

Proficiency Tests

DLA

food
cosmetics
consumer goods
www.dla-lvu.de

Auswertungs-Bericht

Laborvergleichsuntersuchung

DLA 05/2018

Allergene V:

Erdnuss und Mandel

in Backware (Butterkeks)

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

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

<p><i>EP-Anbieter</i> <i>PT-Provider</i></p>	<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>
<p><i>EP-Nummer</i> <i>PT-Number</i></p>	<p>DLA 05/2018</p>
<p><i>EP-Koordinator</i> <i>PT-Coordinator</i></p>	<p>Dr. Matthias Besler-Scharf</p>
<p><i>Status des EP-Bericht</i> <i>Status of PT-Report</i></p>	<p>Abschlussbericht / Final report (12. Dezember 2018)</p> <p>Gültig ist die jeweils letzte Version/Korrektur des Berichts. Sie ersetzt alle vorangegangenen Versionen. Only the latest version/correction of the report is valid. It replaces all preceding versions.</p>
<p><i>EP-Bericht Freigabe</i> <i>PT-Report Authorization</i></p>	<p>Dr. Matthias Besler-Scharf (Technischer Leiter / Technical Manager) - <i>gezeichnet / signed M. Besler-Scharf</i> Dr. Gerhard Wichmann (QM-Beauftragter / Quality Manager) - <i>gezeichnet / signed G. Wichmann</i> Datum / Date: 12. Dezember 2018</p>
<p><i>Unteraufträge</i> <i>Subcontractors</i></p>	<p>Falls im Rahmen der Eignungsprüfung eine Prüfung der Gehalte, Homogenität und Stabilität von EP-Parametern durchgeführt wurde, hat DLA diese im Unterauftrag vergeben. In case the analysis of the content, homogeneity and stability of PT-parameters was part of the proficiency test, the determinations were subcontracted by DLA.</p>
<p><i>Vertraulichkeit</i> <i>Confidentiality</i></p>	<p>Die Teilnehmerergebnisse sind im EP-Bericht in anonymisierter Form mit Auswertenummern benannt. Daten einzelner Teilnehmer werden ausschließlich nach vorheriger Zustimmung des Teilnehmers an Dritte weitergegeben. Participant result are named anonymously with evaluation numbers in the PT report. Data of individual participants will be passed on to third parties only with prior consent of the participant.</p>

Inhalt

1. Einleitung.....	4
2. Durchführung.....	4
2.1 Untersuchungsmaterial.....	4
2.1.1 Homogenität.....	6
2.1.2 Stabilität.....	9
2.2 Probenversand und Informationen zur Untersuchung.....	9
2.3 Ergebnisübermittlung.....	9
3. Auswertung.....	10
3.1 Konsenswert der Teilnehmer (zugewiesener Wert).....	10
3.2 Robuste Standardabweichung.....	11
3.3 Ausschluss von Ergebnissen und Ausreißer.....	11
Ausschluss von Ergebnissen	11
3.4 Zielstandardabweichung (für die Eignungsbeurteilung).....	12
3.4.1 Allgemeines Modell nach Horwitz.....	12
3.4.2 Auswertung eines Versuchs zur Präzision	12
3.4.3 Werte aus Erkenntnissen	15
3.5 z-Score.....	16
3.6 z'-Score.....	17
3.7 Quotient S^*/opt	17
3.8 Standardunsicherheit und Rückführbarkeit.....	17
3.9 Graphische Darstellung der Bezugswerte.....	18
3.10 Wiederfindungsraten: Dotierung.....	18
4. Ergebnisse.....	19
4.1 Vergleichsuntersuchung Erdnuss.....	21
4.1.1 ELISA-Ergebnisse: Erdnuss.....	21
4.1.2 PCR-Ergebnisse: Erdnuss.....	30
4.2 Vergleichsuntersuchung Mandel.....	34
4.2.1 ELISA-Ergebnisse: Mandel.....	34
4.2.2 PCR-Ergebnisse: Mandel.....	44
5. Dokumentation.....	48
5.1 Angaben der Teilnehmer.....	48
5.1.1 ELISA: Erdnuss.....	48
5.1.2 ELISA: Mandel.....	50
5.1.3 PCR: Erdnuss.....	52
5.1.4 PCR: Mandel.....	53
5.2 Homogenität.....	54
5.2.1 Mischungshomogenität vor der Abfüllung.....	54
5.3 Informationen zur Eignungsprüfung (EP).....	55
6. Verzeichnis der Teilnehmer in alphabetischer Reihenfolge.....	56
7. Verzeichnis relevanter Literatur.....	57

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 handelt es sich um handelsübliche Butterkekse. 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 B** folgendermaßen hergestellt:

Als weitere Zutat wurden Kekse mit dem Dotierungsmaterial gebacken (150°C, 30 min), das die allergenen Zutaten Erdnuss und Mandel enthält. Nach Zerkleinerung, Sieben (mesh 1,5 mm) und Homogenisierung wurde der die allergenen Zutaten enthaltende gebackene Keks zu einem Aliquot der Grundmatrix gegeben und die Mischung homogenisiert. Anschließend wurde portionsweise erneut Grundmatrix in 2 weiteren Schritten zugegeben und jeweils maschinell homogenisiert bis die Gesamtmenge erreicht war.

Die **Dotierungsniveauprobe** wurde mit den oben genannten allergenhaltigen Dotierungsmaterialien unter mehrstufiger Zugabe von Kartoffelpulver und Homogenisierung hergestellt. Anschließend wurde die gesamte Menge mittels Zentrifugalmühle (mesh 250 µm) gesiebt.

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
Butterkekse Zutaten: Weizenmehl, Zucker, Butter, Gerstenmalzextrakt, Magermilchpulver, Glucose, Glucosesirup, Backtriebmittel Ammoniumcarbonat, Salz, Emulgator Lecithine Nährwertangaben pro 100 g: Fett 12 g, Kohlenhydrate 76 g, Eiweiß 7,1 g, Salz 0,2 g	100 g/100 g	93,1 g/100g	-
Kekse (gebacken 150°C, 30 min) Zutaten: Weizenmehl, Zucker, Butter, Eier, Salz sowie Erdnüsse, Mandeln und weitere Zutaten (siehe unten)	-	6,9 g/100 g	-
Kartoffelpulver Zutaten: Kartoffeln, E471, E304, E223, E100	-	-	99,7 g/100 g
<i>Erdnüsse, geröstet:</i> gemahlen, Mischung (18 Produkte aus USA, Asien, Afrika, Südamerika) - als Erdnuss* - davon 23,2% Gesamtprotein**	-	32,0 mg/kg 7,4 mg/kg	33,8 mg/kg 7,9 mg/kg
<i>Mandelmus, weiß</i> - als Mandeln* - davon 16,2% Gesamtprotein**	-	68,7 mg/kg 11,1 mg/kg	34,7 mg/kg 5,6 mg/kg
<i>weitere Zutaten:</i> <i>Maltodextrin, Natriumsulfat und Siliciumdi-</i> <i>oxid</i>	-	<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=5,46 für Erdnüsse und F=5,18 für Mandeln)

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 B und Dotierungsmaterialprobe hat eine Wahrscheinlichkeit von 80% bzw. 82% 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 0,87 bzw. 0,95 erhalten. Die Ergebnisse der Microtracer-Analyse sind in der Dokumentation angegeben.

Homogenität der abgefüllten dotierten Probe B

Durchführung der Homogenitätstests

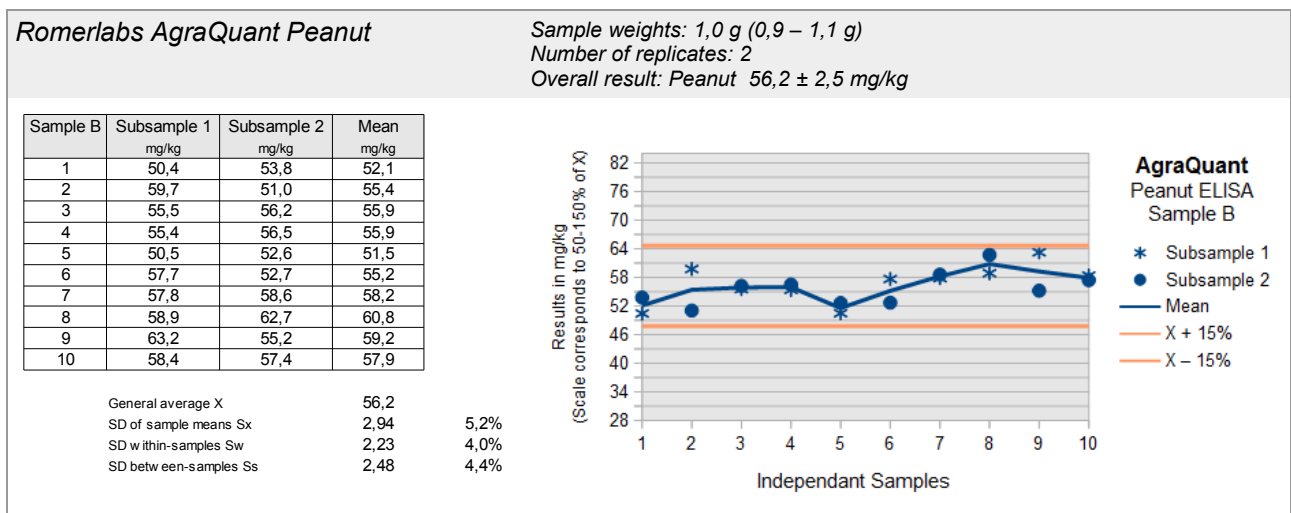
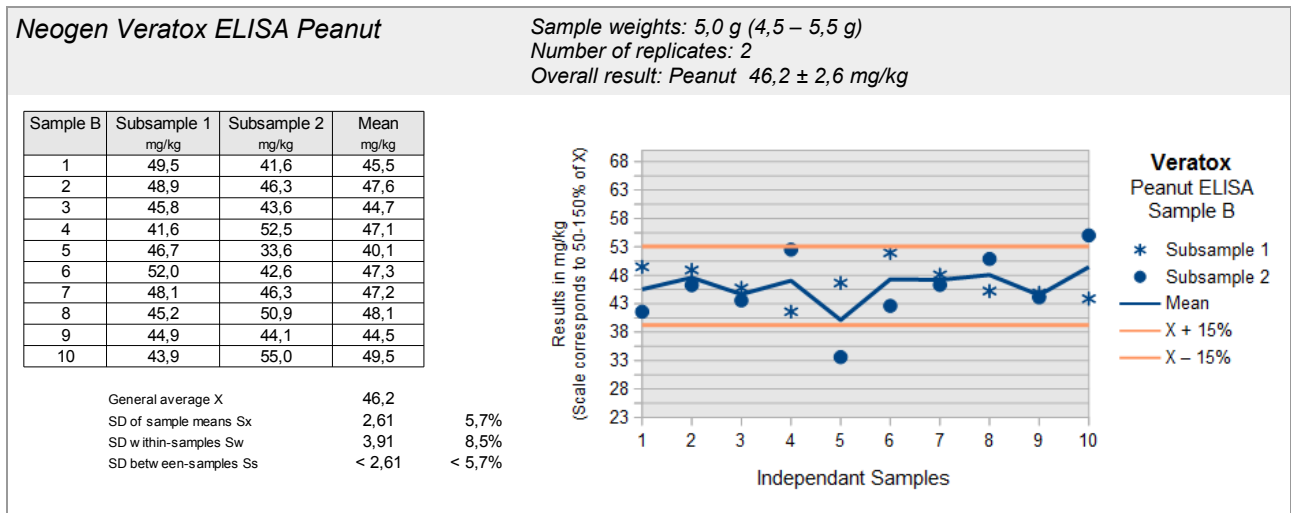
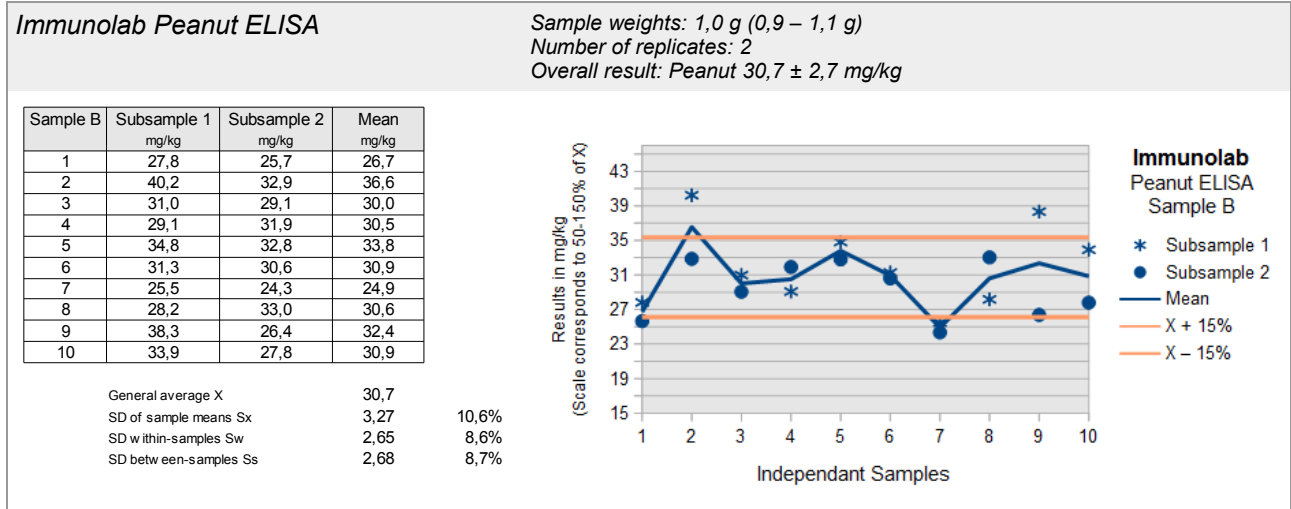
Die Homogenitätstests wurden in Kooperation mit den Labors der angegebenen Testkit-Anbieter durchgeführt. Von DLA wurden zufällig 10 Muster der abgefüllten dotierten Probe ausgewählt und davon jeweils 2 Teilproben in zuvor zufällig codierte Extraktionsbehälter eingewogen und anschließend den Labors zur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

