positiv | 75 | 0.04 | 0.2 | | Casein | Immunolab Casein ELISA |
| MI | 1b | 21.04.17 | positiv | 56,5 | negativ | N/A | positiv | 106,7 | | 0,312 | 45,1 | Milchproteine | Morinaga Casein ELISA Kit |
| NL | 3 | 27.04.18 | - | 59,5 | negativ | | - | 60,5 | 0,05 | 0,2 | | Casein | nutriLinia® Allergen-ELISA Casein-E NC-6031 |
| RS-F | 5 | 24.04.18 | positiv | 38,36 | negativ | <2.5 | positiv | 35,07 | 2,5 | 2,5 | 31,97 | Casein | Ridascreen® FAST Casein R4612, R-Biopharm |
| RS-F | 10 | 21.03.-25.04. | positiv | 113,6 | negativ | | positiv | 87,3 | 0,12 | 0,5 | | Protein | Ridascreen® FAST Casein R4612, R-Biopharm |
| RS-F | 13 | 20.03.18 | nachweisbar | 75 | negativ | < 0,5 | nachweisbar | 103 | | | | Protein | r-Biopharm, Casein-Fast |
| RS-F | 14 | | positiv | >13,5 | negativ | <0,5 | - | | 0,12 | 1 | | Casein | Ridascreen® FAST Casein R4612, R-Biopharm |
| VT | 7 | 21.03. | positiv | 189,8 | negativ | <2,5 | positiv | 206,8 | 1 | 2,5 | 22 | Casein | Veratox Casein Allergen, Neogen |
| div | 15 | 20.3. | positiv | 56 | negativ | <0,25 | positiv | 67 | 0,25 | 0 | | Casein | Auswahl Casein-Kits: |

* NWG Nachweisgrenze / BG Bestimmungsgrenze
 * LOD limit of detection / LOQ limit of quantitation
 * MU Messunsicherheit / MU measurement uncertainty

| Meth. Abk. | Auswertenummer | Spezifität | Hinweise zur Methode (Extraktion und Bestimmung) | Methode akkreditiert ISO/IEC 17025 | Sonstige Hinweise |
|------------|----------------|------------------------|--|------------------------------------|---|
| | | Antikörper | z.B. Extraktionslösung / Zeit / Temperatur | ja/nein | |
| AQ | 6 | Casein | | nein | |
| ES | 12 | | | nein | |
| ES | 1a | Casein | Testkit-Extraktionslösung / 15 min / 60°C | ja | |
| IL | 9 | anti-Casein | | ja | Messbereich: 0,2-6ppm Kreuzreaktivität zu: Schafmilch 1,2%, Ziegenmilch 1,1%. |
| IL | 18 | | | | |
| MI | 1b | Casein | Extraktion 100 °C/10 min | ja | |
| NL | 3 | | | ja | |
| RS-F | 5 | nach Testkit-Anleitung | nach Testkit-Anleitung | ja | Proben wurden bei Reagenzienzugabe fest |
| RS-F | 10 | | | ja | |
| RS-F | 13 | | | nein | |
| RS-F | 14 | | | ja | |
| VT | 7 | | nach Herstellerangaben | ja | Quellende Probe wurde zeitweise fest während der Extraktion |
| div | 15 | Casein aus Kuhmilch | lt. Herstellerangaben | ja | Casein |

5.1.3 ELISA: Milchprotein

| Meth. Abk. | Auswertenummer | Datum der Analyse | Ergebnis Probe A | | Ergebnis Probe B | | Ergebnis Dotierungsprobe | | NWG / LOD * | BG / LOQ * | MU* | Quantitatives Ergebnis als | Methode |
|------------|----------------|-------------------|------------------|-------|------------------|-------|--------------------------|-------|-------------|------------|------|----------------------------|---|
| | | | qualitativ | mg/kg | qualitativ | mg/kg | qualitativ | mg/kg | mg/kg | mg/kg | % | | |
| | | Tag/Monat | | | | | | | | | | | Test-Kit + Anbieter |
| AQ | 9 | 24.04.18 | positiv | >10 | negativ | 0 | positiv | >10 | 0,05 | 0,4 | 0,15 | Milchproteine, gesamt | AgraQuant ELISA Milk COKAL2448, RomerLabs |
| RS-F | 17 | | positiv | 18 | positiv | 2 | positiv | 71 | 10 | 20 | 50 | Milchproteine, gesamt | Ridascreen® FAST Milk R4652, R-Biopharm |
| VT | 12 | | positiv | >25 | negativ | <2,5 | positiv | >25 | | 3 | | Magermilchpulver | Veratox Total Milk Allergen, Neogen |

