

Proficiency Tests

DLA

food
cosmetics
consumer goods
www.dla-lvu.de

Auswertungs-Bericht

Laborvergleichsuntersuchung

DLA 14/2018

Response PT Haselnuss:

**5 prozessierte Proben Haselnuss
(ungeröstet), Nussmus (geröstet),
Nuss-Schokocreme, Nuss-Nougat
und Nuss-Krokant**

in Kartoffelpulver-Matrix

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

proficiency-testing@dla-lvu.de www.dla-lvu.de

Koordinator der LVU:
Dr. Matthias Besler-Scharf

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

<p><i>EP-Anbieter PT-Provider</i></p>	<p>DLA - Dienstleistung Lebensmittel Analytik GbR Gesellschafter: Dr. Matthias Besler-Scharf und Alexandra Scharf MSc.</p> <p>Waldemar-Bonsels-Weg 170, 22926 Ahrensburg, Germany</p> <p>Tel. ++49-(0)4532-9183358 Mob. ++49(0)171-1954375 Fax. ++49(0)4102-9944976 eMail. proficiency-testing@dla-lvu.de</p>
<p><i>EP-Nummer PT-Number</i></p>	<p>DLA 14/2018</p>
<p><i>EP-Koordinator PT-Coordinator</i></p>	<p>Dr. Matthias Besler-Scharf</p>
<p><i>Status des EP-Bericht Status of PT-Report</i></p>	<p>Abschlussbericht / Final report (14. Mai 2019)</p> <p>Gültig ist die jeweils letzte Version/Korrektur des Berichts. Sie ersetzt alle vorangegangenen Versionen. Only the latest version/correction of the report is valid. It replaces all preceding versions.</p>
<p><i>EP-Bericht Freigabe PT-Report Authorization</i></p>	<p>Dr. Matthias Besler-Scharf (Technischer Leiter / Technical Manager) - <i>gezeichnet / signed M. Besler-Scharf</i> Alexandra Scharf MSc. (QM-Beauftragte / Quality Manager) - <i>gezeichnet / signed A. Scharf</i> Datum / Date: 14. Mai 2019</p>
<p><i>Unteraufträge 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 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.....	5
2.1 Untersuchungsmaterial.....	5
2.1.1 Homogenität.....	7
2.1.2 Stabilität.....	7
2.2 Probenversand und Informationen zur Untersuchung.....	8
2.3 Ergebnisübermittlung.....	8
3. Auswertung.....	9
3.1 Qualitativer Score.....	10
3.2 Wiederfindungs-Score (WFR-Score).....	10
3.2.1 Wiederfindungsraten eines Versuchs zur Präzision	11
3.2.2 Werte aus Erkenntnissen	13
4. Ergebnisse.....	14
4.1 Vergleichsuntersuchung prozessierte Haselnussprodukte. . .	15
4.1.1 Qualitative Scores: ELISA-Methoden.....	15
4.1.2 Qualitative Scores: PCR-Methoden.....	16
4.1.3 Qualitative Scores: LC/MS-Methoden.....	16
4.1.4 Quantitativ: ELISA-Methoden Wiederfindungs-Scores (WFR-Scores).....	17
4.1.5 Quantitativ: PCR-Methoden Wiederfindungs-Scores (WFR-Scores).....	18
4.1.6 Quantitativ: LC/MS-Methoden Wiederfindungs-Scores (WFR-Scores).....	19
5. Dokumentation.....	22
5.1 Angaben der Teilnehmer.....	22
5.1.1 ELISA-Methoden.....	22
5.1.2 PCR-Methoden.....	24
5.1.3 LC/MS-Methoden.....	25
5.2 Homogenität.....	26
5.2.1 Mischungshomogenität vor der Abfüllung.....	26
5.3 Informationen zur Eignungsprüfung (EP).....	29
6. Verzeichnis der Teilnehmer in alphabetischer Reihenfolge. . . .	30
7. Verzeichnis relevanter Literatur.....	31

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].

Das vorliegende Eignungsprüfungs-Format „**Response PT - Allergene**“ bietet die Möglichkeit anhand von jeweils 5 unterschiedlich prozessierten Produkten eines Allergens in einfacher Trägermatrix sowie einer „Nullprobe“ nachzuweisen, dass mit der analytischen Bestimmungsmethode des teilnehmenden Labors die betreffenden prozessierten Allergene qualitativ erfasst werden können und quantitative Response-Faktoren für die jeweiligen prozessierten Produkte zu ermitteln.

