

Proficiency Tests

DLA

food
cosmetics
consumer goods
www.dla-lvu.de

Auswertungs-Bericht

Laborvergleichsuntersuchung

DLA 09/2018

Allergene IX:

Milch (Casein) und Eiklarprotein

in Wein

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>	DLA - Dienstleistung Lebensmittel Analytik GbR Gesellschafter: Dr. Gerhard Wichmann und Dr. Matthias Besler-Scharf 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 09/2018
<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 (20. Juni 2018) 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> Dr. Gerhard Wichmann (QM-Beauftragter / Quality Manager) - <i>gezeichnet / signed G. Wichmann</i> Datum / Date: 20. Juni 2018
<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.....	8
2.2 Probenversand und Informationen zur Untersuchung.....	8
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	14
3.5 z-Score.....	15
3.6 z'-Score.....	16
3.7 Quotient S^*/σ_{pt}	16
3.8 Standardunsicherheit und metrologische Rückführbarkeit. .	16
3.9 Graphische Darstellung der Bezugswerte.....	17
3.10 Wiederfindungsraten: Dotierung.....	17
4. Ergebnisse.....	18
4.1 Vergleichsuntersuchung Milch (Casein).....	20
4.1.1 ELISA-Ergebnisse: Casein.....	20
4.2 Vergleichsuntersuchung Ei (Eiklarproteine).....	28
4.2.1 ELISA-Ergebnisse: Eiklarproteine, gesamt.....	28
5. Dokumentation.....	36
5.1 Angaben der Teilnehmer.....	36
5.1.1 ELISA: Milch (Casein).....	36
5.1.2 ELISA: Ei (Eiklarproteine).....	37
5.2 Homogenität.....	38
5.2.1 Mischungshomogenität vor der Abfüllung.....	38
5.3 Informationen zur Eignungsprüfung (EP).....	39
6. Verzeichnis der Teilnehmer in alphabetischer Reihenfolge....	40
7. Verzeichnis relevanter Literatur.....	41

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 handelsüblichen Weißwein "Grauer Burgunder" (Baden, Deutscher Qualitätswein). Die Grundzusammensetzung war für beide Proben A und B gleich (s. Tabelle 1). Der pH-Wert des Weins wurde zur Stabilisierung der Allergene auf pH 7-8 eingestellt.

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

Die Dotierungsmaterialien, die die allergenen Zutaten Magermilchpulver und Eiklarpulver (Weinbehandlungsmittel) enthalten, wurden in der Grundmatrix gelöst und die Mischung homogenisiert.

Die **Dotierungsniveauprobe** wurde mit den oben genannten allergenhaltigen Dotierungsmaterialien unter mehrstufiger Zugabe von Glucose und jeweiliger Homogenisierung hergestellt. Anschließend wurde die gesamte Menge gesiebt (mesh 400 µm) und nochmals homogenisiert.

Die Proben A und B wurden zu Portionen von ca. 50 ml in PE-Flaschen mit Schraubdeckel und die Dotierungsniveauprobe zu Portionen von ca. 15 g in metallisierte PET-Folienbeutel abgefüllt.

Tabelle 1: Zusammensetzung der DLA-Proben

Zutaten	Probe A	Probe B	Dotierungs- niveauprobe
Weißwein Grauer Burgunder Kennzeichnung: Grauer Burgunder trocken, Deutscher Qualitätswein, Baden, enthält Sulfite, 12,5 % vol Vorbehandlung: pH-Einstellung mit Na- triumcarbonat-Lösung auf pH 7-8	99,7 g/100 g	100 g/100g	-
Glucose	-	-	99,8 g/100 g
<i>Milch:</i> - als Magermilchpulver* - davon 37,6% Gesamtprotein** - davon Casein*** - davon β -Lactoglobulin***	233 mg/kg 87,6 mg/kg 70,1 mg/kg 8,8 mg/kg	-	276 mg/kg 104 mg/kg 83,2 mg/kg 10,4 mg/kg
<i>Eiklar-Pulver</i> (Weinbehandlungsmittel) Zutaten: Hühnereiklar (pasteurisiert, sprühgetrocknet) - als Eiklarpulver* - davon 76,4% Gesamtprotein** (Eiklarprotein)	70,0 mg/kg 53,5 mg/kg	-	83,0 mg/kg 63,4 mg/kg
<i>weitere Zutaten:</i> <i>Fructose</i>	<0,35 g/100 g	-	<0,35 g/100 g

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

** Proteingehalte gemäß Laboranalyse des Rohstoffs (Gesamtstickstoff nach Kjeldahl mit $F=6,38$ für Milchprotein und $F=6,25$ für Eiweiß)

*** Proteingehalte gemäß Literaturangaben berechnet (ca. 80% Caseine und ca. 10% β -Lactoglobulin in Gesamt-Milchprotein [29])

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

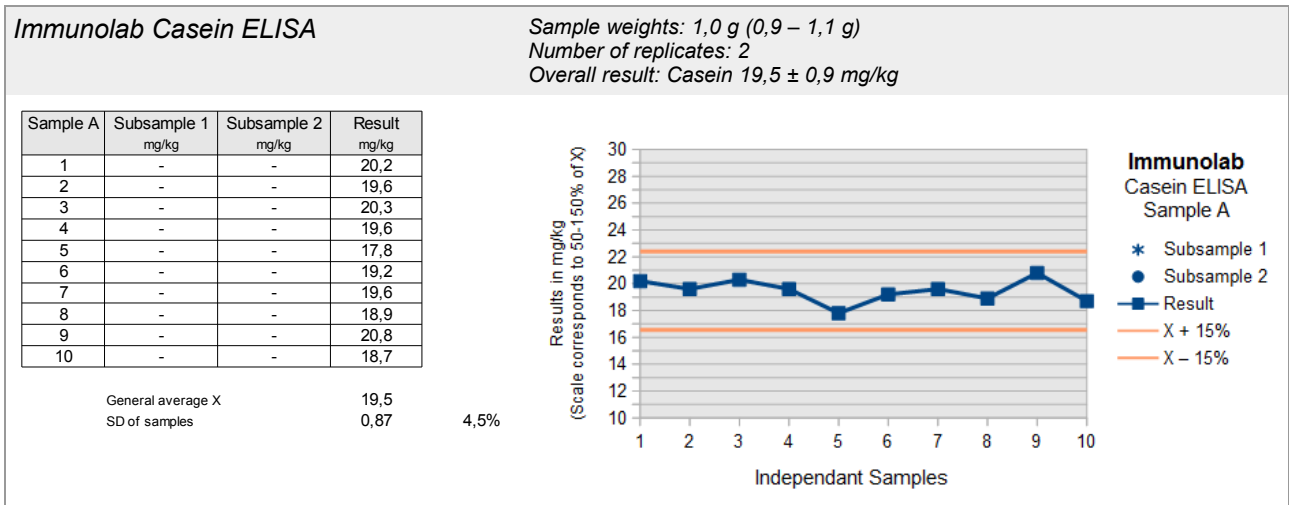
Die **Mischungshomogenität vor der Abfüllung** wurde in 8-fach Bestimmung mittels **Microtracer-Analyse** untersucht. Es handelt sich um eine normierte Methode, die Bestandteil des internationalen GMP-Zertifizierungssystems für Futtermittel ist [14]. Vor der Mischung werden mit Farbstoff beschichtete 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].

Da nur pulverförmige Proben mit der zur Verfügung stehenden Microtracer-Analyse untersucht werden können, wurde nur die Dotierungsniveauprobe untersucht. Die Microtracer-Analyse der Probe hat eine Wahrscheinlichkeit von 99% 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 0,57 erhalten. Die Ergebnisse der Microtracer-Analyse sind in der Dokumentation angegeben.

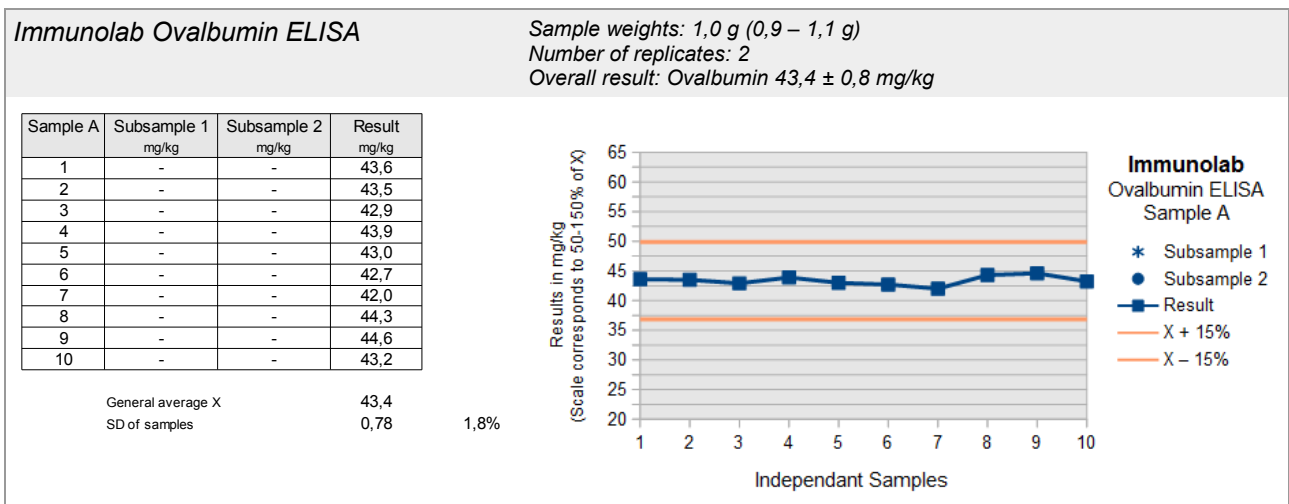
Die **Homogenität der abgefüllten DLA-Proben** (dotierte Probe A) wurde anhand der Allergen-Gehalte Casein und Ovalbumin mittels ELISA-Tests geprüft (s. nächste Seite) und mit einer Standardabweichung zwischen den Proben von $< 15\%$ für das verwendete Verfahren als hinreichend gesichert angesehen [18, 19, 22, 23].

