

Proficiency Tests

**DLA**

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

## **Auswertungs-Bericht**

Laborvergleichsuntersuchung

**DLA 10/2018**

### **Allergene X:**

### **Gluten in "glutenfreiem" Bier**

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

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

Koordinator der LVU:  
Dr. Matthias Besler-Scharf

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

<p><i>EP-Anbieter</i> <i>PT-Provider</i></p>	<p><b>DLA - Dienstleistung Lebensmittel Analytik GbR</b>  Gesellschafter: Dr. Gerhard Wichmann und Dr. Matthias Besler-Scharf</p> <p>Waldemar-Bonsels-Weg 170,  22926 Ahrensburg, Germany</p> <p>Tel. ++49-(0)4532-9183358  Mob. ++49(0)171-1954375  Fax. ++49(0)4102-9944976  eMail. proficiency-testing@dla-lvu.de</p>
<p><i>EP-Nummer</i> <i>PT-Number</i></p>	<p>DLA 10/2018</p>
<p><i>EP-Koordinator</i> <i>PT-Coordinator</i></p>	<p>Dr. Matthias Besler-Scharf</p>
<p><i>Status des EP-Bericht</i> <i>Status of PT-Report</i></p>	<p>Abschlussbericht / Final report (31. August 2018)</p> <p>Gültig ist die jeweils letzte Version/Korrektur des Berichts. Sie ersetzt alle vorangegangenen Versionen.  Only the latest version/correction of the report is valid. It replaces all preceding versions.</p>
<p><i>EP-Bericht Freigabe</i> <i>PT-Report Authorization</i></p>	<p>Dr. Matthias Besler-Scharf (Technischer Leiter / Technical Manager)  - <i>gezeichnet / signed M. Besler-Scharf</i>  Dr. Gerhard Wichmann (QM-Beauftragter / Quality Manager)  - <i>gezeichnet / signed G. Wichmann</i>  Datum / Date: 31. August 2018</p>
<p><i>Unteraufträge</i> <i>Subcontractors</i></p>	<p>Falls im Rahmen der Eignungsprüfung eine Prüfung der Gehalte, Homogenität und Stabilität von EP-Parametern durchgeführt wurde, hat DLA diese im Unterauftrag vergeben.  In case the analysis of the content, homogeneity and stability of PT-parameters was part of the proficiency test, the determinations were subcontracted by DLA.</p>
<p><i>Vertraulichkeit</i> <i>Confidentiality</i></p>	<p>Die Teilnehmerergebnisse sind im EP-Bericht in anonymisierter Form mit Auswertenummern benannt. Daten einzelner Teilnehmer werden ausschließlich nach vorheriger Zustimmung des Teilnehmers an Dritte weitergegeben.  Participant result are named anonymously with evaluation numbers in the PT report. Data of individual participants will be passed on to third parties only with prior consent of the participant.</p>

## Inhalt

1. Einleitung.....	4
2. Durchführung.....	4
2.1 Untersuchungsmaterial.....	4
2.1.1 Homogenität.....	5
2.1.2 Stabilität.....	5
2.2 Probenversand und Informationen zur Untersuchung.....	6
2.3 Ergebnisübermittlung.....	6
3. Auswertung.....	7
3.1 Konsenswert der Teilnehmer (zugewiesener Wert).....	7
3.2 Robuste Standardabweichung.....	8
3.3 Ausschluss von Ergebnissen und Ausreißer.....	8
Ausschluss von Ergebnissen .....	8
3.4 Zielstandardabweichung (für die Eignungsbeurteilung).....	9
3.4.1 Allgemeines Modell nach Horwitz.....	9
3.4.2 Auswertung eines Versuchs zur Präzision .....	9
3.4.3 Werte aus Erkenntnissen .....	11
3.5 z-Score.....	12
3.6 z'-Score.....	13
3.7 Quotient $S^*/opt$ .....	13
3.8 Standardunsicherheit und Rückführbarkeit.....	13
3.9 Graphische Darstellung der Bezugswerte.....	14
4. Ergebnisse.....	15
4.1 Vergleichsuntersuchung Gluten.....	17
4.1.1 ELISA-Ergebnisse: Gluten.....	17
4.1.2 PCR-Ergebnisse: Weizen.....	22
5. Dokumentation.....	23
5.1 Angaben der Teilnehmer.....	23
5.1.1 ELISA: Gluten.....	23
5.1.3 PCR: Weizen.....	25
5.2 Informationen zur Eignungsprüfung (EP).....	26
6. Verzeichnis der Teilnehmer in alphabetischer Reihenfolge.....	27
7. Verzeichnis relevanter Literatur.....	28

## 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

Bei dem Untersuchungsmaterial handelt es sich um handelsübliches "glutenfreies" Bier (Reisbier). Die Grundzusammensetzung war für beide Proben A und B gleich (s. Tabelle 1).

Nach Homogenisierung der Grundmischung wurde Probe A eine glutenhaltige Dotierungsprobe (Mischung von "glutenfreiem" Bier und Hefeweißbier) zugesetzt und erneut homogenisiert.

Anschließend wurden die Proben zu Portionen von ca. 50 mL in PE-Flaschen mit Schraubdeckel abgefüllt.