Um eine Vergleichbarkeit der prozessierten Produkte zu gewährleisten werden die Allergen-Konzentrationen der PT-Probenreihe als Haselnuss-Gehalt auf ein annähernd gleiches Niveau eingestellt. Die Auswertung der PT-Ergebnisse erfolgt qualitativ in Scores von 1-5 (Score 5 = alle Prozessierungen erfolgreich erfasst). Quantitative Ergebnisse werden unter Angabe der erzielten Wiederfindungsrate informativ mit einem Wiederfindungs-Score im Bericht angegeben.

2. Durchführung

2.1 Untersuchungsmaterial

Zur Untersuchung wurden sechs LVU-Proben für den qualitativen Nachweis und ggf. die quantitative Bestimmung von Haselnuss in ungerösteten und gerösteten Haselnüssen, Krokant, Nuss-Schoko-Creme und Nougat in Kartoffelpulver/Maltodextrin zur Verfügung gestellt.

Die jeweiligen Rohstoffe für die Probenreihe waren handelsübliche teils prozessierte Haselnussprodukte. Pro PT-Probe wurden jeweils 5-10 Produkte unterschiedlicher Herkunft verarbeitet.

Es wurden Vormischungen mit Gehalten von ca. 1,0-10 % der betreffenden allergenen Zutaten hergestellt (s. Tab. 1). Hierzu wurden die Produkte ggf. vorzerkleinert, gravimetrisch gemischt, homogenisiert und gesiebt (mesh 400-600 μm). Anschließend wurden die Rohstoffe mit weiteren Zutaten versetzt und mittels Kugelmühle weiter zerkleinert und homogenisiert. Die Allergen-Vormischungen wurden anschließend zur Trägermatrix Kartoffelpulver / Maltodextrin (mesh < 500 μm) gegeben und homogenisiert. Ein Aliquot der Trägermatrix wurde als „Null“-Probe abgenommen.

Die 6 PT-Proben wurden zu Portionen von ca. 20 g in metallisierte PET-Folienbeutel abgefüllt.

Die Haselnuss-Gehalte der PT-Probenreihe lagen im Bereich von 50 bis 54 mg/kg (s. Tabelle 1).

Jeder zugewiesene Wert, hier die dotierten Allergen-Gehalte, sind mit einer Standardunsicherheit behaftet. Als Unsicherheiten wurden u.a. folgende Faktoren berücksichtigt: Proteingehalt des Dotierungsmaterials, Mischungshomogenität, Homogenität und Stabilität von Haselnussprotein. Alle Unsicherheitsbeiträge wurden in Form von Standardabweichungen ausgedrückt und als Varianzen addiert. Die Wurzel aus der Summe der Gesamtvarianzen ergibt die kombinierte Unsicherheit "Uc", die mit dem Erweiterungsfaktor k=2 multipliziert die erweiterte Unsicherheit der zugewiesenen Werte " $U(X_{pt})$ " ergibt [3, 13, 16 - 17].

Tabelle 1: Zusammensetzung der DLA-Proben

PT-Probenreihe	Probe 1 Haselnuss ungeröstet	Probe 2 Haselnuss geröstet	Probe 3 Krokant	Probe 4 Nuss- Schoko- Creme	Probe 5 Nougat	Probe 6 „Null“
Zutaten	g/100 g	g/100g	g/100g	g/100g	g/100g	g/100g
Kartoffelpulver Zutaten: Kartoffeln, E471, E304, E223, E100 Nährwertangaben pro 100 g: Protein 8,3 g, Kohlenhydrate 76 g, Fett 0,6 g, Salz 0,15 g	75	75	75	75	75	75
Maltodextrin	25	25	25	25	25	25
Allergen-Vormischungen Zutaten: Maltodextrin (75% - 92%), Natriumsulfat (< 6%), Siliciumdioxid (< 3,0%), prozessierte Allergenprodukte (je 1,0% - 10% Haselnuss)	0,051	0,054	0,11	0,50	0,16	-
Allergen-Gehalte	mg/kg	mg/kg	mg/kg	mg/kg	mg/kg	mg/kg
Haselnuss, ungeröstet* Protein 13,0 % ** (10 Produkte, Europa)	50,4	-	-	-	-	-
Haselnuss, geröstet* Protein 14,1 % ** (10 Produkte, Europa)	-	53,7	-	-	-	-
Krokant* (20% Haselnuss und Zucker/Glucose) Protein 3,8 % ** (5 Produkte, Europa)	-	-	53,6	-	-	-
Nuss-Schoko-Creme* (12% Haselnuss und weitere Zutaten) Gesamtprotein 5,4 % *** (7 Produkte, Europa)	-	-	-	51,0	-	-
Nougat* (33% Haselnuss und weitere Zutaten) Gesamtprotein 6,7 % *** (6 Produkte, Europa)	-	-	-	-	53,2	-
- als Haselnuss	50,4	53,7	53,6	51,0	53,2	-
erweiterte kombinierte Unsicherheit (k=2) des Haselnuss-Gehalts (= ± 11 %)	± 5,54	± 5,91	± 5,90	± 5,61	± 5,85	-