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

ELISA-Tests: Homogenität Milch / Homogeneity Milk



ELISA-Tests: Homogenität Ei / Homogeneity Egg



2.1.2 Stabilität

Bei dem Lebensmittelmatrix-Probenmaterial handelt es sich um Wein. In eigenen Langzeit-Stabilitätstests über zwei Jahre hat sich der Parameter Eiklarproteine als stabil erwiesen, während die Gehalte an Casein abgenommen haben (ELISA-Bestimmungen). Über den kurzen Zeitraum der LVU wurde keine Abnahme beobachtet. Dennoch kann aufgrund dieser Erkenntnisse die Bewertung der Teilnehmer-Ergebnisse für den Parameter Casein in Wein unter zusätzlicher Berücksichtigung der Standardunsicherheit des zugewiesenen Wertes mittels z'-Score durchgeführt werden.

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 Dotierungsniveauprobe lag bei ca. $0,30$ ($25,3^\circ\text{C}$). 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 9. Kalenderwoche 2018 je eine Portion der Untersuchungsmaterialien A und B sowie eine Dotierungsmaterialprobe verschickt. Die Untersuchungsverfahren wurden freigestellt. Die Untersuchungen waren durchzuführen bis spätestens 13. April 2018.

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

Es handelt sich um zwei unterschiedliche Proben A und B mit möglichen Gehalten an den allergenen Parametern Milch (Casein) und/oder Eiklarprotein im mg/kg Bereich in der Matrix Weißwein.

Eine der beiden Proben sowie die "Dotierungsniveauprobe" wurden mit den allergenen Zutaten hergestellt. Die "Dotierungsniveauprobe" enthält die Allergene in einfacher Matrix (Glucose) mit ähnlichen Gehalten ohne weitere Prozessierung. Die Dotierungsniveauprobe soll wie eine normale Probe untersucht werden.

Wichtiger Hinweis: Der pH-Wert der Weinproben A und B wurde mit einer Natriumcarbonat-Lösung auf pH 7-8 eingestellt, um die Allergene in Lösung/Suspension zu stabilisieren. Vor der Analyse empfehlen wir, die Weinproben vorsichtig umzuschwenken.

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 Teilnehmer haben fristgerecht Ergebnisse abgegeben. Eine Anmeldung wurde vor dem Probenversand storniert.

3. Auswertung

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

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

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

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

3.1 Konsenswert der Teilnehmer (zugewiesener Wert)

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

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

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

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

- i) **Zugewiesener Wert aller Ergebnisse** - X_{ptALL}
- ii) **Zugewiesener Wert von 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
$\sigma_R = 0,22c$	$c < 1,2 \times 10^{-7}$	$< 120 \mu\text{g}/\text{kg}$
$\sigma_R = 0,02c^{0,8495}$	$1,2 \times 10^{-7} \leq c \leq 0,138$	$\geq 120 \mu\text{g}/\text{kg}$
$\sigma_R = 0,01c^{0,5}$	$c > 0,138$	$> 13,8 \text{ g}/100\text{g}$

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

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

3.4.2 Auswertung eines Versuchs zur Präzision

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

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

Die in Tabelle 2 aufgeführten Präzisionsdaten wurden in Ringversuchen mittels teils modifizierten ELISA-Testkit-Methoden anhand von gespikten Weinproben erhalten [31, 32, 34]. In Abhängigkeit des Allergen-Gehalts wurden im Bereich $> 1 \text{ mg}/\text{L}$ relative Vergleichsstandardabweichungen von ca. 12 - 36 % und im Bereich $< 1 \text{ mg}/\text{L}$ von ca. 14 - 90 % erhalten.

Tabelle 2: Relative Wiederholstandardabweichungen (RSD_r) und relative Vergleichsstandardabweichungen (RSD_R) gemäß Auswertungen von Versuchen zur Präzision [31, 32, 34]

Parameter	Matrix	Mittelwerte	RSD_r	RSD_R	Methode / Literatur
Caseinat	Weißweine	0,057 – 0,78 mg/L	-	35,1 – 90,0 %	ELISA [31]
Caseinat	Weißweine	1,4 – 3,0 mg/L	-	20,3 – 29,4 %	ELISA [31]
Caseinat	Weißweine	6,3 – 6,8 mg/L	-	12,1 – 21,4 %	ELISA [31]
Eiklarproteine	Rotweine	1,0 – 1,4 mg/L	23,0 – 27,6 %	30,6 – 32,9 %	ELISA [32]
Eiklarproteine	Rotweine	3,5 – 4,2 mg/L	14,7 – 19,3 %	26,2 – 31,1 %	ELISA [32]
Eiklarproteine	Rotweine	5,9 – 6,9 mg/L	12,5 – 16,5 %	20,1 – 25,7 %	ELISA [32]
Casein	Rotweine	1,02 mg/L	11,7 %	19,4 %	ELISA [34]
Casein	Rotweine	5,6 – 8,5 mg/L	14,7 – 24,0 %	24,8 – 35,6 %	ELISA [34]
Casein	Weißweine	0,12 – 0,80 mg/L	9,1 – 35,0 %	13,7 – 53,8 %	ELISA [34]
Casein	Weißweine	4,1 – 5,5 mg/L	10,8 – 13,6 %	16,7 – 18,3 %	ELISA [34]
Eiklarproteine	Rotweine	0,26 mg/L	55,5 %	67,5 %	ELISA [34]
Eiklarproteine	Rotweine	1,1 – 7,6 mg/L	10,3 – 12,3 %	13,2 – 21,3 %	ELISA [34]
Eiklarproteine	Weißweine	0,59 mg/L	37,4 %	52,1 %	ELISA [34]
Eiklarproteine	Weißweine	3,6 – 6,5 mg/L	11,1 – 17,3 %	17,2 – 22,1 %	ELISA [34]

3.4.3 Werte aus Erkenntnissen

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

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

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

Tabelle 3: ELISA-Validierungskriterien

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

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

Tabelle 4: PCR-Validierungskriterien

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

(a) = Trueness / Richtigkeit

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

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

Gesetzliche Regelungen und Höchstwert-Empfehlungen

Die Kennzeichnung von Allergenen ist in der Lebensmittel-Informations-VO (EU 1169/2011) geregelt. Speziell für Wein ist die Art und Weise der Kennzeichnung der Verwendung von allergenhaltigen Schönungsmitteln bei der Weinherstellung in der Durchführungsverordnung (EU 579/2012) vorgeschrieben [30-33]. Neben Schwefeldioxid sind Weinbehandlungsmittel auf Basis von Milch und Ei auf dem Etikett anzugeben, sofern sie im Wein

nachweisbar sind. Aufgrund von Ringversuchsdaten wurden von der Internationalen Organisation für Rebe und Wein (OIV) als Nachweisgrenze $\leq 0,25$ mg/L und als Bestimmungsgrenze $\leq 0,5$ mg/L als Kriterien für die Quantifizierung von Casein aus Milch sowie Albumin und/oder Lysozym aus Ei in Wein festgelegt [33].

3.5 z-Score

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

Die Berechnung erfolgt nach:

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

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

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

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

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

3.5.1 Warn- und Eingriffssignale

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

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

3.6 z'-Score

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

Die Berechnung erfolgt nach:

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

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

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

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

Zu Warn- und Eingriffssignalen siehe 3.5.1.

3.7 Quotient S^*/σ_{pt}

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

3.8 Standardunsicherheit und metrologische 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 metrologische 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 folgenden Ergebnisseiten sind für die allergenen Bestandteile jeweils gleich aufgebaut. Es werden zunächst die Ergebnisse aller Methoden zu einem Parameter für die Probe A und dann für die Probe B angegeben. Die Ergebnisse der Dotierungsmaterialprobe werden zusammen mit der jeweiligen dotierten Probe behandelt.

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.