Tabelle 1: Zusammensetzung der DLA-Proben

Zutaten	Probe A (dotiert)	Probe B
Bio-Reis-Bier, glutenfrei Kennzeichnung: 4,3%vol Alkohol, Schankbier Zutaten: Wasser, Reissirup, Hopfen Konservierung: Kaliumsorbat*	90 g/100 g	100 g/100 g
Glutenhaltige Dotierungsprobe Zutaten: Mischung von "glutenfreiem" Pilsner Bier und Hefeweißbier mit Weizen- und Gerstenmalz (DLA 10-2016 Probe A)	10 g/100g	-
- davon Gluten**	25 mg/kg	

\* Konservierung der LVU-Proben durch DLA

\*\*Gluten-Gehalt gemäß Auswertebereicht DLA 10-2016 Probe A: robuster Mittelwert 251 mg/kg, einfache Standardunsicherheit 17,2 mg/kg (Methode ELISA: R-Biopharm, Ridascreen Gliadin kompetitiv R7021)

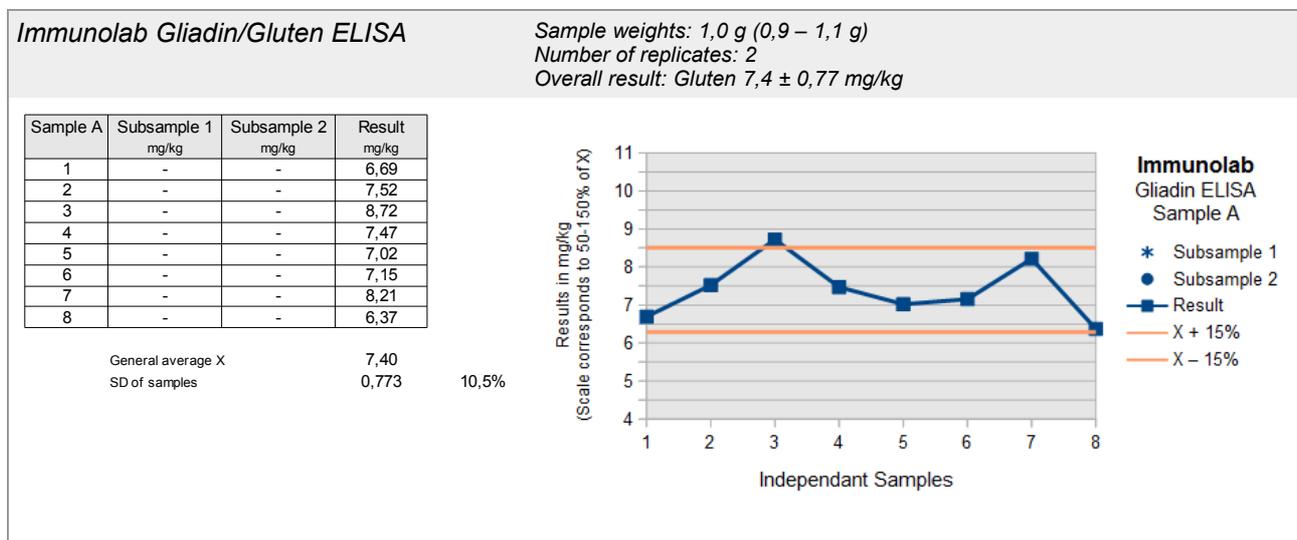
**Hinweis:** Die metrologische Rückführung von Temperatur, Masse und Volumen bei der Herstellung der LVU-Proben wird mittels DAkkS-kalibrierter Referenzmaterialien gewährleistet.

2.1.1 Homogenität

Die **Homogenität der abgefüllten DLA-Proben** (dotierte Probe A) wurde anhand des Gluten-Gehalts mittels ELISA-Test geprüft 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 Gluten / Homogeneity Gluten**



2.1.2 Stabilität

Bei dem Lebensmittelmatrix-Probenmaterial handelt es sich um Bier. In Langzeit-Stabilitätstests über ein Jahr hat sich der Parameter Gluten als stabil erwiesen. 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 20. Kalenderwoche 2018 je eine Portion der Untersuchungsmaterialien A und B verschickt. Die Untersuchungsverfahren wurden freigestellt. Die Untersuchungen waren durchzuführen bis spätestens 29. Juni 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 Gluten aus Gersten- und/oder Weizenmalz (aus Pilsener Bier bzw. Hefe Weizen) im mg/kg Bereich in der Matrix "glutenfreies" Bier.*

*Bitte beachten Sie die beiliegenden Informationen zur Eignungsprüfung. (siehe Dokumentation unter Punkt 5.2 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 17 Teilnehmer haben fristgerecht Ergebnisse abgegeben.

### 3. Auswertung

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

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

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:  $\Delta$  Median - rob. Mittelwert  $> 0,3 \sigma_{pt}$ ) [3].

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

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

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

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

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

### 3.2 Robuste Standardabweichung

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

Folgende robuste Standardabweichungen werden herangezogen:

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

### 3.3 Ausschluss von Ergebnissen und Ausreißer

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

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

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

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

### 3.4 Zielstandardabweichung (für die Eignungsbeurteilung)

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

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

#### 3.4.1 Allgemeines Modell nach Horwitz

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

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

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

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

#### 3.4.2 Auswertung eines Versuchs zur Präzision

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

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

Die 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].

Die in Tabelle 2 aufgeführten Präzisionsdaten wurden in Ringversuchen mittels eines kommerziellen ELISAs zur Bestimmung von Gluten in fermentierten getreidehaltigen Produkten erhalten (AOAC-Methode AACCI 38-55.02) [25]. Es wurden "glutenfreies" Bier auf Hirse-Basis sowie mit Hordein-Verdau (Gerste) dotierte Hirsebiere untersucht.