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

** Proteingehalt gemäß Laboranalyse der Rohstoffmischungen bezogen (Gesamtstickstoff nach Kjeldahl mit F=5,30 für Haselnussprotein)

*** Proteingehalt berechnet gemäß Deklaration der Produkte (neben Haselnuss sind weitere Proteinquellen enthalten)

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

2.1.1 Homogenität

Die **Mischungshomogenität vor der Abfüllung** wurde in 8-fach Bestimmung mittels **Microtracer-Analyse** untersucht. Es handelt sich um eine normierte Methode, die Bestandteil des internationalen GMP-Zertifizierungssystems für Futtermittel ist [14]. Vor der Mischung werden mit Farbstoff beschichtete Eisenpartikel in μm -Größe zur Probe gegeben und die Partikelzahl wird nach der Homogenisierung in entnommenen Aliquoten bestimmt. Die Bewertung der Mischungshomogenität erfolgt auf Grundlage der Poissonverteilung anhand des chi-Quadrat-Tests. Eine Wahrscheinlichkeit von $\geq 5\%$ ist gleichzusetzen mit einer guten homogenen Mischung und von $\geq 25\%$ mit einer exzellenten Mischung [14, 15].

Die Microtracer-Analyse der vorliegenden LVU-Proben 1-5 hat eine Wahrscheinlichkeit von 47%, 94%, 83%, 29% bzw. 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 wurden HorRat-Werte von 1,2, 0,7, 0,9, 1,2 bzw. 0,4 erhalten. Die Ergebnisse der Microtracer-Analyse sind in der Dokumentation angegeben.

2.1.2 Stabilität

Eine Wasseraktivität (a_w) von $< 0,5$ ist ein wichtiger Faktor um die Stabilität von trockenen und getrockneten Produkten während der Lagerung zu gewährleisten, optimale Bedingung für die Lagerung ist der a_w -Wert-Bereich von 0,15 - 0,3, in diesem Bereich ist die geringstmögliche Degradationsrate zu erwarten [16].

Die Erfahrungen mit diversen DLA-Materialien zeigen bei vergleichbarer Matrix und Wasseraktivität (a_w -Wert $< 0,5$) eine gute Haltbarkeit der EP-Proben und Lagerstabilität gegenüber mikrobiellem Verderb und bezüglich des Gehalts an den EP-Parametern.

Der a_w -Wert der EP-Proben lag bei ca. 0,31 (20,1°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 48. Kalenderwoche 2018 je eine Portion der Untersuchungsmaterialien Proben 1 bis 6 verschickt. Die Untersuchungsverfahren wurden freigestellt. Die Untersuchungen waren durchzuführen bis spätestens 11. Januar 2019.

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

Es handelt sich um fünf unterschiedliche Proben mit ähnlichen Gehalten an dem unterschiedlich prozessierten allergenen Parameter Haselnuss in einfacher Trägermatrix sowie eine „Null“-Probe (Trägermatrix).

- *Die Proben 1-5 sind in zufälliger Reihenfolge nummeriert und enthalten Haselnuss (ungeröstet), Nussmus (geröstet), Nuss-Schokocreme, Nuss-Nougat und Nuss-Krokant.*
- *Bitte geben Sie alle quantitativen Ergebnisse als Gesamt-Haselnuss, soweit möglich unter Angabe des zugrundeliegenden Gehalts an Gesamt-Protein in Haselnuss an. Mögliche Umrechnungsfaktoren auf die prozessierten Haselnussprodukte werden separat in der Ergebnisabgabedatei abgefragt.*

Bitte beachten Sie die beiliegenden Informationen zur Eignungsprüfung. (siehe Dokumentation unter Punkt 5.3 EP-Informationen)

2.3 Ergebnisübermittlung

Die Ergebnisabgabe erfolgte einheitlich auf, an die Teilnehmer versandten Übermittlungsbögen bzw. -dateien. 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.