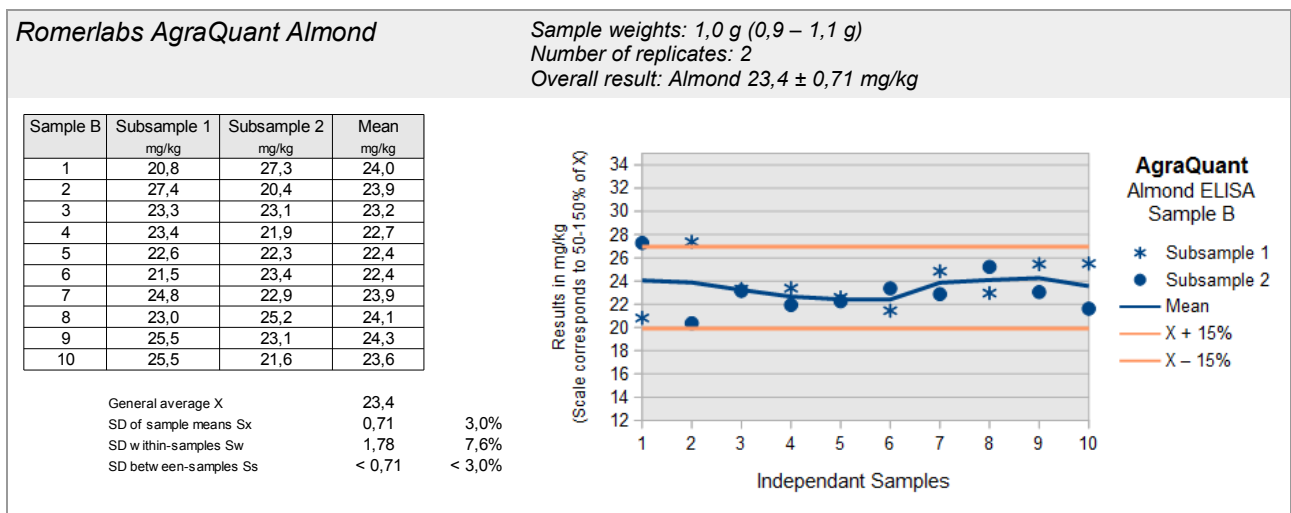
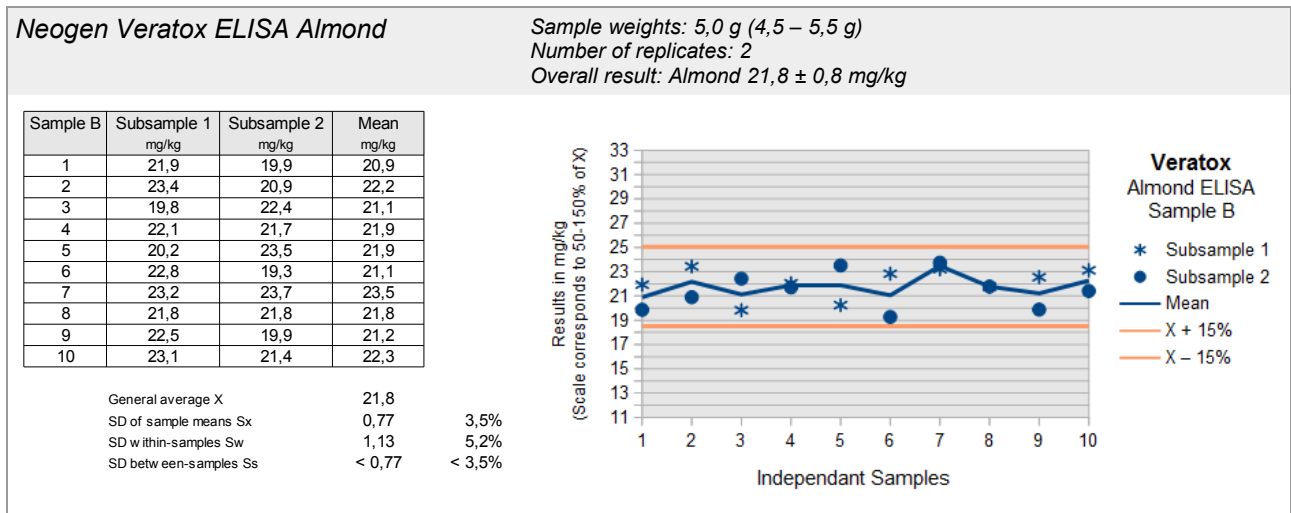
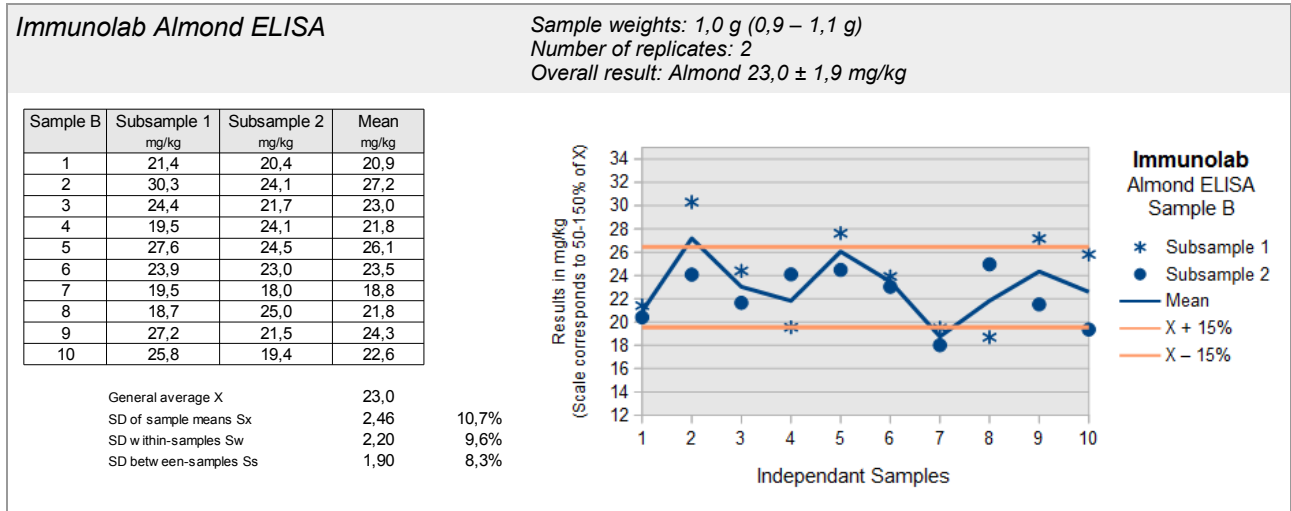
Die Homogenität wird mit einer Standardabweichung zwischen den Proben von $S_s \leq 15\%$ („Heterogenitätsstandardabweichung“) als hinreichend gesichert angesehen. Dieses Kriterium wird für die untersuchte Probe B in allen ELISA-Tests für Erdnuss (Immunolab, Veratox, AgraQuant) und Mandel (Immunolab, Veratox, AgraQuant) erfüllt (s. Seite 7-8). 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 Erdnuss / Homogeneity Peanut



ELISA-Tests: Homogenität Mandel / Homogeneity Almond



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. $0,19$ ($21,2^\circ\text{C}$). 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 38. Kalenderwoche 2018 je eine Portion der Untersuchungsmaterialien A und B sowie eine Dotierungsmaterialprobe verschickt. Die Untersuchungsverfahren wurden freigestellt. Die Untersuchungen waren durchzuführen bis spätestens 2. November 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 Erdnuss und/oder Mandel im mg/kg Bereich in der Matrix Butterkeks. 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 19 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: $\Delta \text{Median} - \text{rob. Mittelwert} > 0,3 \sigma_{pt}$) [3].

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

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

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

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

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

3.2 Robuste Standardabweichung

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

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

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

3.4.2 Auswertung eines Versuchs zur Präzision

Aus der Vergleichsstandardabweichung σ_R und der Wiederholstandardabweichung σ_x 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]:

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

Die in Tabelle 2a (ELISA) und Tabelle 2b (PCR) angegebenen relativen Wiederholstandardabweichungen (RSD_x) 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 für die Allergene Erdnuss, Haselnuss, Mandel und Paranuss im Bereich von 11 - 32% für die ELISA-Methoden und 24 - 42% für die PCR-Methoden (s. Tab. 2a und 2b).

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

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

Tabelle 2b: PCR-Methoden - Relative Wiederholstandardabweichungen (RSD_r) und relative Vergleichsstandardabweichungen (RSD_R) gemäß ausgewählter Auswertungen von Versuchen zur Präzision und die resultierende Zielstandardabweichung σ_{pt} [32-34]

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

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

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

3.6 z'-Score

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

Die Berechnung erfolgt nach:

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

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

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

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

Zu Warn- und Eingriffssignalen siehe 3.5.1.

3.7 Quotient S^*/σ_{pt}

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

3.8 Standardunsicherheit 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.

Die ELISA-Ergebnisse, die als **Erdnussprotein** angegeben wurden, sind mit dem experimentell bestimmten Proteingehalt der Rohstoffe (s. Seite 5) auf das Gesamtlebensmittel (**Erdnuss**) umgerechnet worden.

Die ELISA-Ergebnisse, die als **Mandelprotein** angegeben wurden, sind mit dem experimentell bestimmten Proteingehalt der Rohstoffe (s. Seite 5) auf das Gesamtlebensmittel (**Mandel**) umgerechnet worden.

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 $X_{pt_{Mi}}$	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 Erdnuss

4.1.1 ELISA-Ergebnisse: Erdnuss

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]			
3a	negativ	<1	positiv	50,8	2/2 (100%)	BF	
16	negativ	0	positiv	35,2	2/2 (100%)	BF	
1	negativ	<1	positiv	52,1	2/2 (100%)	BK	
6	negativ	< BG	positiv	31,0	2/2 (100%)	BK	
5	negativ	< 0,1	positiv	35,0	2/2 (100%)	IL	
9	negativ	<1,0	positiv	37,5	2/2 (100%)	IL	
15	negativ	<NWG	positiv	37,6	2/2 (100%)	IL	
18	negativ	<1,3	positiv	5,60	2/2 (100%)	MI-II	Ergebnis umgerechnet °
3b	negativ	<2,5	positiv	>20	2/2 (100%)	RS-F	
7	negativ		positiv	50,9	2/2 (100%)	RS-F	
10	negativ	<11	positiv	224	2/2 (100%)	RS-F	Ergebnis umgerechnet °
11	negativ		positiv	48,8	2/2 (100%)	RS-F	
12	negativ	< 0,13	positiv	42,7	2/2 (100%)	RS-F	
14	negativ	<2,5	positiv	48,5	2/2 (100%)	RS-F	
17	negativ	<2,50	positiv	48,5	2/2 (100%)	RS-F	
1	negativ	<2,5	positiv	41,2	2/2 (100%)	VT	
8	negativ		positiv	154	2/2 (100%)	VT	Ergebnis umgerechnet °

° Umrechnung S. 19

	Probe A	Probe B
Anzahl positiv	0	17
Anzahl negativ	17	0
Prozent positiv	0	100
Prozent negativ	100	0
Konsenswert	negativ	positiv

Methoden:

BF = MonoTrace ELISA, BioFront Technologies

BK = BioKits, Neogen

IL = Immunolab

MI-II = Morinaga Institute ELISA Kit II

RS-F= Ridascreen® Fast, R-Biopharm

VT = Veratox, Neogen

Anmerkung:

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

Quantitative Auswertung ELISA: Probe B

Auswertenummer	Erdnuss [mg/kg]	z-Score $X_{pt_{ALL}}$	z-Score $X_{pt_{RS-F}}$	Methode	Hinweis
3a	50,8	0,72		BF	
16	35,2	-0,73		BF	
1	52,1	0,84		BK	
6	31,0	-1,1		BK	
5	35,0	-0,75		IL	
9	37,5	-0,52		IL	
15	37,6	-0,51		IL	
18	5,60	-3,5		MI-II	Ergebnis umgerechnet, Ausreißer ausgeschlossen °
3b	>20			RS-F	
7	50,9	0,73	0,20	RS-F	
10	224	17	14	RS-F	Ergebnis umgerechnet, Ausreißer ausgeschlossen °
11	48,8	0,53	0,03	RS-F	
12	42,7	-0,03	-0,48	RS-F	
14	48,5	0,51	0,00	RS-F	
17	48,5	0,51	0,00	RS-F	
1	41,2	-0,17		VT	
8	154	10		VT	Ergebnis umgerechnet, Ausreißer ausgeschlossen °

° Umrechnung S. 19

Methoden:

BF = MonoTrace ELISA, BioFront Technologies

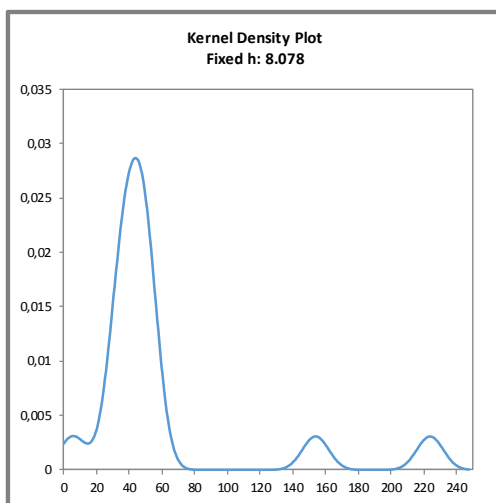
BK = BioKits, Neogen

IL = Immunolab

MI-II = Morinaga Institute ELISA Kit II

RS-F= Ridascreen® Fast, R-Biopharm

VT = Veratox, Neogen

**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 einem Nebenpeak eines Ergebnisses bei ca. 5-6 mg/kg (Methode MI-II) und zwei Peaks > 100 mg/kg, die auf Ausreißer zurückgehen (eventuell wurden die höheren Ergebnisse irrtümlich als Erdnussprotein abgegeben).

Kenndaten: Quantitative Auswertung ELISA Erdnuss

Probe B

Kenndaten	Alle Ergebnisse [mg/kg]	Methode RS-F [mg/kg]
Zugewiesener Wert (X_{pt})	X_{pt_ALL}	$X_{pt_METHOD\ RS-F}$
Anzahl der Messergebnisse [°]	13	5
Anzahl der Ausreißer	3	1
Mittelwert	43,1	47,9
Median	42,7	48,5
Robuster Mittelwert (X_{pt})	43,1	48,5
Robuste Standardabweichung (S^*)	8,23	2,08
<i>Zielkenndaten:</i>		
Zielstandardabweichung σ_{pt}	10,8	12,1
Untere Grenze des Zielbereichs	21,5	24,2
Obere Grenze des Zielbereichs	64,6	73
Quotient S^*/σ_{pt}	0,76	0,17
Standardunsicherheit $U(X_{pt})$	2,9	1,2
Ergebnisse im Zielbereich	13	5
Prozent im Zielbereich	100	100

[°] Messergebnisse ohne Ausreißer (Ergebnisse Nr. 8, 10 und 18)

Methoden:

RS-F = R-Biopharm, Ridascreen® Fast

Anmerkungen zu den Kenndaten und Vergleich der Bezugswerte:

Die Kerndichte-Schätzung zeigte annähernd eine symmetrische Verteilung der Ergebnisse. Die Ausreißer wurden von der statistischen Berechnung ausgeschlossen.