* NWG Nachweisgrenze / BG Bestimmungsgrenze
 * LOD limit of detection / LOQ limit of quantitation
 * MU Messunsicherheit / MU measurement uncertainty

| Meth. Abk. | Auswertenummer | Spezifität | Hinweise zur Methode (Extraktion und Bestimmung) | Methode akkreditiert ISO/IEC 17025 | Sonstige Hinweise |
|------------|----------------|-------------------|--|------------------------------------|---|
| | | Antikörper | z.B. Extraktionslösung / Zeit / Temperatur | ja/nein | |
| AQ | 9 | anti-bovine Milch | | ja | Messbereich: 0,4 - 10 ppm Kreuzreaktivität zu: Schafmilch 0,94%, Ziegenmilch 0,01%. |
| RS-F | 17 | | | nein | |
| VT | 12 | | | ja | |

5.1.4 ELISA: Gluten

| Meth. Abk. | Auswertenummer | Datum der Analyse | Ergebnis Probe A | | Ergebnis Probe B | | Ergebnis Dotierungsprobe | | NWG / LOD * | BG / LOQ * | MU* | Quantitatives Ergebnis als | Methode |
|------------|----------------|-------------------|------------------|-------|------------------|-------|--------------------------|-------|-------------|------------|-------|----------------------------|---|
| | | | qualitativ | mg/kg | qualitativ | mg/kg | qualitativ | mg/kg | mg/kg | mg/kg | mg/kg | | |
| | | Tag/Monat | | | | | | | | | | | Test-Kit + Anbieter |
| EF-Q | 15a | 27.3. | - | 60 | negativ | <3,12 | positiv | 63 | 3,12 | 3,12 | | Gluten | SENSISpec Ingezim Gluten R5 Quick 30.GL2.K2 |
| EF-R5 | 15b | 27.3. | - | 60 | positiv | 3,7 | positiv | 48 | 3,12 | 3,12 | | Gluten | SENSISpec Ingezim Gluten R5 30.GLU.K2 |
| IL | 18 | 19.03.18 | positiv | 114 | negativ | < 0.6 | positiv | 158 | 0.06 | 4 | | Gluten | Immunolab Gliadin/Gluten ELISA |
| RS | 1 | 09.04.18 | positiv | 42,7 | negativ | N/A | positiv | 49 | | 5 | 41,2 | Gluten | Ridascreen® Gliadin R7001, R-Biopharm |
| RS | 2 | 19.04.18 | positiv | 73,7 | positiv | 7 | positiv | 55,74 | 5 | 80 | | Gluten | Ridascreen® Gliadin R7001, R-Biopharm |
| RS | 3 | 27.04.18 | - | 62,6 | negativ | | - | 49,8 | 1 | 5 | | Gluten | Ridascreen® Gliadin R7001, R-Biopharm |
| RS | 5 | 07.04.18 | positiv | 43,06 | negativ | <5 | positiv | 31,28 | 5 | 5 | 24,57 | Gluten | Ridascreen® Gliadin R7001, R-Biopharm |
| RS | 6 | 24.04.18 | positiv | 79,8 | negativ | | positiv | 67,5 | 5 | 5 | 25 | Gluten | Ridascreen® Gliadin R7001, R-Biopharm |
| RS | 7 | 21.03. | positiv | 57,5 | negativ | <5 | positiv | 46,6 | 1 | 5 | 23 | Gluten | Ridascreen® Gliadin R7001, R-Biopharm |
| RS | 8 | 26.03.18 | positiv | | negativ | | positiv | | | | | Bitte auswählen! | Ridascreen® Gliadin R7001, R-Biopharm |
| RS | 10 | 21.03.-25.04. | positiv | 51,6 | negativ | | positiv | 45,3 | 1 | 5 | | Protein | Ridascreen® Gliadin R7001, R-Biopharm |
| RS | 11 | 09.04.18 | positiv | 50,68 | negativ | < 5,0 | positiv | 46,82 | | | | Gluten | Ridascreen® Gliadin R7001, R-Biopharm |
| RS | 12 | | positiv | 67 | negativ | <5 | positiv | 43 | | 5 | | Gluten | Ridascreen® Gliadin R7001, R-Biopharm |
| RS | 14 | | positiv | 43,29 | negativ | <5 | - | | 3 | 5 | | Gluten | Ridascreen® Gliadin R7001, R-Biopharm |
| RS | 16 | 23.03.18 | - | 62,58 | - | 5,85 | - | 39,75 | | | | Bitte auswählen! | r-biopharm RIDASCREEN Gliadin |
| RS | 17 | | positiv | 19 | negativ | 0 | positiv | 14 | 10 | 20 | 50 | Gluten | Ridascreen® Gliadin R7001, R-Biopharm |
| RS | 15c | 16.3. | - | 51 | positiv | <5 | positiv | 47 | 3 | 5 | | Gluten | Ridascreen® Gliadin R7001, R-Biopharm |
| VT-R5 | 9 | 18.04.18 | positiv | 27,23 | negativ | 0 | positiv | 27,95 | 3 | 5 | 0,15 | Gluten | Veratox Gliadin R5, Neogen |
| div | 13 | 20.03.18 | nachweisbar | 64 | negativ | < 5 | nachweisbar | 63 | | | | Protein | R-Biopharm, Sandwich |

