

Proficiency Tests

DLA

food
cosmetics
consumer goods
www.dla-lvu.de

Auswertungs-Bericht

Laborvergleichsuntersuchung

DLA 07/2018

Allergene VII:

Crustaceae und Kokosnuss

in Instantprodukt (Tomatensaucenpulver)

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)

<i>EP-Anbieter</i> <i>PT-Provider</i>	<p>DLA - Dienstleistung Lebensmittel Analytik GbR Gesellschafter: Dr. Matthias Besler-Scharf und Alexandra Scharf MSc.</p> <p>Waldemar-Bonsels-Weg 170, 22926 Ahrensburg, Germany</p> <p>Tel. ++49-(0)4532-9183358 Mob. ++49(0)171-1954375 Fax. ++49(0)4102-9944976 eMail. proficiency-testing@dla-lvu.de</p>
<i>EP-Nummer</i> <i>PT-Number</i>	DLA 07/2018
<i>EP-Koordinator</i> <i>PT-Coordinator</i>	Dr. Matthias Besler-Scharf
<i>Status des EP-Bericht</i> <i>Status of PT-Report</i>	<p>Abschlussbericht / Final report (12. April 2019)</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>
<i>EP-Bericht Freigabe</i> <i>PT-Report Authorization</i>	<p>Dr. Matthias Besler-Scharf (Technischer Leiter / Technical Manager) - <i>gezeichnet / signed M. Besler-Scharf</i> Alexandra Scharf MSc. (QM-Beauftragte / Quality Manager) - <i>gezeichnet / signed A. Scharf</i> Datum / Date: 12. April 2019</p>
<i>Unteraufträge</i> <i>Subcontractors</i>	<p>Falls im Rahmen der Eignungsprüfung eine Prüfung der Gehalte, Homogenität und Stabilität von EP-Parametern durchgeführt wurde, hat DLA diese im Unterauftrag vergeben. In case the analysis of the content, homogeneity and stability of PT-parameters was part of the proficiency test, the determinations were subcontracted by DLA.</p>
<i>Vertraulichkeit</i> <i>Confidentiality</i>	<p>Die Teilnehmerergebnisse sind im EP-Bericht in anonymisierter Form mit Auswertenummern benannt. Daten einzelner Teilnehmer werden ausschließlich nach vorheriger Zustimmung des Teilnehmers an Dritte weitergegeben. Participant result are named anonymously with evaluation numbers in the PT report. Data of individual participants will be passed on to third parties only with prior consent of the participant.</p>

Inhalt

1. Einleitung.....	4
2. Durchführung.....	4
2.1 Untersuchungsmaterial.....	4
2.1.1 Homogenität.....	6
2.1.2 Stabilität.....	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
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.....	18
3.9 Graphische Darstellung der Bezugswerte.....	18
3.10 Wiederfindungsraten: Dotierung.....	18
4. Ergebnisse.....	19
4.1 Vergleichsuntersuchung Crustaceae.....	22
4.1.1 ELISA-Ergebnisse: Crustaceae (als Gesamtprotein).....	22
4.1.2 PCR-Ergebnisse: Crustaceae (getrocknet).....	30
4.2 Vergleichsuntersuchung Kokosnuss.....	33
4.2.1 ELISA-Ergebnisse: Kokosnuss, getrocknet (Kokosmehl).....	33
4.2.2 PCR-Ergebnisse: Kokosnuss.....	35
5. Dokumentation.....	36
5.1 Angaben der Teilnehmer.....	36
5.1.1 ELISA: Crustaceae.....	36
5.1.2 ELISA: Kokosnuss.....	38
5.1.3 PCR: Crustaceae.....	39
5.2 Homogenität.....	40
5.2.1 Mischungshomogenität vor der Abfüllung.....	40
5.3 Informationen zur Eignungsprüfung (EP).....	41
6. Verzeichnis der Teilnehmer in alphabetischer Reihenfolge.....	42
7. Verzeichnis relevanter Literatur.....	43

1. Einleitung

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

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

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

2. Durchführung

2.1 Untersuchungsmaterial

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

Bei dem Untersuchungsmaterial der Lebensmittelmatrixproben handelt es sich um Instant-Saucenpulver mit Zusatz von Kartoffelmehl. Die Grundzusammensetzung war für beide Proben A und B gleich (s. Tabelle 1). Nach Zerkleinern und Sieben (mesh 2,5 mm) wurde die Grundmischung homogenisiert.

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

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

Die **Dotierungsniveauprobe** wurde mit den oben genannten allergenhaltigen Dotierungsmaterialien (mesh 250 µm) unter mehrstufiger Zugabe von Kartoffelpulver (mesh 500 µm) und Homogenisierung hergestellt.

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

Tabelle 1: Zusammensetzung der DLA-Proben

Zutaten	Probe A	Probe B	Dotierungs- niveauprobe
Tomatensaucen-Pulver Zutaten: Tomaten, Stärke, Zucker, Salz, Reismehl, Palmöl, Zwiebeln, Hefeextrakt, Pflanzenöl, Gewürze, Säuerungsmittel: Citronensäure, Kräuter, Basilikumextrakt Nährwertangaben pro 100 g: Fett 7,5 g, Kohlenhydrate 58 g, Ballaststoffe 5,8 g, Eiweiß 8,3 g, Salz 12 g	72,6 g/100 g	76,3 g/100g	-
Kartoffelmehl Nährwertangaben pro 100g: Protein 0 g	22,5 g/100 g	23,7 g/100g	-
Kartoffelpulver Zutaten: Kartoffeln, E471, E304, E223, E100	4,6 g/100 g	-	99,8 g/100 g
Flusskrebs-Pulver Zutaten: Louisiana-Flusskrebs-Fleisch (<i>Procambarus clarkii</i>), gekocht, getrocknet - als Flusskrebs, getrocknet* - davon 79% Gesamtprotein**	75,1 mg/kg 59,1 mg/kg	-	72,6 mg/kg 57,1 mg/kg
Kokosmehl: - als Kokosmehl* - davon 17% Gesamtprotein**	460 mg/kg 78,7 mg/kg	-	445 mg/kg 76,1 mg/kg
weitere Zutaten: Maltodextrin, Titandioxid, Siliciumdioxid und Kaliumsorbat	<0,3 g/100 g	-	<0,2 g/100 g

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

** Proteingehalte gemäß Laboranalyse des Rohstoffs (Gesamtstickstoff nach Kjeldahl mit F=6,25 für Crustaceae-Protein und mit F=5,30 für Kokosprotein)

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-Probe A und der Dotierungsniveauprobe hat eine Wahrscheinlichkeit von 71% bzw. 97% 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 1,1 bzw. 0,5 erhalten. Die Ergebnisse der Microtracer-Analyse sind in der Dokumentation angegeben.