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

ELISA-Ergebnisse, die als Volleipulver, Gesamteiproteine (Summe Eiklar- und Eigelbprotein) bzw. Ovalbumin angegeben wurden, sind in **Eiklarproteine** umgerechnet worden. Sofern angegeben wurden die Vorgaben des betreffenden Testkit-Herstellers berücksichtigt. Es wurde ein Anteil von 26% Eiklarprotein in *Volleipulver* zugrunde gelegt (Biofront ELISA, Ridascreen ELISA). Gesamteiprotein-Gehalte wurden für die Morinaga ELISA-Ergebnisse angegeben. Hier wurden 47% Gesamteiprotein für die Umrechnung in Volleipulver zugrunde gelegt (Literatur: 46% Nährwerttabellen Souci-Fachmann-Kraut / 48% USDA Nutrient Database). Für Ovalbumin wurde gemäß Testkit-Anleitung (Immunolab) von 75% Kreuzreaktivität zu Eiklarprotein ausgegangen (entsprechend 75% Ovalbumin in Eiklarprotein).

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

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

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

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

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

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

° 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 Milch (Casein)

4.1.1 ELISA-Ergebnisse: Casein

Qualitative Auswertung der Ergebnisse: Proben A und B

Auswertenummer	Probe A	Probe A	Probe B	Probe B	Qualitative Bewertung	Methode	Hinweis
	pos/neg	[mg/kg]	pos/neg	[mg/kg]	Übereinstimmungen mit Konsenswerten		
3	positiv	>0,1	negativ	<0,1	2/2 (100%)	AQ	
4	positiv	26,9	negativ	<0,2	2/2 (100%)	AQ	
2	positiv	14,5	negativ	0	2/2 (100%)	BF	
8	positiv	>2,6	negativ	<0,26	2/2 (100%)	ES	Ergebnis umgerechnet °
6	positiv	23,3	negativ	<0,1	2/2 (100%)	IL	
5	positiv	36,0	negativ	<0,25	2/2 (100%)	MI	
1	positiv	45,2	negativ		2/2 (100%)	RS-F	
7	positiv	43,0	negativ	<0,25	2/2 (100%)	RS-F	
9	positiv	50,7	negativ		2/2 (100%)	VT	Ergebnis umgerechnet °

° Umrechnung S. 18

	Probe A	Probe B
Anzahl positiv	9	0
Anzahl negativ	0	9
Prozent positiv	100	0
Prozent negativ	0	100
Konsenswert	positiv	negativ

Methoden:

- AQ = AgraQuant, RomerLabs
- BF = MonoTrace ELISA, BioFront Technologies
- ES = ELISA-Systems
- IL = Immunolab
- MI = Morinaga Institute ELISA Kit II
- RS-F= Ridascreen® Fast, R-Biopharm
- VT = Veratox, Neogen

Anmerkung:

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

Quantitative Auswertung ELISA: Probe A

Auswertenummer	Casein [mg/kg]	z'-Score $X_{pt,ALL}$	Methode	Hinweis
3	>0,1		AQ	
4	26,9	-0,66	AQ	
2	14,5	-1,8	BF	
8	>2,6		ES	Ergebnis umgerechnet °
6	23,3	-1,0	IL	
5	36,0	0,16	MI	
1	45,2	1,0	RS-F	
7	43,0	0,79	RS-F	
9	50,7	1,5	VT	Ergebnis umgerechnet °

° Umrechnung S. 18

Methoden:

AQ = AgraQuant, RomerLabs

BF = MonoTrace ELISA, BioFront Technologies

ES = ELISA-Systems

IL = Immunolab

MI = Morinaga Institute ELISA Kit II

RS-F= Ridascreen® Fast, R-Biopharm

VT = Veratox, Neogen

Anmerkung:

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

Kenndaten: Quantitative Auswertung ELISA Casein

Probe A

Kenndaten	Alle Ergebnisse [mg/kg]
Zugewiesener Wert (X_{pt})	X_{pt_ALL}
Anzahl der Messergebnisse	7
Anzahl der Ausreißer	0
Mittelwert	34,2
Median	36,0
Robuster Mittelwert (X_{pt})	34,2
Robuste Standardabweichung (S^*)	14,9
Zielkenndaten:	
Zielstandardabweichung σ_{pt}'	11,1
Untere Grenze des Zielbereichs	12,1
Obere Grenze des Zielbereichs	56,4
Quotient S^*/σ_{pt}'	1,3
Standardunsicherheit $U_{(X_{pt})}$	7,03
Ergebnisse im Zielbereich	7
Prozent im Zielbereich	100

Anmerkungen zu den Kenndaten und Vergleich der Bezugswerte:

Es wurde unter Berücksichtigung der Standardunsicherheit des zugewiesenen Wertes mittels z'-Score ausgewertet (vgl. 2.1.2 und 3.6).

Die Verteilung der Ergebnisse aller Methoden wies eine normale Variabilität mit einem Quotienten S^*/σ_{pt}' von $< 2,0$ auf.

Die robuste Standardabweichung liegt im höheren 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, aber diese Aussage ist für die methodenübergreifende Auswertung nur eingeschränkt gültig, da für die einzelnen Methoden nur wenige Ergebnisse vorlagen.

Der robuste Mittelwert der Auswertung lag mit 49% vom Zusatzniveau von Casein zu Probe A an der unteren Grenze der relevanten Anforderungen für die eingesetzten Methoden (s. 3.4.3 und "Wiederfindungsraten für Casein" S.27).

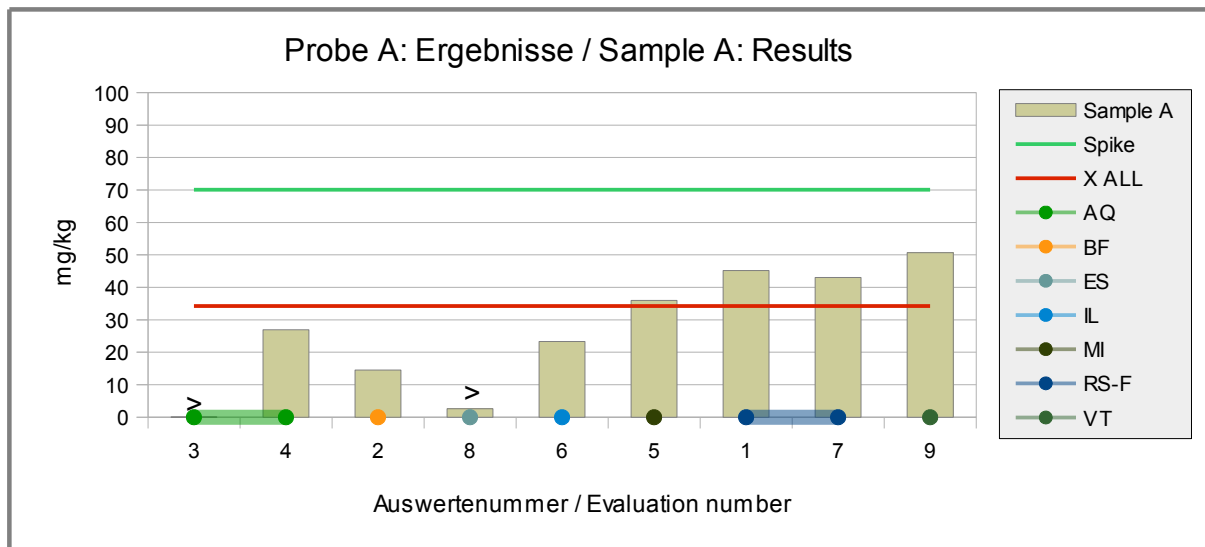


Abb./Fig. 1: ELISA-Ergebnisse Casein
 grüne Linie = Zusatzniveau (Spike)
 rote Linie = robuster Mittelwert aller Ergebnisse
 runde Symbole = Zuordnung der Methoden (s. Legende)

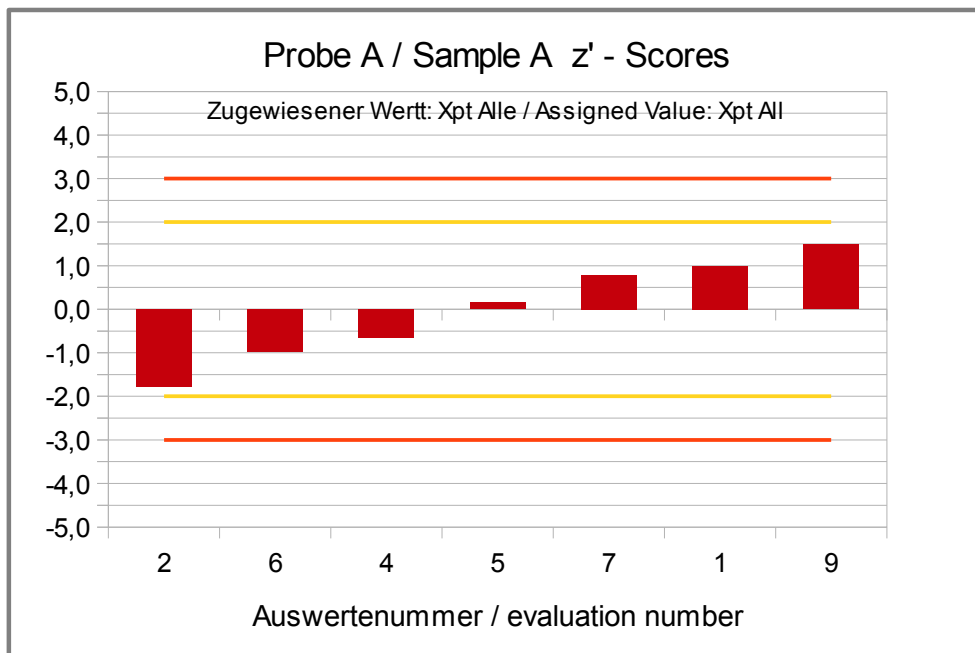


Abb./Fig. 2:
 z'-Scores (ELISA-Ergebnisse als Casein)
 Zugewiesener Wert: robuster Mittelwert aller Ergebnisse