Abgefragt und dokumentiert wurden die o.g. Ergebnisse sowie Angaben zu den Testmethoden wie Spezifitäten, 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 11 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 [26-29, 40]. Darüber hinaus können Matrix- und/oder Prozessierung die Nachweisbarkeit von Allergenen sowohl mittels ELISA- als auch mittels PCR-Verfahren stark beeinflussen.

In der vorliegenden LVU wurden von dem Allergen Haselnuss fünf verschiedenartig prozessierte Produkte, *Haselnuss (ungeröstet)*, *Nussmus (geröstet)*, *Nuss-Schokocreme*, *Nuss-Nougat* und *Nuss-Krokant* zur Verfügung gestellt, um die qualitative Nachweisbarkeit und die Response in der quantitativen Bestimmung der eingesetzten Methoden ermitteln zu können.

Die Teilnehmer-Ergebnisse werden *qualitativ* mit einem Score von 1-5 bewertet, der angibt wie viele prozessierte Produkte erfolgreich erfasst wurden.

Die quantitativen Teilnehmer-Ergebnisse werden mit einem Wiederfindungs-Score (*WFR-Score*) bewertet, der angibt wie viele Ergebnisse im Bereich einer Wiederfindungsrate von 50 - 150% des Dotierungs-Levels liegen.

3.1 Qualitativer Score

Die qualitative Bewertung der Ergebnisse jedes Teilnehmers erfolgt mit Scores von 1 - 5 anhand der Anzahl der Übereinstimmungen der Angaben „positiv“ oder „negativ“ mit den **Dotierungen der LVU-Probenreihe** (siehe Tab. 2). Ein Score von 5 bedeutet, dass alle prozessierten Produkte erfolgreich erfasst wurden.

Die Ergebnisse der Matrixprobe 6 („Null“-Probe) werden nicht bewertet, sofern das betreffende Teilnehmerergebnis in Übereinstimmung mit $\geq 75\%$ positiver oder negativer Ergebnisse der Teilnehmer steht (Konsenswert) oder das Ergebnis unterhalb der Bestimmungsgrenze der eingesetzten Methode liegt.

Tabelle 2: Bewertung der Ergebnisse anhand von qualitativen Scores

Probe 1 Haselnuss, ungeröstet	Probe 2 Haselnuss, geröstet	Probe 3 Krokant	Probe 4 Nuss- Schoko- Creme	Probe 5 Nougat	Probe 6 „Null“	Score qualitativ	Eignung qualitativ
pos/neg	pos/neg	pos/neg	pos/neg	pos/neg	pos/neg	Anzahl erfasster Proben 1 - 5	
negativ	negativ	negativ	negativ	negativ	negativ	0 (0%)	nicht erfolgreich
negativ	negativ	negativ	negativ	positiv	negativ	1 (20%)	1 Produktgruppe
negativ	negativ	negativ	positiv	positiv	negativ	2 (40%)	2 Produktgruppen
negativ	negativ	positiv	positiv	positiv	negativ	3 (60%)	3 Produktgruppen
negativ	positiv	positiv	positiv	positiv	negativ	4 (80%)	4 Produktgruppen
positiv	positiv	positiv	positiv	positiv	negativ	5 (100%)	5 Produktgruppen

3.2 Wiederfindungs-Score (WFR-Score)

Die Bewertung der quantitativen Ergebnisse jedes Teilnehmers für die **dotierten LVU-Proben** erfolgt anhand der Anzahl von Wiederfindungsraten im Akzeptanzbereich und anhand von Wiederfindungs-Scores (*WFR-Scores*). Die Angabe der WFR-Scores wird als Anzahl von Ergebnissen im Akzeptanzbereich (s.u.) pro Anzahl quantitativ bestimmter Proben vorgenommen. Dahinter wird in Klammern der entsprechende Prozentsatz angegeben.

