

Proficiency Tests

**DLA**

food  
cosmetics  
consumer goods  
[www.dla-lvu.de](http://www.dla-lvu.de)

**Auswertungs-Bericht**  
Laborvergleichsuntersuchung

**DLA 06/2018**

**Allergene VI:**  
**Haselnuss und Pecannus**  
**in Schokolade**

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

[proficiency-testing@dla-lvu.de](mailto:proficiency-testing@dla-lvu.de)    [www.dla-lvu.de](http://www.dla-lvu.de)

Koordinator der LVU:  
Dr. Matthias Besler-Scharf

**1. Korrektur 7.02.2019:**

Bei der Auswertung der ELISA-Ergebnisse für Haselnuss wurde irrtümlich der Ergebnissatz von Teilnehmer 9 in Haselnuss umgerechnet. Die Angaben wurden jedoch fristgerecht von Teilnehmer 9 als Haselnuss übermittelt.

Die gesamte Bewertung der ELISA-Ergebnisse für Haselnuss (S.22-29) inklusive der z-Scores wurde entsprechend korrigiert.

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

<i>EP-Anbieter</i> <i>PT-Provider</i>	<b>DLA - Dienstleistung Lebensmittel Analytik GbR</b> Gesellschafter: Dr. Matthias Besler-Scharf und Alexandra Scharf MSc.  Waldemar-Bonsels-Weg 170, 22926 Ahrensburg, Germany  Tel. ++49-(0)4532-9183358 Mob. ++49(0)171-1954375 Fax. ++49(0)4102-9944976 eMail. proficiency-testing@dla-lvu.de
<i>EP-Nummer</i> <i>PT-Number</i>	DLA 06/2018
<i>EP-Koordinator</i> <i>PT-Coordinator</i>	Dr. Matthias Besler-Scharf
<i>Status des EP-Bericht</i> <i>Status of PT-Report</i>	Abschlussbericht / Final report (7. Februar 2019) 1. Korrektur / 1st 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.
<i>EP-Bericht Freigabe</i> <i>PT-Report Authorization</i>	Dr. Matthias Besler-Scharf (Technischer Leiter / Technical Manager) - <i>gezeichnet / signed M. Besler-Scharf</i> Alexandra Scharf MSc. (QM-Beauftragte / Quality Manager) - <i>gezeichnet / signed A. Scharf</i> Datum / Date: 7. Februar 2019
<i>Unteraufträge</i> <i>Subcontractors</i>	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.
<i>Vertraulichkeit</i> <i>Confidentiality</i>	Die Teilnehmerergebnisse sind im EP-Bericht in anonymisierter Form mit Auswertenummern benannt. Daten einzelner Teilnehmer werden ausschließlich nach vorheriger Zustimmung des Teilnehmers an Dritte weitergegeben. Participant result are named anonymously with evaluation numbers in the PT report. Data of individual participants will be passed on to third parties only with prior consent of the participant.

## Inhalt

1. Einleitung.....	4
2. Durchführung.....	4
2.1 Untersuchungsmaterial.....	4
2.1.1 Homogenität.....	6
2.1.2 Stabilität.....	9
2.2 Probenversand und Informationen zur Untersuchung.....	9
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
Ausschluss von Ergebnissen .....	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 $S^*/opt$ .....	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 Haselnuss.....	22
4.1.1 ELISA-Ergebnisse: Haselnuss.....	22
4.1.2 PCR-Ergebnisse: Haselnuss.....	30
4.2 Vergleichsuntersuchung Pecannuss.....	32
4.2.1 ELISA-Ergebnisse: Pecannuss.....	32
4.2.2 PCR-Ergebnisse: Pecannuss.....	40
5. Dokumentation.....	43
5.1 Angaben der Teilnehmer.....	43
5.1.1 ELISA: Haselnuss.....	43
5.1.2 ELISA: Pecannuss.....	44
5.1.3 PCR: Haselnuss.....	45
5.1.4 PCR: Pecannuss.....	45
5.2 Homogenität.....	46
5.2.1 Mischungshomogenität vor der Abfüllung.....	46
5.3 Informationen zur Eignungsprüfung (EP).....	47
6. Verzeichnis der Teilnehmer in alphabetischer Reihenfolge.....	48
7. Verzeichnis relevanter Literatur.....	49

## 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 Bitterschokolade. Die Grundzusammensetzung war für beide Proben A und B gleich (s. Tabelle 1).

Nach Mischen und Homogenisierung der Grundmatrix unter Rühren bei 60°C wurde zur Herstellung der dotierten **Probe B** einem Aliquot der Grundmatrix das Dotierungsmaterial mit den allergenen Zutaten Haselnuss und Pecannuss zugegeben. Die Homogenisierung erfolgte ebenfalls bei 60°C unter Rühren. Anschließend wurde portionsweise erneut Grundmatrix in 3 weiteren Schritten zugegeben und 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 500 µm) gesiebt.

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

Tabelle 1: Zusammensetzung der DLA-Proben

Zutaten	Probe A	Probe B	Dotierungs- niveauprobe
Bitter-Schokolade (Kakao: 70% mindestens) Zutaten: Kakaomasse, Zucker, Kakaobutter, Emul- gator: Sojalecithin, Vanille-Extrakt Nährwertangaben pro 100 g: Fett 43 g, Kohlenhydrate 34 g, Ei- weiß 9,6 g	100 g/100 g	99,8 g/100 g	-
Kartoffelpulver Zutaten: Kartoffeln, E471, E304, E223, E100	-	-	99,8 g/100 g
Haselnüsse, geröstet gemahlen, Mischung (5 Länder / Europa) - als Haselnuss* - davon 14,1% Gesamtprotein**	-	43,9 mg/kg 6,19 mg/kg	38,9 mg/kg 5,48 mg/kg
Pecannuss - als Pecannuss* - davon 10,3% Gesamtprotein**	-	27,2 mg/kg 2,80 mg/kg	26,2 mg/kg 2,70 mg/kg
weitere Zutaten: Maltodextrin, Natriumsulfat und Siliciumdioxid	-	<0,2 g/100 g	<0,2 g/100 g

\*Allergen-Gehalte als „Lebensmittel“ wie in Spalte Zutaten angegeben gemäß gravimetri-  
scher Mischung

\*\* Proteingehalte gemäß Laboranalyse des Rohstoffs (Gesamtstickstoff nach Kjeldahl mit  
F=5,3)

**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  $\mu\text{m}$ -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].

Da keine stückigen Proben wie die Probenmatrix B mit der Microtracer-Analyse untersucht werden können, wurde nur die pulverförmige Dotierungsneveaprobe untersucht. Die Microtracer-Analyse hat eine Wahrscheinlichkeit von 93% 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 wurde ein HorRat-Wert von 0,7 erhalten. Die Ergebnisse der Microtracer-Analyse sind in der Dokumentation angegeben.