Quantitative Auswertung ELISA: Dotierungsniveauprobe

Auswertenummer	Casein [mg/kg]	z'-Score Xpt _{ALL}	Methode	Hinweis
3	>0,2		AQ	
4	33,0	-1,3	AQ	
2	83,3	1,0	BF	
8	>2,6		ES	Ergebnis umgerechnet °
6	28,1	-1,5	IL	
5	57,0	-0,19	MI	
1	54,0	-0,33	RS-F	
7	63,0	0,09	RS-F	
9	154	4,3	VT	Ergebnis umgerechnet °

° Umrechnung S. 18

Methoden:

AQ = AgraQuant, RomerLabs

BF = MonoTrace ELISA, BioFront Technologies

ES = ELISA-Systems

IL = Immunolab

MI = Morinaga Institute ELISA Kit II

RS-F= Ridascreen® Fast, R-Biopharm

VT = Veratox, Neogen

Anmerkung:

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

Kenndaten: Quantitative Auswertung ELISA Casein**Dotierungsniveauprobe**

Kenndaten	Alle Ergebnisse [mg/kg]
Zugewiesener Wert (X_{pt})	X_{pt_ALL}
Anzahl der Messergebnisse	7
Anzahl der Ausreißer	0
Mittelwert	67,5
Median	57,0
Robuster Mittelwert (X_{pt})	61,0
Robuste Standardabweichung (S^*)	31,7
<i>Zielkenndaten:</i>	
Zielstandardabweichung σ_{pt}'	21,4
Untere Grenze des Zielbereichs	18,2
Obere Grenze des Zielbereichs	104
Quotient S^*/σ_{pt}'	1,5
Standardunsicherheit $U_{(X_{pt})}$	15,0
Ergebnisse im Zielbereich	6
Prozent im Zielbereich	86

Anmerkungen zu den Kenndaten und Vergleich der Bezugswerte:

Die Verteilung der Ergebnisse aller Methoden wies eine leicht erhöhte Variabilität mit einem Quotienten S^*/σ_{pt}' von $> 2,0$ auf. Daher wurde unter Berücksichtigung der Standardunsicherheit des zugewiesenen Wertes mittels z' -Score ausgewertet. Der Quotient S^*/σ_{pt}' lag dann bei 1,5.

Die robuste Standardabweichung liegt im höheren 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, aber diese Aussage ist für die methodenübergreifende Auswertung nur eingeschränkt gültig, da für die einzelnen Methoden nur wenige Ergebnisse vorlagen.

Der robuste Mittelwert der Auswertung lag mit 73% vom Zusatzniveau von Casein zur Dotierungsniveauprobe innerhalb der relevanten Anforderungen für die eingesetzten Methoden (s. 3.4.3 und "Wiederfindungsraten für Casein", s. S.27).

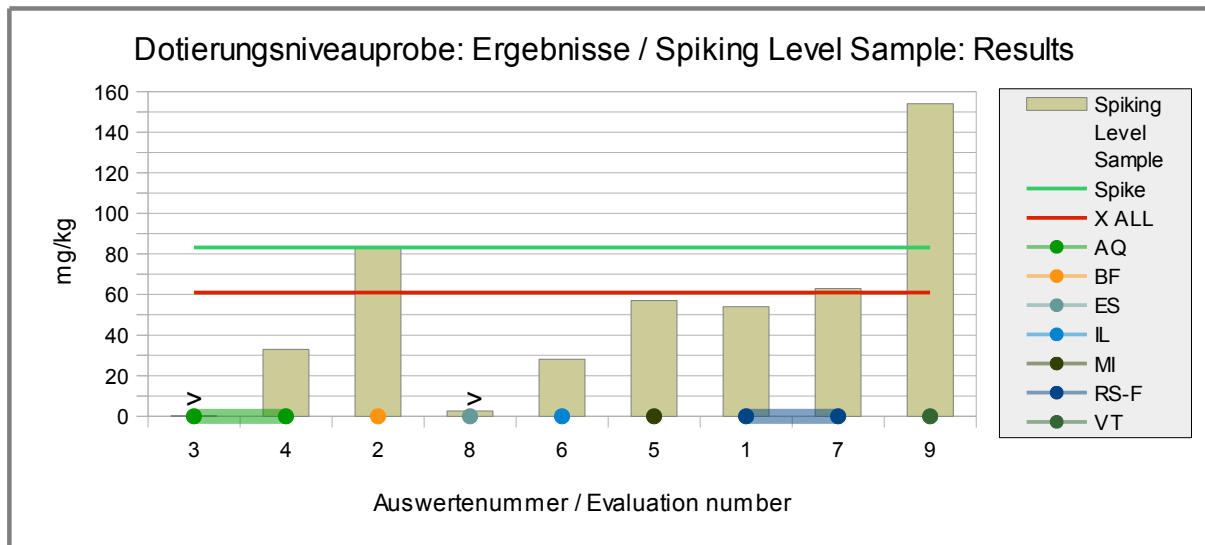


Abb./Fig. 3: ELISA-Ergebnisse Milch (als Casein)
 grüne Linie = Zusatzniveau (Spike)
 rote Linie = robuster Mittelwert aller Ergebnisse
 runde Symbole = Zuordnung der Methoden (s. Legende)

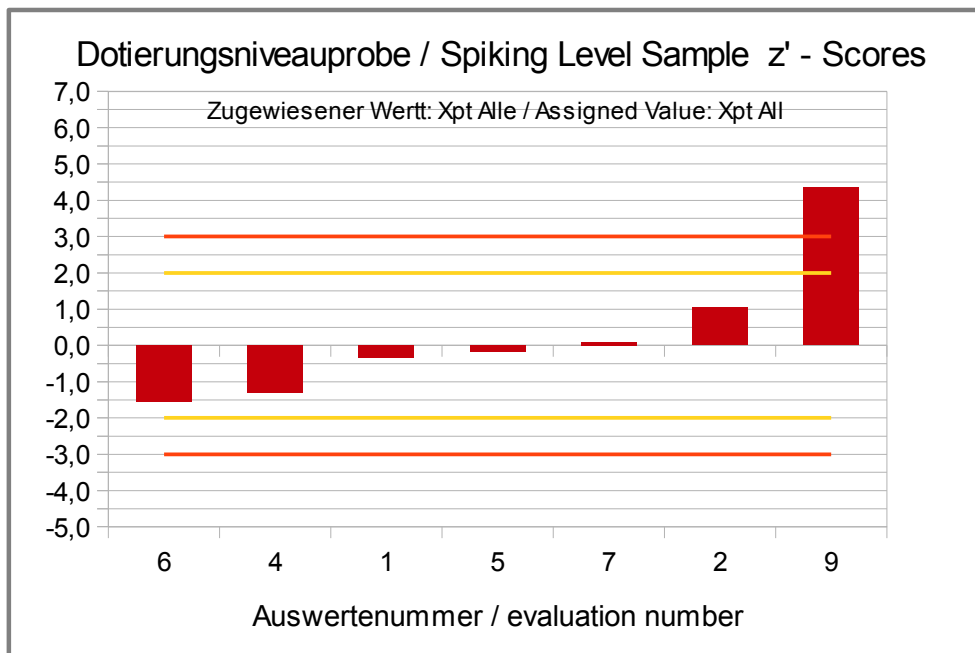


Abb./Fig. 4: z'-Scores (ELISA-Ergebnisse als Casein)
 Zugewiesener Wert: robuster Mittelwert aller Ergebnisse

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

Auswertenummer	Dotierungsniveauprobe	Wiederfindungsrate*	Probe A	Wiederfindungsrate*	Methode	Hinweis
	[mg/kg]	[%]	[mg/kg]	[%]		
3	>0,2		>0,1		AQ	
4	33,0	40	26,9	38	AQ	
2	83,3	100	14,5	21	BF	
8	>2,6		>2,6		ES	Ergebnis umgerechnet °
6	28,1	34	23,3	33	IL	
5	57,0	69	36,0	51	MI	
1	54,0	65	45,2	64	RS-F	
7	63,0	76	43,0	61	RS-F	
9	154	185	50,7	72	VT	Ergebnis umgerechnet °

° Umrechnung S. 18

AB**	50-150 %	AB**	50-150 %
Anzahl im AB	4	Anzahl im AB	4
Prozent im AB	57	Prozent im AB	57

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

** Akzeptanzbereich der AOAC für Allergen-ELISAs

Methoden:

- AQ = AgraQuant, RomerLabs
- BF = MonoTrace ELISA, BioFront Technologies
- ES = ELISA-Systeme
- IL = Immunolab
- MI = Morinaga Institute ELISA Kit II
- RS-F= Ridascreen® Fast, R-Biopharm
- VT = Veratox, Neogen

Anmerkung:

57% (4) der Teilnehmer haben mit der Dotierungsniveauprobe mittels ELISA eine Wiederfindungsrate im Bereich der AOAC-Anforderung von 50-150% erhalten. Für die dotierte Lebensmittelmatrix-Probe A lagen ebenfalls 57% (4) der Wiederfindungsraten in diesem Akzeptanzbereich.