Tabelle 2: Relative Wiederholstandardabweichungen ( $RSD_r$ ) und relative Vergleichsstandardabweichungen ( $RSD_R$ ) gemäß Auswertungen von Versuchen zur Präzision [29]

Parameter	Matrix	Mittelwerte	$RSD_r$	$RSD_R$	Methode / Literatur
Gluten	"glutenfreies" Bier (Hirse-Bier)	2,36 mg/kg	98,0 %	126,1 %	ELISA [29]
Gluten	"glutenfreies" Bier (Hirse-Bier), ge-spiked	26,2 mg/kg	30,2 %	36,8 %	ELISA [29]
Gluten	"glutenfreies" Bier (Hirse-Bier), ge-spiked	119,5 mg/kg	31,2 %	31,2 %	ELISA [29]
Gluten	"glutenfreier" Stärkesirup	1,29 mg/kg	157,3 %	236,1 %	ELISA [29]
Gluten	Stärkesirup	10,6 mg/kg	16,3 %	34,4 %	ELISA [29]
Gluten	Sauerteig	48,4 mg/kg	23,1 %	25,9 %	ELISA [29]
Gluten	Sauerteig	145,6 mg/kg	19,5 %	27,5 %	ELISA [29]

Insbesondere kann auch der Glutengehalt in fermentierten Getreideprodukten von verschiedenen ELISA-Methoden unterschiedlich bewertet werden: Eine Vergleichsstudie von 5 Sandwich-ELISAs und 2 kompetitiven ELISA-Methoden zur Bestimmung von Gluten in verschiedenen Stufen der Bierherstellung wurde von Panda et al. (2015) durchgeführt [30].

Von Colgrave et al. (2014) wurde eine LC-MS/MS-Methode zur Bestimmung von Gluten in hydrolysierte Form in Bier im Vergleich zu ELISA-Methoden vorgestellt [31].

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	Wiederholstandardabweichung	Vergleichsstandardabweichung
MHLW 2006	50 - 150%		≤ 25%
CEN 2009		≤ 20%	
AOAC 2010	50 - 150%	6,9 - 34,4% <sup>(a)</sup>	19,5 - 57,2% <sup>(a)</sup>
CAC 2010	70 - 120%	≤ 25%	≤ 35%

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

Tabelle 4: PCR-Validierungskriterien

Literatur [18]	Wiederfindungsrate	Wiederholstandardabweichung	Vergleichsstandardabweichung
CAC 2010	± 25% <sup>(a)</sup>	≤ 25%	≤ 35%

(a) = Trueness / Richtigkeit

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

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

Gesetzliche Regelungen und Höchstwert-Empfehlungen

Die Kennzeichnung von Allergenen ist in der Lebensmittel-Informations-VO (EU 1169/2011) geregelt. Für die Kennzeichnung von Gluten bzw. glutenhaltigen Getreiden gilt gemäß EU-Verordnung 828/2014: Lebensmittel mit einem

Glutengehalt <20 mg/kg dürfen als "glutenfrei" und mit Gehalten von maximal 100 mg/kg als mit dem Hinweis "sehr geringer Glutengehalt" bezeichnet werden.

### 3.5 z-Score

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

Die Berechnung erfolgt nach:

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

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

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

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

- i) **z-Score** -  $z_{ALL}$  (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  $\geq 10$  Ergebnisse vorliegen [3].

### 3.6 z'-Score

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

Die Berechnung erfolgt nach:

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

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

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

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

Zu Warn- und Eingriffssignalen siehe 3.5.1.

### 3.7 Quotient $S^*/\sigma_{pt}$

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

### 3.8 Standardunsicherheit und Rückführbarkeit

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

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

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

gering für die Standardunsicherheit des zugewiesenen Wertes gewählt wurde.

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

### 3.9 Graphische Darstellung der Bezugswerte

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

## 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 die Ergebnisse aller ELISA- bzw. PCR-Methoden zu einem Parameter für die Proben A, B und C (qualitativ und ggf. quantitativ) angegeben.

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, werden Teilnehmerergebnisse mit unterschiedlichen Angaben (z.B. als Protein oder allergenes Lebensmittel) soweit möglich von DLA harmonisiert.