Die Wiederfindungsraten werden in Bezug auf das jeweilige zugesetzte prozessierte Allergen (Zusatzniveau) berechnet. Die Bezugswerte ergeben sich aus den unter 2.1 Untersuchungsmaterial in Tabelle 1 angegebenen Gehalten der Proben 1 bis 5. 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 [21]. Für quantitative PCR-Bestimmungen sowie LC/MS wird ebenfalls dieser Akzeptanzbereich herangezogen.

Es werden nur exakte quantitative Angaben berücksichtigt. Einzelergebnisse die außerhalb des angegebenen Messbereiches liegen (z.B. mit der Angabe > 25 mg/kg oder $< 2,5$ mg/kg) oder die Angabe „0“ werden nicht berücksichtigt.

Die angegebenen Wiederfindungsraten dienen u.a. einer Einschätzung von Prozessierungseinflüssen.

3.2.1 Wiederfindungsraten eines Versuchs zur Präzision

In Ringversuchen der ASU §64 Methoden wurden abhängig von Matrix bzw. Prozessierung und Konzentrationsbereich Wiederfindungsraten im Bereich von 57 - 119% für die ELISA-Methoden und 43 - 121% für die PCR-Methoden erhalten (s. Tab. 3a und 3b). Die angegebenen Zielstandardabweichungen σ_{pt} wurden für eine Anzahl von $m = 2$ Wiederholmessungen berechnet.

Tabelle 3a: ELISA-Methoden - Wiederfindungsraten und Präzisionsdaten ausgewählter Auswertungen von Versuchen zur Präzision [33-34]

Parameter	Matrix	Mittelwerte [mg/kg]	Wiederfindung	rob RSD _r	RSD _r	RSD _R	opt	Methode / Literatur
Erdnuss	Vollmilchschokolade	173,7	87 %	-	8,8%	31%	30,4%	ELISA Herst. A ASU 00.00-69
		33,8	85 %	-	5,2%	20%	19,7%	
		5,9	59 %	-	7,8%	31%	30,5%	
Erdnuss	Vollmilchschokolade	215,7	108 %	-	5,9%	32%	31,7%	ELISA Herst. B ASU 00.00-69
		40,1	100 %	-	7,2%	14%	13,0%	
		10,1	101 %	-	7,3%	16%	15,1%	
Erdnuss	Feinherbschokolade	148,2	74 %	-	6,0%	22%	21,6%	ELISA Herst. A ASU 00.00-69
		30,9	77 %	-	13%	25%	23,2%	
		5,7	57 %	-	6,1%	33%	32,7%	
Haselnuss	Feinherbschokolade	16,3	81 %	-	4,7%	12%	11,5%	ELISA Herst. A ASU 44.00-7
		7,56	76 %	-	8,9%	15%	13,6%	
		3,73	75 %	-	13%	24%	22,2%	
		1,62	81 %	-	15%	33%	31,2%	
Haselnuss	Feinherbschokolade	21,3	106 %	-	7,1%	14%	13,1%	ELISA Herst. B ASU 44.00-7
		10,7	107 %	-	11%	19%	17,3%	
		4,69	94 %	-	11%	17%	15,1%	
		2,37	119 %	-	9,3%	17%	16,4%	

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 [30]. 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 [30].

Das IRMM (Institute for Reference Materials and Measurements) hat in einem Ringversuch die Eignung fünf verschiedener ELISA-Test-Kits zur Bestimmung von Erdnuss getestet [33]. Die Mittelwerte lagen im Konzentrationsbereich von 0,3 - 16,1 mg/kg bzw. 1,2 - 20,4 mg/kg. Die jeweils niedrigsten relativen Vergleichsstandardabweichungen der fünf Test-Kits lagen für die Matrix Bitterschokolade bei 20 - 42% und für Kekse bei 23 - 61%.

Tabelle 3b: PCR-Methoden - Relative Wiederholstandardabweichungen (RSD_r) und relative Vergleichsstandardabweichungen (RSD_R) gemäß ausgewählter Auswertungen von Versuchen zur Präzision und die resultierende Zielstandardabweichung σ_{pt} [35-37]

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

3.2.2 Werte aus Erkenntnissen

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 [25], von der Arbeitsgruppe 12 „Lebensmittelallergene“ des Technischen Komitees CEN/TC 275 [22-24], von einer internationalen "Food Allergen Working Group" unter der Leitung der AOAC Presidential Task Force on Food Allergens [26] und vom Codex Alimentarius Committee (CAC/GL 74-2010) [21] erarbeitet worden.