### **Homogenität der abgefüllten dotierten Probe B**

#### Durchführung der Homogenitätstests

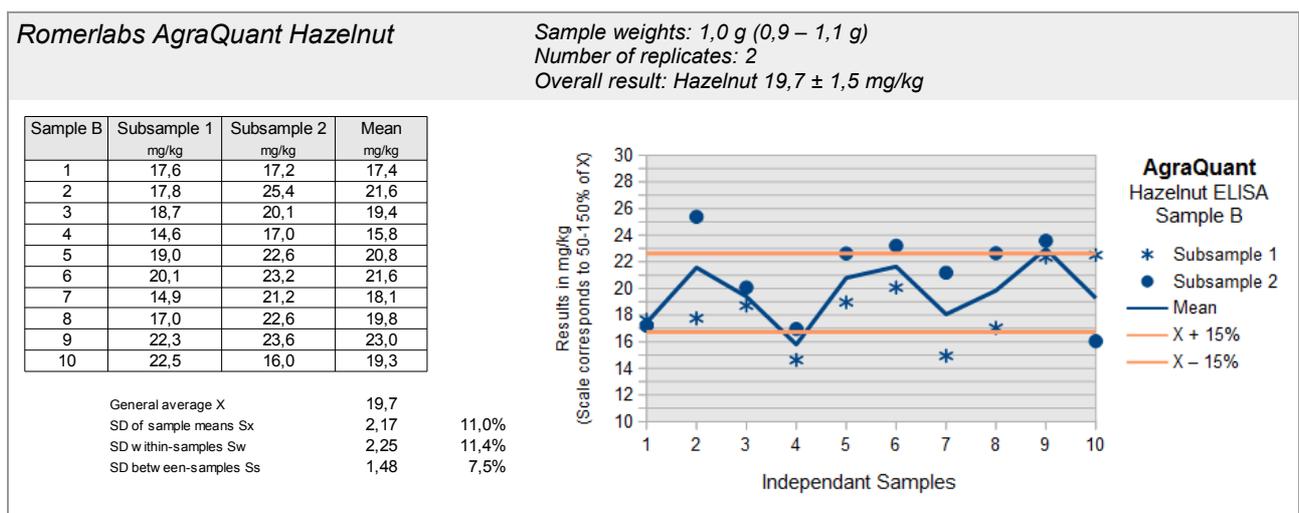
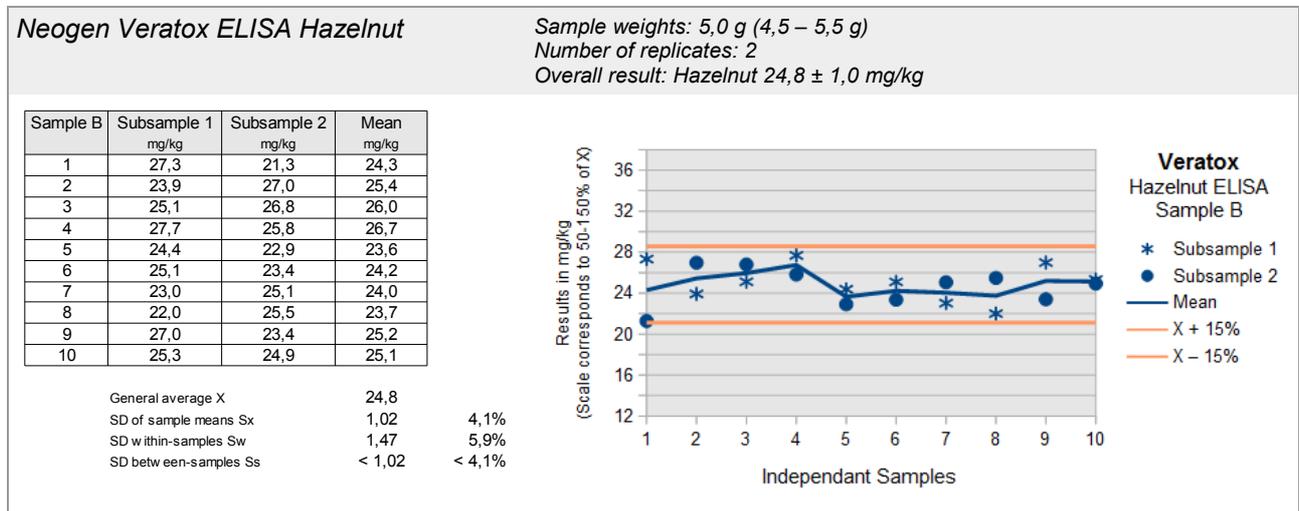
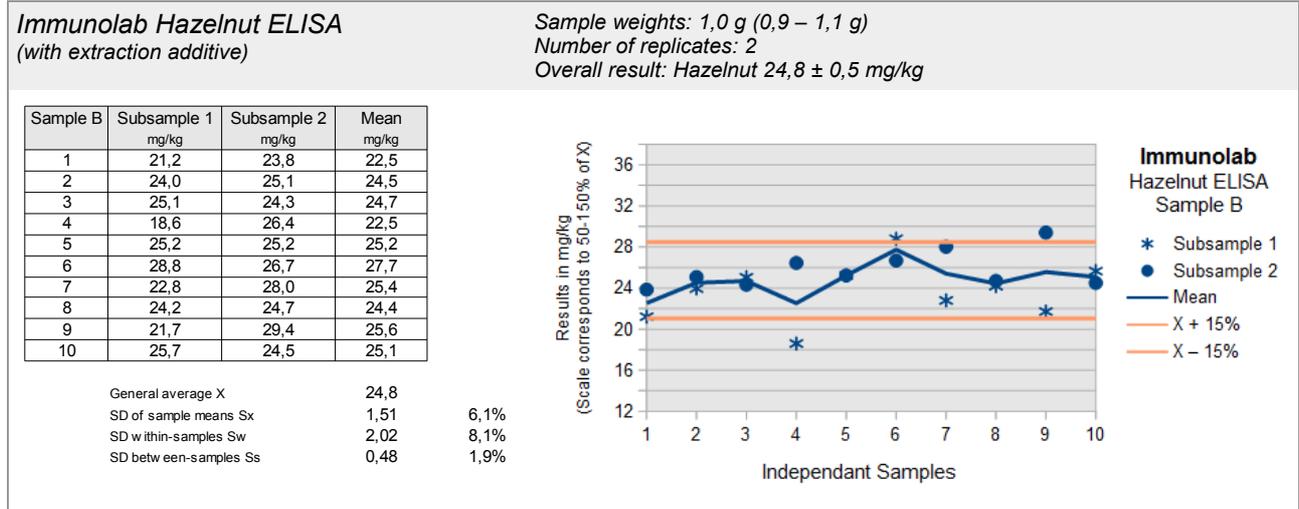
Die Homogenitätstests wurden in Kooperation mit den Labors der angegebenen Testkit-Anbieter durchgeführt. Von DLA wurden zufällig 10 Muster der abgefüllten dotierten Probe ausgewählt und davon jeweils 2 Teilproben in zuvor zufällig-coodierte Extraktionsbehälter eingewogen und anschließend den Labors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

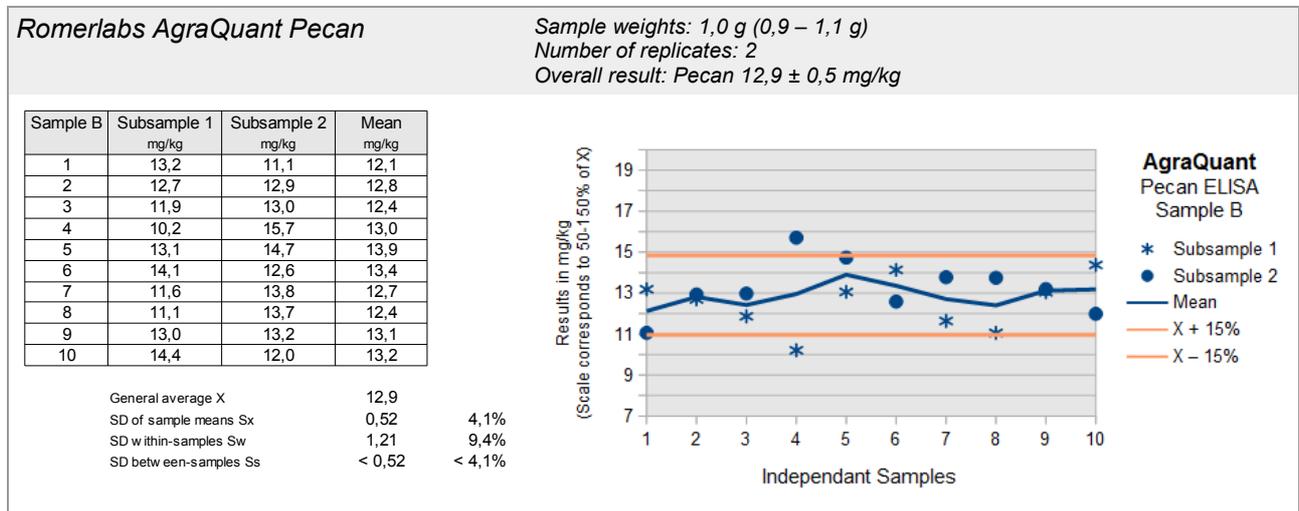
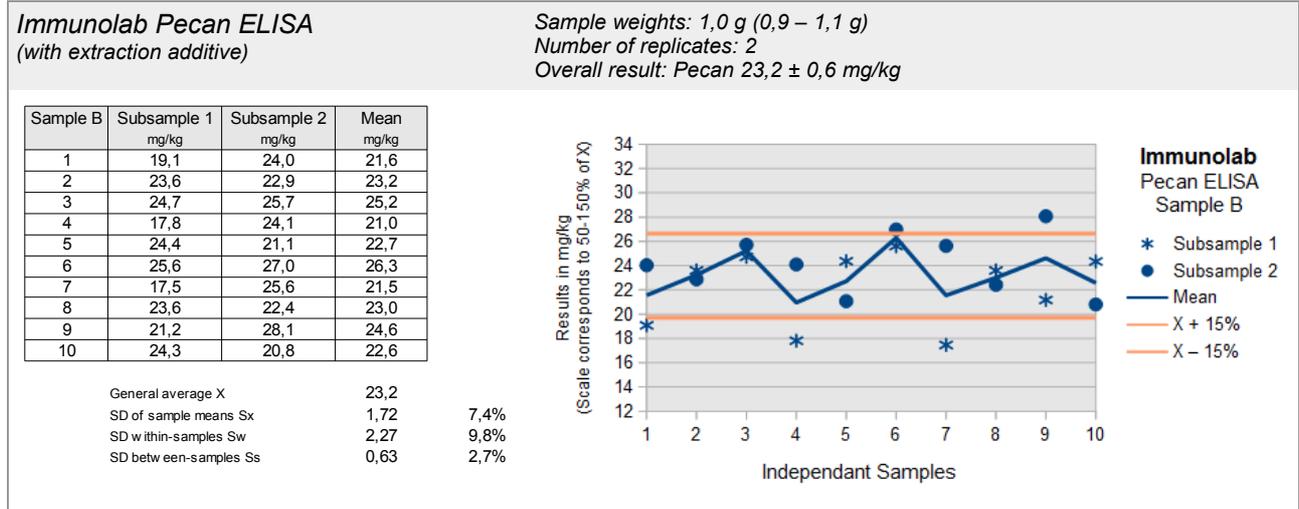
Die Homogenität wird mit einer Standardabweichung zwischen den Proben von  $S_s \leq 15\%$  („Heterogenitätsstandardabweichung“) als hinreichend gesichert angesehen. Dieses Kriterium wird für die untersuchte Probe B in allen ELISA-Tests sowohl für Haselnuss (Immunolab, Veratox und AgraQuant) als auch für Pecannuss (Immunolab und 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 Haselnuss / Homogeneity Hazelnut**



**ELISA-Tests: Homogenität Pecannuss / Homogeneity Pecan**



### 2.1.2 Stabilität

Bei dem Lebensmittelmatrix-Probenmaterial handelt es sich um Schokolade, die aufgrund des geringen Wassergehalts jahrelang haltbar ist. Die Lagerstabilität bzw. Haltbarkeit der Proben (mikrobieller Verderb) ist somit erfahrungsgemäß während des Untersuchungszeitraums unter den angegebenen Lagerbedingungen gewährleistet.