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

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

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

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

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

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

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

<sup>o</sup> Zielbereich berechnet mit z-Score oder z'-Score

## 4.1 Vergleichsuntersuchung Gluten

### 4.1.1 ELISA-Ergebnisse: Gluten

#### Qualitative Auswertung der Ergebnisse: Proben A und B

Auswertenummer	Probe A	Probe A	Probe B	Probe B	Qualitative Bewertung	Methode	Hinweis
	pos/neg	[mg/kg]	pos/neg	[mg/kg]	Übereinstimmungen mit Konsenswerten		
17	positiv	10,0	positiv	4,00	1/2 (50%)	IL	
7a	positiv	11,0	negativ	<5	2/2 (100%)	IN	
10a	positiv		negativ		2/2 (100%)	RQ	Lateral Flow
1	positiv	31,0	negativ		2/2 (100%)	RS-C	
3	positiv	13,0	negativ	<10	2/2 (100%)	RS-C	
4	positiv	12,6	negativ	<10	2/2 (100%)	RS-C	
5	positiv	41,0	negativ	< 10	2/2 (100%)	RS-C	
6	positiv	20,6	negativ	<10,0	2/2 (100%)	RS-C	
7b	positiv	21,0	negativ	<10	2/2 (100%)	RS-C	
8	positiv	20,4	negativ		2/2 (100%)	RS-C	
9	positiv	19,0	negativ		2/2 (100%)	RS-C	
10b	positiv	52,0	negativ	<5	2/2 (100%)	RS-C	
11	positiv	20,1	negativ	<10	2/2 (100%)	RS-C	
12	positiv	12,4	negativ	<10	2/2 (100%)	RS-C	
13	positiv	10,7	negativ	<10,0	2/2 (100%)	RS-C	
14	positiv	10,2	negativ	<10,0	2/2 (100%)	RS-C	
15	positiv	12,0	negativ		2/2 (100%)	RS-C	
16	positiv	22,0	negativ		2/2 (100%)	RS-C	
2	positiv	12,1	negativ	<5,0	2/2 (100%)	VT-R5	

	Probe A	Probe B
Anzahl positiv	19	1
Anzahl negativ	0	18
Prozent positiv	100	5
Prozent negativ	0	95
Konsenswert	positiv	negativ

#### Methoden:

IL = Immunolab  
 IN = INgezim Gluten Hidrolizado, Ingenasa  
 RQ = RIDA®QUICK (Lateral Flow), R-Biopharm  
 RS-C = Ridascreeen® competitive, R-Biopharm  
 VT-R5 = Veratox, Neogen

#### Anmerkung:

Die Konsenswerte stehen in qualitativer Übereinstimmung mit der Dotierung von Probe A. Ein positives Ergebnis für Probe B wurde mit der Methode IL an der Bestimmungsgrenze der Methode erhalten. Das Ergebnis liegt unter den von den Teilnehmern angegebenen Bestimmungsgrenzen für die anderen Methoden.

**Quantitative Auswertung ELISA: Probe A**

Auswertenummer	Gluten [mg/kg]	z-Score $X_{pt_{ALL}}$	z-Score $X_{pt_{RS-C}}$	Methode	Hinweis
17	10,0	-1,5		IL	
7a	11,0	-1,2		IN	
10a				RQ	Lateral Flow
1	31,0	3,9	3,3	RS-C	
3	13,0	-0,69	-0,92	RS-C	
4	12,6	-0,79	-1,0	RS-C	
5	41,0	6,4	5,7	RS-C	Ausreißer ausgeschlossen
6	20,6	1,2	0,87	RS-C	
7b	21,0	1,3	1,0	RS-C	
8	20,4	1,2	0,83	RS-C	
9	19,0	0,83	0,50	RS-C	
10b	52,0	9,2	8,3	RS-C	Ausreißer ausgeschlossen
11	20,1	1,1	0,76	RS-C	
12	12,4	-0,83	-1,1	RS-C	
13	10,7	-1,3	-1,5	RS-C	
14	10,2	-1,4	-1,6	RS-C	
15	12,0	-0,95	-1,2	RS-C	
16	22,0	1,6	1,2	RS-C	
2	12,1	-0,92		VT-R5	

**Methoden:**

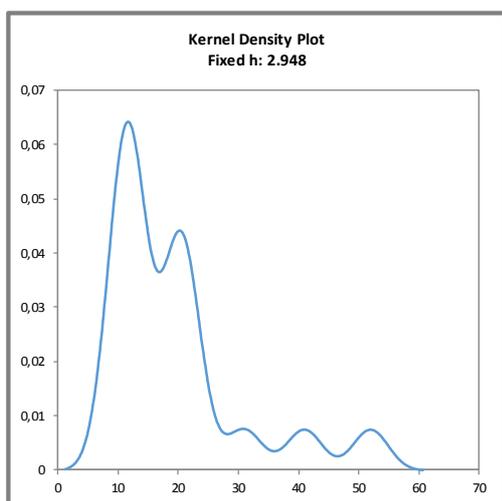
IL = Immunolab

IN = INgezim Gluten Hidrolizado, Ingenasa

RQ = RIDA®QUICK (Lateral Flow), R-Biopharm

RS-C = Ridascreen® competitive, R-Biopharm

VT-R5 = Veratox, Neogen

**Abb. / Fig. 1:**

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

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

**Anmerkung:**

Die Kerndichte-Schätzung zeigt eine zweigipfelige Verteilung der Ergebnisse mit drei Nebenpeaks, die auf Einzelergebnisse oberhalb des Zielbereichs zurückgehen.

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

<b>Kenndaten</b>	<b>Alle Ergebnisse</b> [mg/kg]	<b>Methode RS-C</b> [mg/kg]
Zugewiesener Wert ( $X_{pt}$ )	$X_{pt\_ALL}$	$X_{pt\_METHOD\ RS-C}$
Anzahl der Messergebnisse *	16	13
Anzahl der Ausreißer	-	-
Mittelwert	16,1	17,3
Median	12,8	19,0
<b>Robuster Mittelwert (<math>X_{pt}</math>)</b>	<b>15,7</b>	<b>16,9</b>
<b>Robuste Standardabweichung (<math>S^*</math>)</b>	<b>5,72</b>	<b>5,87</b>
Zielkenndaten:		
<b>Zielstandardabweichung <math>\sigma_{pt}</math></b>	<b>3,93</b>	<b>4,23</b>
<b>Untere Grenze des Zielbereichs</b>	<b>7,86</b>	<b>8,45</b>
<b>Obere Grenze des Zielbereichs</b>	<b>23,6</b>	<b>25,4</b>
Quotient $S^*/\sigma_{pt}$	1,5	1,4
Standardunsicherheit $U(X_{pt})$	1,79	2,04
Ergebnisse im Zielbereich	15	12
Prozent im Zielbereich	94	92