* NWG Nachweisgrenze / BG Bestimmungsgrenze
 * LOD limit of detection / LOQ limit of quantitation

Continuation ELISA: Gluten

| Meth. Abk. | Auswertenummer | Spezifität | Hinweise zur Methode (Extraktion und Bestimmung) | Methode akkreditiert ISO/IEC 17025 | Sonstige Hinweise |
|------------|----------------|--|--|------------------------------------|--|
| | | Antikörper | z.B. Extraktionslösung / Zeit / Temperatur | ja/nein | |
| EF-Q | 15a | R5, erkennt Prolamine aus Weizen, Roggen, Gerste | lt. Herstellerangaben | ja | |
| EF-R5 | 15b | R5, erkennt Prolamine aus Weizen, Roggen, Gerste | lt. Herstellerangaben | ja | |
| IL | 18 | | | | |
| RS | 1 | Gluten (R5) | Cocktail-Lösung / 40 min / 50°C | ja | |
| RS | 2 | Monoklonaler Antikörper R5 | Cocktail (patentiert) / 40 min / 50°C. Ethanol Lösung (80%) / 1h / 20-25°C | | |
| RS | 3 | | | ja | |
| RS | 5 | nach Testkit-Anleitung | nach Testkit-Anleitung | ja | Proben wurden fest bei Zugabe von Reagenzien |
| RS | 6 | R5 (gegen Prolamine von Weizen, Roggen, Gerste) | | nein | |
| RS | 7 | | nach Herstellerangaben | ja | Quellende Probe wurde zeitweise fest während der Extraktion |
| RS | 8 | R5 | | ja | |
| RS | 10 | | | ja | |
| RS | 11 | Monoklonal R5 | 80% Ethanol / 1h / Raumtemperatur | ja | |
| RS | 12 | R5 | | ja | |
| RS | 14 | | | ja | |
| RS | 16 | | Extraktion mit Cocktaillösung | | R7001 |
| RS | 17 | | | nein | |
| RS | 15c | R5, erkennt Prolamine aus Weizen, Roggen, Gerste | lt. Herstellerangaben | ja | nicht quantifizierbare Spuren zwischen NWG und BG |
| VT-R5 | 9 | anti-R5 | | ja | Messbereich: 5-80 ppm, Spezifität: Glutenfraktionen aus Weizen, Roggen und Gerste. Keine Kreuzreaktivität zu: Hafer, Mais, Reis, Soja, Hirse, Teff, Buchweizen, Quinoa und Amaranth. |
| div | 13 | R5 | | nein | |