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 Degraderationsrate 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 Dotierungsniveauprobe lag bei ca.  $0,34$  ( $20,6^\circ\text{C}$ ). 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 42. Kalenderwoche 2018 je eine Portion der Untersuchungsmaterialien A und B sowie eine Dotierungsmaterialprobe verschickt. Die Untersuchungsverfahren wurden freigestellt. Die Untersuchungen waren durchzuführen bis spätestens 30. 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 Haselnuss und Pecannuss im mg/kg Bereich in der Matrix Schokolade. 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 10 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 Einzelmethode** -  $X_{ptMETHOD i}$   
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  $\sigma_{pt}$  (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  $\sigma_{pt}$  (= 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  $\sigma_R$  abgeleitet [6]. Später wurde das Modell von Thompson für bestimmte Konzentrationsbereiche modifiziert [10]. Die Vergleichsstandardabweichung  $\sigma_R$  kann als relative Zielstandardabweichung  $\sigma_{pt}$  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  $\sigma_R$  und der Wiederholstandardabweichung  $\sigma_x$  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  $\sigma_{pt}$  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  $\sigma_{pt}$  wurden für eine Anzahl von  $m = 2$  Wiederholmessungen berechnet. Bei einer Anzahl von  $m = 1$  ist die Vergleichsstandardabweichung  $\sigma_R$  gleich der Zielstandardabweichung  $\sigma_{pt}$ .

**Tabelle 2a:** ELISA-Methoden - Relative Wiederholstandardabweichungen ( $RSD_r$ ) und relative Vergleichsstandardabweichungen ( $RSD_R$ ) gemäß ausgewählter Auswertungen von Versuchen zur Präzision und die resultierende Zielstandardabweichung  $\sigma_{pt}$  [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	Feinherb-schokolade	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	Feinherb-schokolade	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	Feinherb-schokolade	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 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  $\sigma_{pt}$  [32-34]

Parameter	Matrix	Mittelwerte [mg/kg]	Wiederfindung	rob $RSD_r$	$RSD_r$	$RSD_R$	$\sigma_{pt}$	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 <small>multiplex</small> 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 <small>multiplex</small> 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 <small>multiplex</small> 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 <small>multiplex</small> 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% <sup>(a)</sup>	19,5 - 57,2% <sup>(a)</sup>
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% <sup>(a)</sup>	≤ 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  $\sigma_{pt}$  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 ( $\sigma_{pt}$ ) 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<sub>ALL</sub>** (bezogen auf alle Ergebnisse)
- ii) **z-Score** - **z<sub>METHOD i</sub>** (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  $\geq 10$  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 ( $\sigma_{pt}$ ) 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  $\sigma_{pt}'$  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 $S^*/\sigma_{pt}$

In Anlehnung an den HorRat-Wert kann die Bewertung einer Laborvergleichsuntersuchung als aussagekräftig gelten, wenn der Quotient von robuster Standardabweichung  $S^*$  und Zielstandardabweichung  $\sigma_{pt}$  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 **Haselnuss-** oder **Pecannussprotein** angegeben wurden, sind mit dem experimentell bestimmten Proteingehalt der Rohstoffe auf das **Gesamtlebensmittel (Haselnuss, Pecannuss)** umgerechnet worden (s. Seite 5).

Qualitativ werden die Ergebnisse 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. Für jeden Teilnehmer wird in Bezug auf die Konsens-Ergebnisse eine qualitative Bewertung vorgenommen. Hier wurde die Übereinstimmung mit den Konsens-Werten in Prozent angegeben.

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

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

Auswertenummer	Ergebnis	Ergebnis	z-Score $X_{ptALL}$	z-Score $X_{ptMi}$	Methode	Hinweis
	pos/neg	[mg/kg]				

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

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

<sup>o</sup> 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 Haselnuss

### 4.1.1 ELISA-Ergebnisse: Haselnuss

#### 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	0	positiv	51,7	2/2 (100%)	BF	
7	negativ	<3,5	positiv	24,8	2/2 (100%)	ES	Ergebnis umgerechnet °
2	negativ	<1	positiv	30,4	2/2 (100%)	IL	
10	negativ	<0,3	positiv	26,0	2/2 (100%)	IL	
1	negativ		positiv	38,7	2/2 (100%)	RS-F	
3	negativ	<2.5	positiv	50,7	2/2 (100%)	RS-F	
6	negativ	<2,5	positiv	>20	2/2 (100%)	RS-F	
8	negativ		positiv	35,0	2/2 (100%)	RS-F	
5	negativ	<2.5	positiv	15,2	2/2 (100%)	VT	
9	negativ		positiv	14,8	2/2 (100%)	VT	

° Umrechnung S. 20

	Probe A	Probe B
Anzahl positiv	0	10
Anzahl negativ	10	0
Prozent positiv	0	100
Prozent negativ	100	0
Konsenswert	negativ	positiv

#### Methoden:

BF = MonoTrace ELISA, BioFront Technologies

ES = ELISA-Systems

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	Haselnuss [mg/kg]	z'-Score $X_{pt_{ALL}}$	Methode	Hinweis
4	51,7	1,9	BF	
7	24,8	-0,69	ES	Ergebnis umgerechnet °
2	30,4	-0,15	IL	
10	26,0	-0,58	IL	
1	38,7	0,66	RS-F	
3	50,7	1,8	RS-F	
6	>20		RS-F	
8	35,0	0,30	RS-F	
5	15,2	-1,6	VT	
9	14,8	-1,7	VT	

° Umrechnung S. 20

**Methoden:**

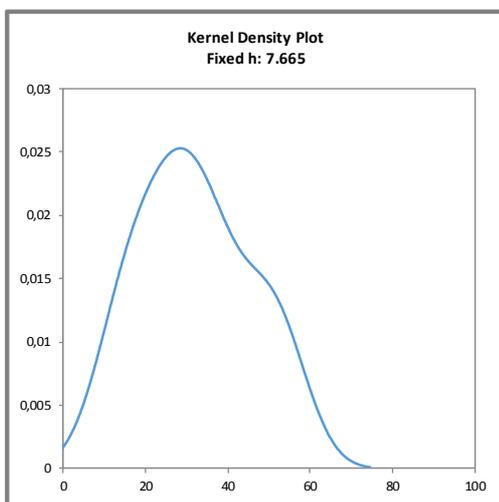
BF = MonoTrace ELISA, BioFront Technologies

ES = ELISA-Systems

IL = Immunolab

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 einer Schulter bei etwa 50 mg/kg (Methoden BF und RS-F).

Kenndaten: Quantitative Auswertung ELISA Haselnuss

**Probe B**

<b>Kenndaten</b>	<b>Alle Ergebnisse</b> [mg/kg]
Zugewiesener Wert ( $X_{pt}$ )	$X_{pt\_ALL}$
Anzahl der Messergebnisse	9
Anzahl der Ausreißer	0
Mittelwert	31,9
Median	30,4
<b>Robuster Mittelwert (<math>X_{pt}</math>)</b>	<b>31,9</b>
<b>Robuste Standardabweichung (<math>S^*</math>)</b>	<b>15,3</b>
Zielkenndaten:	
<b>Zielstandardabweichung <math>\sigma_{pt}'</math></b>	<b>10,2</b>
<b>Untere Grenze des Zielbereichs</b>	<b>11,5</b>
<b>Obere Grenze des Zielbereichs</b>	<b>52,4</b>
Quotient $S^*/\sigma_{pt}'$	1,5
Standardunsicherheit $U_{(X_{pt})}$	6,38
Ergebnisse im Zielbereich	9
Prozent im Zielbereich	100