Homogenität der abgefüllten dotierten Probe A

Durchführung der Homogenitätstests

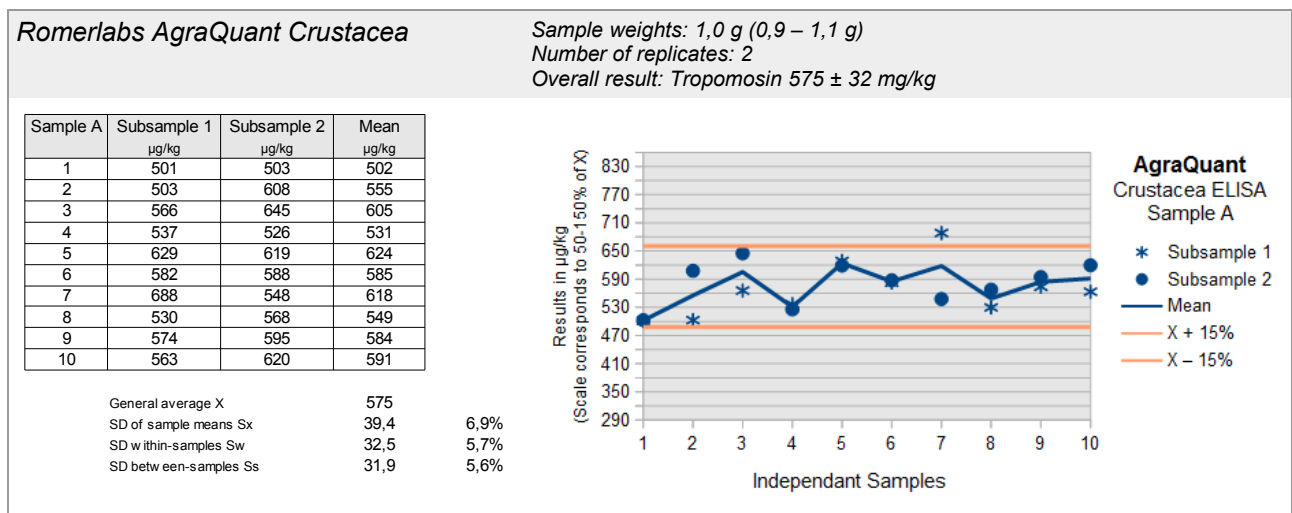
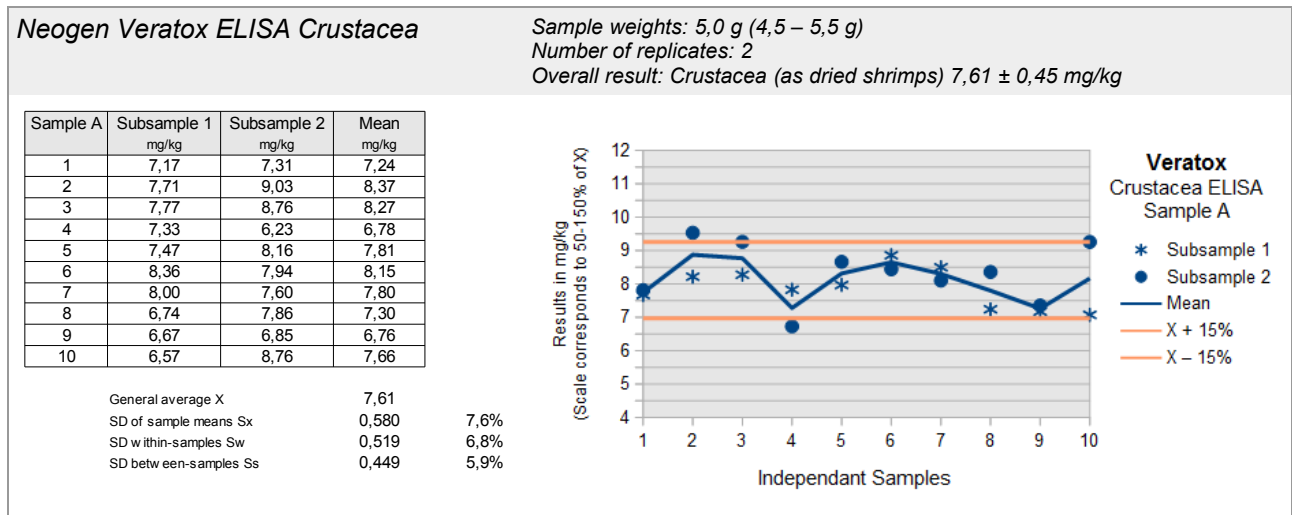
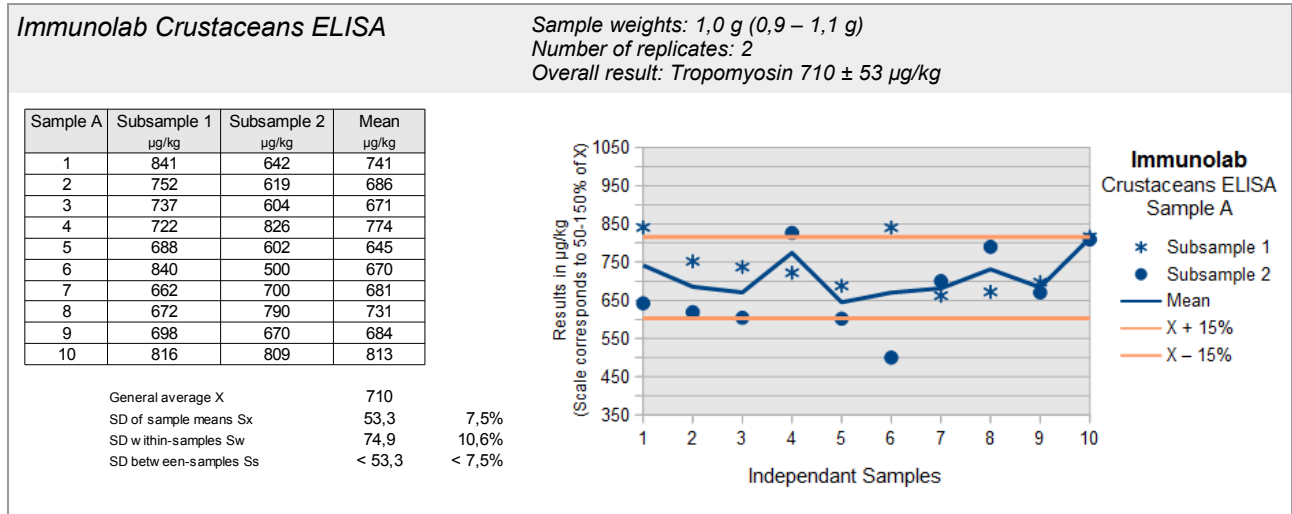
Die Homogenitätstests wurden in Kooperation mit den Labors der angegebenen Testkit-Anbieter durchgeführt. Von DLA wurden zufällig 10 Muster der abgefüllten dotierten Probe ausgewählt und davon jeweils 2 Teilproben in zuvor zufällig-coodierte Extraktionsbehälter eingewogen und anschließend den Labors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

Bewertung der Homogenität

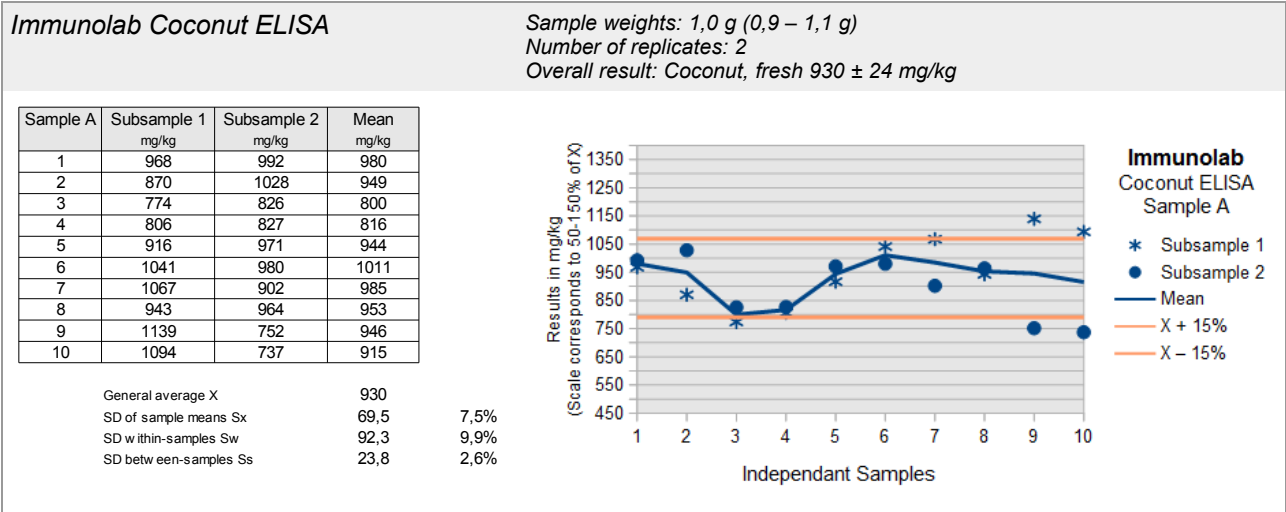
Die Homogenität wird mit einer Standardabweichung zwischen den Proben von $S_s \leq 15\%$ („Heterogenitätsstandardabweichung“) als hinreichend gesichert angesehen. Dieses Kriterium wird für die untersuchte Probe A in allen ELISA-Tests für Kokosnuss (Immunolab) und Crustaceae (Immunolab, Veratox, AgraQuant)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



ELISA-Tests: Homogenität Kokosnuss / Homogeneity Coconut



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. $0,29$ ($24,3^\circ\text{C}$). 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 47. Kalenderwoche 2018 je eine Portion der Untersuchungsmaterialien A und B sowie eine Dotierungsmaterialprobe verschickt. Die Untersuchungsverfahren wurden freigestellt. Die Untersuchungen waren durchzuführen bis spätestens 04. Januar 2019.