4.2 Vergleichsuntersuchung Ei (Eiklarproteine)

4.2.1 ELISA-Ergebnisse: Eiklarproteine, gesamt

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	12,4	negativ	0	2/2 (100%)	BF	Ergebnis umgerechnet °
4	positiv	97,8	negativ	<0,05	2/2 (100%)	IL	
6	positiv	50,4	negativ	<0,04	2/2 (100%)	IL	Ergebnis umgerechnet °
3a	positiv	31,7	negativ	<0,2	2/2 (100%)	MI	Ergebnis umgerechnet °
5	positiv	29,2	negativ	<0,2	2/2 (100%)	MI	Ergebnis umgerechnet °
1	positiv	28,9	negativ		2/2 (100%)	RS-F	Ergebnis umgerechnet °
3b	positiv	29,9	negativ	<0,07	2/2 (100%)	RS-F	Ergebnis umgerechnet °
7	positiv	31,0	negativ	< 0,13	2/2 (100%)	RS-F	
8	positiv	>3,6	negativ	<0,1	2/2 (100%)	RS-F	
9	positiv	41,0	negativ		2/2 (100%)	VT	

° Umrechnung S. 18

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

Methoden:

BF = MonoTrace ELISA, BioFront Technologies

IL = Immunolab

MI = Morinaga Institute ELISA Kit II

RS-F= Ridascreen® Fast, R-Biopharm

VT = Veratox, Neogen

Anmerkung:

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

Quantitative Auswertung ELISA: Probe A

Auswertenummer	Eiklarproteine [mg/kg]	z-Score Xpt _{ALL}	Methode	Hinweis
2	12,4	-2,4	BF	Ergebnis umgerechnet °
4	97,8	8,3	IL	Ausreißer, ausgeschlossen
6	50,4	2,3	IL	Ergebnis umgerechnet °
3a	31,7	-0,03	MI	Ergebnis umgerechnet °
5	29,2	-0,34	MI	Ergebnis umgerechnet °
1	28,9	-0,38	RS-F	Ergebnis umgerechnet °
3b	29,9	-0,25	RS-F	Ergebnis umgerechnet °
7	31,0	-0,11	RS-F	
8	>3,6		RS-F	
9	41,0	1,1	VT	

° Umrechnung S. 18

Methoden:

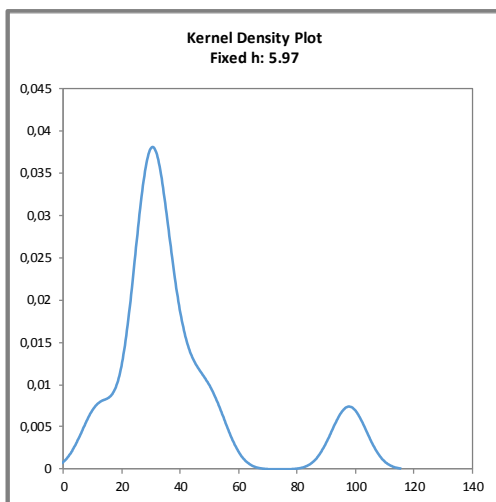
BF = MonoTrace ELISA, BioFront Technologies

IL = Immunolab

MI = Morinaga Institute ELISA Kit II

RS-F= Ridascreen® Fast, R-Biopharm

VT = Veratox, Neogen

**Abb. / Fig. 5:**Kerndichte-Schätzung aller ELISA-Ergebnisse (mit $h = 0,75 \times \sigma_{pt}$ von X_{ptALL})Kernel density plot of all ELISA results (with $h = 0,75 \times \sigma_{pt}$ of X_{ptALL})**Anmerkung:**

Die Kerndichte-Schätzung zeigt annähernd eine symmetrische Verteilung der Ergebnisse mit zwei Schultern und einem Nebenpeak bei ca. 100 mg/kg, der auf ein Einzelergebnis zurückgeht (Ausreißer ausgeschlossen).

Kenndaten: Quantitative Auswertung ELISA Eiklarproteine

Probe A

Kenndaten	Alle Ergebnisse [mg/kg]
Zugewiesener Wert (X_{pt})	X_{pt_ALL}
Anzahl der Messergebnisse [°]	8
Anzahl der Ausreißer	1
Mittelwert	31,8
Median	30,5
Robuster Mittelwert (X_{pt})	31,9
Robuste Standardabweichung (S^*)	7,96
<i>Zielkenndaten:</i>	
Zielstandardabweichung σ_{pt}	7,98
Untere Grenze des Zielbereichs	16,0
Obere Grenze des Zielbereichs	47,9
Quotient S^*/σ_{pt}	1,0
Standardunsicherheit $U(X_{pt})$	3,52
Ergebnisse im Zielbereich	6
Prozent im Zielbereich	75

[°] ohne Ergebnis Nr. 4 (als Ausreißer ausgeschlossen)

Anmerkungen zu den Kenndaten und Vergleich der Bezugswerte:

Die Kerndichte-Schätzung zeigte annähernd eine symmetrische Verteilung mit zwei Nebenpeaks, die auf Einzelergebnisse zurück gehen. Ein Ausreißer wurde vorab von der statistischen Auswertung ausgeschlossen.

Die Auswertung der Ergebnisse aller Methoden zeigte eine normale bis geringe Variabilität der Ergebnisse. Der Quotient S^*/σ_{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 60% vom Zusatzniveau von Eiklarprotein zu Probe A innerhalb der relevanten Anforderungen für die eingesetzten Methoden (s. 3.4.3 und "Wiederfindungsraten für Eiklarprotein" S.35).

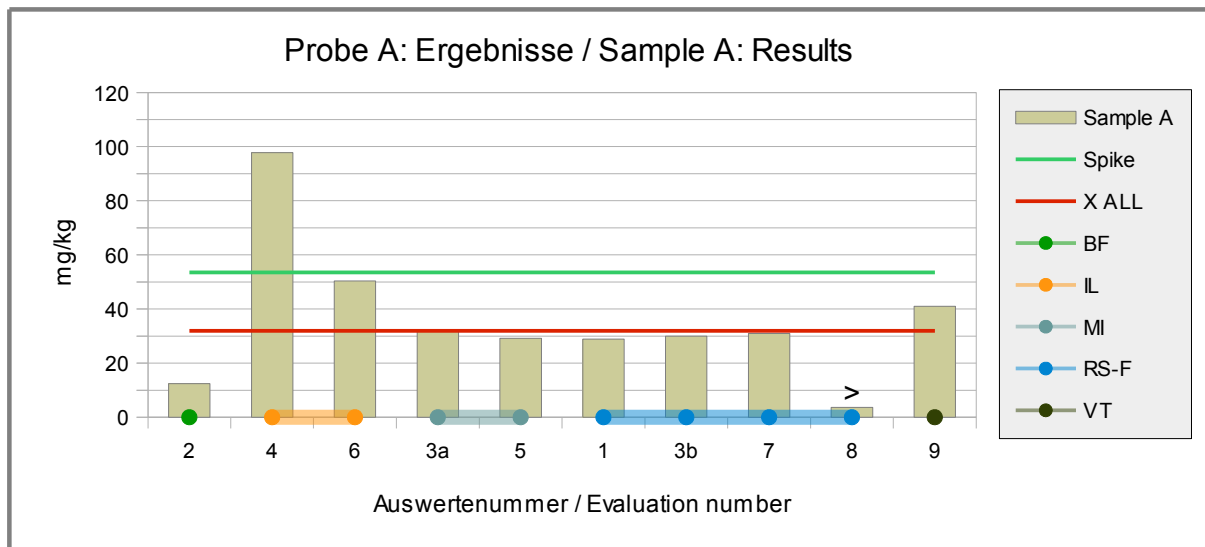


Abb./Fig. 6: ELISA-Ergebnisse Eiklarprotein
 grüne Linie = Zusatzniveau (Spike)
 rote Linie = robuster Mittelwert aller Ergebnisse
 runde Symbole = Zuordnung der Methoden (s. Legende)