Die Auswertungen der Ergebnisse aller Methoden und von Methode RS-F zeigten eine geringe Variabilität der Ergebnisse. Der Quotient S^*/σ_{pt} lag jeweils unter 1,0. Die robuste Standardabweichung liegt im Bereich von etablierten Werten für die Wiederhol- und Vergleichsstandardabweichung der eingesetzten Bestimmungsmethoden (vgl. 3.4.2 Auswertung eines Versuchs zur Präzision und 3.4.3 Werte aus Erkenntnissen). Die Vergleichbarkeit der Ergebnisse ist gegeben. Diese Aussage ist für die methodenübergreifende Auswertung nur eingeschränkt gültig, da für einige Methoden nur wenige Ergebnisse vorlagen.

Die zugewiesenen Werte der Auswertungen lagen mit 134% bzw. 152% vom Zusatzniveau von Erdnuss zu Probe B im Bereich bzw. an der oberen Grenze des Bereichs der relevanten Anforderungen für die eingesetzten Methoden (s. 3.4.3 und "Wiederfindungsraten für Erdnuss" S.29).

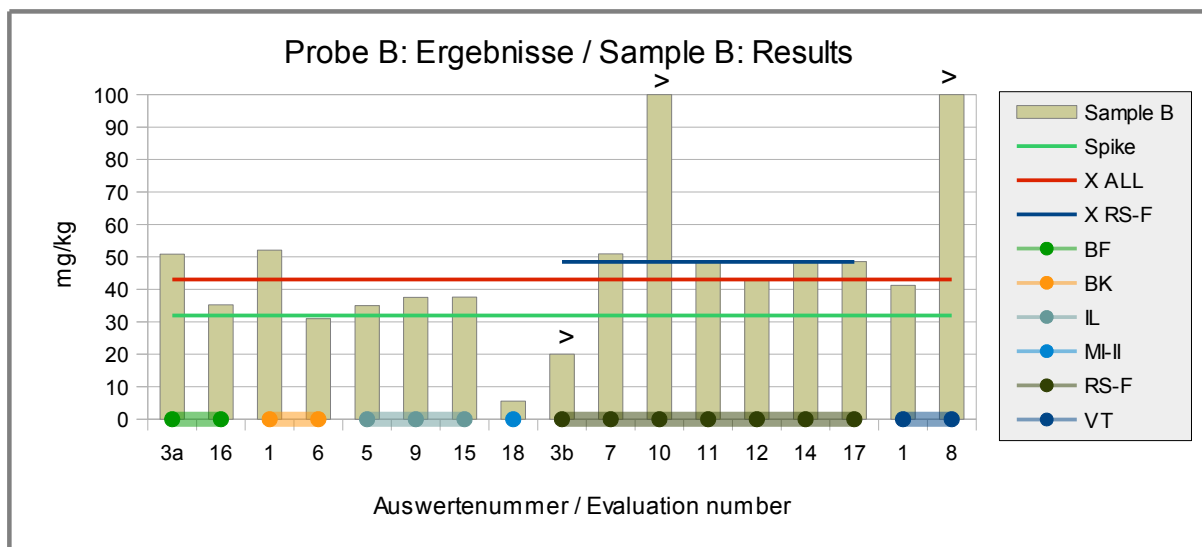


Abb./Fig. 2: ELISA-Ergebnisse Erdnuss
 grüne Linie = Zusatzniveau (Spike)
 rote Linie = robuster Mittelwert aller Ergebnisse
 blaue Linie = robuster Mittelwert Ergebnisse Methode RS-F
 runde Symbole = Zuordnung der Methoden (s. Legende)

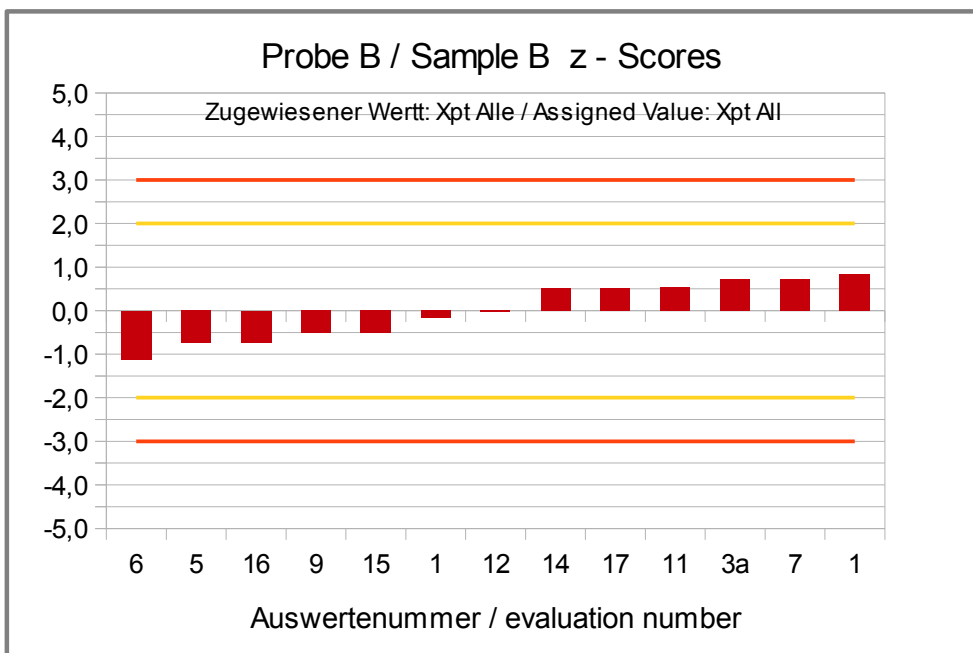


Abb./Fig. 3:
 z-Scores (ELISA-Ergebnisse als Erdnuss)
 Zugewiesener Wert: robuster Mittelwert (Alg. A) aller Ergebnisse

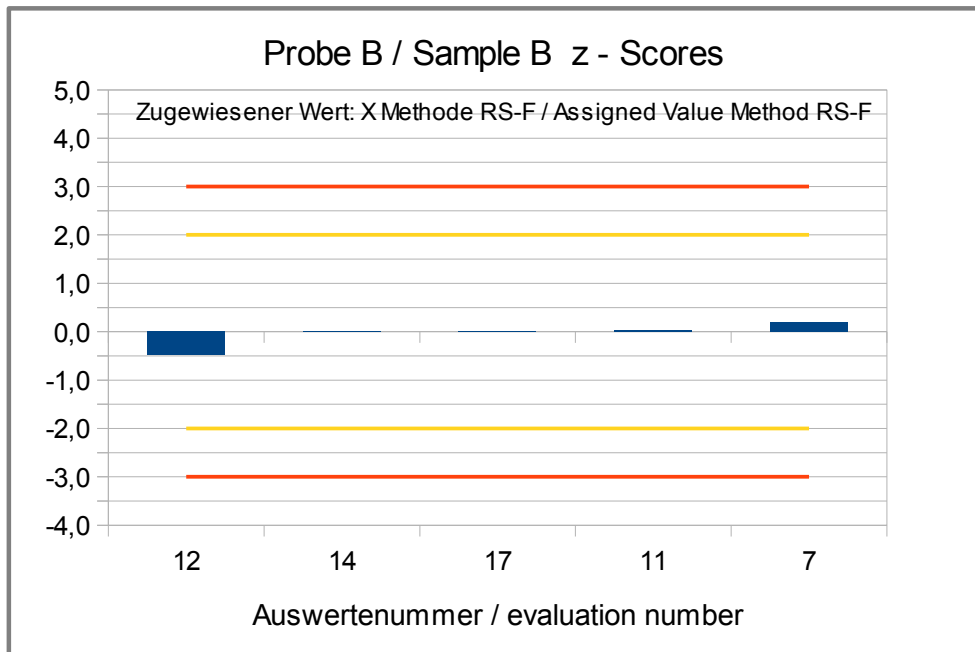


Abb./Fig. 4:

z-Scores (ELISA-Ergebnisse als Erdnuss)

Zugewiesener Wert: robuster Mittelwert (Alg. A) Methode RS-F (R-Biopharm, Ridascreen Fast)

Quantitative Auswertung ELISA: Dotierungsniveauprobe

Auswertenummer	Erdnuss [mg/kg]	z-Score Xpt _{ALL}	z-Score Xpt _{RS-F}	Methode	Hinweis
3a	216	3,9		BF	
16	118	0,32		BF	
1	175	2,4		BK	
6	85,0	-0,89		BK	
5	71,0	-1,4		IL	
9	100	-0,34		IL	
15	109	-0,01		IL	
18	12,1	-3,6		MI-II	Ergebnis umgerechnet °
3b	>20			RS-F	
7	104	-0,20		RS-F	
10	362	9,3		RS-F	Ergebnis umgerechnet, Ausreißer ausgeschlossen °
11				RS-F	
12	125	0,59		RS-F	
14	83,8	-0,93		RS-F	
17	79,5	-1,1		RS-F	
1	73,7	-1,3		VT	
8	206	3,5		VT	Ergebnis umgerechnet °

° Umrechnung S. 19

Methoden:

BF = MonoTrace ELISA, BioFront Technologies

BK = BioKits, Neogen

IL = Immunolab

MI-II = Morinaga Institute ELISA Kit II

RS-F= Ridascreen® Fast, R-Biopharm

VT = Veratox, Neogen

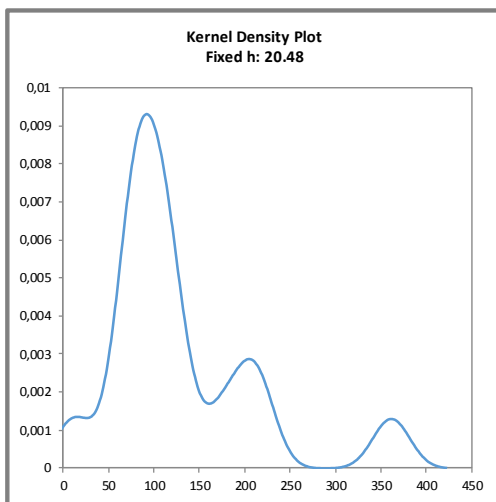


Abb. / Fig. 5:

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 eines Ergebnisses bei ca. 12 mg/kg (Methode MI-II) und zwei Peaks > 150 mg/kg, die auf einen Ausreißer und drei Ergebnisse außerhalb des Zielbereichs zurückgehen (eventuell wurden die höheren Ergebnisse irrtümlich als Erdnussprotein abgegeben).

Kenndaten: Quantitative Auswertung ELISA Erdnuss**Dotierungsniveauprobe**

Kenndaten	Alle Ergebnisse [mg/kg]
Zugewiesener Wert (X_{pt})	X_{pt_ALL}
Anzahl der Messergebnisse [°]	14
Anzahl der Ausreißer	1
Mittelwert	111
Median	102
Robuster Mittelwert (X_{pt})	109
Robuste Standardabweichung (S^*)	52,5
<i>Zielkenndaten:</i>	
Zielstandardabweichung σ_{pt}	27,3
Untere Grenze des Zielbereichs	54,6
Obere Grenze des Zielbereichs	164
Quotient S^*/σ_{pt}	1,9
Standardunsicherheit $U(X_{pt})$	17,5
Ergebnisse im Zielbereich	10
Prozent im Zielbereich	71

[°] Messergebnisse ohne Ausreißer (Ergebnisse Nr. 10)

Anmerkungen zu den Kenndaten und Vergleich der Bezugswerte:

Die Kerndichte-Schätzung zeigte annähernd eine symmetrische Verteilung der Ergebnisse mit kleineren Nebenpeaks. Der Ausreißer wurde von der statistischen Berechnung ausgeschlossen.

Die Auswertung 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 vorliegen.

Der zugewiesene Wert der Auswertung über alle Methoden lag mit 322% vom Zusatzniveau von Erdnuss zur Dotierungsniveauprobe, deutlich oberhalb der relevanten Anforderungen für die eingesetzten Methoden (s. 3.4.3 und "Wiederfindungsraten für Erdnuss" S.29).