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 Crustaceae (Flusskrebs, gekocht, getrocknet) und/oder Kokosnuss im mg/kg Bereich in der Matrix Instantsuppenpulver. 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.

Von 14 Teilnehmern haben 13 Teilnehmer ihre Ergebnisse fristgerecht abgegeben. Ein Teilnehmer hat keine 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	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 12 - 33% für die ELISA-Methoden und 18 - 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} [32-36].

Parameter	Matrix	Mittelwerte [mg/kg]	Wiederfindung	rob RSD_r	RSD_r	RSD_R	σ_{pt}	Methode / Literatur
Mandel	Reiskekse	105,2	105 %	-	19,3%	27,5%	23,9%	rt-PCR ASU 18.00-20
		18,0	90 %		44,0%	49,1%	38,0%	
		10,5	105 %		32,0%	38,8%	31,5%	
Mandel	Weizenkekse Soßenpulver	114,3	94,6 %	-	22,1%	41,8%	38,8%	rt-PCR ASU 18.00-20
		88,1	88,1 %		43,9%	43,1%	- %	
Mandel	Reiskekse	109	109 %	-	17,6%	32,8%	30,3%	rt-PCR multiplex ASU 18.00-22
		21,3	107 %		35,8%	45,0%	37,2%	
		12,3	121 %		32,0%	47,8%	42,1%	
Mandel	Weizenkekse Soßenpulver	120,7	98,2 %	-	15,7%	32,5%	30,5%	rt-PCR multiplex ASU 18.00-22
		112	94,1 %		36,2%	42,8%	34,3%	
Soja	Weizenmehl Maismehl	107	107 %	63 %	-	31 %	-	rt-PCR ASU 16.01-9
		145	145 %	34 %	-	24 %	-	
Sojamehl	Brühwurst (100°C, 60 min)	114,1	114 %	-	14,7%	22,2%	19,6%	rt-PCR ASU 08.00-65
		64,4	161 %		27,7%	41,4%	36,5%	
Sojamehl	Wurst, autoklaviert	33,1	33,1 %	-	21,5%	30,8	26,8%	rt-PCR ASU 08.00-65
Sojamehl	Brühwurst (100°C, 60 min)	82,0	82 %	-	17,3%	24,1%	20,8%	rt-PCR ASU 08.00-59
		39,6	99 %		22,9%	31,8%	27,4%	
		19,6	98 %		22,9%	24,0%	17,7%	
		9,3	93 %		31,1%	30,2%	-	

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 [23] und vom Codex Alimentarius Committee (CAC/GL 74-2010) [18] erarbeitet worden.

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

Tabelle 3: ELISA-Validierungskriterien

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

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

Tabelle 4: PCR-Validierungskriterien

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

(a) = Trueness / Richtigkeit

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

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

3.5 z-Score

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

Die Berechnung erfolgt nach:

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

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

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

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

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

3.5.1 Warn- und Eingriffssignale

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

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

3.6 z'-Score

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

Die Berechnung erfolgt nach:

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

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

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

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

Zu Warn- und Eingriffssignalen siehe 3.5.1.

3.7 Quotient S^*/σ_{pt}

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

3.8 Standardunsicherheit und Rückführbarkeit

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

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

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

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

3.9 Graphische Darstellung der Bezugswerte

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

3.10 Wiederfindungsraten: Dotierung

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

4. Ergebnisse

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

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

Die folgenden Ergebnisseiten sind für die allergenen Bestandteile jeweils gleich aufgebaut. Es werden zunächst die Ergebnisse aller ELISA- bzw. PCR-Methoden zu einem Parameter für die Proben A und B (qualitativ und ggf. quantitativ) und danach für die Dotierungsniveauprobe 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** für Crustaceae wurden als **Crustaceae-Protein** ausgewertet.

Ergebnisse, die als frisches Produkt angegeben wurden, sind je nach Testkit direkt in Crustaceae-Protein (Testkit-Anleitung: Ridascreen mit 20% Protein, Handbuch: Veratox mit 22,78% Protein) oder zunächst in Crustaceae, getrocknet (BioFront) umgerechnet worden. Im zweiten Fall wurde eine Trockenmasse von 21,8% (experimenteller Wert der Rohware Flusskrebs) zugrunde gelegt und anschließend mit dem experimentell bestimmten Proteingehalt von 79% in der Trockenmasse (vgl. S.5) auf den Gesamtproteingehalt umgerechnet.

Ergebnisse, die als Crustaceae-Trockengewicht angegeben wurden (AgraQuant), sind ebenfalls mit dem experimentell bestimmten Proteingehalt von 79% in der Trockenmasse (vgl. S.5) auf den Gesamtproteingehalt umgerechnet worden.

ELISA-Ergebnisse, die als Tropomyosin angegeben wurden, sind mit den Herstellerangaben von 20% Tropomyosin im Gesamtprotein auf das Gesamtprotein umgerechnet worden (AgraQuant, Immunolab, Eurofins).

Ergebnisse, die als Kokosnuss frisch angegeben wurden (ELISA Immunolab) bzw. als solche laut Herstellerangaben (Kokosnuss = Kokosnuss frisch, persönliche Kommunikation) angegeben sind (ELISA Eurofins SensiSpec), sind in das Trocken-Produkt Kokosmehl umgerechnet worden. Dabei wurde eine Trockenmasse von 55,2% (Lebensmittel-Tabellen Souci, Fachmann, Kraut) zugrunde gelegt.

Das **PCR Ergebnis** für Crustacea, frisch wurde mit einer Trockenmasse von 21,8% (experimenteller Wert der Rohware Flusskrebs) in Crustaceae, getrocknet umgerechnet.

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_{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 ^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 Crustaceae

4.1.1 ELISA-Ergebnisse: Crustaceae (als Gesamtprotein)

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		
2	positiv	0,390	negativ	<0,02	2/2 (100%)	AQ	
3	positiv	0,956	negativ	<0,08	2/2 (100%)	AQ	Ergebnis umgerechnet °
6	positiv	0,351	negativ	<0,02	2/2 (100%)	AQ	
9	positiv	0,900	negativ	<0,1	2/2 (100%)	AQ	
1	positiv	6,04	negativ	0	2/2 (100%)	BF	Ergebnis umgerechnet °
7	positiv	3,35	negativ	<0,1	2/2 (100%)	EF	Ergebnis umgerechnet °
10	negativ	<0,25	negativ	<0,25	1/2 (50%)	ES	keine positive Probe identifiziert, Ergebnis umgerechnet °
13	positiv	3,64	negativ	0	2/2 (100%)	IL	Ergebnis umgerechnet °
4	positiv	6,78	negativ	<4	2/2 (100%)	RS-F	Ergebnis umgerechnet °
5	negativ		negativ		1/2 (50%)	RS-F	keine positive Probe identifiziert
11	positiv	1,75	negativ	<0,57	2/2 (100%)	VT	Ergebnis umgerechnet °

° Umrechnung S. 19

	Probe A	Probe B
Anzahl positiv	9	0
Anzahl negativ	2	11
Prozent positiv	82	0
Prozent negativ	18	100
Konsenswert	positiv	negativ

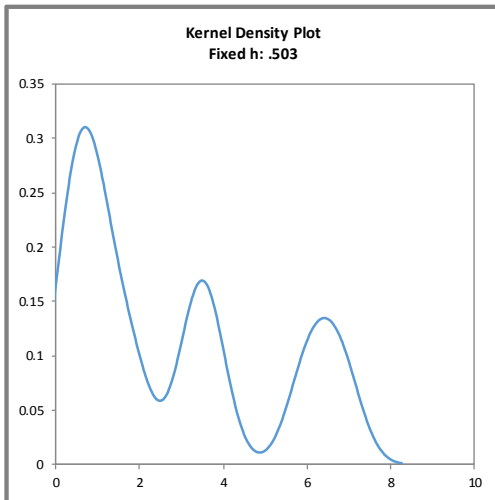
Methoden:

AQ = AgraQuant, RomerLabs
 BF = MonoTrace ELISA, BioFront Technologies
 EF = SensiSpec ELISA Kit, Eurofins
 ES = ELISA-Systeme
 IL = Immunolab
 RS-F= Ridascreeen® Fast, R-Biopharm
 VT = Veratox, Neogen

Anmerkung:

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

Für Probe A wurden zwei negative Ergebnisse mit der Methode ES bzw. RS-F erhalten.