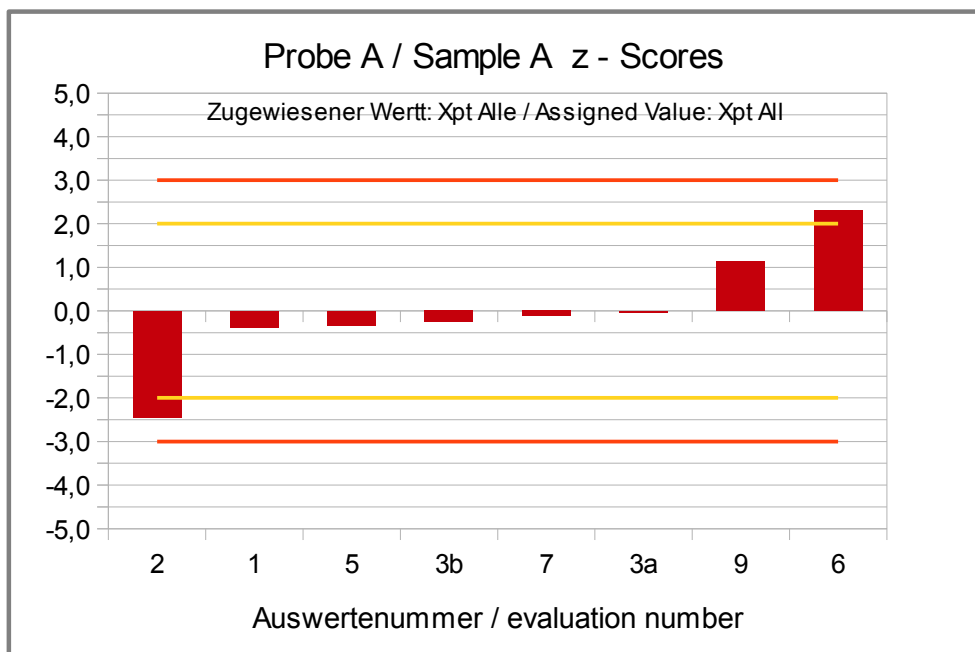


Abb./Fig. 7:
 z-Scores (ELISA-Ergebnisse als Eiklarprotein)
 Zugewiesener Wert: robuster Mittelwert aller Ergebnisse

Quantitative Auswertung ELISA: Dotierungsniveauprobe

Auswertenummer	Eiklarproteine [mg/kg]	z-Score $X_{pt,ALL}$	Methode	Hinweis
2	28,5	-1,5	BF	Ergebnis umgerechnet °
4	64,7	1,7	IL	
6	46,5	0,08	IL	Ergebnis umgerechnet °
3a	45,0	-0,05	MI	Ergebnis umgerechnet °
5	39,6	-0,53	MI	Ergebnis umgerechnet °
1	46,5	0,08	RS-F	Ergebnis umgerechnet °
3b	34,8	-0,95	RS-F	Ergebnis umgerechnet °
7	43,0	-0,23	RS-F	
8	>3,6		RS-F	
9	62,0	1,4	VT	

° Umrechnung S. 18

Methoden:

BF = MonoTrace ELISA, BioFront Technologies

IL = Immunolab

MI = Morinaga Institute ELISA Kit II

RS-F= Ridascreen® Fast, R-Biopharm

VT = Veratox, Neogen

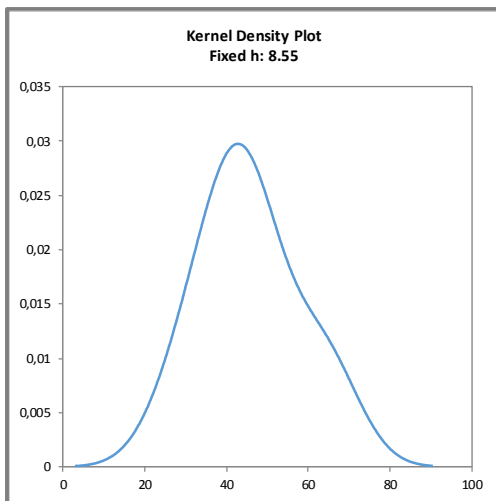


Abb. / Fig. 8:

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.

Kenndaten: Quantitative Auswertung ELISA Eiklarproteine**Dotierungsniveauprobe**

Kenndaten	Alle Ergebnisse [mg/kg]
Zugewiesener Wert (X_{pt})	X_{pt_ALL}
Anzahl der Messergebnisse	9
Anzahl der Ausreißer	0
Mittelwert	45,6
Median	45,0
Robuster Mittelwert (X_{pt})	45,6
Robuste Standardabweichung (S^*)	13,2
Zielkenndaten:	
Zielstandardabweichung σ_{pt}	11,4
Untere Grenze des Zielbereichs	22,8
Obere Grenze des Zielbereichs	68,4
Quotient S^*/σ_{pt}	1,2
Standardunsicherheit $U(X_{pt})$	5,51
Ergebnisse im Zielbereich	9
Prozent im Zielbereich	100

Anmerkungen zu den Kenndaten und Vergleich der Bezugswerte:

Die Kerndichte-Schätzung zeigte annähernd eine symmetrische Verteilung der Ergebnisse.

Die Auswertung der Ergebnisse aller Methoden zeigte eine normale bis geringe Variabilität der Ergebnisse. Der Quotient S^*/σ_{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 72% vom Zusatzniveau von Eiklarprotein zur Dotierungsniveauprobe innerhalb der relevanten Anforderungen für die eingesetzten Methoden (s. 3.4.3 und "Wiederfindungsraten für Eiklarprotein" S.35).

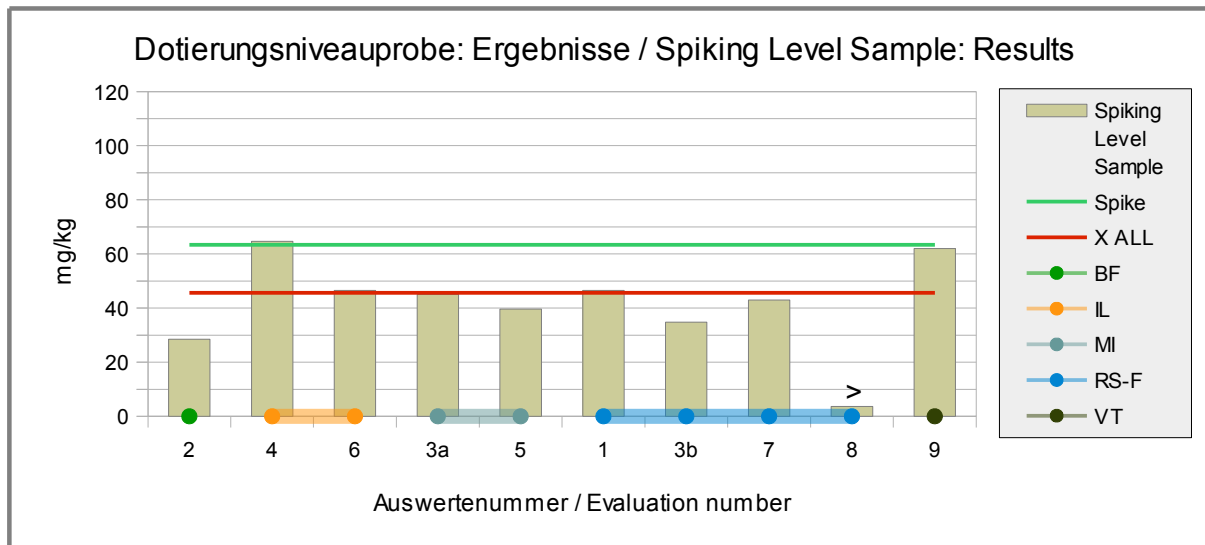


Abb./Fig. 9: ELISA-Ergebnisse Eiklarproteine
 grüne Linie = Zusatzniveau (Spike)
 rote Linie = robuster Mittelwert aller Ergebnisse
 runde Symbole = Zuordnung der Methoden (s. Legende)

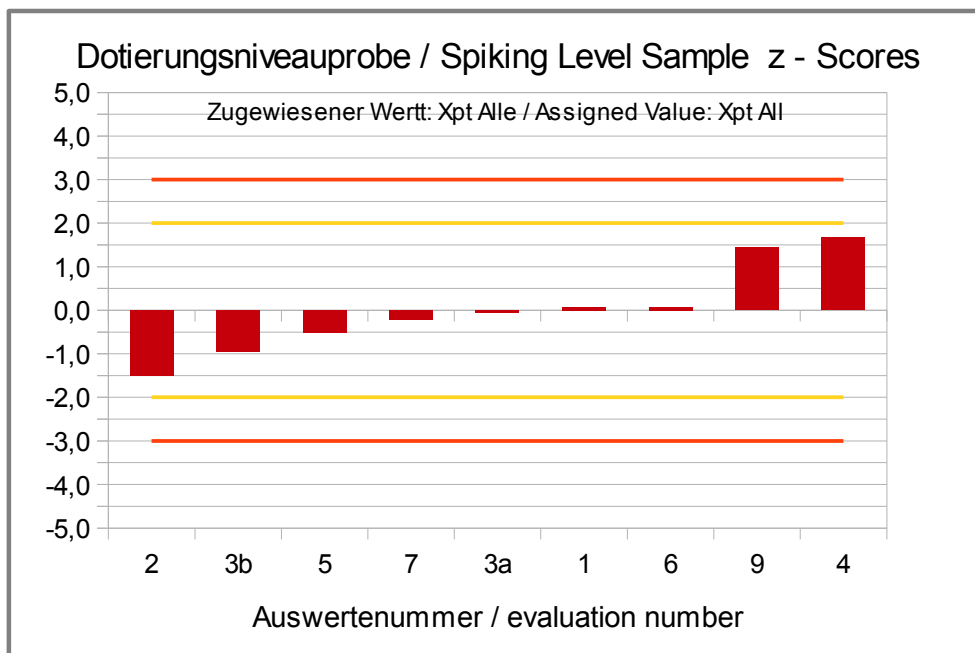


Abb./Fig. 10: z-Scores (ELISA-Ergebnisse als Eiklarproteine)
 Zugewiesener Wert: robuster Mittelwert aller Ergebnisse