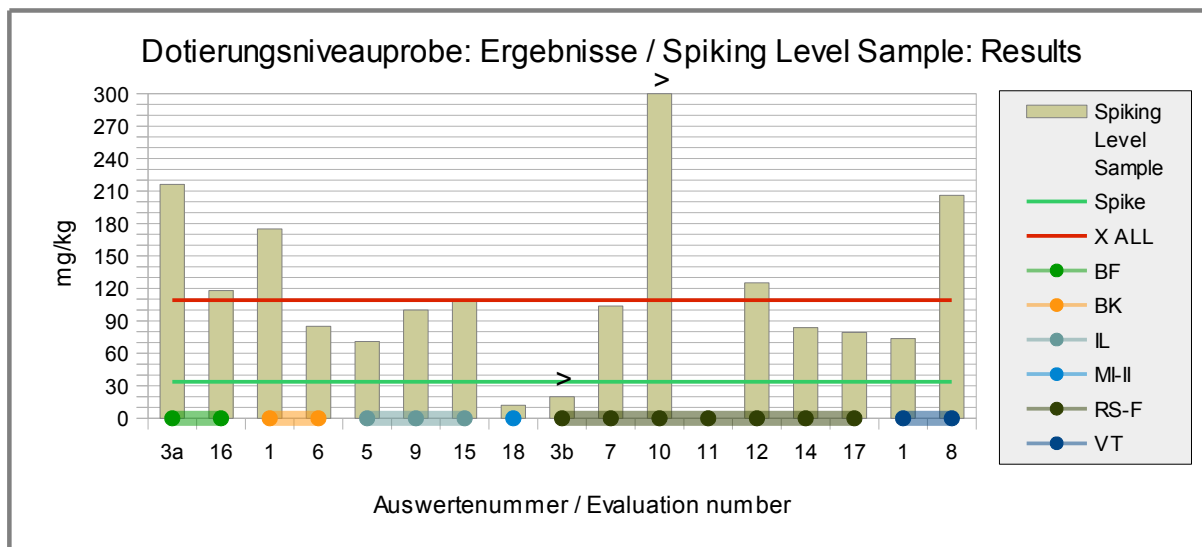


Abb./Fig. 6: ELISA-Ergebnisse Erdnuss
 grüne Linie = Zusatzniveau (Spike)
 rote Linie = robuster Mittelwert aller Ergebnisse
 runde Symbole = Zuordnung der Methoden (s. Legende)

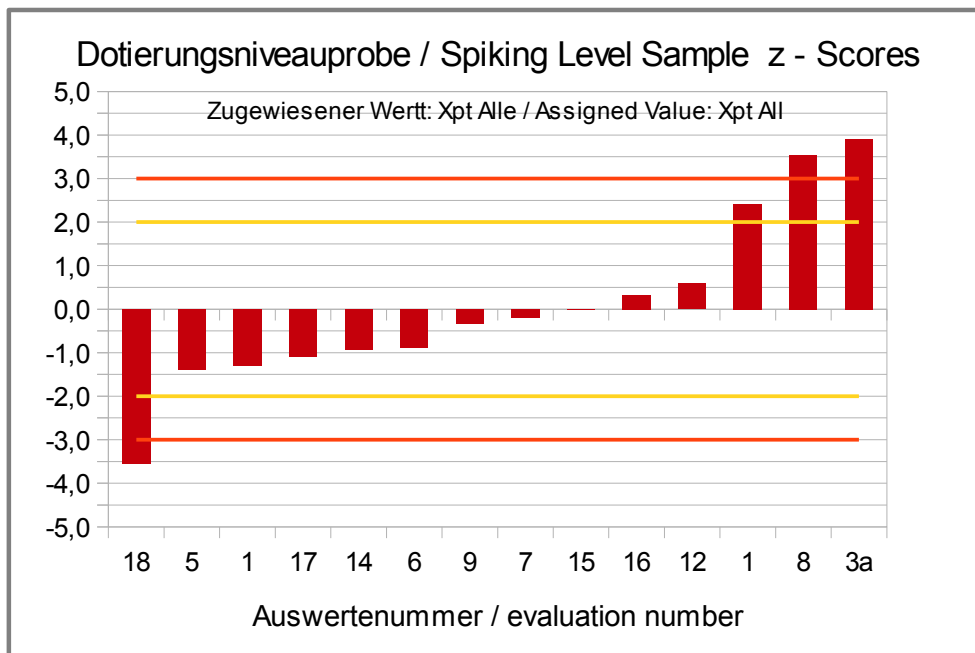


Abb./Fig. 7:
 z-Scores (ELISA-Ergebnisse als Erdnuss)
 Zugewiesener Wert: robuster Mittelwert (Alg. A) aller Ergebnisse

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

Auswertenummer	Dotierungsniveauprobe	Wiederfindungsrate*	Probe B	Wiederfindungsrate*	Methode	Hinweis
	[mg/kg]	[%]	[mg/kg]	[%]		
3a	216	638	50,8	159	BF	
16	118	349	35,2	110	BF	
1	175	518	52,1	163	BK	
6	85,0	251	31,0	97	BK	
5	71,0	210	35,0	110	IL	
9	100	296	37,5	117	IL	
15	109	322	37,6	118	IL	
18	12,1	36	5,60	18	MI-II	Ergebnis umgerechnet °
3b	>20		>20		RS-F	
7	104	307	50,9	159	RS-F	
10	362	1070	224	701	RS-F	Ergebnis umgerechnet °
11			48,8	153	RS-F	
12	125	370	42,7	134	RS-F	
14	83,8	248	48,5	152	RS-F	
17	79,5	235	48,5	152	RS-F	
1	73,7	218	41,2	129	VT	
8	206	609	154	482	VT	Ergebnis umgerechnet °

° Umrechnung S. 19

AB**	50-150 %	AB**	50-150 %
Anzahl im AB	0	Anzahl im AB	7
Prozent im AB	0	Prozent im AB	44

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

** Akzeptanzbereich der AOAC für Allergen-ELISAs

Methoden:

BF = MonoTrace ELISA, BioFront Technologies

BK = BioKits, Neogen

IL = Immunolab

MI-II = Morinaga Institute ELISA Kit II

RS-F= Ridascreen® Fast, R-Biopharm

VT = Veratox, Neogen

Anmerkung:

Alle Wiederfindungsraten der ELISA-Ergebnisse für die Dotierungsniveauprobe lagen mit einer Ausnahme oberhalb des Bereichs der AOAC-Anforderung von 50-150%.

Für die prozessierte dotierte Lebensmittelmatrix-Probe B lagen 44% (7) der Wiederfindungsraten in diesem Akzeptanzbereich.

4.1.2 PCR-Ergebnisse: Erdnuss

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	negativ		positiv		2/2 (100%)	ASU	
13	negativ		positiv	14	2/2 (100%)	ASU	
15	negativ		positiv		2/2 (100%)	GI	
3	negativ	<0,4	positiv	>0,4	2/2 (100%)	SFA	
12	negativ	<0,4	positiv	22,7	2/2 (100%)	SFA	
14a	negativ	<1	positiv	41,0	2/2 (100%)	SFA	
14b	negativ	<1	positiv	35,1	2/2 (100%)	SFA-ID	
11	negativ		positiv		2/2 (100%)	SFA-Q	
4	negativ		positiv	6,50	2/2 (100%)	div	
7	negativ		negativ		1/2 (50%)	div	keine Positivprobe detektiert
18	negativ		positiv		2/2 (100%)	div	

	Probe A	Probe B
Anzahl positiv	0	10
Anzahl negativ	11	1
Prozent positiv	0	91
Prozent negativ	100	9
Konsenswert	negativ	positiv

Methoden:

ASU = ASU §64 Methode/method

GI = GEN-IAL First Allergen

SFA = Sure Food Allergen, R-Biopharm / Congen

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

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

div = keine genaue Angabe / andere Methode

Anmerkung:

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

Quantitative Auswertung PCR: Probe B

Eine Auswertung der quantitativen Ergebnisse erfolgte nicht, weil zu wenige Einzelergebnisse pro PCR Methode vorlagen. Die Auswertung über alle Methoden erfolgte nicht, weil die zwei Einzelergebnisse der ASU und einer anderen Methode (div) deutlich unter den drei Ergebnissen der SFA-Methoden lagen.

(Quantitative) Auswertung PCR: Dotierungsniveauprobe

Eine Auswertung der quantitativen Ergebnisse erfolgte nicht, weil zu wenige Einzelergebnisse pro PCR Methode vorlagen. Die Auswertung über alle Methoden erfolgte nicht, weil die zwei Einzelergebnisse der ASU und einer anderen Methode (div) deutlich unter den drei Ergebnissen der SFA-Methoden lagen.

Auswertenummer	Erdnuss	Erdnuss	z-Score $X_{pt_{ALL}}$	Methode	Hinweis
	pos/neg	[mg/kg]			
6	positiv			ASU	
13	positiv	27,7		ASU	
15	positiv			GI	
3	positiv	>0,4		SFA	
12	positiv	78,5		SFA	
14a	positiv	74,1		SFA	
14b	positiv	42,4		SFA-ID	
11	positiv			SFA-Q	
4	positiv	28,0		div	
7	negativ			div	
18	positiv			div	

Anzahl positiv	10
Anzahl negativ	1
Prozent positiv	91
Prozent negativ	9
Konsenswert	positiv

Methoden:

ASU = ASU §64 Methode/method

GI = GEN-IAL First Allergen

SFA = Sure Food Allergen, R-Biopharm / Congen

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

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

div = keine genaue Angabe / andere Methode

Anmerkung:

Es wurden 91% positive Ergebnisse für die Dotierungsniveauprobe erhalten.

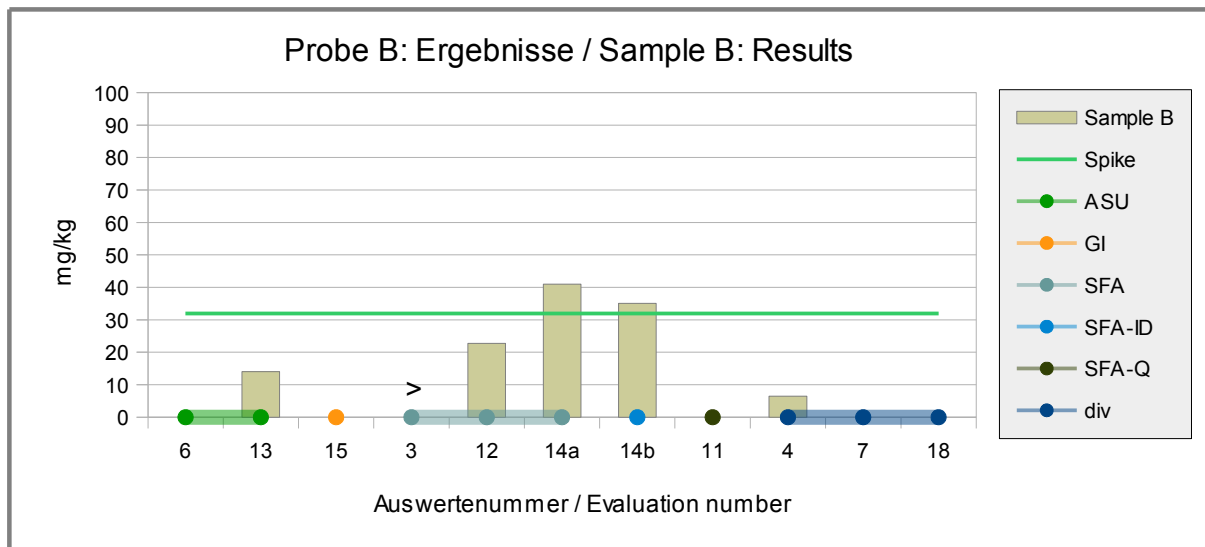


Abb./Fig. 8: PCR-Ergebnisse Erdnuss (Probe B)
 grüne Linie = Zusatzniveau (Spike)
 runde Symbole = Zuordnung der Methoden (s. Legende)

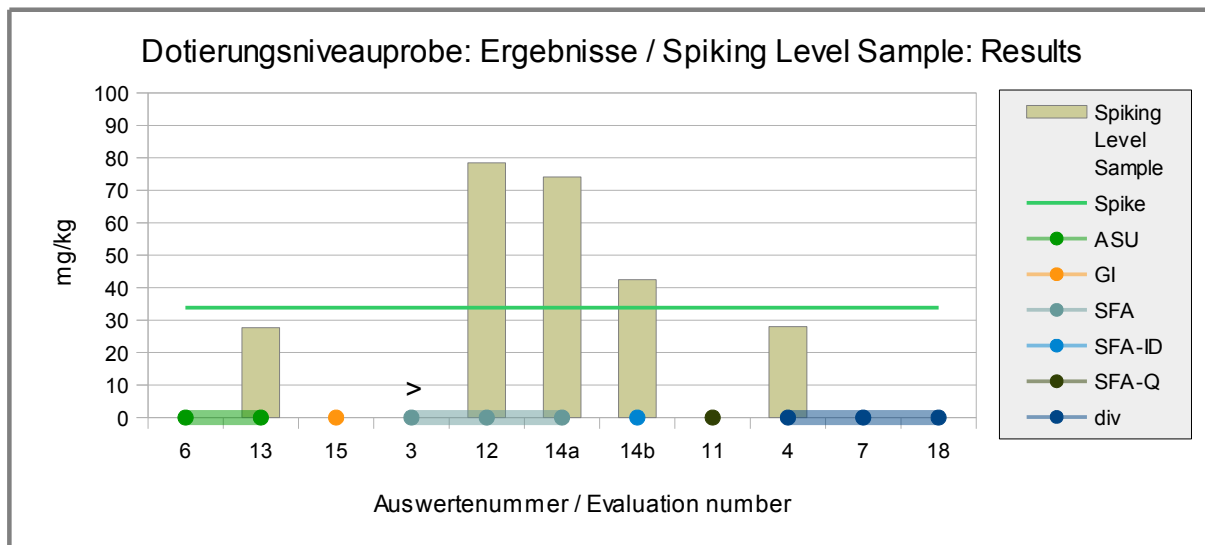


Abb./Fig. 9: PCR-Ergebnisse Erdnuss (Dotierungsniveauprobe)
 grüne Linie = Zusatzniveau (Spike)
 runde Symbole = Zuordnung der Methoden (s. Legende)

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

Auswertenummer	Dotierungsniveauprobe	Wiederfindungsrate*	Probe B	Wiederfindungsrate*	Methode	Hinweis
	[mg/kg]	[%]	[mg/kg]	[%]		
6					ASU	
13	27,7	82	14	44	ASU	
15					GI	
3	>0,4		>0,4		SFA	
12	78,5	232	22,7	71	SFA	
14a	74,1	219	41,0	128	SFA	
14b	42,4	125	35,1	110	SFA-ID	
11					SFA-Q	
4	28,0	83	6,50	20	div	
7					div	
18					div	

AB**	50-150 %	AB**	50-150 %
Anzahl im AB	3	Anzahl im AB	3
Prozent im AB	60	Prozent im AB	60

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

** Akzeptanzbereich der AOAC für Allergen-ELISAs

Methoden:

ASU = ASU §64 Methode/method

GI = GEN-IAL First Allergen

SFA = Sure Food Allergen, R-Biopharm / Congen

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

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

div = keine genaue Angabe / andere Methode

Anmerkung:

Ein Teilnehmer (Auswertenummer 14b) hat mittels PCR sowohl für die Dotierungsniveauprobe als auch für die prozessierte dotierte Lebensmittelmatrix-Probe B Wiederfindungsraten im Bereich der AOAC-Anforderung von 50-150% erhalten. Insgesamt lagen für die Dotierungsniveauprobe und Probe B jeweils 60% (3) der Ergebnisse innerhalb des Akzeptanzbereichs.