Quantitative Auswertung ELISA: Probe A**Abb. / Fig. 1:**

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 drei Maxima für die Ergebnisse, die von je 4 (Methode AQ), 3 (Methoden EF, IL und VT) und 2 Werten (Methoden BF und RS-F) gebildet werden (s. Abb. 1).

Kenndaten: Quantitative Auswertung ELISA Crustaceae (als Gesamtprotein)

Probe A

Kenndaten	Alle Ergebnisse [mg/kg]
Zugewiesener Wert (X_{pt})	X_{pt_ALL}
Anzahl der Messergebnisse	9
Anzahl der Ausreißer	
Mittelwert	2,68
Median	1,75
Robuster Mittelwert	2,68
Robuste Standardabweichung	2,75
<i>Zielkenndaten:</i>	
Zielstandardabweichung σ_{pt}	
Untere Grenze des Zielbereichs	
Obere Grenze des Zielbereichs	
<i>Quotient S^*/σ_{pt}</i>	
<i>Standardunsicherheit $U(X_{pt})$</i>	
<i>Ergebnisse im Zielbereich</i>	
<i>Prozent im Zielbereich</i>	

Anmerkungen zu den Kenndaten und Vergleich der Bezugswerte:

Die Kerndichte-Schätzung zeigte ein Maximum bei Werten von 0,35 bis 0,9 mg/kg (4 Ergebnisse Methode AQ), sowie zwei weitere kleinere Maxima (andere Methoden). Eine gemeinsame Auswertung der Ergebnisse verschiedener Methoden war nicht möglich. Aufgrund der geringen Anzahl von Ergebnissen wurde auch keine Auswertung nach Einzelmethoden vorgenommen.

Die einzelnen quantitativen Ergebnisse wurden im Vergleich zum Zusatzniveau zur Information bewertet (siehe "Wiederfindungsraten für für Crustaceae (als Gesamtprotein)" S.29).

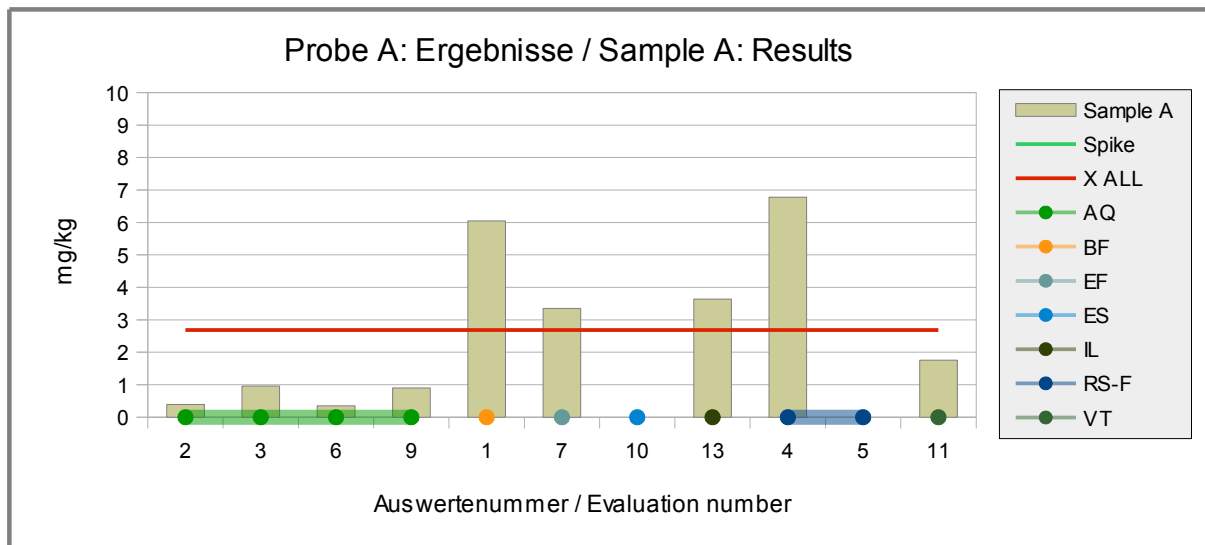


Abb./Fig. 2: ELISA-Ergebnisse Crustaceae (als Gesamtprotein)
 Zusatzniveau (Spike 59,1 mg/kg, nicht dargestellt)
 rote Linie = robuster Mittelwert aller Ergebnisse (zur Information)
 runde Symbole = Zuordnung der Methoden (s. Legende)

Quantitative Auswertung ELISA: Dotierungsniveauprobe

Auswertenummer	Crustaceae Protein pos/neg	Crustaceae Protein [mg/kg]	z-Score Xpt _{ALL}	Methode	Hinweis
2	positiv	0,560		AQ	
3	positiv	1,32		AQ	Ergebnis umgerechnet °
6	positiv	0,787		AQ	
9	positiv	7,30		AQ	
1	positiv	9,95		BF	Ergebnis umgerechnet °
7	positiv	3,95		EF	Ergebnis umgerechnet °
10	positiv	0,515		ES	Ergebnis umgerechnet °
13	positiv	5,08		IL	Ergebnis umgerechnet °
4	positiv	16,7		RS-F	Ergebnis umgerechnet °
5	positiv	> 160		RS-F	Art der quantitativen Angabe unklar
11	positiv	3,46		VT	Ergebnis umgerechnet °

° Umrechnung S. 19

Anzahl positiv	11	
Anzahl negativ	0	
Prozent positiv	100	
Prozent negativ	0	
Konsenswert	positiv	

Methoden:

- AQ = AgraQuant, RomerLabs
- BF = MonoTrace ELISA, BioFront Technologies
- EF = SensiSpec ELISA Kit, Eurofins
- ES = ELISA-Systems
- IL = Immunolab
- RS-F= Ridascreen® Fast, R-Biopharm
- VT = Veratox, Neogen

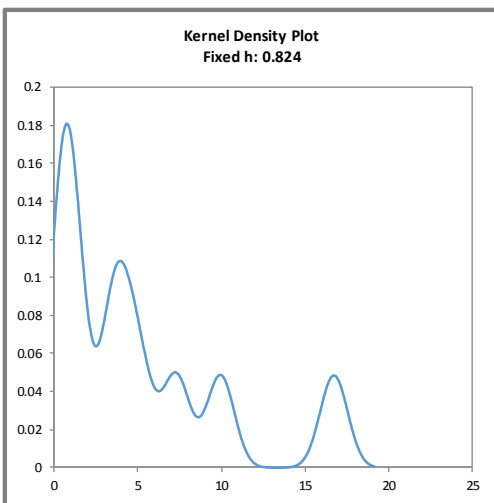


Abb. / Fig. 3:

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 eine uneinheitliche Verteilung der Ergebnisse.

Kenndaten: Quantitative Auswertung ELISA Crustaceae (als Gesamtprotein)**Dotierungsniveauprobe**

Kenndaten	Alle Ergebnisse [mg/kg]
Zugewiesener Wert (X_{pt})	$X_{pt_{ALL}}$
Anzahl der Messergebnisse	10
Anzahl der Ausreißer	
Mittelwert	4,97
Median	3,71
Robuster Mittelwert (X_{pt})	4,40
Robuste Standardabweichung (S^*)	4,43
<i>Zielkenndaten:</i>	
Zielstandardabweichung σ_{pt}	
Untere Grenze des Zielbereichs	
Obere Grenze des Zielbereichs	
<i>Quotient S^*/σ_{pt}</i>	
<i>Standardunsicherheit $U(X_{pt})$</i>	
<i>Ergebnisse im Zielbereich</i>	
<i>Prozent im Zielbereich</i>	

Anmerkungen zu den Kenndaten und Vergleich der Bezugswerte:

Die Kerndichte-Schätzung zeigte eine Vielzahl von Maxima. Eine gemeinsame Auswertung der Ergebnisse verschiedener Methoden war nicht möglich. Aufgrund der geringen Anzahl von Ergebnissen wurde auch keine Auswertung nach Einzelmethoden vorgenommen.