\* ohne Ergebnisse 5 und 10b (vorab ausgeschlossen)

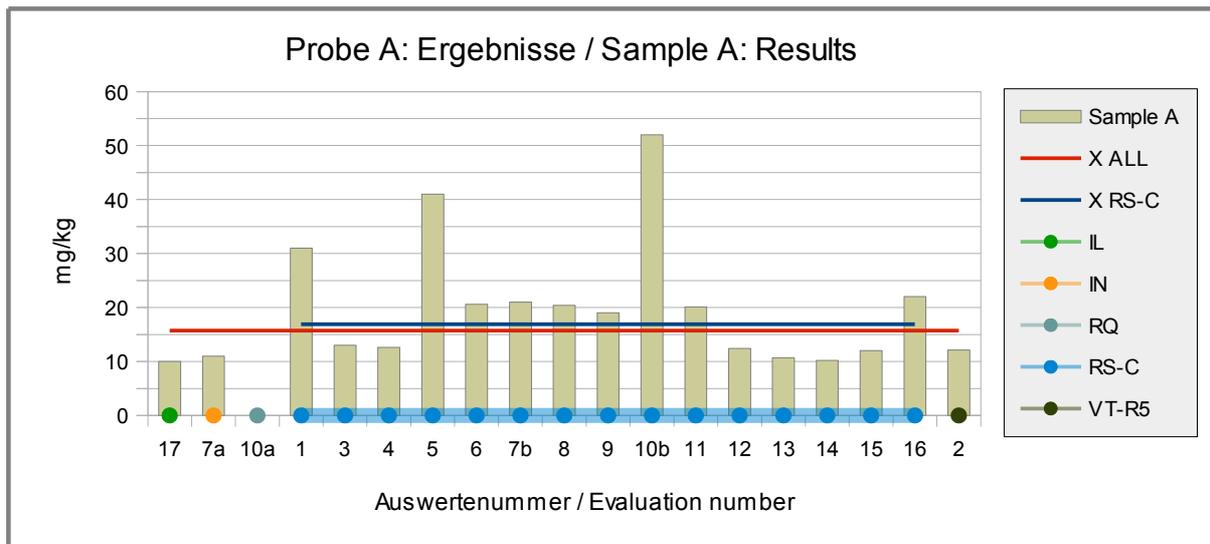
**Methoden:**

RS-C = R-Biopharm, Ridascreen® competitive

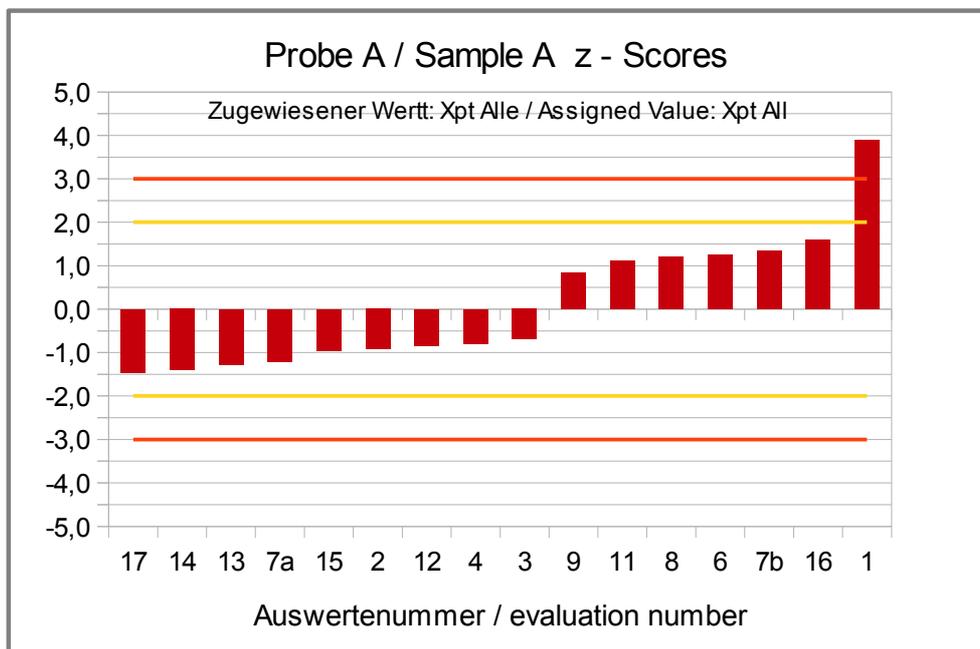
Anmerkungen zu den Kenndaten und Vergleich der Bezugswerte:

Die Kerndichte-Schätzung zeigte keine eindeutigen methodenabhängigen Unterschiede. Der beobachtete zweite Gipfel ist auf ca. die Hälfte der Ergebnisse von Methode RS-C zurückzuführen. Die Ergebnisse der Methode RS-C des ersten Gipfels liegen bei  $11,8 \pm 1,3$  mg/kg ( $n=6$ ) und die des zweiten Gipfels bei  $20,5 \pm 1,1$  mg/kg ( $n=6$ ). Aus den Angaben der Teilnehmer (u.a. Extraktionslösungen, Analysendatum, Standort des Labors) lassen sich keine Ursachen ableiten (s. Dokumentation). Auffällig ist lediglich der Faktor von ca. 2, der der Umrechnung von Gliadin auf Gluten entspricht. Alle Teilnehmer mit einer Ausnahme haben jedoch die Ergebnisse als Gluten in der Ergebnisabgabedatei angegeben. Da die resultierenden statistischen Kenndaten unauffällig waren, wurde trotzdem eine gemeinsame Auswertung der Ergebnisse vorgenommen. Zwei Ausreißer wurden vorab ausgeschlossen.