4.2 Vergleichsuntersuchung Mandel

4.2.1 ELISA-Ergebnisse: Mandel

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]			
2	negativ	<0,4	positiv	22,3	2/2 (100%)	AQ	
7	negativ		positiv	148	2/2 (100%)	AQ	Ergebnis umgerechnet °
15	negativ	<NWG	positiv	22,0	2/2 (100%)	AQ	
3a	negativ	<1	positiv	110	2/2 (100%)	BF	
16	negativ	0	positiv	26,8	2/2 (100%)	BF	
5	negativ	< 0,2	positiv	24,0	2/2 (100%)	IL	
9	negativ	<0,4	positiv	24,4	2/2 (100%)	IL	
3b	negativ	<2,5	positiv	>20	2/2 (100%)	RS-F	
6	negativ	< BG	positiv	30,0	2/2 (100%)	RS-F	
10	negativ	<15	positiv	179	2/2 (100%)	RS-F	Ergebnis umgerechnet °
11	negativ		positiv	32,1	2/2 (100%)	RS-F	
14	negativ	<2,5	positiv	36,5	2/2 (100%)	RS-F	
17	negativ	<2,50	positiv	36,6	2/2 (100%)	RS-F	
18	negativ	<2,5	positiv	37,0	2/2 (100%)	RS-F	
19	negativ	<2,5	positiv	42,0	2/2 (100%)	RS-F	
1	negativ	<2,5	positiv	27,2	2/2 (100%)	VT	
8	negativ		positiv	94,4	2/2 (100%)	VT	Ergebnis umgerechnet °

° Umrechnung S. 19

	Probe A	Probe B
Anzahl positiv	0	17
Anzahl negativ	17	0
Prozent positiv	0	100
Prozent negativ	100	0
Konsenswert	negativ	positiv

Methoden:

AQ = AgraQuant, RomerLabs
 BF = MonoTrace ELISA, BioFront Technologies
 IL = Immunolab
 RS-F= Ridascreen® Fast, R-Biopharm
 VT = Veratox, Neogen

Anmerkung:

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

Quantitative Auswertung ELISA: Probe B

Auswertenummer	Mandel [mg/kg]	z-Score X _{pt} _{ALL}	z-Score X _{pt} _{RS-F}	Methode	Hinweis
2	22,3	-1,0		AQ	
7	148	16		AQ	Ergebnis umgerechnet ° Ausreißer ausgeschlossen
15	22,0	-1,1		AQ	
3a	110	11		BF	Ausreißer ausgeschlossen
16	26,8	-0,43		BF	
5	24,0	-0,80		IL	
9	24,4	-0,75		IL	
3b	>20			RS-F	
6	30,0	0,00	-0,64	RS-F	
10	179	20	16	RS-F	Ergebnis umgerechnet ° Ausreißer ausgeschlossen
11	32,1	0,28	-0,40	RS-F	
14	36,5	0,87	0,09	RS-F	
17	36,6	0,88	0,10	RS-F	
18	37,0	0,93	0,15	RS-F	
19	42,0	1,6	0,71	RS-F	
1	27,2	-0,37		VT	
8	94,4	8,6		VT	Ergebnis umgerechnet ° Ausreißer ausgeschlossen

° Umrechnung S. 19

Methoden:

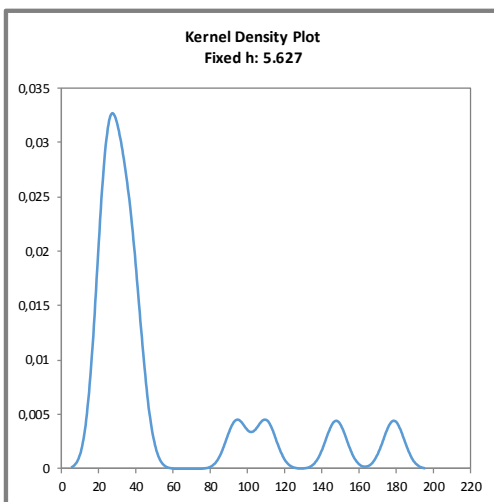
AQ = AgraQuant, RomerLabs

BF = MonoTrace ELISA, BioFront Technologies

IL = Immunolab

RS-F= Ridascreen® Fast, R-Biopharm

VT = Veratox, Neogen

**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 mehreren kleinen Nebenpeaks > 90 mg/kg, die auf Ausreißer zurückgehen (eventuell wurden die umgerechneten Ergebnisse irrtümlich als Mandelprotein abgegeben).

Kenndaten: Quantitative Auswertung ELISA Mandel

Probe B

Kenndaten	Alle Ergebnisse [mg/kg]	Methode RS-F [mg/kg]
Zugewiesener Wert (X_{pt})	X_{pt_ALL}	$X_{pt_METHOD\ RS-F}$
Anzahl der Messergebnisse [°]	12	6
Anzahl der Ausreißer	4	1
Mittelwert	30,1	35,7
Median	28,6	36,6
Robuster Mittelwert (X_{pt})	30,0	35,7
Robuste Standardabweichung (S^*)	7,43	4,77
Zielkenndaten:		
Zielstandardabweichung σ_{pt}	7,50	8,93
Untere Grenze des Zielbereichs	15,0	17,9
Obere Grenze des Zielbereichs	45,0	53,6
Quotient S^*/σ_{pt}	0,99	0,53
Standardunsicherheit $U_{(X_{pt})}$	2,68	2,43
Ergebnisse im Zielbereich	12	6
Prozent im Zielbereich	100	100

[°] Messergebnisse ohne Ausreißer (Ergebnisse Nr. 3a, 7, 8 und 10)

Methoden:

RS-F = R-Biopharm, Ridascreen® Fast

Anmerkungen zu den Kenndaten und Vergleich der Bezugswerte:

Die Kerndichte-Schätzung zeigte annähernd eine symmetrische Verteilung der Ergebnisse. Ausreißer wurden von der statistischen Berechnung ausgeschlossen.

Die Auswertung der Ergebnisse aller Methoden bzw. von Methode RS-F zeigten eine geringe Variabilität der Ergebnisse. Die Quotienten S^*/σ_{pt} lagen bei ca. 1,0 und 0,5. 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 zugewiesenen Werte der Auswertungen lagen mit 44% bzw. 52% vom Zusatzniveau von Mandel zu Probe B etwas unterhalb bzw. im unteren Bereich der relevanten Anforderungen für die eingesetzten Methoden (s. 3.4.3 und "Wiederfindungsraten für Mandel" S.43).

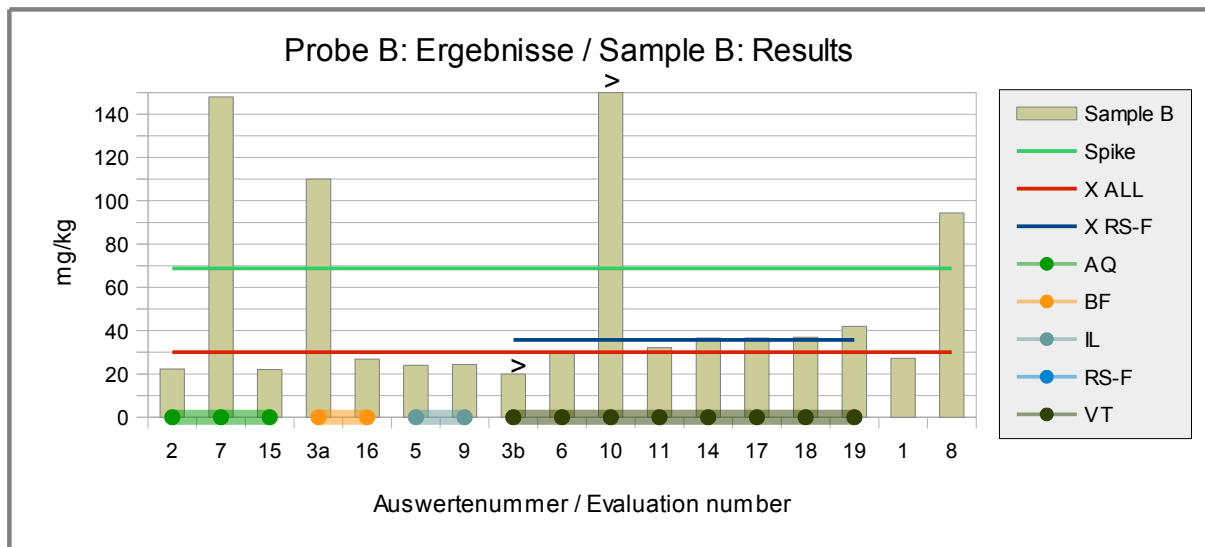


Abb./Fig. 11: ELISA-Ergebnisse Mandel
 grüne Linie = Zusatzniveau (Spike)
 rote Linie = robuster Mittelwert aller Ergebnisse
 blaue Linie = robuster Mittelwert Ergebnisse Methode RS-F
 runde Symbole = Zuordnung der Methoden (s. Legende)

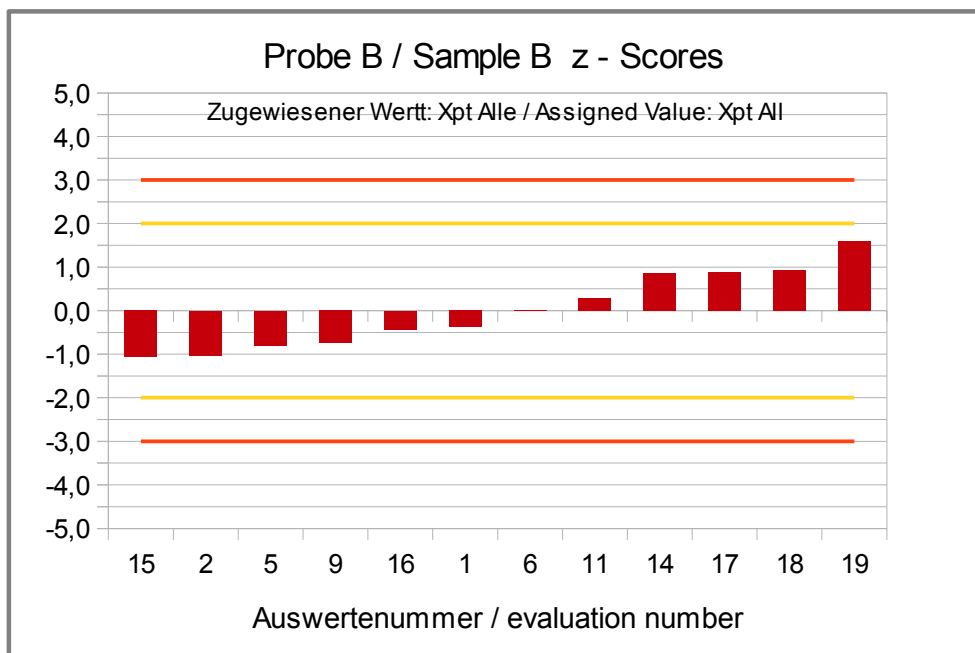


Abb./Fig. 12:
 z-Scores (ELISA-Ergebnisse als Mandel)
 Zugewiesener Wert: robuster Mittelwert (Alg. A) aller Ergebnisse

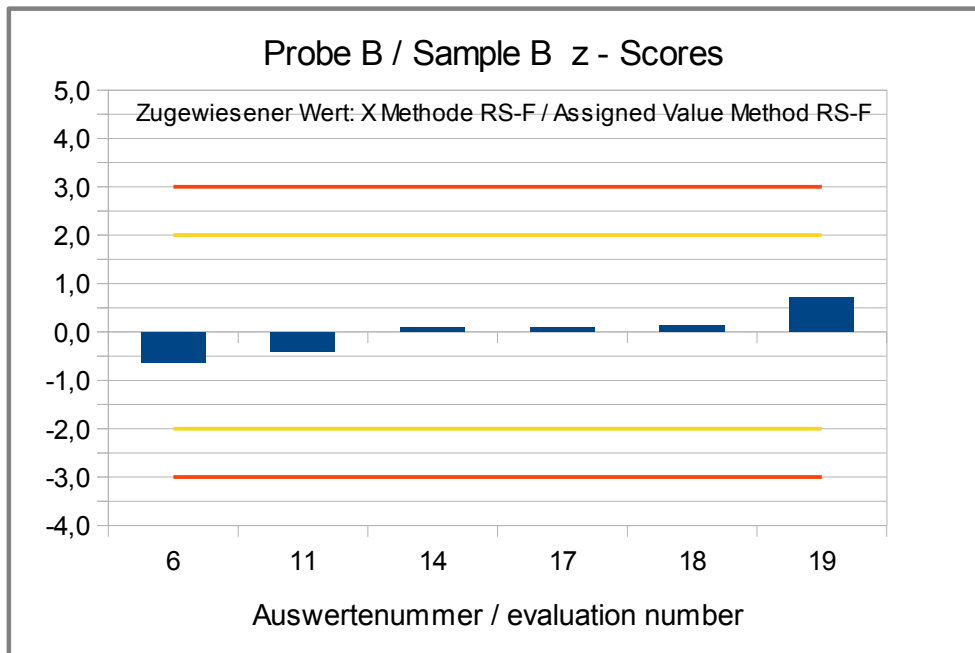


Abb./Fig. 13:

z-Scores (ELISA-Ergebnisse als Mandel)

Zugewiesener Wert: robuster Mittelwert (Alg. A) Methode RS-F (R-Biopharm, Ridascreen Fast)

Quantitative Auswertung ELISA: Dotierungsniveauprobe

Auswertenummer	Mandel [mg/kg]	z-Score X _{pt} ^{ALL}	z-Score X _{pt} ^{RS-F}	Methode	Hinweis
2	31,6	-0,73		AQ	
7	215	18		AQ	Ergebnis umgerechnet ° Ausreißer ausgeschlossen
15	31,0	-0,79		AQ	
3a	141	11		BF	Ausreißer ausgeschlossen
16	66,3	2,9		BF	
5	27,0	-1,2		IL	
9	56,3	1,8		IL	
3b	>20			RS-F	
6	30,0	-0,89	-0,80	RS-F	
10	198	17	17	RS-F	Ergebnis umgerechnet ° Ausreißer ausgeschlossen
11				RS-F	
14	46,5	0,81	0,95	RS-F	
17	37,6	-0,10	0,01	RS-F	
18	38,0	-0,06	0,05	RS-F	
19	37,0	-0,17	-0,06	RS-F	
1	36,9	-0,18		VT	
8	188	15		VT	Ergebnis umgerechnet ° Ausreißer ausgeschlossen

° Umrechnung S. 19

Methoden:

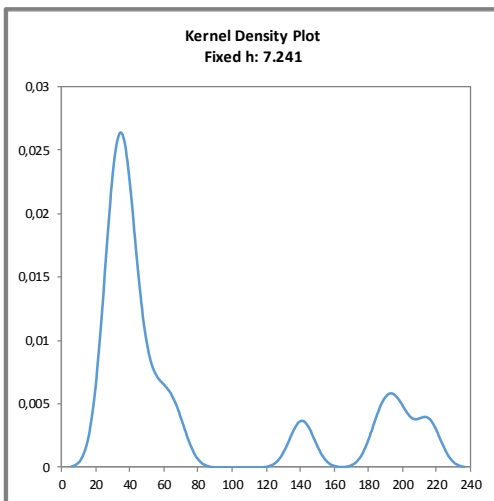
AQ = AgraQuant, RomerLabs

BF = MonoTrace ELISA, BioFront Technologies

IL = Immunolab

RS-F = Ridascree® Fast, R-Biopharm

VT = Veratox, Neogen

**Abb. / Fig. 14:**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. 60 mg/kg. Mehrere kleine Nebenpeaks > 120 mg/kg gehen auf Ausreißer zurück (eventuell wurden die umgerechneten Ergebnisse irrtümlich als Mandelprotein abgegeben).