Die einzelnen quantitativen Ergebnisse wurden im Vergleich zum Zusatzniveau zur Information bewertet (siehe "Wiederfindungsraten für für Crustaceae (als Gesamtprotein)" S.29).

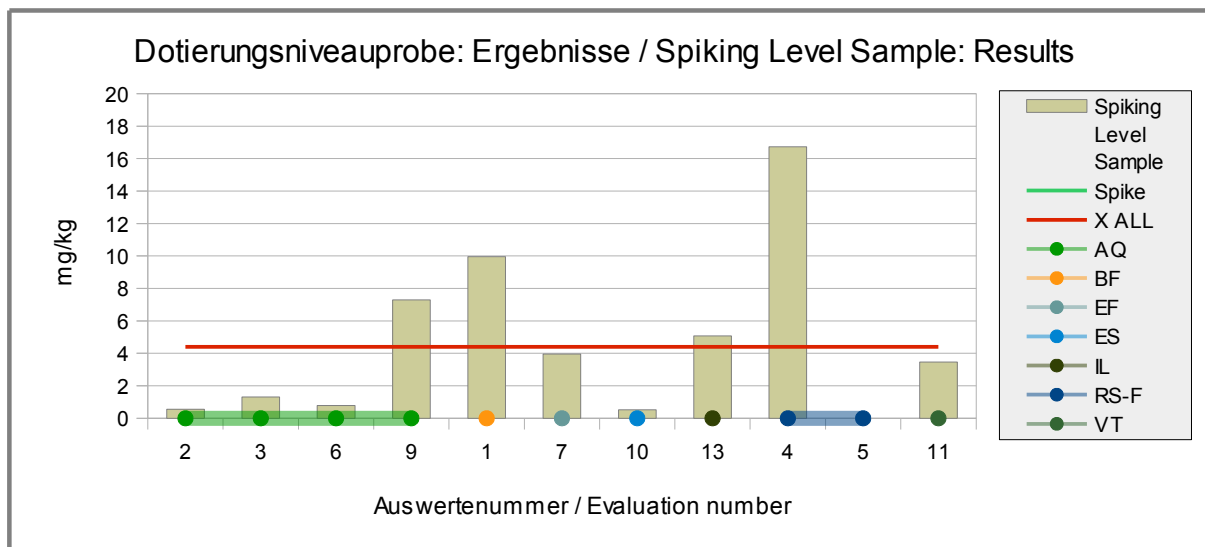


Abb./Fig. 4: ELISA-Ergebnisse Crustaceae (als Gesamtprotein)
 Zusatzniveau (Spike 57,1 mg/kg, nicht dargestellt)
 rote Linie = robuster Mittelwert aller Ergebnisse (zur Information)
 runde Symbole = Zuordnung der Methoden (s. Legende)

**Wiederfindungsraten ELISA für Crustaceae (als Gesamtprotein):
Dotierungsniveauprobe und Probe A**

Auswertenummer	Dotierungsniveauprobe	Wiederfindungsrate*	Probe A	Wiederfindungsrate*	Methode	Hinweis
	[mg/kg]	[%]	[mg/kg]	[%]		
2	0,560	1	0,390	1	AQ	
3	1,32	2	0,956	2	AQ	Ergebnis umgerechnet °
6	0,787	1	0,351	1	AQ	
9	7,30	13	0,900	2	AQ	
1	9,95	17	6,04	10	BF	Ergebnis umgerechnet °
7	3,95	7	3,35	6	EF	Ergebnis umgerechnet °
10	0,515	1	<0,25		ES	Ergebnis umgerechnet °
13	5,08	9	3,64	6	IL	Ergebnis umgerechnet °
4	16,7	29	6,78	11	RS-F	Ergebnis umgerechnet °
5	> 160				RS-F	
11	3,46	6	1,75	3	VT	Ergebnis umgerechnet °

° Umrechnung S. 19

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

* Wiederfindungsrate 100% Bezugsgröße: Crustaceae-Protein, s. Seite 5

** Akzeptanzbereich der AOAC für Allergen-ELISAs

Methoden:

- AQ = AgraQuant, RomerLabs
- BF = MonoTrace ELISA, BioFront Technologies
- EF = SensiSpec ELISA Kit, Eurofins
- ES = ELISA-Systems
- IL = Immunolab
- RS-F= Ridascreen® Fast, R-Biopharm
- VT = Veratox, Neogen

Anmerkung:

Keiner der Teilnehmer hat mit der Dotierungsniveauprobe oder der dotierten Lebensmittelmatrix-Probe A mittels ELISA eine Wiederfindungsrate im Bereich der AOAC-Anforderung von 50-150% erhalten. Die Wiederfindungsraten lagen im Bereich von 1-29% bzw. 1-11% vom Zusatzniveau.

4.1.2 PCR-Ergebnisse: Crustaceae (getrocknet)

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		
12	positiv		negativ		2/2 (100%)	ASU	
4	positiv	12,4	negativ	<0,22	2/2 (100%)	SFA	Ergebnis umgerechnet °
8	positiv		negativ		2/2 (100%)	SFA	

° Umrechnung S. 19

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

Methoden:

ASU = ASU §64 Methode/method

SFA = Sure Food ALLERGEN, R-Biopharm / Congen

Anmerkung:

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

Quantitative Auswertung PCR: Probe A

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

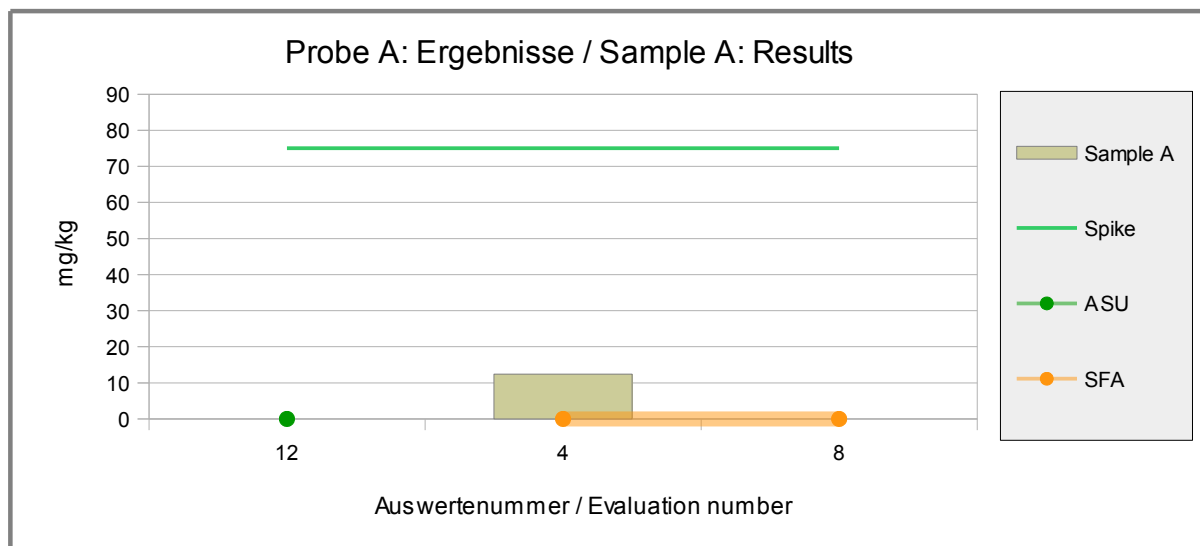


Abb./Fig. 5: PCR-Ergebnisse Crustaceae (getrocknet)
 grüne Linie = Zusatzniveau (Spike)
 runde Symbole = Zuordnung der Methoden (s. Legende)

(Quantitative) Auswertung PCR: Dotierungsniveauprobe

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

Auswertenummer	Crustaceae Protein pos/neg	Crustaceae Protein [mg/kg]	z-Score Xpt _{ALL}	Methode	Hinweis
12	positiv			ASU	
4	positiv	13,1		SFA	Ergebnis umgerechnet °
8	positiv			SFA	

° Umrechnung S. 19

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

Methoden:

ASU = ASU §64 Methode/method

SFA = Sure Food ALLERGEN, R-Biopharm / Congen

Anmerkung:

Für die Dotierungsniveauprobe wurden 100% positive Ergebnisse erhalten.