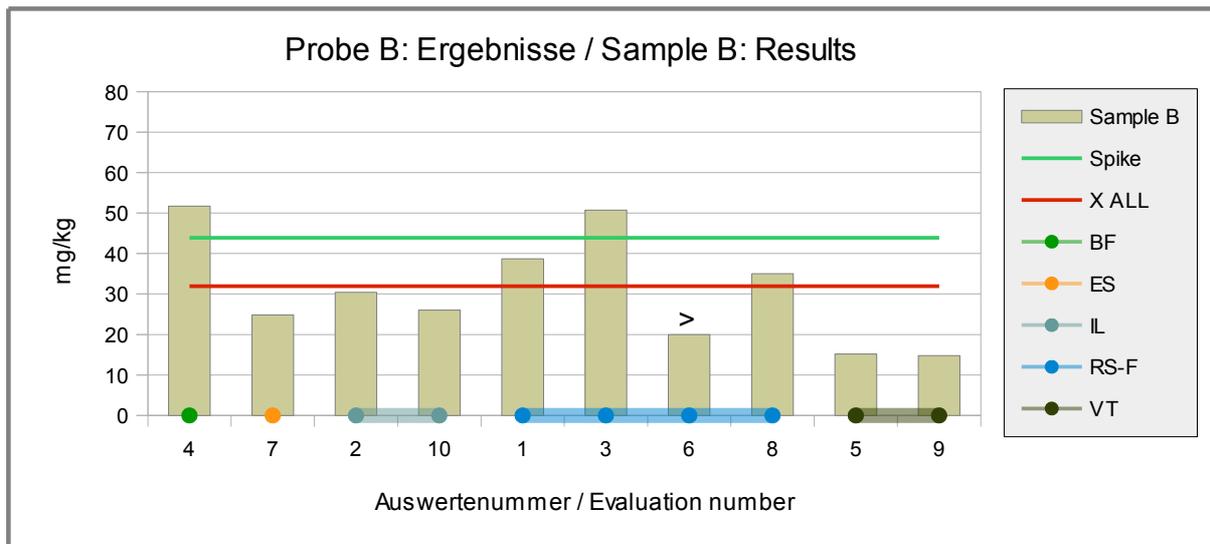
Anmerkungen zu den Kenndaten und Vergleich der Bezugswerte:

Die Kerndichte-Schätzung zeigte annähernd eine symmetrische Verteilung und keine eindeutigen methodenabhängigen Unterschiede.

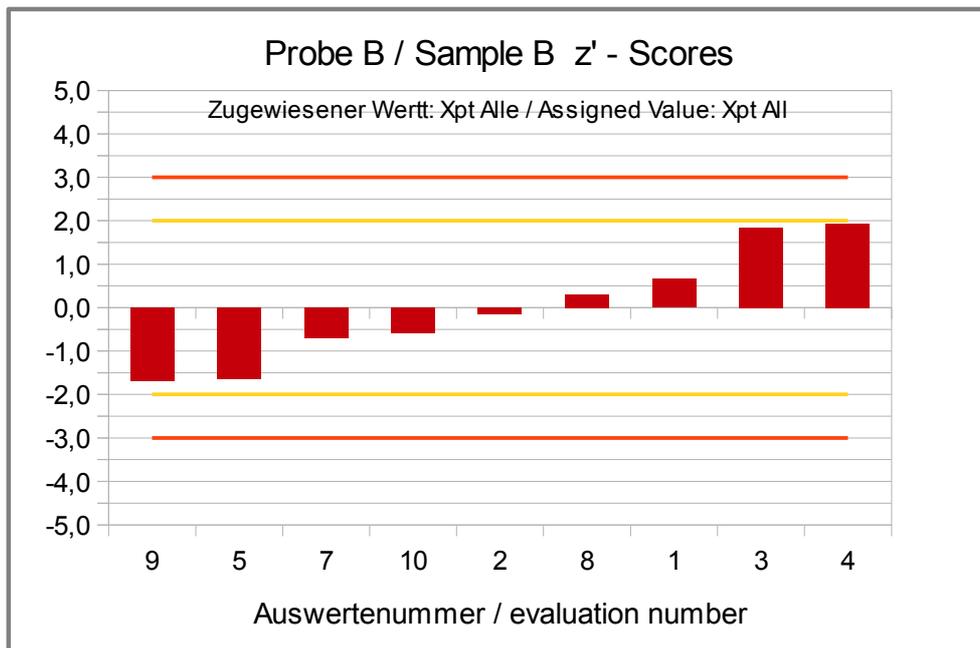
Aufgrund der relativ breiten Verteilung und der geringen Anzahl von Ergebnissen der Einzelmethode wurde nur eine methodenübergreifende Bewertung der Ergebnisse mittels z'-Score vorgenommen.

Die Auswertung zeigte eine normale Variabilität der Ergebnisse. Der Quotient  $S^*/\sigma_{pt}'$  lag unter 2,0. Die robuste Standardabweichung lag im oberen Bereich von etablierten Werten für die 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 nur eingeschränkt gültig, da für einige Methoden nur wenige Ergebnisse vorlagen.

Der robuste Mittelwert der Auswertung lag mit 73% vom Zusatzniveau von Haselnuss zu Probe B, innerhalb der relevanten Anforderungen für die eingesetzten Methoden (s. 3.4.3 und "Wiederfindungsraten für Haselnuss" S.29).



**Abb./Fig. 2:** ELISA-Ergebnisse Haselnuss  
 grüne Linie = Zusatzniveau (Spike)  
 rote Linie = robuster Mittelwert aller Ergebnisse  
 runde Symbole = Zuordnung der Methoden (s. Legende)



**Abb./Fig. 3:** z'-Scores (ELISA-Ergebnisse als Haselnuss) Zugewiesener Wert: robuster Mittelwert aller Ergebnisse

**Quantitative Auswertung ELISA: Dotierungsniveauprobe**

Auswertenummer	Haselnuss [mg/kg]	z'-Score $X_{pt_{ALL}}$	Methode	Hinweis
4	52,3	1,8	BF	
7	19,2	-1,4	ES	Ergebnis umgerechnet °
2	36,2	0,27	IL	
10	34,0	0,06	IL	
1	36,0	0,25	RS-F	
3	51,8	1,8	RS-F	
6	>20		RS-F	
8	30,0	-0,33	RS-F	
5	17,8	-1,5	VT	
9	23,2	-1,0	VT	

° Umrechnung S. 20

**Methoden:**

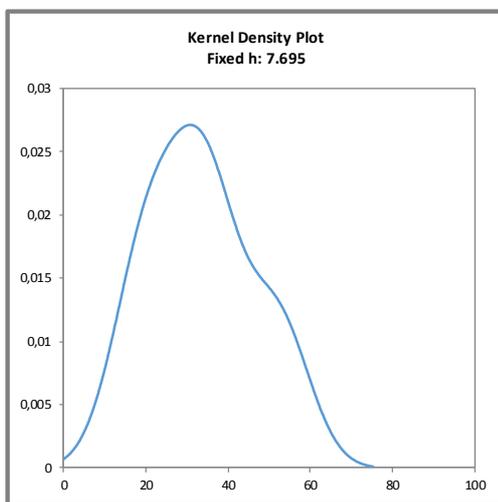
BF = MonoTrace ELISA, BioFront Technologies

ES = ELISA-Systems

IL = Immunolab

RS-F= Ridascreeen® Fast, R-Biopharm

VT = Veratox, Neogen



**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 mit einer Schulter bei ca. 60 mg/kg (Methoden BF und RS-F).

**Kenndaten: Quantitative Auswertung ELISA Haselnuss****Dotierungsniveauprobe**

<b>Kenndaten</b>	<b>Alle Ergebnisse</b> [mg/kg]
Zugewiesener Wert ( $X_{pt}$ )	$X_{pt\_ALL}$
Anzahl der Messergebnisse	9
Anzahl der Ausreißer	0
Mittelwert	33,4
Median	34,0
<b>Robuster Mittelwert (<math>X_{pt}</math>)</b>	<b>33,4</b>
<b>Robuste Standardabweichung (<math>S^*</math>)</b>	<b>14,3</b>
Zielkenndaten:	
<b>Zielstandardabweichung <math>\sigma_{pt}'</math></b>	<b>10,26</b>
<b>Untere Grenze des Zielbereichs</b>	<b>12,9</b>
<b>Obere Grenze des Zielbereichs</b>	<b>53,9</b>
Quotient $S^*/\sigma_{pt}'$	1,4
Standardunsicherheit $U_{(X_{pt})}$	5,96
Ergebnisse im Zielbereich	9
Prozent im Zielbereich	100