Kenndaten: Quantitative Auswertung ELISA Mandel

Dotierungsniveauprobe

Kenndaten	Alle Ergebnisse [mg/kg]	Methode RS-F [mg/kg]
Zugewiesener Wert (X_{pt})	X_{pt}_{ALL}	$X_{pt}_{METHOD\ RS-F}$
Anzahl der Messergebnisse [°]	11	5
Anzahl der Ausreißer	4	1
Mittelwert	39,8	37,8
Median	37,0	37,6
Robuster Mittelwert (X_{pt})	38,6	37,5
Robuste Standardabweichung (S^*)	10,7	5,84
<i>Zielkenndaten:</i>		
Zielstandardabweichung σ_{pt}	9,66	9,39
Untere Grenze des Zielbereichs	19,3	18,8
Obere Grenze des Zielbereichs	57,9	56,3
<i>Quotient S^*/σ_{pt}</i>	<i>1,1</i>	<i>0,62</i>
<i>Standardunsicherheit $U(X_{pt})$</i>	<i>4,05</i>	<i>3,27</i>
<i>Ergebnisse im Zielbereich</i>	<i>10</i>	<i>5</i>
<i>Prozent im Zielbereich</i>	<i>91</i>	<i>100</i>

[°] Messergebnisse ohne Ausreißer (Ergebnisse Nr. 3a, 7, 8 und 10)

Methoden:

RS-F = R-Biopharm, Ridascreen® Fast

Anmerkungen zu den Kenndaten und Vergleich der Bezugswerte:

Die Kerndichte-Schätzung zeigte annähernd eine symmetrische Verteilung der Ergebnisse. Ausreißer wurden von der statistischen Berechnung ausgeschlossen.

Die Auswertung der Ergebnisse aller Methoden bzw. von Methode RS-F zeigten eine geringe Variabilität der Ergebnisse. Die Quotienten S^*/σ_{pt} lagen bei 1,1 und 0,6. 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 zugewiesenen Werte der Auswertungen lagen mit 111% bzw. 108% vom Zusatzniveau von Mandel zur Dotierungsniveauprobe im Bereich der relevanten Anforderungen für die eingesetzten Methoden (s. 3.4.3 und "Wiederfindungsraten für Mandel" S.43).

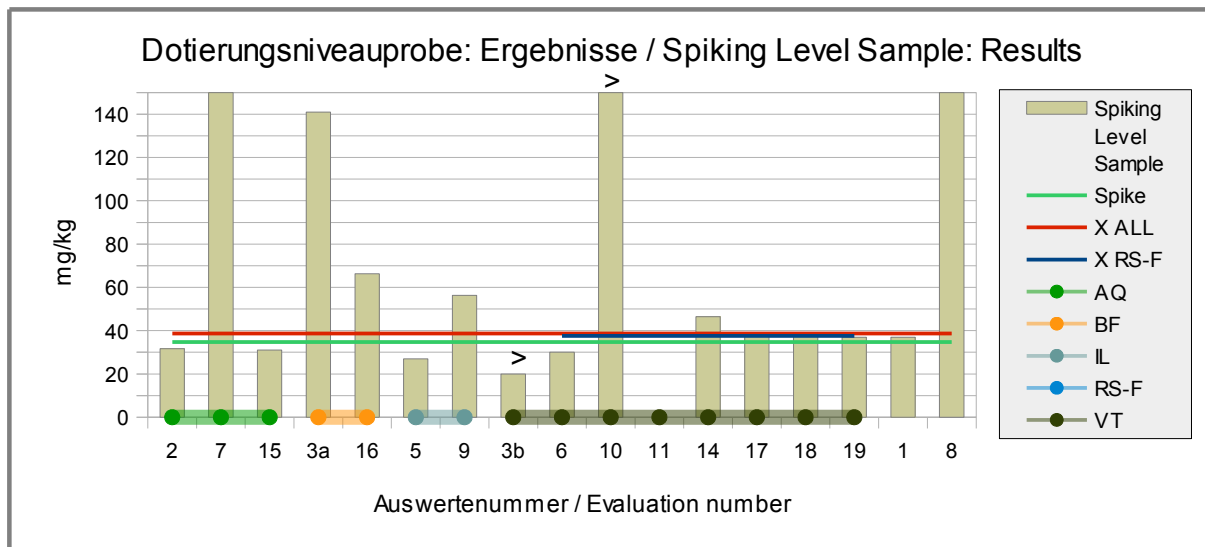


Abb./Fig. 15: ELISA-Ergebnisse Mandel
 grüne Linie = Zusatzniveau (Spike)
 rote Linie = robuster Mittelwert aller Ergebnisse
 blaue Linie = robuster Mittelwert Ergebnisse Methode RS-F
 runde Symbole = Zuordnung der Methoden (s. Legende)

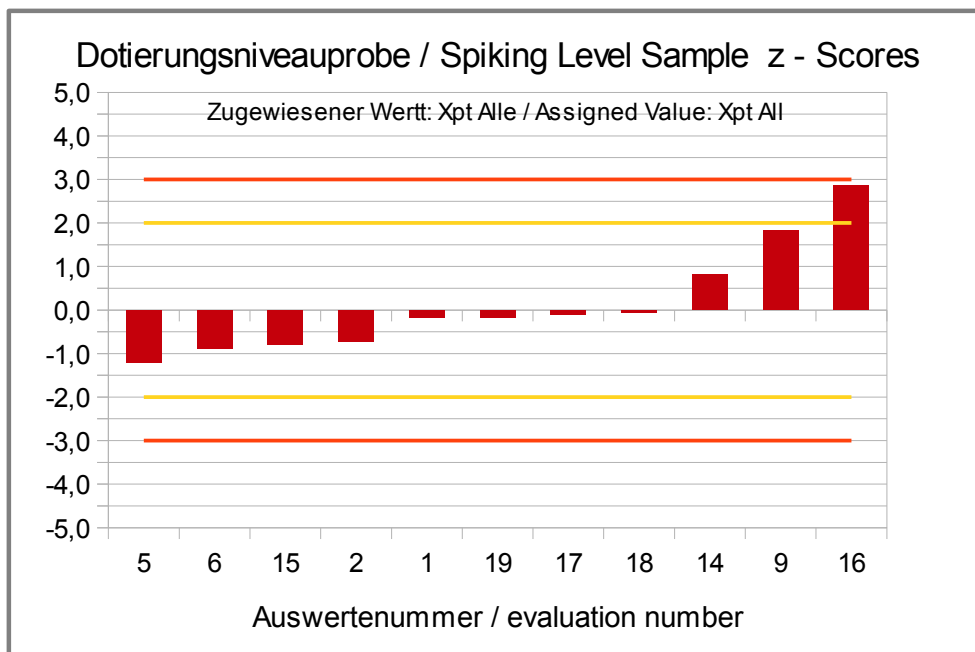


Abb./Fig. 16:
 z-Scores (ELISA-Ergebnisse als Mandel)
 Zugewiesener Wert: robuster Mittelwert (Alg. A) aller Ergebnisse

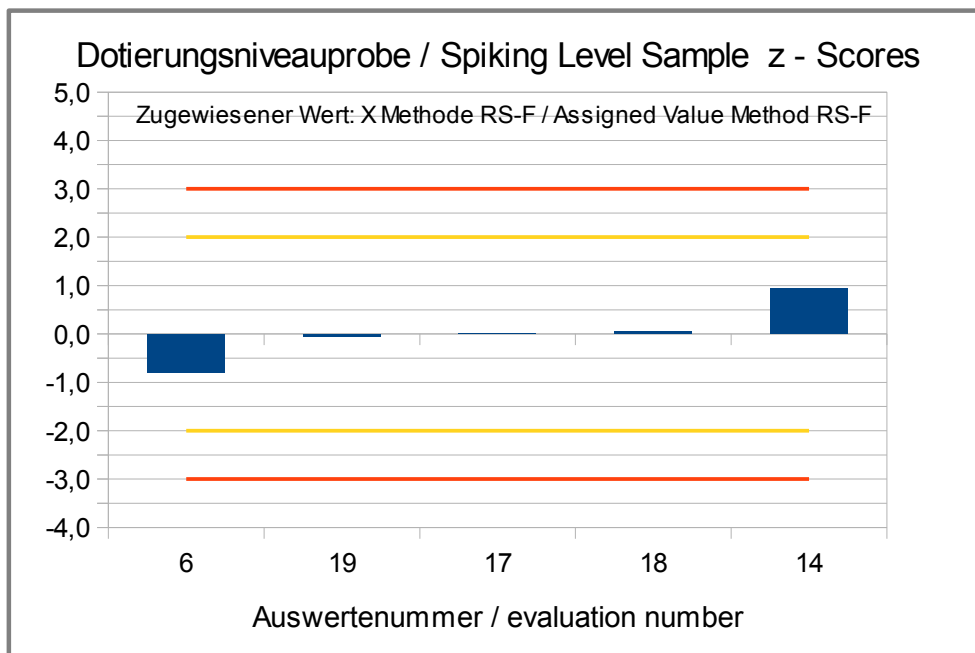


Abb./Fig. 17:

z-Scores (ELISA-Ergebnisse als Mandel)

Zugewiesener Wert: robuster Mittelwert (Alg. A) Methode RS-F (R-Biopharm, Ridascreen Fast)

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

Auswertenummer	Dotierungsniveauprobe	Wiederfindungsrate*	Probe B	Wiederfindungsrate*	Methode	Hinweis
	[mg/kg]	[%]	[mg/kg]	[%]		
2	31,6	91	22,3	32	AQ	
7	215	620	148	215	AQ	Ergebnis umgerechnet °
15	31,0	89	22,0	32	AQ	
3a	141	406	110	160	BF	
16	66,3	191	26,8	39	BF	
5	27,0	78	24,0	35	IL	
9	56,3	162	24,4	36	IL	
3b	>20		> 20		RS-F	
6	30,0	86	30,0	44	RS-F	
10	198	571	179	261	RS-F	Ergebnis umgerechnet °
11			32,1	47	RS-F	
14	46,5	134	36,5	53	RS-F	
17	37,6	108	36,6	53	RS-F	
18	38,0	110	37,0	54	RS-F	
19	37,0	107	42,0	61	RS-F	
1	36,9	106	27,2	40	VT	
8	188	542	94,4	137	VT	Ergebnis umgerechnet °

° Umrechnung S. 19

AB**	50-150 %	AB**	50-150 %
Anzahl im AB	9	Anzahl im AB	5
Prozent im AB	60	Prozent im AB	31

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

Methoden:

AQ = AgraQuant, RomerLabs
 BF = MonoTrace ELISA, BioFront Technologies
 IL = Immunolab
 RS-F= Ridascreen® Fast, R-Biopharm
 VT = Veratox, Neogen

Anmerkung:

60% (9) der Teilnehmer haben mit der Dotierungsniveauprobe mittels ELISA eine Wiederfindungsrate im Bereich der AOAC-Anforderung von 50-150% erhalten. Für die prozessierte dotierte Lebensmittelmatrix-Probe B lagen 31% (5) der Wiederfindungsraten in diesem Akzeptanzbereich.

4.2.2 PCR-Ergebnisse: Mandel**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		
4	negativ		positiv	< 20	2/2 (100%)	ASU	
7	negativ		negativ		1/2 (50%)	ASU	keine Positivprobe detektiert
13	negativ		positiv	19,6	2/2 (100%)	ASU	
15	negativ		positiv		2/2 (100%)	GI	
6	negativ		positiv		2/2 (100%)	SFA	
14	negativ	<1	positiv	15,1	2/2 (100%)	SFA-ID	
11	negativ		positiv		2/2 (100%)	SFA-Q	

	Probe A	Probe B
Anzahl positiv	0	6
Anzahl negativ	7	1
Prozent positiv	0	86
Prozent negativ	100	14
Konsenswert	negativ	positiv

Methoden:

ASU = ASU §64 Methode/method

GI = GEN-IAL First Allergen

SFA = Sure Food Allergen, R-Biopharm / Congen

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

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

Anmerkung:

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

Quantitative Auswertung PCR: Probe B

Eine quantitative Auswertung erfolgte nicht, weil zu wenige quantitative Ergebnisse angegeben wurden.

(Quantitative) Auswertung PCR: Dotierungsniveauprobe

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

Auswertenummer	Mandel	Mandel	z-Score Xpt _{ALL}	Methode	Hinweis
	pos/neg	[mg/kg]			
4	positiv	38,0		ASU	
7	positiv			ASU	
13	positiv	< BG		ASU	
15	positiv			GI	
6	positiv			SFA	
14	positiv	20,2		SFA-ID	
11	positiv			SFA-Q	

Anzahl positiv	7	
Anzahl negativ	0	
Prozent positiv	100	
Prozent negativ	0	
Konsenswert	positiv	

Methoden:

ASU = ASU §64 Methode/method

GI = GEN-IAL First Allergen

SFA = Sure Food Allergen, R-Biopharm / Congen

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

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

Anmerkung:

Für die Dotierungsniveauprobe wurden 100% positive Ergebnisse erhalten.