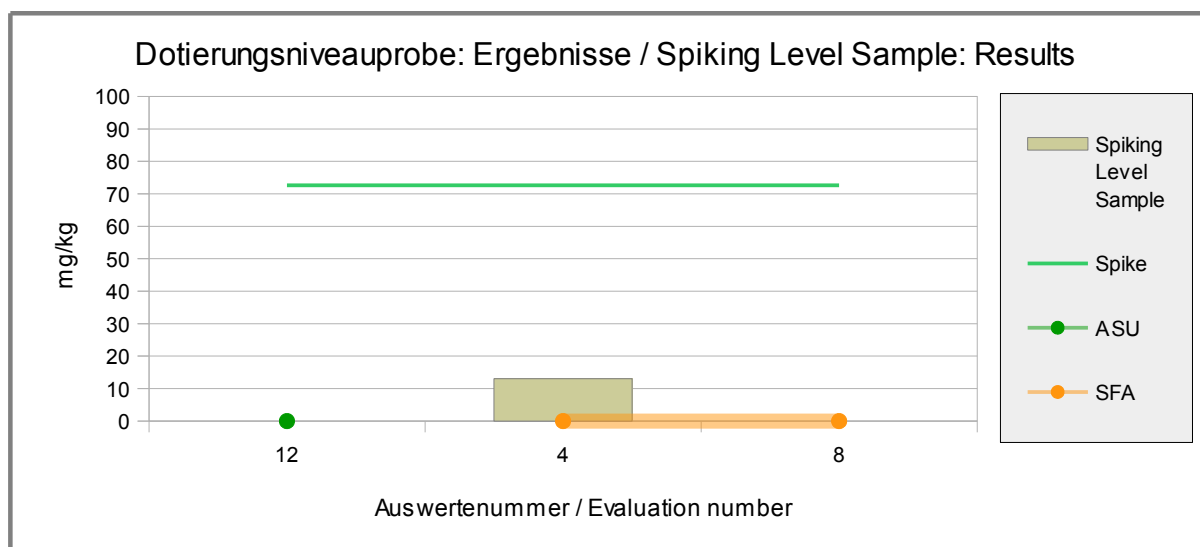


Abb./Fig. 6: PCR-Ergebnisse Crustaceae (getrocknet)
 grüne Linie = Zusatzniveau (Spike)
 runde Symbole = Zuordnung der Methoden (s. Legende)

**Wiederfindungsraten PCR für Crustaceae:
Dotierungsniveauprobe und Probe A**

Auswertenummer	Dotierungsniveauprobe	Wiederfindungsrate*	Probe A	Wiederfindungsrate*	Methode	Hinweis
	[mg/kg]	[%]	[mg/kg]	[%]		
12					ASU	
4	13,1	18	12,4	17	SFA	Ergebnis umgerechnet °
8					SFA	

° Umrechnung S. 19

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

Methoden:

ASU = ASU §64 Methode/method

SFA = Sure Food ALLERGEN, R-Biopharm / Congen

* Wiederfindungsrate 100% Bezugsgröße: Crustaceae (getrocknet), s. Seite 5

** Akzeptanzbereich der AOAC für Allergen-ELISAs

Anmerkung:

Ein Teilnehmer hat quantitative Ergebnisse mittels PCR bestimmt. Die Wiederfindungsraten lagen mit 18% Dotierungsniveauprobe und 17% für die dotierte Lebensmittelmatrix-Probe A unterhalb des Bereichs der AOAC-Anforderung von 50-150%.

4.2 Vergleichsuntersuchung Kokosnuss

4.2.1 ELISA-Ergebnisse: Kokosnuss, getrocknet (Kokosmehl)

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	positiv	646	negativ	0	2/2 (100%)	BF	
7	positiv	994	negativ	<1,1	2/2 (100%)	EF	Ergebnis umgerechnet °
13	positiv	519	negativ	0	2/2 (100%)	IL	Ergebnis umgerechnet °

° Umrechnung S. 19

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

Methoden:

BF = MonoTrace ELISA, BioFront Technologies
 EF = SensiSpec ELISA Kit, Eurofins
 IL = Immunolab

Anmerkung:

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

Quantitative Auswertung ELISA: Probe A

Eine quantitative Auswertung erfolgte nicht, weil zu wenige Ergebnisse vorlagen.

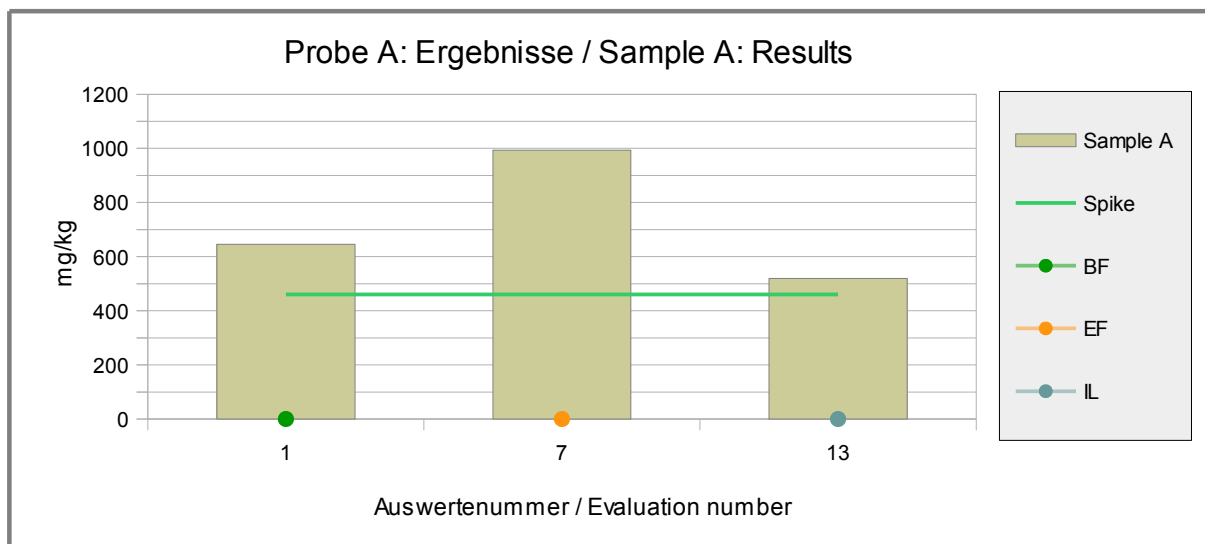


Abb./Fig. 7: ELISA-Ergebnisse Kokosnuss (als Kokosmehl)
 grüne Linie = Zusatzniveau (Spike)
 runde Symbole = Zuordnung der Methoden (s. Legende)

(Quantitative) Auswertung ELISA: Dotierungsniveauprobe

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

Auswertenummer	Kokosmehl pos/neg	Kokosmehl [mg/kg]	z-Score Xpt _{ALL}	Methode	Hinweis
1	positiv	>1000		BF	
7	positiv	828		EF	Ergebnis umgerechnet °
13	positiv	487		IL	Ergebnis umgerechnet °

° Umrechnung S. 19

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

Methoden:

BF = MonoTrace ELISA, BioFront Technologies

EF = SensiSpec ELISA Kit, Eurofins

IL = Immunolab

Anmerkung:

Für die Dotierungsniveauprobe wurden 100% positive Ergebnisse erhalten.