5.1.5 PCR: Gluten-haltige Getreide

| Meth. Abk. | Auswertenummer | Datum der Analyse | Ergebnis Probe A | | Ergebnis Probe B | | Ergebnis Dotierungsprobe | | NWG / LOD * | BG / LOQ * | MU* | Quantitatives Ergebnis als | Methode |
|------------|----------------|-------------------|------------------|-------|------------------|-------|--------------------------|-------|-------------|------------|-----|----------------------------|---------------------------------------|
| | | | qualitativ | mg/kg | qualitativ | mg/kg | qualitativ | mg/kg | mg/kg | mg/kg | % | | |
| | | Tag/Monat | | | | | | | | | | | Test-Kit + Anbieter |
| 4L | 9 | 23.04.18 | positiv | | positiv | | positiv | | | | | Gluten | 4LAB Diagnostics |
| div | 15 | 16.3. | positiv | | positiv | | positiv | | 4 | | | glutenhaltige Getreide DNA | Eur F Res Tech 212 (2001) 228ff, mod. |

* NWG Nachweisgrenze / BG Bestimmungsgrenze
 * LOD limit of detection / LOQ limit of quantitation
 * MU Messunsicherheit / MU measurement uncertainty

| Meth. Abk. | Auswertenummer | Spezifität | Hinweise zur Methode (Extraktion und Bestimmung) | Methode akkreditiert ISO/IEC 17025 | Sonstige Hinweise |
|------------|----------------|-----------------------|--|------------------------------------|---|
| | | Target-Sequenz / -DNA | z.B. Extraktion / Enzyme / Clean-Up / Real Time PCR / Gelelektrophorese / Cyclen | ja/nein | |
| 4L | 9 | | | ja | Testsystem für qualitativen Nachweis von Gluten-haltiger Getreide containing DNA in Lebensmitteln mittels PCR Real Time |
| div | 15 | | CTAB / Proteinase K / Promega Wizard DNA CleanUp / PCR / Gelelektrophorese / 45 Zyklen | ja | |

5.2 Homogenität

5.2.1 Mischungshomogenität vor der Abfüllung

Microtracer Homogenitätstest

DLA 03-2018 Probe A

| | | |
|----------------------|--------------|-------|
| Gewicht Gesamtprobe | 2,78 | kg |
| Microtracer | FSS-rot lake | |
| Teilchengröße | 75 – 300 | µm |
| Gewicht pro Partikel | 2,0 | µg |
| Tracerzugabe | 20,9 | mg/kg |

Analysenergebnisse:

| Probe | Einwaage [g] | Partikel Anzahl | Partikel [mg/kg] |
|-------|--------------|-----------------|------------------|
| 1 | 5,05 | 60 | 23,8 |
| 2 | 4,99 | 59 | 23,6 |
| 3 | 5,06 | 67 | 26,5 |
| 4 | 5,01 | 62 | 24,8 |
| 5 | 5,06 | 69 | 27,3 |
| 6 | 4,97 | 71 | 28,6 |
| 7 | 5,08 | 65 | 25,6 |
| 8 | 5,08 | 72 | 28,3 |

Poisson-Verteilung

| | | |
|---------------------------|-----------|----------|
| Probenanzahl | 8 | |
| Freiheitsgrad | 7 | |
| Mittelwert | 65,6 | Partikel |
| Standardabweichung | 4,87 | Partikel |
| χ^2 (CHI-Quadrat) | 2,53 | |
| Wahrscheinlichkeit | 92 | % |
| Wiederfindungsrate | 125 | % |