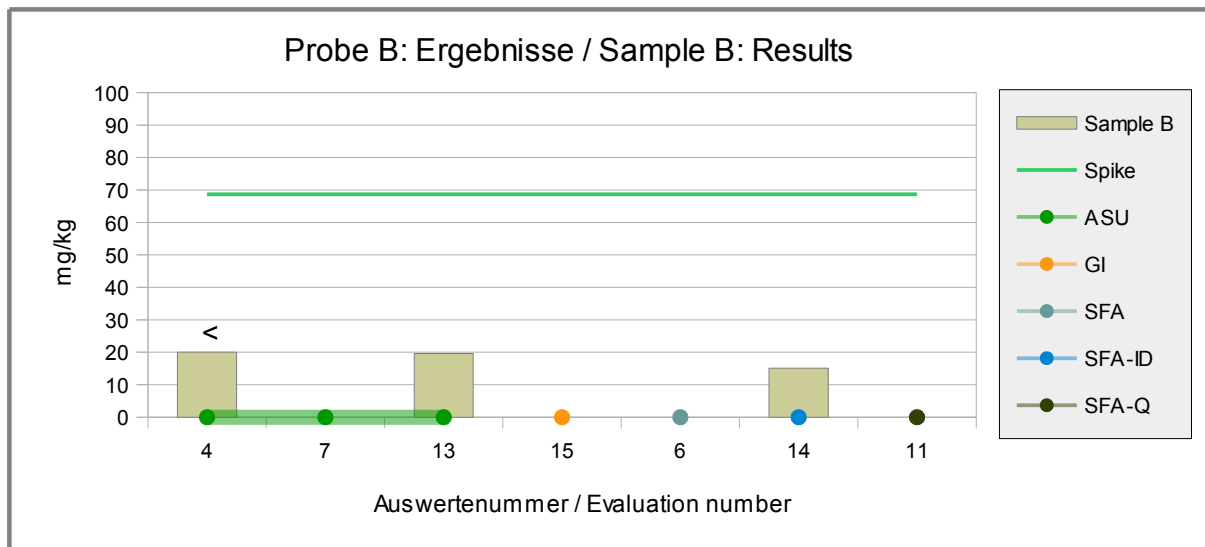


Abb./Fig. 18: PCR-Ergebnisse Mandel Probe B
 grüne Linie = Zusatzniveau (Spike)
 runde Symbole = Zuordnung der Methoden (s. Legende)

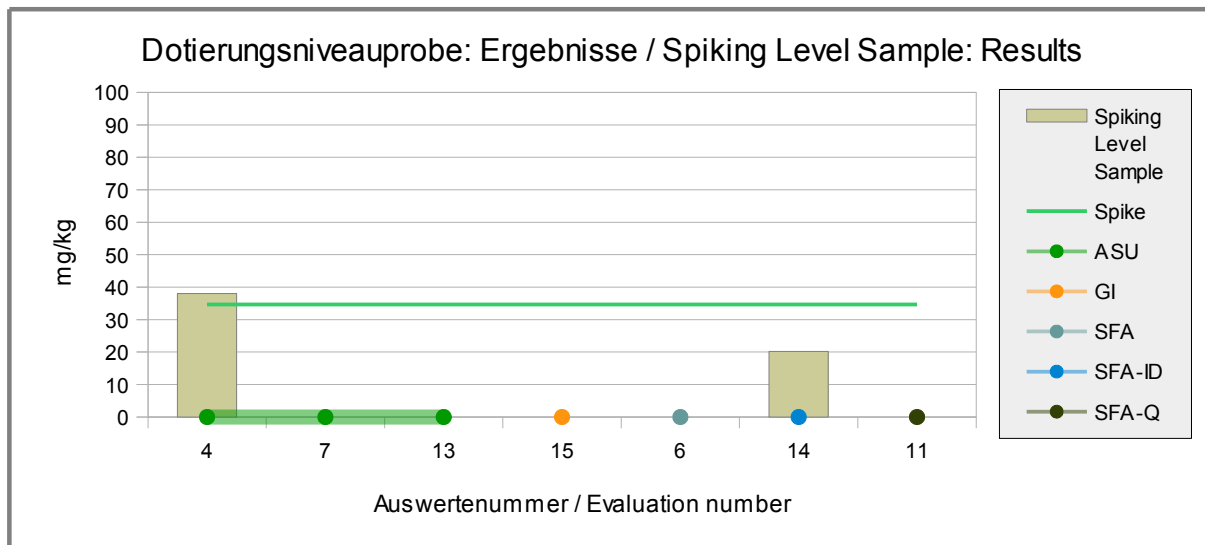


Abb./Fig. 19: PCR-Ergebnisse Mandel Dotierungs-niveauprobe
 grüne Linie = Zusatzniveau (Spike)
 runde Symbole = Zuordnung der Methoden (s. Legende)

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

Auswertenummer	Dotierungsniveauprobe	Wiederfindungsrate*	Probe B	Wiederfindungsrate*	Methode	Hinweis
	[mg/kg]	[%]	[mg/kg]	[%]		
4	38	110	< 20		ASU	
7					ASU	
13	< BG		19,6	29	ASU	
15					GI	
6					SFA	
14	20,19	58	15,1	22	SFA-ID	
11					SFA-Q	

AB**	50-150 %	AB**	50-150 %
Anzahl im AB	2	Anzahl im AB	0
Prozent im AB	100	Prozent im AB	0

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

** Akzeptanzbereich der AOAC für Allergen-ELISAs

Methoden:

ASU = ASU §64 Methode/method

GI = GEN-IAL First Allergen

SFA = Sure Food Allergen, R-Biopharm / Congen

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

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

Anmerkung:

Zwei Teilnehmer haben mit der Dotierungsniveauprobe mittels PCR eine Wiederfindungsrate im Bereich der AOAC-Anforderung von 50-150% erhalten. Für die prozessierte dotierte Lebensmittelmatrix-Probe B lagen die Wiederfindungsraten unterhalb dieses Akzeptanzbereichs.

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: Erdnuss

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
BF	3a		negativ	<1	positiv	50,8	positiv	216		1		Erdnuss	MonoTrace Peanut ELISA kit, BioFront Technologies
BF	16	01.11.18	negativ	0	positiv	35,2	positiv	118	0,24	1		Erdnuss	MonoTrace Peanut ELISA kit, BioFront Technologies
BK	1	03.10.18	negativ	<1	positiv	52,1	positiv	175,1	1	1		Erdnuss	BioKits Peanut Assay Kit, Neogen
BK	6	24/09/2018, 26/09/2018	-	< BG	-	31	-	85		1		Erdnuss	BioKits Peanut Assay Kit, Neogen
IL	5	24.09.18	negativ	< 0,1	positiv	35	positiv	71	0,1	1		Erdnuss	Immunolab Peanut ELISA
IL	9	30.10.18	-	<1,0	-	37,5	-	100		1		Erdnuss	Immunolab Peanut ELISA
IL	15	30.11.18	negativ	<NWG	positiv	37,6	positiv	109	0,1	1	15	Erdnuss	Immunolab Peanut ELISA
MI-II	18	26.09.18	negativ	<0,31	positiv	1,3	positiv	2,8	0,12	0,31		Erdnussprotein	Peanut ELISA Kit-II, Morinaga
RS-F	3b		negativ	<2,5	positiv	>20	positiv	>20		2,5		Erdnuss	Ridascreen Fast Peanut (R6202), r-Biopharm
RS-F	7	10.10.18	negativ		positiv	50,9	positiv	103,7	2,5	2,5	34	Erdnuss	Ridascreen Fast Peanut (R6202), r-Biopharm
RS-F	10	12.10.18	-	<2,5	-	52	-	84	0,13	2,5	5,2	Erdnussprotein	Ridascreen Fast Peanut (R6202), r-Biopharm
RS-F	11	24.10.18	negativ		positiv	48,8	positiv		2,5	2,5	30,6	Erdnuss	Ridascreen Fast Peanut (R6202), r-Biopharm
RS-F	12	30.10.18	negativ	< 0.13	positiv	42,7	positiv	125,3	0,13	2,5		Erdnuss	Ridascreen Fast Peanut (R6202), r-Biopharm
RS-F	14	27.09.18	negativ	<2.5	positiv	48,5	positiv	83,8	2,5	2,5	35,66	Erdnuss	Ridascreen Fast Peanut (R6202), r-Biopharm
RS-F	17	10.10.18	negativ	<2,50	positiv	48,53	positiv	79,45	0,13	2,5	12,18	Erdnuss	Ridascreen Fast Peanut (R6202), r-Biopharm
VT	1	02.10.18	negativ	<2,5	positiv	41,2	positiv	73,7	2,5	2,5		Erdnuss	Veratox Peanut, Neogen

* NWG Nachweisgrenze / BG Bestimmungsgrenze

* LOD limit of detection / LOQ limit of quantitation

* MU Messunsicherheit / MU measurement uncertainty

Fortsetzung ELISA Erdnuss:

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	
BF	3a			ja	
BF	16		1:10 Extraktionsverhältnis, bei 62°C für 10 min	nein	Produkt # PA3-EK
BK	1				
BK	6	Polyklonaler AK gegen Conarachin (Ara h1)	nach Anleitung	ja	
IL	5	polyklonal			
IL	9			ja	
IL	15			ja	
MHI	18	erkennt Erdnussproteine	lt. Herstellerangaben	ja	
RS-F	3b			nein	
RS-F	7		gemäß Handbuch	ja	
RS-F	10	Antikörper detektieren spezifisch Erdnussproteine, inklusive die Erdnussallergene Ara h 1 und Ara h 2.	1 g Probe + 20 ml Extraktionspuffer/erwärmt auf 60°C/10min/ zentrifugieren 10 min 2500g/ 100µL pro Kavität	nein	weitere Verdünnung 1:10 für Proben B und C
RS-F	11		nach Testkitanleitung	ja	
RS-F	12	Antikörper detektieren spezifisch Erdnussproteine, inklusive die Erdnussallergene Ara h 1 und Ara h 2.	nach Testkitanleitung	ja	
RS-F	14	nach Testkitanleitung	nach Testkitanleitung	ja	
RS-F	17	Ara h 1, Ara h 2	lt. Testkitanweisung mit Zugabe 1g Magermilchpulver	ja	
VT	1				
VT	8		PBS/15min/60°C	ja	

5.1.2 ELISA: Mandel

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	%		
AQ	2	17.10.18	negativ	<0,4	positiv	22,3	positiv	31,6	0,2	0,4		Mandel	AgraQuant ELISA Almond COKAL0748, RomerLabs
AQ	7	04.10.18	negativ		positiv	24	positiv	34,9	0,4	0,4	16	Mandelprotein	AgraQuant ELISA Almond COKAL0748, RomerLabs
AQ	15	30.11.18	negativ	<NWG	positiv	22	positiv	31	0,2	0,4	15	Mandel	AgraQuant ELISA Almond COKAL0748, RomerLabs
BF	3a		negativ	<1	positiv	110	positiv	141		1		Mandel	MonoTrace Almond ELISA kit, BioFront Technologies
BF	16	01.11.18	negativ	0	positiv	26,8	positiv	66,3	0,23	1		Mandel	MonoTrace Almond ELISA kit, BioFront Technologies
IL	5	24.09.18	negativ	< 0,2	positiv	24	positiv	27	0,2	0,4		Mandel	Immunolab Almond ELISA
IL	9	30.10.18	-	<0,4	-	24,4	-	56,3		0,4		Mandel	Immunolab Almond ELISA
RS-F	3b		negativ	<2,5	positiv	>20	positiv	>20		2,5		Mandel	Ridascreen® FAST Almond R6901, R-Biopharm
RS-F	6	16/10/2018, 17/10/2018	-	< BG	-	30	-	30		2,5		Mandel	Ridascreen® FAST Almond R6901, R-Biopharm
RS-F	10	15.10.18	-	<2,5	-	29	-	32	0,1	2,5		Mandelprotein	Ridascreen® FAST Almond R6901, R-Biopharm
RS-F	11	24.10.18	negativ		positiv	32,1	positiv		2,5	2,5	31,3	Mandel	Ridascreen® FAST Almond R6901, R-Biopharm
RS-F	14	19.10.18	negativ	<2,5	positiv	36,52	positiv	46,48	2,5	2,5	36,17	Mandel	Ridascreen® FAST Almond R6901, R-Biopharm
RS-F	17	10.10.18	negativ	<2,50	positiv	36,6	positiv	37,63	0,1	2,5	27,37	Mandel	Ridascreen® FAST Almond R6901, R-Biopharm
RS-F	18	26.09.18	negativ	<2,5	positiv	37	positiv	38	1,7	2,5		Mandel	Ridascreen® FAST Almond R6901, R-Biopharm
RS-F	19	02.11.18	-	<2,5	-	42	-	37	1,5	2,5	40	Mandel	Ridascreen® FAST Almond R6901, R-Biopharm
VT	1	16.10.18	negativ	<2,5	positiv	27,2	positiv	36,9	2,5	2,5		Mandel	Veratox Almond, Neogen
VT	8	18.10.18	negativ		positiv	15,3	positiv	30,4	3	10	30	Mandelprotein	Veratox Almond, Neogen

* NWG Nachweisgrenze / BG Bestimmungsgrenze

* LOD limit of detection / LOQ limit of quantitation

* MU Messunsicherheit / MU measurement uncertainty

Fortsetzung *ELISA Mandel*:

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	2				
AQ	7		gemäß Handbuch	ja	Kreuzreaktion zu anderen Prunusarten vorhanden
AQ	15			ja	
BF	3a			ja	
BF	16	Monoklonaler Antikörper-basierender Assay	1:20 Extraktionsverhältnis, bei 62°C für 10 min	nein	Produkt # AP2-EK
IL	5	polyklonal			
IL	9			ja	
RS-F	3b			nein	
RS-F	6	Mandelprotein	nach Anleitung	ja	
RS-F	10	spezifische Antikörper gegen Mandelproteine.	1 g Probe + 20 ml Extraktionspuffer/erwärmen auf 60°C/10min/ zentrifugieren 10 min 2500g/ 100µL pro Kavität	nein	weitere Verdünnung 1:10 für Probe B, und 1:2 für Probe C
RS-F	11		nach Testkitanleitung	ja	
RS-F	14	nach Testkitanleitung	nach Testkitanleitung	ja	
RS-F	17	Mandelprotein	lt. Testkitanweisung mit Zugabe 1g Magermilchpulver	ja	
RS-F	18	erkennt Mandelproteine	lt. Herstellerangaben	ja	
RS-F	19			ja	
VT	1				Matrixeffekte für Probe beobachtet. Nur die Ergebnisse für verdünnte Probe berichtet.
VT	8		PBS/15min/60°C	ja	