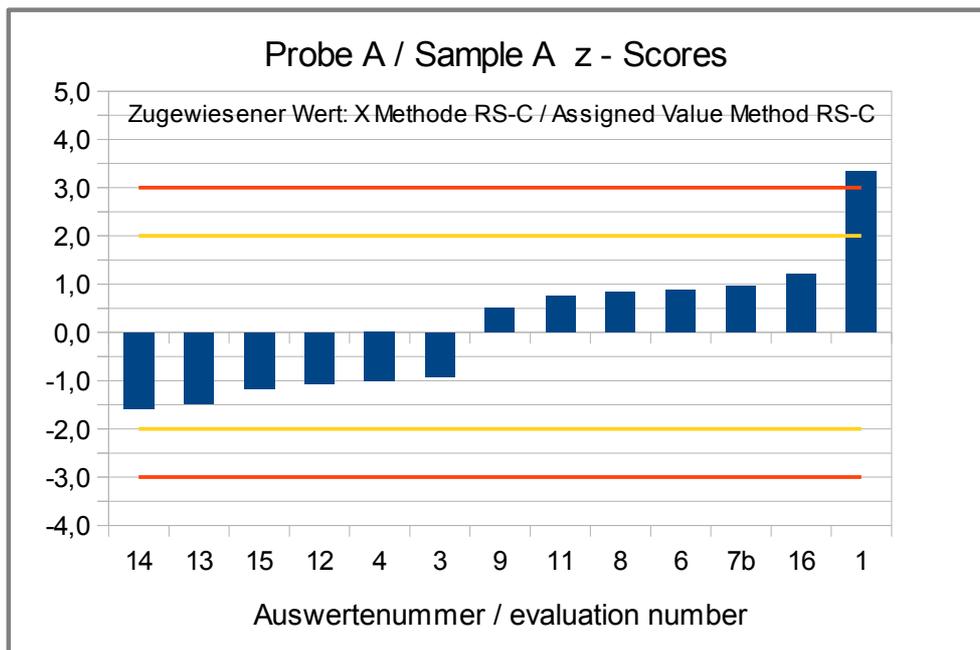
Die Verteilungen der Ergebnisse aller Methoden sowie von Methode RS-C zeigten eine normale Variabilität mit Quotienten  $S^*/\sigma_{pt}$  von  $< 2,0$ . Die robusten Standardabweichungen liegen im Bereich von etablierten Werten für die Wiederhol- und Vergleichsstandardabweichung der eingesetzten Bestimmungsmethoden (vgl. 3.4.2 Auswertung eines Versuchs zur Präzision und 3.4.3 Werte aus Erkenntnissen). Die Vergleichbarkeit der Ergebnisse ist insofern gegeben. Die o.g. Auffälligkeiten der Ergebnisse von Methode RS-C sind zu beachten.



**Abb./Fig. 2:** ELISA-Ergebnisse Gluten  
 rote Linie = robuster Mittelwert aller Ergebnisse  
 blaue Linie = robuster Mittelwert Ergebnisse Methode RS-C  
 runde Symbole = Zuordnung der Methoden (s. Legende)



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



**Abb./Fig. 4:**

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

**4.1.2 PCR-Ergebnisse: Weizen****Qualitative Auswertung der Ergebnisse: Proben A und B**

Auswertenummer	Probe A	Probe A	Probe B	Probe B	Qualitative Bewertung	Methode	Hinweis
	pos/neg	[mg/kg]	pos/neg	[mg/kg]	Übereinstimmungen mit Konsenswerten		
10	-		-			div	

**Methoden:**

div = keine genaue Angabe / andere Methode

Anmerkung:

Ein Teilnehmer hat die Proben A und B versucht mittels PCR zu untersuchen. Es wurde keine amplifizierbare Weizen-DNA erhalten.