Normalverteilung

| | | |
|----------------------------|-------------|-------|
| Probenanzahl | 8 | |
| Mittelwert | 26,1 | mg/kg |
| Standardabweichung | 1,94 | mg/kg |
| rel. Standardabweichung | 7,43 | % |
| Horwitz Standardabweichung | 9,80 | % |
| HorRat-Wert | 0,76 | |
| Wiederfindungsrate | 125 | % |

Microtracer Homogenitätstest

DLA 03-2018 Dotierungsniveauprobe

| | | |
|----------------------|--------------|-------|
| Gewicht Gesamtprobe | 1,50 | 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 | 5,10 | 90 | 35,3 |
| 2 | 5,10 | 97 | 38,0 |
| 3 | 5,03 | 83 | 33,0 |
| 4 | 4,98 | 87 | 34,9 |
| 5 | 5,03 | 88 | 35,0 |
| 6 | 5,00 | 81 | 32,4 |
| 7 | 4,97 | 81 | 32,6 |
| 8 | 5,07 | 102 | 40,2 |

Poisson-Verteilung

| | | |
|---------------------------|-----------|----------|
| Probenanzahl | 8 | |
| Freiheitsgrad | 7 | |
| Mittelwert | 88,6 | Partikel |
| Standardabweichung | 6,93 | Partikel |
| χ^2 (CHI-Quadrat) | 3,79 | |
| Wahrscheinlichkeit | 80 | % |
| Wiederfindungsrate | 129 | % |

Normalverteilung

| | | |
|----------------------------|-------------|-------|
| Probenanzahl | 8 | |
| Mittelwert | 35,2 | mg/kg |
| Standardabweichung | 2,75 | mg/kg |
| rel. Standardabweichung | 7,82 | % |
| Horwitz Standardabweichung | 9,36 | % |
| HorRat-Wert | 0,84 | |
| Wiederfindungsrate | 129 | % |

5.4 Informationen zur Eignungsprüfung (EP)

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

| | |
|--|--|
| EP-Nummer | DLA 03-2018 |
| EP-Name | Allergene III: β-Lactoglobulin, Casein und Gluten in Kindernahrung mit „Dotierungsniveauprobe“ |
| Probenmatrix (Prozessierung) | Proben A + B: Kindernahrung (Breipulver)/ Zutaten: Hirse-, Reis-, Mais- und Buchweizenmehl, Thiamin sowie Kartoffelpulver, weitere Zusatzstoffe und Allergene Lebensmittel Magermilchpulver und Weizenmehl (eine der beiden Proben) Dotierungsniveauprobe: Kartoffelpulver, weitere Zusatzstoffe und Allergene Lebensmittel (Magermilchpulver und Weizenmehl) |
| Probenzahl und Probenmenge | 2 unterschiedliche Proben A + B: je 25 g + 1 Dotierungsniveauprobe: 15 g |
| Lagerungsinformation | Proben A + B: Raumtemperatur (Langzeit gekühlt 2 - 10 °C) Dotierungsniveauprobe: Raumtemperatur |
| Verwendungszweck | Ausschließlich für Laboruntersuchungen (Qualitätskontrollproben) |
| Parameter | qualitativ + quantitativ: β -Lactoglobulin, Casein und/oder Gluten (glutenhaltige Getreide) Proben A + B: < 500 mg/kg Dotierungsniveauprobe: < 500 mg/kg |
| Untersuchungsmethoden | Methode ist freigestellt |
| Hinweis zur Analyse | Die Untersuchung der Eignungsprüfung soll entsprechend einer laborüblichen Routineanalyse vorgenommen werden. Generell empfehlen wir vor der Analyse, insbesondere bei kleinen Analyseneinwaagen, eine repräsentative Probenmenge entsprechend guter Laborpraxis zu homogenisieren. Am besten wird jeweils die gesamte Probenmenge homogenisiert. |
| Ergebnisangabe | Es werden für jede Probe A , B und Dotierungsniveauprobe je ein Ergebnis ermittelt. Die Einzelergebnisse sind in die Ergebnisabgabe-Datei einzutragen. |
| Einheiten | mg/kg |
| Anzahl von Stellen | mindestens 2 signifikante Stellen |
| Ergebnisabgabe | Die Ergebnisabgabe-Datei wird per eMail übermittelt an: pt@dla-lvu.de |
| Abgabetermin | spätestens 27. April 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-Scharf |