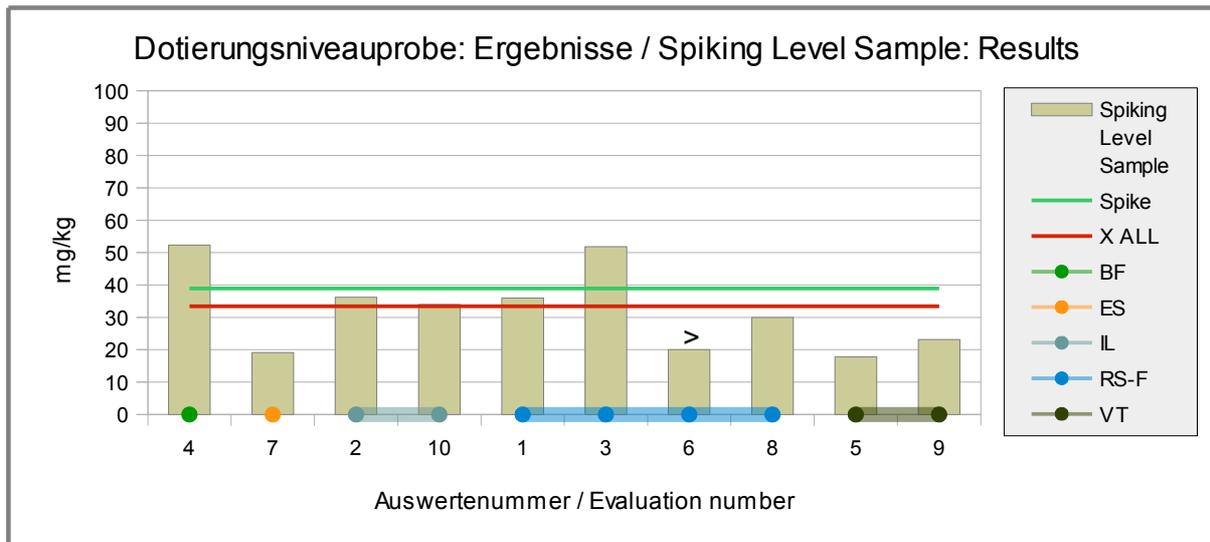
Anmerkungen zu den Kenndaten und Vergleich der Bezugswerte:

Die Kerndichte-Schätzung zeigte annähernd eine symmetrische Verteilung und keine eindeutigen methodenabhängigen Unterschiede.

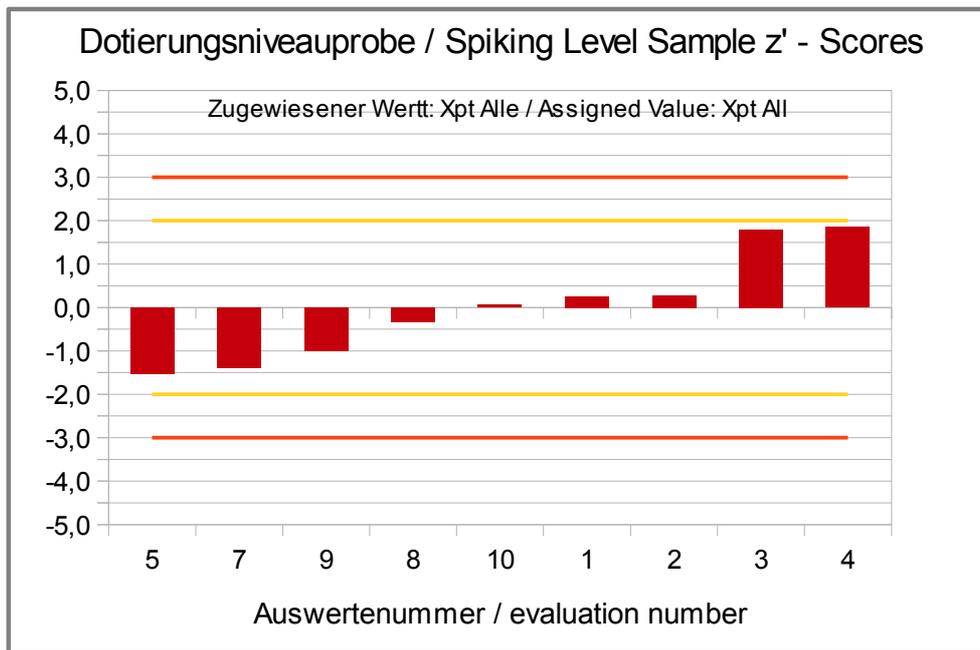
Aufgrund der relativ breiten Verteilung und der geringen Anzahl von Ergebnissen der Einzelmethoden wurde nur eine methodenübergreifende Bewertung der Ergebnisse mittels z'-Score vorgenommen.

Die Auswertung der Ergebnisse aller Methoden zeigte eine normale Variabilität der Ergebnisse. Der Quotient  $S^*/\sigma_{pt}'$  lag unter 2,0. Die robuste Standardabweichung lag im oberen Bereich von etablierten Werten für die 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 robuste Mittelwert der Auswertung lag mit 86% vom Zusatzniveau von Haselnuss zur Dotierungsniveauprobe innerhalb der relevanten Anforderungen für die eingesetzten Methoden (s. 3.4.3 und "Wiederfindungsraten für Haselnuss", s. S.29).



**Abb./Fig. 5:** ELISA-Ergebnisse Haselnuss  
 grüne Linie = Zusatzniveau (Spike)  
 rote Linie = robuster Mittelwert aller Ergebnisse  
 runde Symbole = Zuordnung der Methoden (s. Legende)



**Abb./Fig. 6:** z'-Scores (ELISA-Ergebnisse als Haselnuss) Zugewiesener Wert: robuster Mittelwert aller Ergebnisse

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

Auswertenummer	Dotierungsniveauprobe	Wiederfindungsrate*	Probe B	Wiederfindungsrate*	Methode	Hinweis
	[mg/kg]	[%]	[mg/kg]	[%]		
4	52,3	134	51,7	118	BF	
7	19,2	49	24,8	57	ES	Ergebnis umgerechnet °
2	36,2	93	30,4	69	IL	
10	34,0	87	26,0	59	IL	
1	36,0	93	38,7	88	RS-F	
3	51,8	133	50,7	116	RS-F	
6	>20		>20		RS-F	
8	30,0	77	35,0	80	RS-F	
5	17,8	46	15,2	35	VT	
9	23,2	60	14,8	34	VT	

° Umrechnung S. 20

AB**	50-150 %	AB**	50-150 %
Anzahl im AB	7	Anzahl im AB	7
Prozent im AB	78	Prozent im AB	78

\* Wiederfindungsrate 100% Bezugsgröße: Haselnuss, s. Seite 5

\*\* Akzeptanzbereich der AOAC für Allergen-ELISAs

**Methoden:**

BF = MonoTrace ELISA, BioFront Technologies

ES = ELISA-Systems

IL = Immunolab

RS-F= Ridascreen® Fast, R-Biopharm

VT = Veratox, Neogen

Anmerkung:

78% (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 B lagen ebenfalls 78% (7) der Wiederfindungsraten in diesem Akzeptanzbereich.

**4.1.2 PCR-Ergebnisse: Haselnuss**

**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		
7	negativ		positiv		2/2 (100%)	div	
8	negativ		positiv	150	2/2 (100%)	div	angegeben als Haselnuss-DNA

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

**Methoden:**

div = keine genaue Angabe / andere Methode

div = not indicated / other method

Anmerkung:

Die Ergebnisse 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 vorlagen.

**(Quantitative) Auswertung PCR: Dotierungsniveauprobe**

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

Auswertenummer	Haselnuss	Haselnuss	z-Score Xpt <sub>ALL</sub>	Methode	Hinweis
	pos/neg	[mg/kg]			
7	positiv			div	
8	positiv	100		div	angegeben als Haselnuss-DNA

Anzahl positiv	2	
Anzahl negativ	0	
Prozent positiv	100	
Prozent negativ	0	
Konsenswert	positiv	

**Methoden:**

div = keine genaue Angabe / andere Methode

div = not indicated / other method

Anmerkung:

Für die Dotierungsniveauprobe wurden 100% positive Ergebnisse erhalten.

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

Da keine quantitativen Ergebnisse als Haselnuss, sondern nur als Haselnuss-DNA, vorlagen, wurden keine Wiederfindungsraten berechnet.

## 4.2 Vergleichsuntersuchung Pecannuss

### 4.2.1 ELISA-Ergebnisse: Pecannuss

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		
1	negativ		positiv	13,6	2/2 (100%)	3M	Ergebnis umgerechnet °
4	negativ	0	positiv	42,1	2/2 (100%)	BF	
5	negativ	<2,0	positiv	42,5	2/2 (100%)	BF	
6	negativ	<2	positiv	17,8	2/2 (100%)	BF	
3	negativ	<2	positiv	10,7	2/2 (100%)	IL	
10	negativ	<0,2	positiv	26,0	2/2 (100%)	IL	

° Umrechnung S. 20

	Probe A	Probe B
Anzahl positiv	0	6
Anzahl negativ	6	0
Prozent positiv	0	100
Prozent negativ	100	0
Konsenswert	negativ	positiv

**Methoden:**

3M = 3M Protein ELISA Kit  
 BF = MonoTrace ELISA, BioFront Technologies  
 IL = Immunolab

Anmerkung:

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

**Quantitative Auswertung ELISA: Probe B**

Aufgrund der heterogenen Verteilung und der geringen Anzahl der Ergebnisse wurde keine Bewertung z-Score vorgenommen (s. nächste Seite).