## 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: Gluten

Meth. Abk.	Auswertenummer	Datum der Analyse	Ergebnis Probe A		Ergebnis Probe B		NWG / LOD *	BG / LOQ *	MU*	Quantitatives Ergebnis als	Methode
			qualitativ	mg/kg	qualitativ	mg/kg	mg/kg	mg/kg			
		Tag/Monat									Test-Kit + Anbieter
IL	17	22.05.18	positiv	10	positiv	4	0,06	4		Gluten	Immunolab Gliadin/Gluten ELISA
IN	7a	27.6.	positiv	11	negativ	<5	5	5		Gluten	Ingezim Gluten Hidrolizado R.30.HLH.K2/48
RQ	10a	12.06.18	positiv		negativ		6,3			Gluten	RIDA QUICK Gliadin R7003, R-Biopharm
RS-C	1	11.06.18	positiv	31	negativ			10		mg Gluten/kg Lebensmittel	Ridascreen® Gliadin competitive R7021, R- Biopharm
RS-C	3	29.05.18	positiv	13	negativ	< 10		< 10	50	Gluten	Ridascreen® Gliadin competitive R7021, R- Biopharm
RS-C	4	18.05.18	positiv	12,61	negativ	<10	10	10	12,64	Gluten	Ridascreen® Gliadin competitive R7021, R- Biopharm
RS-C	5	26.06.18	positiv	41	negativ	< 10				Gluten	Ridascreen® Gliadin competitive R7021, R- Biopharm
RS-C	6	21.05.18	positiv	20,6	negativ	<10,0					R-Biopharm, R7021
RS-C	7b	4.6.	positiv	21	negativ	<10	10	10		Gluten	Ridascreen® Gliadin competitive R7021, R- Biopharm
RS-C	8	20.06.18	positiv	20,4	negativ		10	10		Gluten	Ridascreen® Gliadin competitive R7021, R- Biopharm
RS-C	9	20.06.18	positiv	19	negativ			10		Gluten	Ridascreen® Gliadin competitive R7021, R- Biopharm
RS-C	10b	12.06.18	-	52	-	< 5	5	10		Gluten	Ridascreen® Gliadin competitive R7021, R- Biopharm
RS-C	11	22.5.18/ 07.06.18	-	20,1	-	< 10	4,6	10		Gluten	Ridascreen® Gliadin competitive R7021, R- Biopharm
RS-C	12	31.05.18	positiv	12,44	negativ	<10		10		Gluten	Ridascreen® Gliadin competitive R7021, R- Biopharm
RS-C	13	31/05	positiv	10,7	negativ	<10,0	10	10		Gluten	Ridascreen® Gliadin competitive R7021, R- Biopharm
RS-C	14	06.06.18	positiv	10,2	negativ	<10,0		10		Gluten	Ridascreen® Gliadin competitive R7021, R- Biopharm
RS-C	15	17.05.18	positiv	12	negativ		10	10	35	Gluten	Ridascreen® Gliadin competitive R7021, R- Biopharm
RS-C	16	17.05.18	positiv	22	negativ		5	10	25	Gluten	Ridascreen® Gliadin competitive R7021, R- Biopharm
VT-R5	2	28.06.18	positiv	12,1	negativ	<5,0	2	3,73	12,9	Gluten	Veratox Gliadin R5, Neogen

\* NWG Nachweisgrenze / BG Bestimmungsgrenze

\* LOD limit of detection / LOQ limit of quantitation

\* MU Messunsicherheit / MU measurement uncertainty

Fortsetzung ELISA Gluten:

Meth. Abk.	Auswertenummer	Spezifität	Hinweise zur Methode (Extraktion und Bestimmung)	Methode akkreditiert ISO/IEC 17025	Sonstige Hinweise
		Antikörper	z.B. Extraktionslösung / Zeit / Temperatur	ja/nein	
IL	17	polyclonal			Probe B minimal über LOQ
IN	7a		lt. Herstellerangaben	Ja	
RQ	10a	R5	Extraktion mit 60% Ethanollösung, die 10 % Fischgelatine enthält, nach Testvorschrift	ja	
RS-C	1	R5	Ethanol		
RS-C	3		laut Manual, mit Fischgelatine	ja	
RS-C	4	nach Testkit-Anleitung	nach Testkit-Anleitung	nein	
RS-C	5	R5	60% Ethanol + Fischgelatine / 20 min / Raumtemperatur	Ja	Laborergebnis
RS-C	6			Ja	leider keine Pulldown-Listen verfügbar
RS-C	7b	monoklonal R5	lt. Herstellerangaben	Ja	
RS-C	8			ja	
RS-C	9			nein	
RS-C	10b	R5	Extraktion mit 60% Ethanollösung, die 10 % Fischgelatine enthält, nach Testvorschrift	ja	
RS-C	11	monoklonaler R5	nach Herstellerangaben	ja	
RS-C	12			Ja	
RS-C	13			nein	
RS-C	14				
RS-C	15	monoklonaler Antikörper R5	gemäß Handbuch	Ja	
RS-C	16	R5	ETOH 60% +Fischgelatine /10min/22°C		
VT-R5	2	R5	0,25 g + 2,5 mL renaturierende Cocktail-Lösung (w/Extraktionsadditiv); Incubation bei 50°C, 40 min; Endvolumen 10 mL; Verdünnung 1:12,5.	nein	Messung & Auswertung mit ELISA Reader Neogen Stat Fax 4700

**5.1.3 PCR: Weizen**

Meth. Abk.	Auswertenummer	Datum der Analyse	Ergebnis Probe A		Ergebnis Probe B		NWG / LOD *	BG / LOQ *	MU*	Quantitatives Ergebnis als	Methode
			qualitativ	mg/kg	qualitativ	mg/kg	mg/kg	mg/kg	%		
div	10	25.05.18	-		-					Weizen-DNA	Test-Kit + Anbieter Alary et al. 2002, Cereal Chem. 79: 553-558