* 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 |
|--------------------------|------------|-----------------|
| | | ITALIEN |
| | | KANADA |
| | | ITALIEN |
| | | SPANIEN |
| | | Deutschland |
| | | ÖSTERREICH |
| | | Deutschland |
| | | Deutschland |
| | | POLEN |
| | | Deutschland |
| | | SCHWEIZ |
| | | Deutschland |
| | | Deutschland |
| | | GROSSBRITANNIEN |
| | | Deutschland |
| | | NIEDERLANDE |
| | | SPANIEN |
| | | 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 Methodenvalidierung / DIN ISO 5725 series part 1, 2 and 6 Accuracy (trueness and precision) of measurement methods and results
5. Verordnung / Regulation 882/2004/EU; Verordnung über über amtliche Kontrollen zur Überprüfung der Einhaltung des Lebensmittel- und Futtermittelrechts sowie der Bestimmungen über Tiergesundheit und Tierschutz / Regulation on official controls performed to ensure the verification of compliance with feed and food law, animal health and animal welfare rules
6. Evaluation of analytical methods used for regulation of food and drugs; W. Horwitz; Analytical Chemistry, 54, 67-76 (1982)
7. The International Harmonised Protocol for the Proficiency Testing of Analytical Laboratories ; J.AOAC Int., 76(4), 926 - 940 (1993)
8. A Horwitz-like funktion describes precision in proficiency test; M. Thompson, P.J. Lowthian; Analyst, 120, 271-272 (1995)
9. Protocol for the design, conduct and interpretation of method performance studies; W. Horwitz; Pure & Applied Chemistry, 67, 331-343 (1995)
10. Recent trends in inter-laboratory precision at ppb and sub-ppb concentrations in relation to fitness for purpose criteria in proficiency testing; M. Thompson; Analyst, 125, 385-386 (2000)
11. The International Harmonised Protocol for the Proficiency Testing of Analytical Chemistry Laboratories; Pure Appl Chem, 78, 145 - 196 (2006)
12. AMC Kernel Density - Representing data distributions with kernel density estimates, amc technical brief, Editor M Thompson, Analytical Methods Committee, AMCTB No 4, Revised March 2006 and Excel Add-in Kernel.xla 1.0e by Royal Society of Chemistry
13. EURACHEM/CITAC Leitfaden, Ermittlung der Messunsicherheit bei analytischen Messungen (2003); Quantifying Uncertainty in Analytical Measurement (1999)
14. GMP+ Feed Certification scheme, Module: Feed Safety Assurance, chapter 5.7 Checking procedure for the process accuracy of compound feed with micro tracers in GMP+ BA2 Control of residues, Version: 1st of January 2015 GMP+ International B.V.
15. MTSE SOP No. 010.01 (2014): Quantitative measurement of mixing uniformity and carry-over in powder mixtures with the rotary detector technique, MTSE Micro Tracers Services Europe GmbH
16. Homogeneity and stability of reference materials; Linsinger et al.; Accred Qual Assur, 6, 20-25 (2001)
17. AOAC Official Methods of Analysis: Guidelines for Standard Method Performance Requirements, Appendix F, p. 2, AOAC Int (2016)
18. Codex Alimentarius Commission (2010) - Guidelines on performance criteria and validation of methods for detection, identification and quantification of specific DNA sequences and specific proteins in foods, CAC/GL 74-2010
19. DIN EN ISO 15633-1:2009; Nachweis von Lebensmittelallergenen mit immunologischen Verfahren - Teil 1: Allgemeine Betrachtungen / Foodstuffs - Detection of food allergens by immunological methods - Part 1: General considerations
20. DIN EN ISO 15634-1:2009; Nachweis von Lebensmittelallergenen mit molekularbiologischen Verfahren - Teil 1: Allgemeine Betrachtungen / Foodstuffs - Detection of food allergens by molecular biological methods -