Auswertenummer	Pecannuss	z-Score Xpt <sub>ALL</sub>	Methode	Hinweis
	[mg/kg]			
1	13,6		3M	Ergebnis umgerechnet °
4	42,1		BF	
5	42,5		BF	
6	17,8		BF	
3	10,7		IL	
10	26,0		IL	

° Umrechnung S. 20

**Methoden:**

3M = 3M Protein ELISA Kit

BF = MonoTrace ELISA, BioFront Technologies

IL = Immunolab

**Anmerkung:**

Eine Kerndichte-Schätzung wurde aufgrund der Anzahl von < 8 Ergebnissen nicht vorgenommen.

Kenndaten: Quantitative Auswertung ELISA Pecannuss

**Probe B**

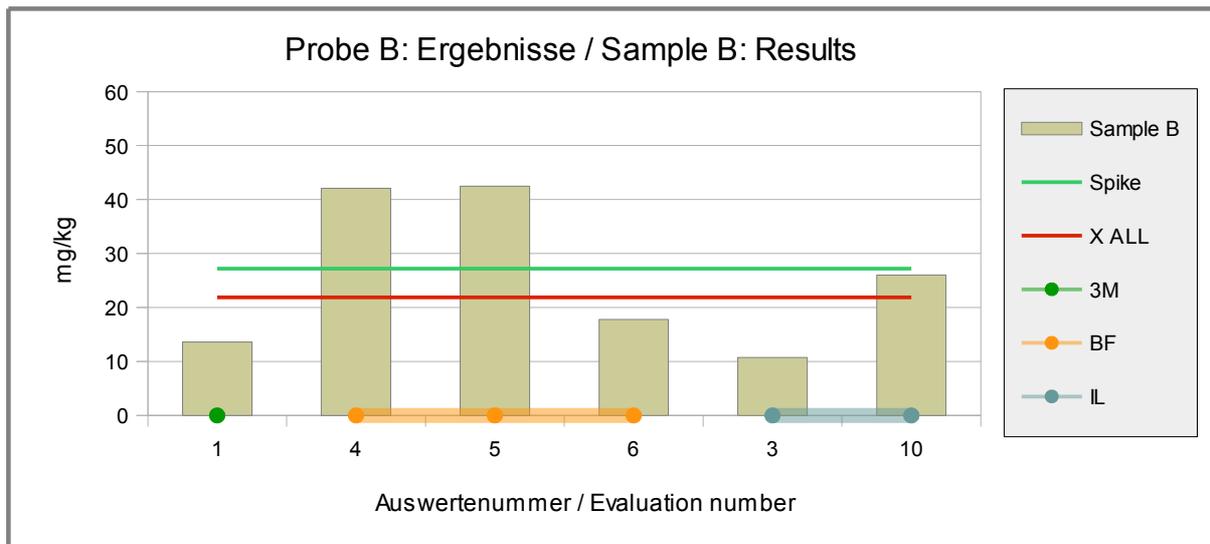
<b>Kenndaten</b>	<b>Alle Ergebnisse</b> [mg/kg]
Zugewiesener Wert ( $X_{pt}$ )	<b><math>X_{pt}_{ALL}</math></b>
Anzahl der Messergebnisse	6
Anzahl der Ausreißer	0
Mittelwert	25,5
<b>Median (<math>X_{pt}</math>)</b>	<b>25,5</b>
Robuster Mittelwert	21,9
<b>Robuste Standardabweichung (<math>S^*</math>)</b>	<b>15,9</b>
Zielkenndaten:	
<b>Zielstandardabweichung <math>\sigma_{pt}</math></b>	
<b>Untere Grenze des Zielbereichs</b>	
<b>Obere Grenze des Zielbereichs</b>	
Quotient $S^*/\sigma_{pt}$	
Standardunsicherheit $U(X_{pt})$	
Ergebnisse im Zielbereich	
Prozent im Zielbereich	

Anmerkungen zu den Kenndaten und Vergleich der Bezugswerte:

Eine Kerndichte-Schätzung wurde aufgrund der geringen Anzahl von Ergebnissen nicht vorgenommen.

Die Verteilung der Ergebnisse aller Methoden wies eine erhöhte Variabilität mit einem Quotienten  $S^*/\sigma_{pt}$  von 2,9 auf. Aufgrund der heterogenen Daten und der geringen Anzahl wurde keine Bewertung der Ergebnisse mittels z-Score vorgenommen.

Der Median der Teilnehmerergebnisse lag mit 94% vom Zusatzniveau von Pecannuss zu Probe B, innerhalb der relevanten Anforderungen für die eingesetzten Methoden (s. 3.4.3 und "Wiederfindungsraten für ELISA für Pecannuss" S.39).



**Abb./Fig. 7:** ELISA-Ergebnisse Pecannuss  
 grüne Linie = Zusatzniveau (Spike)  
 rote Linie = robuster Mittelwert aller Ergebnisse  
 runde Symbole = Zuordnung der Methoden (s. Legende)

**Quantitative Auswertung ELISA: Dotierungsniveauprobe**

Auswertenummer	Pecannuss [mg/kg]	z-Score $X_{pt_{ALL}}$	Methode	Hinweis
1	23,3	-2,3	3M	Ergebnis umgerechnet °
4	69,8	1,0	BF	
5	61,1	0,40	BF	
6	64,4	0,64	BF	
3	52,6	-0,21	IL	
10	51,0	-0,33	IL	

° Umrechnung S. 20

**Methoden:**

3M = 3M Protein ELISA Kit

BF = MonoTrace ELISA, BioFront Technologies

IL = Immunolab

**Anmerkung:**

Eine Kerndichte-Schätzung wurde aufgrund der Anzahl von < 8 Ergebnissen nicht vorgenommen.

**Kenndaten: Quantitative Auswertung ELISA Pecannuss****Dotierungsniveauprobe**

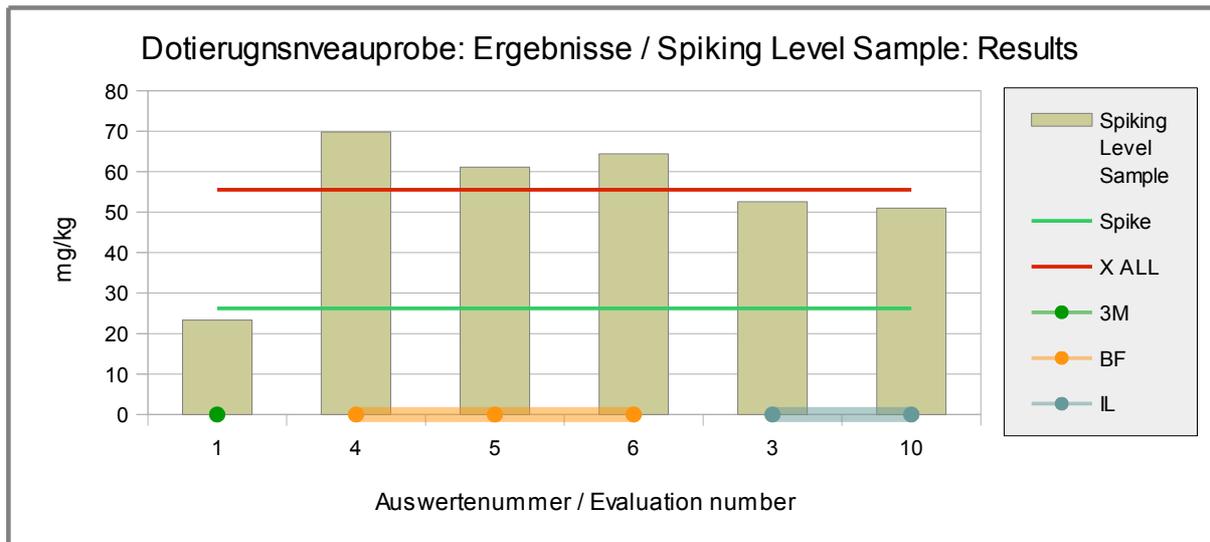
<b>Kenndaten</b>	<b>Alle Ergebnisse</b> [mg/kg]
Zugewiesener Wert ( $X_{pt}$ )	<b><math>X_{pt_{ALL}}</math></b>
Anzahl der Messergebnisse	6
Anzahl der Ausreißer	0
Mittelwert	53,7
Median	56,9
<b>Robuster Mittelwert (<math>X_{pt}</math>)</b>	<b>55,5</b>
<b>Robuste Standardabweichung (<math>S^*</math>)</b>	<b>14,3</b>
<i>Zielkenndaten:</i>	
<b>Zielstandardabweichung <math>\sigma_{pt}</math></b>	<b>13,9</b>
<b>Untere Grenze des Zielbereichs</b>	<b>27,8</b>
<b>Obere Grenze des Zielbereichs</b>	<b>83,3</b>
Quotient $S^*/\sigma_{pt}$	1,0
Standardunsicherheit $U(X_{pt})$	7,30
Ergebnisse im Zielbereich	5
Prozent im Zielbereich	83

Anmerkungen zu den Kenndaten und Vergleich der Bezugswerte:

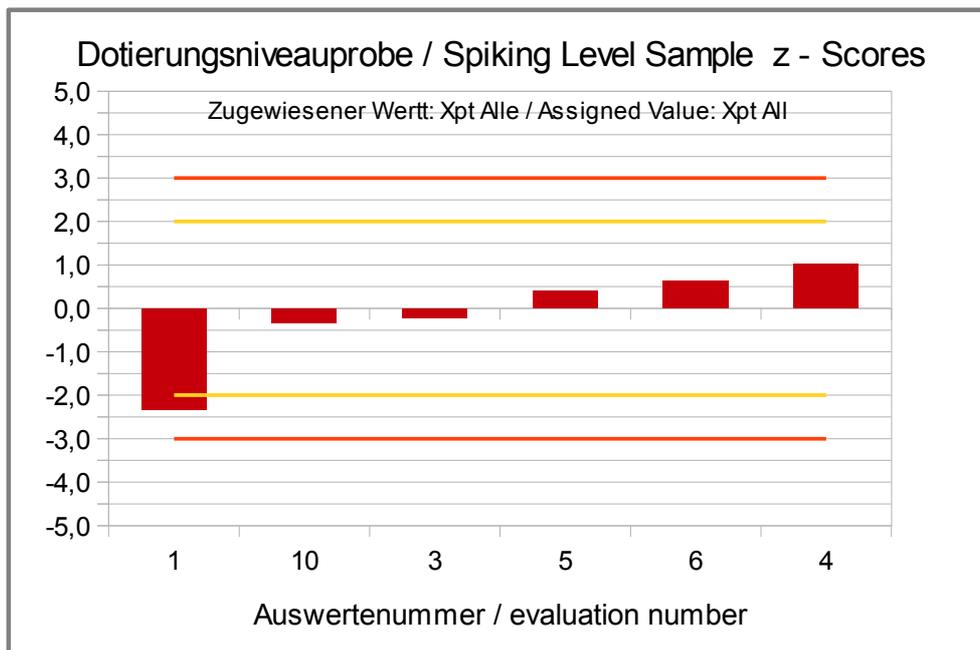
Eine Kerndichte-Schätzung wurde aufgrund der geringen Anzahl von Ergebnissen nicht vorgenommen.

Die Verteilung der Ergebnisse aller Methoden zeigte eine normale bis geringe Variabilität. Der Quotient  $S^*/\sigma_{pt}$  lag deutlich 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 robuste Mittelwert der Auswertung lag mit 212% vom Zusatzniveau von Pecannuss zur Dotierungsniveauprobe oberhalb der relevanten Anforderungen für die eingesetzten Methoden (s. 3.4.3 und "Wiederfindungsraten für ELISA für Pecannuss", s. S.39).



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



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

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

Auswertenummer	Dotierungsniveauprobe	Wiederfindungsrate*	Probe B	Wiederfindungsrate*	Methode	Hinweis
	[mg/kg]	[%]	[mg/kg]	[%]		
1	23,3	89	13,6	50	3M	Ergebnis umgerechnet °
4	69,8	266	42,1	155	BF	
5	61,1	233	42,5	156	BF	
6	64,4	246	17,8	65	BF	
3	52,6	201	10,7	39	IL	
10	51	195	26,0	96	IL	

° Umrechnung S. 20

AB**	50-150 %	AB**	50-150 %
Anzahl im AB	1	Anzahl im AB	3
Prozent im AB	17	Prozent im AB	50

**Methoden:**

3M = 3M Protein ELISA Kit  
 BF = MonoTrace ELISA, BioFront Technologies  
 IL = Immunolab

\* Wiederfindungsrate 100% Bezugsgröße: Pecannuss, s. Seite 5

\*\* Akzeptanzbereich der AOAC für Allergen-ELISAs

Anmerkung:

Einer der Teilnehmer (17%) hat mit der Dotierungsniveauprobe mittels ELISA eine Wiederfindungsrate im Bereich der AOAC-Anforderung von 50-150% erhalten, während alle anderen Wiederfindungsraten bei ca. 200% und höher lagen. Für die dotierte Lebensmittelmatrix-Probe B lagen 50% (3) der Wiederfindungsraten im Akzeptanzbereich.

4.2.2 PCR-Ergebnisse: Pecannuss

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		
3	negativ	<1	positiv	11,7	2/2 (100%)	SFA	
7	negativ		positiv		2/2 (100%)	div	
8	negativ		positiv	300	2/2 (100%)	div	angegeben als Pecannuss-DNA

	Probe A	Probe B
Anzahl positiv	0	3
Anzahl negativ	3	0
Prozent positiv	0	100
Prozent negativ	100	0
Konsenswert	negativ	positiv

Methoden:

SFA = Sure Food ALLERGEN, R-Biopharm / Congen  
 div = keine genaue Angabe / andere Methode  
 div = not indicated / other method

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 vorlagen.

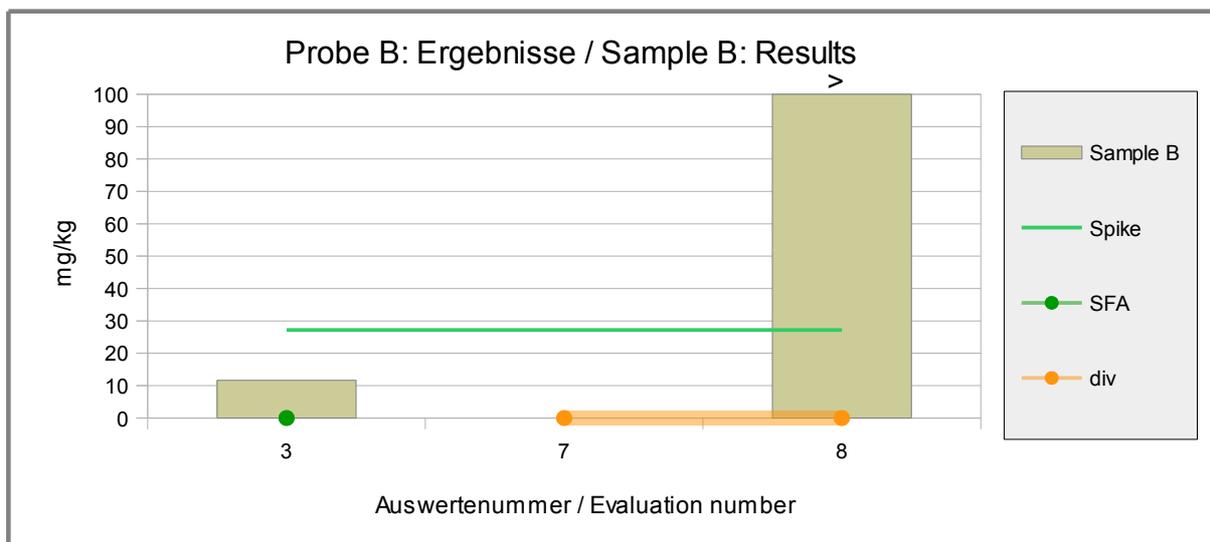


Abb./Fig. 10: PCR-Ergebnisse Pecannuss  
 grüne Linie = Zusatzniveau (Spike)  
 runde Symbole = Zuordnung der Methoden (s. Legende)

**(Quantitative) Auswertung PCR: Dotierungsniveauprobe**

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

Auswertenummer	Pecannuss	Pecannuss	Methode	Hinweis
	pos/neg	[mg/kg]		
3	positiv		SFA	
7	positiv		div	
8	positiv	300	div	angegeben als Pecannuss-DNA

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

**Methoden:**

SFA = Sure Food Allergen, R-Biopharm / Congen

div = keine genaue Angabe / andere Methode

div = not indicated / other method

Anmerkung:

Für die Dotierungsniveauprobe wurden 100% positive Ergebnisse erhalten.

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

Auswertenummer	Dotierungsniveauprobe	Wiederfindungsrate*	Probe B	Wiederfindungsrate*	Methode	Hinweis
	[mg/kg]	[%]	[mg/kg]	[%]		
3			11,7	43	SFA	
7					div	
8	300		300		div	angegeben als Pecannuss-DNA

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

**Methoden:**

SFA = Sure Food ALLERGEN, R-Biopharm / Congen  
 div = keine genaue Angabe / andere Methode  
 div = not indicated / other method

\* Wiederfindungsrate 100% Bezugsgröße: Pecannuss, s. Seite 5

\*\* Akzeptanzbereich der AOAC für Allergen-ELISAs

Anmerkung:

*Es lag nur ein quantitatives PCR-Ergebnis als Pecannuss für Probe B vor. Die Wiederfindungsrate lag etwas unterhalb des Bereichs der AOAC-Anforderung von 50-150%. Die Ergebnisse, die als DNA-Gehalt angegeben wurden, wurden nicht berücksichtigt.*