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

Meth. Abk.	Auswertenummer	Spezifität	Hinweise zur Methode (Extraktion und Bestimmung)	Methode akkreditiert ISO/IEC 17025	Sonstige Hinweise
		Target-Sequenz / -DNA	z.B. Extraktion / Enzyme / Clean-Up / Real Time PCR / Gelelektrophorese / Cyclen	ja/nein	
div	10	Lipid-Transfer-Protein-Gen (Ltp)	CTAB Präzipitation, QIAgen PCR Purification Kit	nein	mit der vorhandenen Analytik war keine amplifizierbare DNA isolierbar, Aussage, ob Probe Bestandteile aus Weizen enthält, nicht möglich

**5.2 Informationen zur Eignungsprüfung (EP)**

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

EP-Nummer	<b>DLA 10-2018</b>
EP-Name	<b>Allergene X: Gluten in „glutenfreiem“ Bier</b>
Probenmatrix (Prozessierung)	<b>Proben A + B:</b> Zutaten: Wasser, Reissirup, Hopfen und eine Probe A oder B zusätzlich Gersten- und Weizenmalz
Probenzahl und Probenmenge	2 unterschiedliche Proben A + B: je 50 ml
Lagerungsinformation	<b>Bei Ankunft die Proben bitte kühl lagern (2 - 10°C)</b>
Verwendungszweck	Ausschließlich für Laboruntersuchungen (Qualitätskontrollproben)
Parameter	qualitativ + quantitativ: Gluten Proben A + B: < 500 mg/kg
Untersuchungsmethoden	Methode ist freigestellt
Hinweis zur Analyse	Die Untersuchung der Eignungsprüfung soll entsprechend einer laborüblichen Routineanalyse vorgenommen werden. <b>Vor der Analyse empfehlen wir, die Bierproben durch vorsichtiges Umschwenken zu homogenisieren.</b>
Ergebnisangabe	Es werden für jede Probe A und B je ein Ergebnis ermittelt. Die Einzelergebnisse sind in die Ergebnisabgabe-Datei einzutragen.
Einheiten	mg/kg
Anzahl von Stellen	mindestens 2 signifikante Stellen
Ergebnisabgabe	Die Ergebnisabgabe-Datei wird per eMail übermittelt an: <b>pt@dla-lvu.de</b>
Abgabetermin	<b>spätestens 29. Juni 2018</b>
Auswertebericht	Der Auswertebericht wird voraussichtlich 6 Wochen nach Abgabetermin der Ergebnisse fertiggestellt und per eMail als PDF-Datei zugesandt.
Koordinator und Ansprechpartner der EP	Dr. Matthias Besler-Scharf

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

## 6. Verzeichnis der Teilnehmer in alphabetischer Reihenfolge

Teilnehmer / Participant	Ort / Town	Land / Country
		ITALIEN
		Deutschland
		CANADA
		Deutschland
		Deutschland
		Deutschland
		ARGENTINIEN
		GROSSBRITANNIEN
		Deutschland
		FRANKREICH
		SPANIEN
		CANADA
		Deutschland

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

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

## 7. Verzeichnis relevanter Literatur

1. DIN EN ISO/IEC 17025:2005; Allgemeine Anforderungen an die Kompetenz von Prüf- und Kalibrierlaboratorien / General requirements for the competence of testing and calibration laboratories
2. DIN EN ISO/IEC 17043:2010; Konformitätsbewertung - Allgemeine Anforderungen an Eignungsprüfungen / Conformity assessment - General requirements for proficiency testing
3. ISO 13528:2015 & DIN ISO 13528:2009; Statistische Verfahren für Eignungsprüfungen durch Ringversuche / Statistical methods for use in proficiency testing by interlaboratory comparisons
4. ASU §64 LFGB: Planung und statistische Auswertung von Ringversuchen zur 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 purposes<sup>1</sup>, EFSA Panel on Dietetic Products, Nutrition and Allergies (NDA), European Food Safety Authority (EFSA), Parma, Italy, EFSA Journal 2014;12(11):3894
27. IRMM, Poms et al.; Inter-laboratory validation study of five different commercial ELISA test kits for determination of peanut residues in cookie and dark chocolate; European Commission, Joint Research Centre, Belgium; GE/R/FSQ/D08/05/2004
28. Jayasena et al. (2015) Comparison of six commercial ELISA kits for their specificity and sensitivity in detecting different major peanut allergens. J Agric Food Chem. 2015 Feb 18;63(6):1849-55
29. Lacorn & Weiss (2015) Partially Hydrolyzed Gluten in Fermented Cereal-Based Products by R5 Competitive ELISA: Collaborative Study, First Action 2015.05. J AOAC Int 98(5):1346-54.
30. Panda et al. (2015) Detection and Quantification of Gluten during the Brewing and Fermentation of Beer Using Antibody-Based Technologies. J Food Prot. 78(6):1167-77.
31. Colgrave et al. (2014) Using mass spectrometry to detect hydrolysed gluten in beer that is responsible for false negatives by ELISA. J Chromatogr A 1370:105-14.

**DLA 10/2018 - Allergene X**

Alle 17 Teilnehmer haben mindestens ein Ergebnis eingereicht. Die Auswertung erfolgte hinsichtlich des Parameters Gluten in 2 unterschiedlichen Bierproben, wovon eine gluten-haltigem Bier dotiert wurde.

Die Ergebnisse wurden qualitativ und quantitativ ausgewertet. Details inklusive separater Auswertung nach Testkit-Herstellern sind dem Auswertebereicht zu entnehmen.

4 Teilnehmer hatten ihren Sitz im Europäischen Ausland (Frankreich, Großbritannien, Italien, Spanien) und sowie 3 Teilnehmer in Kanada und Argentinien.