5.1.3 PCR: Erdnuss

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	qualitativ	mg/kg	qualitativ	mg/kg	qualitativ	mg/kg	mg/kg	mg/kg	%		Test-Kit + Anbieter
ASU	6	25.09.18	negativ		positiv		positiv					Erdnuss-DNA	ASU §64 Methode/method
ASU	13	31.10.18	negativ		positiv	14	positiv	27,7	5	20	50	Erdnuss	ASU §64 Methode/method
GI	15	29.11.18	negativ		positiv		positiv					Erdnuss-DNA	GEN-IAL First Allergen, Coring System Diagnostix
SFA	3		negativ	<0,4	positiv	>0,4	positiv	>0,4				Erdnuss	Sure Food Allergen, R-Biopharm / Congen
SFA	12	29.10.18	negativ	< 0.4	positiv	22,7	positiv	78,5	0,4	1		Erdnuss	Sure Food Allergen, R-Biopharm / Congen
SFA	14a	26.09.18	negativ	<1	positiv	40,97	positiv	74,09	1	1	29,12	Erdnuss	Sure Food Allergen, R-Biopharm / Congen
SFA-ID	14b	26.09.18	negativ	<1	positiv	35,07	positiv	42,42	1	1	30,56	Erdnuss	Sure Food Allergen ID, R-Biopharm / Congen
SFA-Q	11	12.10.18	negativ		positiv		positiv		0,4			Erdnuss-DNA	Sure Food Allergen Quant, R-Biopharm / Congen
div	4	02.10.18	negativ		positiv	6,5	positiv	28	1	5	50	Erdnuss	andere: Ladenburger et al (2017) J AOAC Intern 101 (1), modifiziert
div	7	11.10.18	negativ		negativ		negativ					Erdnuss-DNA	Auswahl PCR-Methoden
div	18	26.09.18	negativ		positiv		positiv		4			Erdnuss-DNA	interne Methode

* 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	
ASU	6	86bp langer Sequenzabschnitt des Gens für Ara h2	SureFood Prep Advanced r-biopharm/ Proteinase K/ Real Time PCR/ 45 Zyklen	ja	
ASU	13	Ara h 2 (86 bp)	Automatisierte Extraktion (Maxwell RSC), kein Clean-up, 50 Zyklen	ja	Qualitativer Test mittels SureFood Allergen Peanut der Fa. Congen und mittels § 64 LFGB L-44.00-11(Erdnuss)
GI	15			ja	
SFA	3			ja	
SFA	12		nach Testkitanleitung	ja	
SFA	14a	nach Testkitanleitung	nach Testkitanleitung	ja	Kit Code S3603
SFA-ID	14b	nach Testkitanleitung	nach Testkitanleitung (Quantifizierung mit Quantard 40)	ja	Kit Code S3103
SFA-Q	11		nach Testkitanleitung	ja	
div	4	ATPase Untereinheit 6 (atp6) 104bp	CTAB-Präzipitationsmethode, s. z.B. ASU L 18.00-22	ja	Kalibrierung/Quantifizierung mittels Matrix-Standards, dotiertes Material: Erdnuss, geröstet, entfettet.
div	7	Ara h 2 L77197	Maxwell FFS Kit	ja	NWG: 0,02 ng/µl Erdnuss DNA /PCR-Ansatz
div	18		CTAB / Proteinase K / Promega Wizard DNA CleanUp / Real-time PCR / 45Zyklen	ja	

5.1.4 PCR: Mandel

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
ASU	4	01.10.18	negativ		positiv	< 20	positiv	38	5	20	50	Mandel	ASU §64 Methode/method
ASU	7	11.10.18	negativ		negativ		positiv					Mandel-DNA	ASU §64 Methode/method
ASU	13	31.10.18	negativ		positiv	19,6	positiv	< BG	10	20	50	Mandel	ASU §64 Methode/method
GI	15	26.11.18	negativ		positiv		positiv					Mandel-DNA	GEN-IAL First Allergen, Coring System Diagnostix
SFA	6	26.09.18	negativ		positiv		positiv					Mandel-DNA	Sure Food Allergen, R-Biopharm / Congen
SFA-ID	14	26.09.18	negativ	<1	positiv	15,12	positiv	20,19	1	1	30,41	Mandel	Sure Food Allergen ID, R-Biopharm / Congen
SFA-Q	11	01.10.18	negativ		positiv		positiv		0,4			Mandel-DNA	Sure Food Allergen Quant, R-Biopharm / Congen

* 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	
ASU	4	nsLTP-Gen; 82bp	CTAB-Präzipitationsmethode, s. z.B. ASU L 18.00-22	ja	Kalibrierung/Quantifizierung mittels Matrix-Standards, dotiertes Material: Mandel, entfettet.
ASU	7	PRU AV1 Gens (BQ641046)	Maxwell FFS Kit	ja	NWG: 0,004 ng/µl Mandel DNA /PCR-Ansatz
ASU	13	nsLTP Gen (82 bp)	Automatisierte Extraktion (Maxwell RSC), kein Clean-up	ja	§ 64 LFGB L-18.00-20
GI	15			ja	
SFA	6	charakteristischer Sequenzabschnitt der Mandel-DNA	SureFood Prep Advanced r-biopharm/ Proteinase K/ Real Time PCR/ 45 Zyklen	ja	
SFA-ID	14	nach Testkitanleitung	nach Testkitanleitung (Quantifizierung mit Quantard 40)	nein	Kit Code S3104
SFA-Q	11		nach Testkitanleitung	ja	

5.2 Homogenität

5.2.1 Mischungshomogenität vor der Abfüllung

Microtracer Homogenitätstest

DLA 05-2018 Probe B

Gewicht Gesamtprobe	2,70	kg
Microtracer	FSS-rot lake	
Teilchengröße	75 – 300	µm
Gewicht pro Partikel	2,0	µg
Tracerzugabe	29,8	mg/kg

Analysenergebnisse:

Probe	Einwaage [g]	Partikel Anzahl	Partikel [mg/kg]
1	5,02	84	33,5
2	5,02	81	32,3
3	4,98	70	28,1
4	5,00	88	35,2
5	5,09	87	34,2
6	5,05	75	29,7
7	4,96	71	28,6
8	5,01	80	31,9

Poisson-Verteilung

Probenanzahl	8	
Freiheitsgrad	7	
Mittelwert	79,5	Partikel
Standardabweichung	6,58	Partikel
χ^2 (CHI-Quadrat)	3,82	
Wahrscheinlichkeit	80	%
Wiederfindungsrate	106	%

Normalverteilung

Probenanzahl	8	
Mittelwert	31,7	mg/kg
Standardabweichung	2,62	mg/kg
rel. Standardabweichung	8,28	%
Horwitz Standardabweichung	9,51	%
HorRat-Wert	0,87	
Wiederfindungsrate	106	%

Microtracer Homogenitätstest

DLA 05-2018 Dotierungsniveauprobe

Gewicht Gesamtprobe	1,58	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	5,03	51	20,3
2	4,98	62	24,9
3	5,08	58	22,8
4	5,10	68	26,7
5	5,00	56	22,4
6	5,02	63	25,1
7	5,00	52	20,8
8	5,08	61	24,0

Poisson-Verteilung

Probenanzahl	8	
Freiheitsgrad	7	
Mittelwert	58,9	Partikel
Standardabweichung	5,55	Partikel
χ^2 (CHI-Quadrat)	3,66	
Wahrscheinlichkeit	82	%
Wiederfindungsrate	112	%

Normalverteilung

Probenanzahl	8	
Mittelwert	23,4	mg/kg
Standardabweichung	2,20	mg/kg
rel. Standardabweichung	9,43	%
Horwitz Standardabweichung	10,0	%
HorRat-Wert	0,95	
Wiederfindungsrate	112	%

5.3 Informationen zur Eignungsprüfung (EP)

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

EP-Nummer	DLA 05-2018
EP-Name	Allergene V: Erdnuss und Mandel in Backware mit „Dotierungsniveauprobe“
Probenmatrix (Prozessierung)	Proben A + B: Butterkekse (gebacken ca. 150°C)/ Zutaten: Weizenmehl, Zucker, Butter, Gerstenmalzextrakt, Magermilchpulver, Glucosesirup, Backtriebmittel: Ammoniumcarbonat, Salz, Emulgator: Lecithine, weitere Zusatzstoffe und Allergene Lebensmittel (eine der beiden Proben) Dotierungsniveauprobe: Kartoffelpulver, weitere Zusatzstoffe und Allergene Lebensmittel
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: Erdnuss (Erdnussprotein, DNA), Mandel (Mandelprotein, DNA) Proben A + B: < 500 mg/kg Dotierungsniveauprobe: < 500 mg/kg
Untersuchungsmethoden	Methode ist freigestellt
Hinweis zur Analyse	Die Untersuchung der Eignungsprüfung soll entsprechend einer laborüblichen Routineanalyse vorgenommen werden. Generell empfehlen wir vor der Analyse, insbesondere bei kleinen Analyseneinwaagen, eine repräsentative Probenmenge entsprechend guter Laborpraxis zu homogenisieren. 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 02. November 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
		SPANIEN
		Deutschland
		USA
		CANADA
		ITALIEN
		Deutschland
		Deutschland
		Deutschland
		Deutschland
		Deutschland
		GRIECHENLAND
		Deutschland
		POLEN
		SPANIEN
		Deutschland
		GROSSBRITANNIEN
		GRIECHENLAND
		GEORGIEN
		GRIECHENLAND

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

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

7. Verzeichnis relevanter Literatur

1. DIN EN ISO/IEC 17025:2005; Allgemeine Anforderungen an die Kompetenz von Prüf- und Kalibrierlaboratorien / General requirements for the competence of testing and calibration laboratories
2. DIN EN ISO/IEC 17043:2010; Konformitätsbewertung - Allgemeine Anforderungen an Eignungsprüfungen / Conformity assessment - General requirements for proficiency testing
3. ISO 13528:2015 & DIN ISO 13528:2009; Statistische Verfahren für Eignungsprüfungen durch Ringversuche / Statistical methods for use in proficiency testing by interlaboratory comparisons
4. ASU §64 LFGB: Planung und statistische Auswertung von Ringversuchen zur Methodvalidierung / DIN ISO 5725 series part 1, 2 and 6 Accuracy (trueness and precision) of measurement methods and results
5. Verordnung / Regulation 882/2004/EU; Verordnung über über amtliche Kontrollen zur Überprüfung der Einhaltung des Lebensmittel- und Futtermittelrechts sowie der Bestimmungen über Tiergesundheit und Tierschutz / Regulation on official controls performed to ensure the verification of compliance with feed and food law, animal health and animal welfare rules
6. Evaluation of analytical methods used for regulation of food and drugs; W. Horwitz; Analytical Chemistry, 54, 67-76 (1982)
7. The International Harmonised Protocol for the Proficiency Testing of Analytical Laboratories ; J.AOAC Int., 76(4), 926 - 940 (1993)
8. A Horwitz-like funktion describes precision in proficiency test; M. Thompson, P.J. Lowthian; Analyst, 120, 271-272 (1995)
9. Protocol for the design, conduct and interpretation of method performance studies; W. Horwitz; Pure & Applied Chemistry, 67, 331-343 (1995)
10. Recent trends in inter-laboratory precision at ppb and sub-ppb concentrations in relation to fitness for purpose criteria in proficiency testing; M. Thompson; Analyst, 125, 385-386 (2000)
11. The International Harmonised Protocol for the Proficiency Testing of Analytical Chemistry Laboratories; Pure Appl Chem, 78, 145 - 196 (2006)
12. AMC Kernel Density - Representing data distributions with kernel density estimates, amc technical brief, Editor M Thompson, Analytical Methods Committee, AMCTB No 4, Revised March 2006 and Excel Add-in Kernel.xla 1.0e by Royal Society of Chemistry
13. EURACHEM/CITAC Leitfaden, Ermittlung der Messunsicherheit bei analytischen Messungen (2003); Quantifying Uncertainty in Analytical Measurement (1999)
14. GMP+ Feed Certification scheme, Module: Feed Safety Assurance, chapter 5.7 Checking procedure for the process accuracy of compound feed with micro tracers in GMP+ BA2 Control of residues, Version: 1st of January 2015 GMP+ International B.V.
15. MTSE SOP No. 010.01 (2014): Quantitative measurement of mixing uniformity and carry-over in powder mixtures with the rotary detector technique, MTSE Micro Tracers Services Europe GmbH
16. 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 Fleischerzeugnissen Enzymimmunologisches Verfahren (2007) [Determination of soyprotein in meat and meat products by enzyme immunoassay]
30. ASU §64 LFGB L 00.00-69 Bestimmung von Erdnuss-Kontaminationen in Lebensmitteln mittels ELISA im Mikrotiterplattensystem (2003) [Foodstuffs, determination of peanut contaminations in foodstuffs by ELISA in microtiterplates]
31. ASU §64 LFGB L 44.00-7 Bestimmung von Haselnuss-Kontaminationen in Schokolade und Schokoladenwaren mittels ELISA im Mikrotiterplattensystem (2006) [Foodstuffs, determination of hazelnut contaminations in chocolate and chocolate products by ELISA in microtiterplates]
32. ASU §64 LFGB L 18.00-20 Untersuchung von Lebensmitteln - Nachweis und Bestimmung von Mandel (Prunus dulcis) in Reis- und Weizenkeksen sowie in Soßenpulver mittels real-time PCR (2014) [Foodstuffs, detection and determination of almond (Prunus dulcis) in rice and wheat cookies and sauce powders by PCR]
33. ASU §64 LFGB L 18.00-21 Untersuchung von Lebensmitteln - Nachweis und Bestimmung von Paranuss (Bertholletia excelsa) in Reis- und Weizenkeksen sowie in Soßenpulver mittels real-time PCR (2014) [Foodstuffs, detection and determination of brazil nut (Bertholletia excelsa) in rice and wheat cookies and sauce powders by PCR]
34. ASU §64 LFGB L 18.00-22 Untersuchung von Lebensmitteln - Simultaner Nachweis und Bestimmung von Lupine, Mandel, Paranuss und Sesam in Reis- und Weizenkeksen sowie Soßenpulver mittels real-time PCR (2014) [Foodstuffs, simultaneous detection and determination of lupin, almond, brazil nut and sesame in rice and wheat cookies and sauce powders by PCR]

DLA 05/2018 - Allergene V

Alle 19 Teilnehmer haben mindestens ein Ergebnis eingereicht. Die Auswertung erfolgte hinsichtlich der Parameter Erdnuss und Mandel für ELISA- (qualitativ und quantitativ) und PCR-Methoden (qualitativ). Zusätzlich wurden für jeden Teilnehmer Wiederfindungsraten für die Dotierungs-niveauprobe und die dotierte Probe ermittelt. Details zu den einzelnen Parametern inklusive separater Auswertung nach Testkit-Herstellern sind dem Auswertebereicht zu entnehmen.

9 Teilnehmer hatten ihren Sitz im Europäischen Ausland (Griechenland, Großbritannien, Italien, Polen, Spanien) und Georgien. Zwei Teilnehmer hatten ihren Sitz in Kanada und den USA.