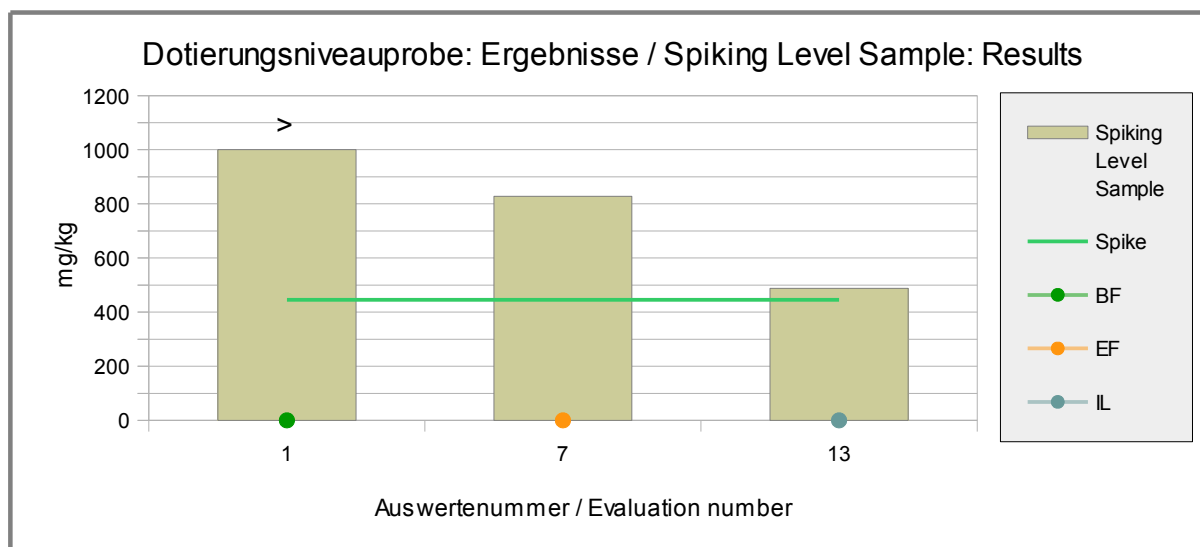


Abb./Fig. 8: ELISA-Ergebnisse Kokosnuss (als Kokosmehl)

grüne Linie = Zusatzniveau (Spike)

runde Symbole = Zuordnung der Methoden (s. Legende)

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

Auswertenummer	Dotierungsniveauprobe	Wiederfindungsrate*	Probe A	Wiederfindungsrate*	Methode	Hinweis
	[mg/kg]	[%]	[mg/kg]	[%]		
1	>1000		646	140	BF	
7	828	186	994	216	EF	Ergebnis umgerechnet °
13	487	110	519	113	IL	Ergebnis umgerechnet °

° Umrechnung S. 19

AB**	50-150 %	AB**	50-150 %
Anzahl im AB	1	Anzahl im AB	2
Prozent im AB	50	Prozent im AB	67

Methoden:

BF = MonoTrace ELISA, BioFront Technologies

EF = SensiSpec ELISA Kit, Eurofins

IL = Immunolab

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

** Akzeptanzbereich der AOAC für Allergen-ELISAs

Anmerkung:

Ein Teilnehmer hat mit der Dotierungsniveauprobe mittels ELISA eine Wiederfindungsrate im Bereich der AOAC-Anforderung von 50-150% erhalten. Für dotierte Lebensmittelmatrix-Probe A lagen zwei Wiederfindungsraten in diesem Akzeptanzbereich.

4.2.2 PCR-Ergebnisse: Kokosnuss

Für Kokosnuss wurden keine Ergebnisse mittels PCR abgegeben.

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: Crustaceae

Meth. Abk.	Auswertenummer	Datum der Analyse	Ergebnis Probe A		Ergebnis Probe B		Ergebnis Dotierungsprobe		NWG / LOD *	BG / LOQ *	MU*	Angabe quantitatifs Ergebnis als z.B. Lebensmittel / Protein	Methode
			qualitativ	mg/kg	qualitativ	mg/kg	qualitativ	mg/kg					
AQ	2	19.01.00	positiv	0,39	negativ	<0.02	positiv	0,56		0,02		Crustacea Protein	AgraQuant ELISA Crustacea COKAL2248, RomerLabs
AQ	3	01.12.18	nachgewiesen	1,21	Nicht nachgewiesen	<0.1	nachgewiesen	1,67	0,1	0,1	50	Crustacea	Romer
AQ	6	12.04.18	positiv	0,351	negativ	<0.02	positiv	0,787		0,02		Crustacea Protein	AgraQuant ELISA Crustacea COKAL2248, RomerLabs
AQ	9	28.12.18	positiv	0,9	negativ	<0.1	positiv	7,3	0,0045	0,1		Crustacea Protein	AgraQuant ELISA Crustacea COKAL2248, RomerLabs
BF	1	03.01.19	positiv	35,1	negativ	0	positiv	57,8	0,07	1		Crustaceae, frisch	MonoTrace Crustacea ELISA kit, BioFront Technologies
EF	7	17.12.18	positiv	0,67	negativ	<0,02	positiv	0,79	0,01	0,02		Tropomyosin Krustentiere	Eurofins SensiSpec Crustaceans (Tropomyosin) ELISA Kit
ES	10	17.12.18	negativ	<0,05	negativ	<0,05	positiv	0,103	0,01	0,05	50	Tropomyosin Protein	ELISA Systems Crustacean ESCRURD-48
IL	13	27.11.18	positiv	0,727	negativ	0	positiv	1,015	0.0009	0,02		Tropomyosin	Immunolab Crustaceans (Tropomyosin) ELISA
RS-F	4	27.12.18	positiv	33,9	negativ	<20	positiv	83,65	20	20	32,91	Crustaceae, frisch	Ridascreen® FAST Crustacean R7312, R-Biopharm
RS-F	5		negativ		negativ		positiv	> 160	20	20	0,1		Ridascreen® FAST Crustacean R7312, R-Biopharm
VT	11	11.12.18	positiv	7,7	negativ	<2.5	positiv	15,2		2,5		Crustaceae, frisch	Veratox Crustacea, Neogen

* NWG Nachweisgrenze / BG Bestimmungsgrenze

* LOD limit of detection / LOQ limit of quantitation

* MU Messunsicherheit / MU measurement uncertainty

Fortsetzung ELISA Crustaceae:

Meth. Abk.	Auswertenummer	Spezifität	Hinweise zur Methode (Extraktion und Bestimmung)	Methode akkreditiert nach ISO/IEC 17025	Sonstige Hinweise
		Antikörper	z.B. Extraktionslösung / Zeit / Temperatur	ja/nein	
AQ	2				
AQ	3	Unbekannt	Tropomyosin Detektion, als Crustacea angegeben (nicht Protein)	ja / nein	
AQ	6			ja	
AQ	9				
BF	1	monoklonale Antikörper-basiertes Kit	1:10 Extraktionsverhältnis, 10 Minuten bei 42°C	nein	
EF	7	erkennt Krustentier-Tropomyosin	lt. Herstellerangaben	ja	
ES	10		Nach Kit-Anleitung	ja	
IL	13	Tropomyosin			
RS-F	4	Nach Kit-Anleitung	Nach Kit-Anleitung	ja	Die Variabilität zwischen den Ergebnissen war hoch für diese Proben
RS-F	5			ja	
VT	11			nein	

5.1.2 ELISA: Kokosnuss

Meth. Abk.	Auswertenummer	Datum der Analyse	Ergebnis Probe A		Ergebnis Probe B		Ergebnis Dotierungsprobe		NWG / LOD *	BG / LOQ *	MU*	Angabe quantitatives Ergebnis als	Methode
			qualitativ	mg/kg	qualitativ	mg/kg	qualitativ	mg/kg	mg/kg	mg/kg	%	z.B. Lebensmittel / Protein	
BF	1	03.01.19	positiv	646	negativ	0	positiv	>1000	0,13	1		Kokosnussmehl	MonoTrace Coconut ELISA kit, BioFront Technologies
EF	7	13.12.18	positiv	1800	negativ	<2	positiv	1500	1,5	2		Kokosnuss	Eurofins SensiSpec Coconut ELISA Kit
IL	13	27.11.18	positiv	941	negativ	0	positiv	883	0,4	1		Kokosnuss, frisch	Immunolab Coconut 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 nach ISO/IEC 17025	Sonstige Hinweise
		Antikörper	z.B. Extraktionslösung / Zeit / Temperatur	ja/nein	
BF	1	monoklonale Antikörperbasiertes Kit	1:10 Extraktionsverhältnis, 10 Minuten bei 60°C	nein	
EF	7	erkennt Kokosnussprotein	lt. Herstellerangaben	ja	
IL	13	Kokosnuss, gesamt			