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

Auswertenummer	Dotierungsniveauprobe	Wiederfindungsrate*	Probe A	Wiederfindungsrate*	Methode	Hinweis
	[mg/kg]	[%]	[mg/kg]	[%]		
2	28,5	45	12,4	23	BF	Ergebnis umgerechnet °
4	64,7	102	97,8	183	IL	
6	46,5	73	50,4	94	IL	Ergebnis umgerechnet °
3a	45,0	71	31,7	59	MI	Ergebnis umgerechnet °
5	39,6	62	29,2	55	MI	Ergebnis umgerechnet °
1	46,5	73	28,9	54	RS-F	Ergebnis umgerechnet °
3b	34,8	55	29,9	56	RS-F	Ergebnis umgerechnet °
7	43,0	68	31,0	58	RS-F	
8	>3,6		>3,6		RS-F	
9	62,0	98	41,0	77	VT	

° Umrechnung S. 18

AB**	50-150 %	AB**	50-150 %
Anzahl im AB	8	Anzahl im AB	7
Prozent im AB	89	Prozent im AB	78

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

** Akzeptanzbereich der AOAC für Allergen-ELISAs

Methoden:

BF = MonoTrace ELISA, BioFront Technologies

IL = Immunolab

MI = Morinaga Institute ELISA Kit II

RS-F= Ridascreen® Fast, R-Biopharm

VT = Veratox, Neogen

Anmerkung:

89% (8) der Teilnehmer haben mit der Dotierungsniveauprobe mittels ELISA eine Wiederfindungsrate im Bereich der AOAC-Anforderung von 50-150% erhalten. Für die dotierte Lebensmittelmatrix-Probe A lagen 78% (7) der Wiederfindungsraten in diesem Akzeptanzbereich.

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: Milch (Casein)

Meth. Abk.	Auswertenummer	Datum der Analyse Tag/Monat	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			
													Test-Kit + Anbieter
AQ	3	01.03.18	positiv	> 0.1	negativ	< 0.1	positiv	> 0.2	0,2			Casein	AgraQuant Casein CO-KAL 1200, RomerLabs
AQ	4	22.03.18	positiv	26,9	negativ	<0,2	positiv	33	0,2	0,2		Casein	AgraQuant Casein CO-KAL 1200, RomerLabs
BF	2	12. Apr	positiv	14,5	negativ	0	positiv	83,3	0,12	1		Casein	MonoTrace Milk (Casein) ELISA kit, BioFront Technologies
ES	8		positiv	>10	negativ	<1	positiv	>10		1		Magermilchpulver	ELISA Systems Casein ESCASPRD-48
IL	6	05.03.18	positiv	23,3	negativ	< 0.1	positiv	28,1	0.04	0.2		Casein	Immunolab Casein ELISA
Mi	5	06.3.	positiv	36	negativ	<0,25	positiv	57	0,25	0,25		Casein	Morinaga Casein ELISA Kit II (M2113)
RS-F	1		positiv	45,2	negativ		positiv	54	0,25	0,25	12,2	Casein	Ridascreen® FAST Casein R4612, R-Biopharm
RS-F	7	07.03.18	-	43	-	< 0,25	-	63	0,12	0,25		Casein	Ridascreen® FAST Casein R4612, R-Biopharm
VT	9	14.03.18	positiv	176	negativ		positiv	534	1			Magermilchpulver	Veratox Casein Allergen, Neogen

* NWG Nachweisgrenze / BG Bestimmungsgrenze

* LOD limit of detection / LOQ limit of quantitation

* MU Messunsicherheit / MU measurement uncertainty

Meth. Abk.	Auswertenummer	Spezifität	Hinweise zur Methode (Extraktion und Bestimmung)	Methode akkr. ISO/IEC 17025	Sonstige Hinweise
		Antikörper	z.B. Extraktionslösung / Zeit / Temperatur		
AQ	3		Application Note Wine, Dotierungsprobe nach Standardvorschrift	ja	
AQ	4	Casein, näheres nicht bekannt	Dotierungsniveauprobe mit Extraktionspuffer vorverdünnt	nein	
BF	2	Anti-Casein, monoklonal	1:10 Extraktionsverhältnis bei 60°C für 10 min	nein	
ES	8			nein	
IL	6	Casein			
Mi	5	Casein (Milchprotein)	lt. Herstellerangaben	ja	
RS-F	1	gegen Casein		nein	
RS-F	7		Extraktion mit mitgelieferten Extraktionspuffer, 60 °C, 10 min	ja	
VT	9			ja	Neogen Total milk

5.1.2 ELISA: Ei (Eiklarproteine)

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	2	12. Apr	positiv	47,7	negativ	0	positiv	107,2	0,3	1		Volleipulver	BF
IL	4	22.03.18	positiv	97,8	negativ	<0,05	positiv	64,7	0,5	0,5		Eiklarproteine, gesamt	IL
IL	6	05.03.18	positiv	37,8	negativ	< 0,03	positiv	34,9	0,004	0,025		Ovalbumin	IL
MI	3a	08.03.18	positiv	57,7	negativ	< 0,31	positiv	81,9	0,31	0,31		Eiprotein	MI
MI	5	09.3.	positiv	53	negativ	<0,31	positiv	72	0,31	0,31		Volleiprotein	MI
RS-F	1		positiv	111	negativ		positiv	178,7	0,25	0,25	17,4	Volleipulver	RS-F
RS-F	3b	12.03.18	positiv	115	negativ	< 0,25	positiv	134	0,5	0,5		Volleipulver	RS-F
RS-F	7	07.03.18	-	31	-	< 0,13	-	43	0,03	0,13		Eiklarprotein	RS-F
RS-F	8		positiv	>3,6	negativ	<0,1	positiv	>3,6	0,03	0,1		Eiklarproteine, gesamt	RS-F
VT	9	12.03.18	positiv	41	negativ		positiv	62	1			Eiklarproteine, gesamt	VT

* 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 akkr. ISO/IEC 17025	Sonstige Hinweise
		Antikörper	z.B. Extraktionslösung / Zeit / Temperatur		
BF	2	Anti-Ovomucoid, monoklonal	1:20 Extraktionsverhältnis, bei 60°C für 10 min	nein	Für Weinanalyse 5% Magermilchpulver zum 1x Extraktionspuffer gemäß Kit-Anleitung zugegeben
IL	4	Ovalbumin, näheres nicht bekannt	Dotierungsniveauprobe mit Extraktionspuffer vorverdünnt	nein	Kit Immunolab Ovalbumin ELISA;
IL	6	Ovalbumin			
MI	3a		Standardvorschrift Short Time Extraction Protocol	nein	
MI	5	Ovalbumin	lt. Herstellerangaben	ja	
RS-F	1	gegen Eiklar-Proteine		nein	
RS-F	3b		Application Note Wine, Dotierungsprobe nach Standardvorschrift	ja	
RS-F	7		Extraktion mit mitgelieferten Extraktionspuffer, 60 °C, 10 min	ja	
RS-F	8			ja	
VT	9			ja	

5.2 Homogenität**5.2.1 Mischungshomogenität vor der Abfüllung****Microtracer Homogenitätstest****DLA 09-2018 Dotierungsniveauprobe**

Gewicht Gesamtprobe	1,51	kg
Microtracer	FSS-rot lake	
Teilchengröße	75 – 300	µm
Gewicht pro Partikel	2,0	µg
Tracerzugabe	15,1	mg/kg

Analysenergebnisse:

Probe	Einwaage [g]	Partikel Anzahl	Partikel [mg/kg]
1	5,06	46	18,2
2	5,05	44	17,4
3	5,02	49	19,5
4	5,04	47	18,7
5	5,01	48	19,2
6	5,09	41	16,1
7	5,08	46	18,1
8	5,09	45	17,7

Poisson-Verteilung

Probenanzahl	8	
Freiheitsgrad	7	
Mittelwert	45,8	Partikel
Standardabweichung	2,71	Partikel
χ^2 (CHI-Quadrat)	1,12	
Wahrscheinlichkeit	99	%
Wiederfindungsrate	120	%

Normalverteilung

Probenanzahl	8	
Mittelwert	18,1	mg/kg
Standardabweichung	1,07	mg/kg
rel. Standardabweichung	5,92	%
Horwitz Standardabweichung	10,3	%
HorRat-Wert	0,57	
Wiederfindungsrate	120	%