## 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: Haselnuss

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	4	25/11	negativ	0	positiv	51,7	positiv	52,3	0,04	1		Haselnuss	MonoTrace Hazelnut ELISA kit, BioFront Technologies
ES	7	01.11.18	negativ	<0,5	positiv	3,5	positiv	2,7	0,25	0,5		Haselnuss-protein	ELISA Systems Hazelnut ESHRD-48
IL	2	30.11.18	-	<1	-	30,4	-	36,2		1		Haselnuss	Immunolab Hazelnut ELISA
IL	10	27.10.18	negativ	<0.3	positiv	26	positiv	34	0.3	1		Haselnuss	Immunolab Hazelnut ELISA
RS-F	1	27.11.18	negativ		positiv	38,7	positiv	36		2,5		Haselnuss	Ridascreen® FAST Hazelnut R6802, R-Biopharm
RS-F	3	22.10.18	negativ	<2.5	positiv	50,71	positiv	51,82	2,5	2,5	33,3	Haselnuss	Ridascreen® FAST Hazelnut R6802, R-Biopharm
RS-F	6		negativ	<2,5	positiv	>20	positiv	>20		2,5		Haselnuss	Ridascreen® FAST Hazelnut R6802, R-Biopharm
RS-F	8	13.11.18	negativ		positiv	35	positiv	30	1,5	2,5		Bitte auswählen!	Ridascreen® FAST Hazelnut R6802, R-Biopharm
VT	5	22/11	negativ	<2.5	positiv	15,2	positiv	17,8		2,5		Haselnuss	Veratox Hazelnut, Neogen
VT	9	17.10.18	negativ		positiv	14,8	positiv	23,2	3	10	30	Haselnuss	Veratox Hazelnut, 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	
BF	4	Monoclonal antibody	1:20 Extraktionsverhältnis/10 min/60°C	nein	5% nicht-fette Trockenmilch zu 1X Extraktionspuffer hinzugefügt
ES	7	erkennt Haselnussproteine	lt. Herstellerangaben	ja	
IL	2			ja	
IL	10		Verwendung von Immunolab Extraktionsadditiv		
RS-F	1				Test kit Ergebnis – ausgedrückt als Gesamthaselnuss
RS-F	3	Nach Herstelleranleitung	Nach Herstelleranleitung	ja	
RS-F	6			ja	
RS-F	8		gemäss Anleitung	ja	
VT	5				
VT	9		PBS/15min/60°C	ja	

**5.1.2 ELISA: Pecannuss**

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
3M	1	21.11.18	Negativ		positiv	1,4	positiv	2,4		0,7		Pecannuss Protein	other: 3M E96PEC
BF	4	25/11	negativ	0	positiv	42,1	positiv	69,8	0,17	1		Pecannuss	MonoTrace Pecan ELISA kit, BioFront Technologies
BF	5	20/11	negativ	<2.0	positiv	42,5	positiv	61,1		2		Pecannuss	MonoTrace Pecan ELISA kit, BioFront Technologies
BF	6		negativ	<2	positiv	17,8	positiv	64,4		2		Pecannuss	BioFront
IL	3	22.10.18	negativ	<2	positiv	10,74	positiv	52,6	2	2	30	Pecannuss	Immunolab Pecan Nut ELISA
IL	10	27.10.18	negativ	< 0.2	positiv	26	positiv	51	0.2	2		Pecannuss	Immunolab Pecan Nut ELISA

\* 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	
3M	1				Test kit Ergebnis – ausgedrückt als Pecannussprotein
BF	4	Monoclonal antibody	1:10 Extraktionsverhältnis/10 min/60°C	nein	5% nicht-fette Trockenmilch zu 1X Extraktionspuffer hinzugefügt
BF	5				
BF	6			nein	
IL	3	nach Herstellerangaben	nach Herstellerangaben	ja	
IL	10		Verwendung von Immunolab Extraktionsadditiv		

**5.1.3 PCR: Haselnuss**

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
div	7	01.11.18	negativ		positiv		positiv		10			Haselnuss-DNA	ASU §64 Methode/method
div	8	31.10.18	negativ		positiv	150	positiv	100		100		Haselnuss-DNA	andere: bitte eingeben!

\* 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	
div	7	Haselnuss-DNAp	CTAB / Proteinase K / Promega Wizard DNA CleanUp / Real-time PCR / 45 Zyklen	ja	
div	8		Piknova et al, 2008		bezogen auf Gesamt-DNA, grobe Schätzung, ohne Referenzproben

**5.1.4 PCR: Pecannuss**

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
SFA	3	27.11.18	negativ	<1	positiv	11,67	positiv		1	1	30	Pecannuss	Sure Food Allergen, R-Biopharm / Congen
div	7	01.11.18	negativ		positiv		positiv		4			Pecannuss-DNA	interne Methode
div	8	30.10.18	negativ		positiv	300	positiv	300		100		Pecannuss-DNA	andere: bitte eingeben!

\* 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	
SFA	3	nach Herstellerangaben	nach Herstellerangaben	nein	
div	7	Pecannuss- und Walnuss-DNAp	CTAB / Proteinase K / Promega Wizard DNA CleanUp / PCR Gelelektrophorese / 45 Zyklen	ja	Probe B und Dotierungsniveauprobe intern mittels Walnuss ELISA untersucht: Ergebnis <3mg/kg Walnuss
div	8		Brezna et al. 2008		bezogen auf Gesamt-DNA, grobe Schätzung, ohne Referenzproben

**5.2 Homogenität**

**5.2.1 Mischungshomogenität vor der Abfüllung**

**Microtracer Homogenitätstest**

**DLA 06-2018 Dotierungsniveauprobe**

Gewicht Gesamtprobe 1,55 kg  
 Microtracer FSS-rot lake  
 Teilchengröße 75 – 300 µm  
 Gewicht pro Partikel 2,0 µg  
 Tracerzugabe 20,4 mg/kg

**Analysenergebnisse:**

Probe	Einwaage [g]	Partikel Anzahl	Partikel [mg/kg]
1	4,97	92	37,0
2	5,03	89	35,4
3	5,03	91	36,2
4	5,06	80	31,6
5	5,02	88	35,1
6	4,99	79	31,7
7	5,02	81	32,3
8	5,00	82	32,8

**Poisson-Verteilung**

Probenanzahl	8	
Freiheitsgrad	7	
Mittelwert	85,3	Partikel
Standardabweichung	5,40	Partikel
$\chi^2$ (CHI-Quadrat)	2,40	
<b>Wahrscheinlichkeit</b>	<b>93</b>	%
Wiederfindungsrate	167	%

**Normalverteilung**

Probenanzahl	8	
Mittelwert	34,0	mg/kg
Standardabweichung	2,15	mg/kg
rel. Standardabweichung	6,34	%
Horwitz Standardabweichung	9,41	%
<b>HorRat-Wert</b>	<b>0,67</b>	
Wiederfindungsrate	167	%

**5.3 Informationen zur Eignungsprüfung (EP)**

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

EP-Nummer	<b>DLA 06-2018</b>
EP-Name	<b>Allergene VI: Haselnuss und Pecannuss in Schokolade</b>
Probenmatrix (Prozessierung)	<b>Proben A + B:</b> Schokolade 70% Kakao/ Zutaten: Kakaomasse, Zucker, Kakaobutter, Emulgator: Lecithine, Vanilleextrakt weitere Zusatzstoffe und Allergene Lebensmittel (eine der beiden Proben) <b>Dotierungsniveauprobe:</b> 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: Haselnuss (Haselnussprotein, DNA), Pecannuss (Pecannuss protein, 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: <b>pt@dla-lvu.de</b>
Abgabetermin	<b>spätestens 30. November 2018</b>
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. Ggf. werden die Prüfung der Gehalte, Homogenität und Stabilität von EP-Parametern von DLA im Unterauftrag vergeben.

## 6. Verzeichnis der Teilnehmer in alphabetischer Reihenfolge

Teilnehmer / Participant	Ort / Town	Land / Country
		SPANIEN
		USA
		CANADA
		Deutschland
		GRIECHENLAND
		Deutschland
		SCHWEIZ
		CANADA
		GROSSBRITANNIEN
		SPANIEN

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

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

## 7. Verzeichnis relevanter Literatur

1. DIN EN ISO/IEC 17025:2005; Allgemeine Anforderungen an die Kompetenz von Prüf- und Kalibrierlaboratorien / General requirements for the competence of testing and calibration laboratories
2. DIN EN ISO/IEC 17043:2010; Konformitätsbewertung - Allgemeine Anforderungen an Eignungsprüfungen / Conformity assessment - General requirements for proficiency testing
3. ISO 13528:2015 & DIN ISO 13528:2009; Statistische Verfahren für Eignungsprüfungen durch Ringversuche / Statistical methods for use in proficiency testing by inter-laboratory 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 purposes<sup>1</sup>, 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 exceisa) in Reis- und Weizenkeksen sowie in Soßenpulver mittels real-time PCR (2014) [Foodstuffs, detection and determination of brazil nut (Bertholletia exceisa) in rice and wheat cookies and sauce powders by PCR]
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 06/2018 - Allergene VI**

Alle 10 Teilnehmer haben mindestens ein Ergebnis eingereicht. Die Auswertung erfolgte hinsichtlich der Parameter Haselnuss und Pecannuss für ELISA- (qualitativ und quantitativ) und PCR-Methoden (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 Auswertebereicht zu entnehmen.

5 Teilnehmer hatten ihren Sitz im Europäischen Ausland (Großbritannien, Griechenland, Schweiz, Spanien) und drei Teilnehmer in Canada und den USA.