5.1.3 PCR: Crustaceae

Meth. Abk.	Auswertenummer	Datum der Analyse	Ergebnis Probe A		Ergebnis Probe B		Ergebnis Dotierungsprobe		NWG / LOD *	BG / LOQ *	MU*	Angabe quantitatives Ergebnis als z.B. Lebensmittel / Protein	Methode
			positiv / negativ	mg/kg	positiv / negativ	mg/kg	positiv / negativ	mg/kg					
			positiv		negativ		positiv					Crustaceae-DNA	Test-Kit + Anbieter
ASU	12		positiv		negativ		positiv					Crustaceae-DNA	ASU §64 Methode/method
SFA	4	27.12.18	positiv	56,86	negativ	<1	positiv	59,92	1	1	30	Crustaceae, frisch	Sure Food ALLERGEN, R-Biopharm / Congen
SFA	8		positiv		negativ		positiv		2				Sure Food ALLERGEN, 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 nach ISO/IEC 17025	Sonstige Hinweise
		Target-Sequenz / -DNA	z.B. Extraktion / Enzyme / Clean-Up / Real Time PCR / Gelelektrophorese / Cyclen	ja/nein	
ASU	12	16SrRNA	Extraktion mittels Promega Wizard DNACleanup100, 45Zyklen, konventionelle PCR mit Sequenzanalyse	ja	Procambus clarkii
SFA	4	Nach Kit-Anleitung	Nach Kit-Anleitung	nein	Die Variabilität zwischen den Ergebnissen war hoch für diese Proben
SFA	8		SUREFOOD PREP ADVANCED/TAQ POLIMERASE/SCHRITT EINS DURCHGEFÜHRT/40 CYCLEN	nein	

5.2 Homogenität

5.2.1 Mischungshomogenität vor der Abfüllung

Microtracer Homogenitätstest

DLA 07-2018 Probe A

Gewicht Gesamtprobe	3,09	kg
Microtracer	FSS-rot lake	
Teilchengröße	75 – 300	µm
Gewicht pro Partikel	2,0	µg
Tracerzugabe	19,8	mg/kg

Analysenergebnisse:

Probe	Einwaage [g]	Partikel Anzahl	Partikel [mg/kg]
1	5,06	56	22,1
2	5,07	58	22,9
3	5,02	49	19,5
4	4,98	50	20,1
5	5,00	45	18,0
6	5,06	64	25,3
7	5,00	55	22,0
8	4,97	59	23,7

Poisson-Verteilung		
Probenanzahl	8	
Freiheitsgrad	7	
Mittelwert	54,5	Partikel
Standardabweichung	5,99	Partikel
χ ² (CHI-Quadrat)	4,61	
Wahrscheinlichkeit	71	%
Wiederfindungsrate	110	%

Normalverteilung		
Probenanzahl	8	
Mittelwert	21,7	mg/kg
Standardabweichung	2,39	mg/kg
rel. Standardabweichung	11,0	%
Horwitz Standardabweichung	10,1	%
HorRat-Wert	1,1	
Wiederfindungsrate	110	%

Microtracer Homogenitätstest

DLA 07-2018 Spiking Level Sample

Gewicht Gesamtprobe	1,01	kg
Microtracer	FSS-rot lake	
Teilchengröße	75 – 300	µm
Gewicht pro Partikel	2,0	µg
Tracerzugabe	37,7	mg/kg

Analysenergebnisse:

Probe	Einwaage [g]	Partikel Anzahl	Partikel [mg/kg]
1	5,00	111	44,4
2	5,01	114	45,5
3	5,02	112	44,6
4	5,05	101	40,0
5	5,00	114	45,6
6	5,02	107	42,6
7	4,99	105	42,1
8	5,02	103	41,0

Poisson-Verteilung		
Probenanzahl	8	
Freiheitsgrad	7	
Mittelwert	108,4	Partikel
Standardabweichung	5,28	Partikel
χ ² (CHI-Quadrat)	1,80	
Wahrscheinlichkeit	97	%
Wiederfindungsrate	115	%

Normalverteilung		
Probenanzahl	8	
Mittelwert	43,2	mg/kg
Standardabweichung	2,11	mg/kg
rel. Standardabweichung	4,9	%
Horwitz Standardabweichung	9,1	%
HorRat-Wert	0,5	
Wiederfindungsrate	115	%

5.3 Informationen zur Eignungsprüfung (EP)

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

EP-Nummer	DLA 07-2018
EP-Name	Allergene VII: Crustaceae und Kokosnuss in Instantprodukt mit „Dotierungsniveauprobe“
Probenmatrix (Prozessierung)	Proben A + B: Tomatensuppen-Pulver/ Zutaten: Tomaten, Stärke, Zucker, Salz, Reismehl, Palmöl, Zwiebeln, Hefeextrakt, Pflanzenöl, Gewürze, Säuerungsmittel: Citronensäure, Kräuter, Basilikumextrakt, 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: Crustaceae (Crustaceae protein, DNA) zugegeben als gekochter, getrockneter Flusskrebs , und Kokosnuss (Kokosnussprotein, DNA) zugegeben als Kokosmehl 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. Von den Proben A + B soll jeweils die Gesamtmenge homogenisiert werden.
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 04. Januar 2019
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
		USA
		CANADA
		Deutschland
		SCHWEDEN
		GROSSBRITANNIEN
		CANADA
		Deutschland
		GROSSBRITANNIEN
		ITALIEN
		SPANIEN
		Deutschland
		GROSSBRITANNIEN
		GROSSBRITANNIEN
		GROSSBRITANNIEN

[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 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 16.01-9 Untersuchung von Lebensmitteln - Bestimmung von Soja (Glycine max) in Getreidemehl mittels real-time PCR (2016) [Foodstuffs, determination of soya (Glycine max) in cereal flour by real-time PCR]
33. 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]
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]
35. ASU §64 LFGB L 08.00-59 Untersuchung von Lebensmitteln - Nachweis und Bestimmung von Senf (Sinapis alba) sowie Soja (Glycine max) in Brühwürsten mittels real-time PCR (2013) [Foodstuffs, detection and determination of mustard (Sinapis alba) and soya (Glycine max) in boiled sausages by real-time PCR]
36. ASU §64 LFGB L 08.00-65 Untersuchung von Lebensmitteln - Simultaner Nachweis und Bestimmung von schwarzem Senf (Brassica nigra L.), braunem Senf (Brassica juncea L.), weißem Senf (Sinapis alba), Sellerie (Apium graveolens) und Soja (Glycine max) in Brühwurst mittels real-time PCR (2017) [Foodstuffs, simultaneous detection and determination of black mustard (Brassica nigra L.), brown mustard (Brassica juncea L.), white mustard (Sinapis alba), celery (Apium graveolens) and soya (Glycine max) in boiled sausages by real-time PCR]

DLA 07/2018 - Allergene VII

13 von 14 Teilnehmern haben mindestens ein Ergebnis eingereicht. Die Auswertung erfolgte für ELISA-Methoden hinsichtlich des Parameters Crustaceae qualitativ und quantitativ und für Kokosnuss aufgrund der wenigen Ergebnisse nur qualitativ. Die PCR-Methoden wurden für Crustaceae ebenfalls qualitativ bewertet. Zusätzlich wurden für jeden Teilnehmer Wiederfindungsraten für die Dotierungsmaterialprobe und die dotierte Probe ermittelt. Details zu den einzelnen Parametern inklusive separater Auswertung nach Testkit-Herstellern sind dem Auswertebereich zu entnehmen. 8 Teilnehmer hatten ihren Sitz im Europäischen Ausland (Großbritannien, Italien, Spanien, Schweden) und zwei Teilnehmer in Kanada sowie ein Teilnehmer in den USA.