Part 1: General considerations

21. DIN EN ISO 15842:2010 Lebensmittel - Nachweis von Lebensmittelallergenen - Allgemeine Betrachtungen und Validierung von Verfahren / Foodstuffs - Detection of food allergens - General considerations and validation of methods
22. Ministry of Health and Welfare, JSM, Japan 2006
23. Working Group Food Allergens, Abbott et al., Validation Procedures for Quantitative Food Allergen ELISA Methods: Community Guidance and Best Practices JAOAC Int. 93:442-50 (2010)
24. Working Group on Prolamin Analysis and Toxicity (WGPAT): Méndez et al. Report of a collaborative trial to investigate the performance of the R5 enzyme linked immunoassay to determine gliadin in gluten-free food. Eur J Gastroenterol Hepatol. 17:1053-63 (2005)
25. DLA Publikation: Performance of ELISA and PCR methods for the determination of allergens in food: an evaluation of six years of proficiency testing for soy (Glycine max L.) and wheat gluten (Triticum aestivum L.); Scharf et al.; J Agric Food Chem. 61(43):10261-72 (2013)
26. EFSA (2014) Scientific Opinion on the evaluation of allergenic foods and food ingredients for labelling purposes¹, EFSA Panel on Dietetic Products, Nutrition and Allergies (NDA), European Food Safety Authority (EFSA), Parma, Italy, EFSA Journal 2014;12(11):3894
27. IRMM, Poms et al.; Inter-laboratory validation study of five different commercial ELISA test kits for determination of peanut residues in cookie and dark chocolate; European Commission, Joint Research Centre, Belgium; GE/R/FSQ/D08/05/2004
28. Jayasena et al. (2015) Comparison of six commercial ELISA kits for their specificity and sensitivity in detecting different major peanut allergens. J Agric Food Chem. 2015 Feb 18;63(6):1849-55
29. ASU §64 LFGB L 06.00-56 Bestimmung von Sojaprotein in Fleisch und Fleischzerzeugnissen Enzymimmunologisches Verfahren (2007)
30. ASU §64 LFGB L 00.00-69 Bestimmung von Erdnuss-Kontaminationen in Lebensmitteln mittels ELISA im Mikrotiterplattensystem (2003)
31. ASU §64 LFGB L 44.00-7 Bestimmung von Haselnuss-Kontaminationen in Schokolade und Schokoladenwaren mittels ELISA im Mikrotiterplattensystem (2006)
32. ASU §64 LFGB L 16.01-9 Untersuchung von Lebensmitteln - Bestimmung von Soja (Glycine max) in Getreidemehl mittels real-time PCR (2016)
33. 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)
34. ASU §64 LFGB L 08.00-65 Untersuchung von Lebensmitteln - Simultaner Nachweis und Bestimmung von schwarzem Senf (Brassica nigra L.), braunem Senf (Brassica juncea L.), weißem Senf (Sinapis alba). Sellerie (Apium graveolens) und Soja (Glycine max) in Brühwurst mittels real-time PCR (2016)
35. 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)
36. Allergen Data Collection - Update (2002): Cow's Milk (Bos domesticus), Besler M., Eigenmann P., Schwartz R., Internet Symposium on Food Allergens 4(1): 19-106, <http://www.food-allergens.de>
37. 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 provision of information to consumers on the absence or reduced presence of gluten in food
38. 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
39. 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 ce-

reals and cereal products, nutrient tables of foods]

DLA 03/2018 - Allergene III

Alle 18 Teilnehmer haben mindestens ein Ergebnis eingereicht. Die Auswertung erfolgte hinsichtlich der Parameter β -Lactoglobulin, Casein und Gluten für ELISA- (qualitativ und quantitativ). Die Auswertung für Milch (ELISA-Methode) und Weizen (PCR-Methode) erfolgte qualitativ. Zusätzlich wurden für jeden Teilnehmer Wiederfindungsraten für die Dotierungsniveauprobe und die dotierte Probe ermittelt. Details zu den einzelnen Parametern inklusive separater Auswertung nach Testkit-Herstellern sind dem Auswertebereich zu entnehmen.

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