5.3 Informationen zur Eignungsprüfung (EP)

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

EP-Nummer	DLA 09-2018
EP-Name	Allergene IX: Milch (Casein) und Eiklarprotein in Wein
Probenmatrix (Prozessierung)	Proben A + B: Weißwein (Grauer Burgunder, Deutscher Qualitätswein, Baden 2016) und weitere Zusatzstoffe und Allergene Lebensmittel (Magermilchpulver, Eiklarpulver) (eine der beiden Proben) Dotierungsniveauprobe: Glucose, weitere Zusatzstoffe und Allergene Lebensmittel (Magermilchpulver, Eiklarpulver)
Probenzahl und Probenmenge	2 unterschiedliche Proben A + B: je 50 ml + 1 Dotierungsniveauprobe: 15 g
Lagerungsinformation	Proben A + B: Raumtemperatur (Langzeit gekühlt 2 - 10 °C) Dotierungsniveauprobe: Raumtemperatur
Verwendungszweck	Ausschließlich für Laboruntersuchungen (Qualitätskontrollproben)
Parameter	qualitativ + quantitativ: Milch (Casein), Eiklarprotein 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 (hier Umschwenken/Rühren).
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 13. April 2018
uswertebericht	Der Auswertebericht wird voraussichtlich 6 Wochen nach Abgabetermin der Ergebnisse fertiggestellt und per eMail als PDF-Datei zugesandt.
Koordinator und Ansprechpartner der EP	Dr. Matthias Besler-Scharf

* Die Kontrolle der Mischungshomogenität wird von DLA durchgeführt. Die Prüfung der Gehalte, Homogenität und Stabilität von EP-Parametern wird von DLA im Unterauftrag vergeben.

6. Verzeichnis der Teilnehmer in alphabetischer Reihenfolge

Teilnehmer / Participant	Ort / Town	Land / Country
		Deutschland
		Deutschland
		USA
		Deutschland
		Deutschland
		Deutschland
		Deutschland
		Deutschland
		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 interlaboratory comparisons
4. ASU §64 LFGB: Planung und statistische Auswertung von Ringversuchen zur Methodvalidierung / DIN ISO 5725 series part 1, 2 and 6 Accuracy (trueness and precision) of measurement methods and results
5. Verordnung / Regulation 882/2004/EU; Verordnung über über amtliche Kontrollen zur Überprüfung der Einhaltung des Lebensmittel- und Futtermittelrechts sowie der Bestimmungen über Tiergesundheit und Tierschutz / Regulation on official controls performed to ensure the verification of compliance with feed and food law, animal health and animal welfare rules
6. Evaluation of analytical methods used for regulation of food and drugs; W. Horwitz; Analytical Chemistry, 54, 67-76 (1982)
7. The International Harmonised Protocol for the Proficiency Testing of Analytical Laboratories ; J.AOAC Int., 76(4), 926 - 940 (1993)
8. A Horwitz-like funktion describes precision in proficiency test; M. Thompson, P.J. Lowthian; Analyst, 120, 271-272 (1995)
9. Protocol for the design, conduct and interpretation of method performance studies; W. Horwitz; Pure & Applied Chemistry, 67, 331-343 (1995)
10. Recent trends in inter-laboratory precision at ppb and sub-ppb concentrations in relation to fitness for purpose criteria in proficiency testing; M. Thompson; Analyst, 125, 385-386 (2000)
11. The International Harmonised Protocol for the Proficiency Testing of Analytical Chemistry Laboratories; Pure Appl Chem, 78, 145 - 196 (2006)
12. AMC Kernel Density - Representing data distributions with kernel density estimates, amc technical brief, Editor M Thompson, Analytical Methods Committee, AMCTB No 4, Revised March 2006 and Excel Add-in Kernel.xla 1.0e by Royal Society of Chemistry
13. EURACHEM/CITAC Leitfaden, Ermittlung der Messunsicherheit bei analytischen Messungen (2003); Quantifying Uncertainty in Analytical Measurement (1999)
14. GMP+ Feed Certification scheme, Module: Feed Safety Assurance, chapter 5.7 Checking procedure for the process accuracy of compound feed with micro tracers in GMP+ BA2 Control of residues, Version: 1st of January 2015 GMP+ International B.V.
15. MTSE SOP No. 010.01 (2014): Quantitative measurement of mixing uniformity and carry-over in powder mixtures with the rotary detector technique, MTSE Micro Tracers Services Europe GmbH
16. Homogeneity and stability of reference materials; Linsinger et al.; Accred Qual Assur, 6, 20-25 (2001)
17. AOAC Official Methods of Analysis: Guidelines for Standard Method Performance Requirements, Appendix F, p. 2, AOAC Int (2016)
18. Codex Alimentarius Commission (2010) - Guidelines on performance criteria and validation of methods for detection, identification and quantification of specific DNA sequences and specific proteins in foods, CAC/GL 74-2010
19. DIN EN ISO 15633-1:2009; Nachweis von Lebensmittelallergenen mit immunologischen Verfahren - Teil 1: Allgemeine Betrachtungen / Foodstuffs - Detection of food allergens by immunological methods - Part 1: General considerations
20. DIN EN ISO 15634-1:2009; Nachweis von Lebensmittelallergenen mit molekularbiologischen Verfahren - Teil 1: Allgemeine Betrachtungen / Foodstuffs - Detection of food allergens by molecular biological methods -

Part 1: General considerations

21. DIN EN ISO 15842:2010 Lebensmittel - Nachweis von Lebensmittelallergenen - Allgemeine Betrachtungen und Validierung von Verfahren / Foodstuffs - Detection of food allergens - General considerations and validation of methods
22. Ministry of Health and Welfare, JSM, Japan 2006
23. Working Group Food Allergens, Abbott et al., Validation Procedures for Quantitative Food Allergen ELISA Methods: Community Guidance and Best Practices JAOAC Int. 93:442-50 (2010)
24. Working Group on Prolamin Analysis and Toxicity (WGPAT): Méndez et al. Report of a collaborative trial to investigate the performance of the R5 enzyme linked immunoassay to determine gliadin in gluten-free food. Eur J Gastroenterol Hepatol. 17:1053-63 (2005)
25. DLA Publikation: Performance of ELISA and PCR methods for the determination of allergens in food: an evaluation of six years of proficiency testing for soy (Glycine max L.) and wheat gluten (Triticum aestivum L.); Scharf et al.; J Agric Food Chem. 61(43):10261-72 (2013)
26. EFSA (2014) Scientific Opinion on the evaluation of allergenic foods and food ingredients for labelling purposes¹, EFSA Panel on Dietetic Products, Nutrition and Allergies (NDA), European Food Safety Authority (EFSA), Parma, Italy, EFSA Journal 2014;12(11):3894
27. IRMM, Poms et al.; Inter-laboratory validation study of five different commercial ELISA test kits for determination of peanut residues in cookie and dark chocolate; European Commission, Joint Research Centre, Belgium; GE/R/FSQ/D08/05/2004
28. Jayasena et al. (2015) Comparison of six commercial ELISA kits for their specificity and sensitivity in detecting different major peanut allergens. J Agric Food Chem. 2015 Feb 18;63(6):1849-55
29. Allergen Data Collection - Update (2002): Cow's Milk (Bos domesticus), Besler M., Eigenmann P., Schwartz R., Internet Symposium on Food Allergens 4(1): 19-106, <http://www.food-allergens.de>
30. Peñas et al. (2015) Allergenic Proteins in Enology: A Review on Technological Applications and Safety Aspects, Molecules 2015, 20, 13144-13164
31. Restani et al. (2012) Validation by a Collaborative Interlaboratory Study of an ELISA Method for the Detection of Caseinate Used as a Fining Agent in Wine, Food Anal. Methods (2012) 5:480-486
32. Restani et al. (2014) Collaborative Interlaboratory Studies for the Validation of ELISA Methods for the Detection of Allergenic Fining Agents Used in Wine According to the Criteria of OIV Resolution 427-2010 Modified by OIV-Comex 502-2012, Food Anal. Methods (2014) 7:706-712
33. RESOLUTION OIV/OENO 427/2010 + 502-2012: CRITERIA FOR THE METHODS OF QUANTIFICATION OF POTENTIALLY ALLERGENIC RESIDUES OF FINING AGENT PROTEINS IN WINE, International Organisation of Vine and Wine 2010 / 2012
34. Lacorn et al. (2014) Collaborative Tests of ELISA Methods for the Determination of Egg White Protein and Caseins Used as Fining Agents in Red and White Wines, Food Anal. Methods (2014) 7:417-429

DLA 09/2018 - Allergene IX

Alle 9 Teilnehmer haben mindestens ein Ergebnis eingereicht. Die Auswertung erfolgte hinsichtlich der Parameter Casein und Eiklarproteine qualitativ und quantitativ, soweit möglich methodenübergreifend. Für die Auswertung von einzelnen ELISA-Methoden lagen zuwenig Ergebnisse vor. Zusätzlich wurden für jeden Teilnehmer Wiederfindungsraten für die Dotierungsniveauprobe und die dotierte Probe ermittelt. Details zu den einzelnen Parametern sind dem Auswertebereich zu entnehmen. Zwei Teilnehmer hatten ihren Sitz im Ausland (Spanien, USA).