Die hier relevanten ELISA- bzw. PCR-Validierungskriterien der Gremien sind in den Tabellen 4 und 5 angegeben.

Tabelle 4: ELISA-Validierungskriterien

Literatur [21-26]	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 5: PCR-Validierungskriterien

Literatur [20]	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 i.d.R. eine relative Zielstandardabweichung σ_{pt} Wert von 25% und für die Wiederfindungsrate entsprechend 50-150% fest.

4. Ergebnisse

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

Es erfolgte eine getrennte Auswertung von ELISA-, PCR- und LC/MS-Methoden.

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.

Die **Vergleichbarkeit der quantitativen Ergebnisangaben** war gegeben, da alle ELISA-, PCR- und LC/MS-Ergebnisse als Haselnuss angegeben waren. Eine Umrechnung der Ergebnisse war nicht erforderlich.

Die qualitativen Ergebnisse und deren Bewertung werden in tabellarischer Form folgendermaßen aufgeführt:

Auswertenummer	Probe 1	Probe 2	Probe 3	Probe 4	Probe 5	Probe 6 „Null“	Score qualitativ	Methode	Hinweis
	pos/neg	pos/neg	pos/neg	pos/neg	pos/neg	pos/neg	Anzahl erfasster Proben 1 - 5		

Die quantitativen Ergebnisse und deren Bewertung werden in tabellarischer Form folgendermaßen aufgeführt:

Auswertenummer	Probe 1		Probe 2		Probe 3		Probe 4		Probe 5		WFR-Score	Methode	Hinweis
	Ergebnis	WFR *	Ergebnis	WFR *	Ergebnis	WFR *	Ergebnis	WFR *	Ergebnis	WFR *			
	[mg/kg]	[%]	[mg/kg]	[%]	[mg/kg]	[%]	[mg/kg]	[%]	[mg/kg]	[%]	Anzahl im AB**		

* Wiederfindungsrate

4.1 Vergleichsuntersuchung prozessierte Haselnussprodukte

4.1.1 Qualitative Scores: ELISA-Methoden

Auswertenummer	Probe 1 Haselnuss, ungeröstet	Probe 2 Haselnuss, geröstet	Probe 3 Krokant	Probe 4 Schoko- Creme	Probe 5 Nougat	Probe 6 „Null“	Score qualitativ	Methode	Hinweis
	pos/neg	pos/neg	pos/neg	pos/neg	pos/neg	pos/neg	Anzahl erfasster Proben 1-5		
10	positiv	positiv	positiv	positiv	positiv	negativ	5 (100%)	AQ	
1	positiv	positiv	positiv	positiv	positiv	negativ	5 (100%)	BF	
6a	positiv	positiv	positiv	positiv	positiv	negativ	5 (100%)	EF	
8	positiv	positiv	positiv	positiv	positiv	negativ	5 (100%)	ES	
11	positiv	positiv	positiv	positiv	positiv	negativ	5 (100%)	IL	
5	positiv	positiv	positiv	positiv	positiv	negativ	5 (100%)	RS-F	
6b	positiv	positiv	positiv	positiv	positiv	negativ	5 (100%)	RS-F	
7	positiv	positiv	positiv	positiv	positiv	negativ	5 (100%)	RS-F	
4	positiv	positiv	positiv	positiv	positiv	negativ	5 (100%)	VT	

	Probe 1	Probe 2	Probe 3	Probe 4	Probe 5	Probe 6
Anzahl positiv	9	9	9	9	9	0
Anzahl negativ	0	0	0	0	0	9
Prozent positiv	100	100	100	100	100	0
Prozent negativ	0	0	0	0	0	100
Konsenswert	positiv	positiv	positiv	positiv	positiv	negativ
Dotierung	positiv	positiv	positiv	positiv	positiv	negativ

Methoden:

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

Anmerkung:

Für alle prozessierten Produkte (Proben 1 bis 5) wurden mittels ELISA-Methoden Konsenswerte von 100% positiven Ergebnissen erhalten.

4.1.2 Qualitative Scores: PCR-Methoden

Auswertenummer	Probe 1 Haselnuss, ungeröstet	Probe 2 Haselnuss, geröstet	Probe 3 Krokant	Probe 4 Nuss- Schoko- Creme	Probe 5 Nougat	Probe 6 „Null“	Score qualitativ	Methode	Hinweis
	pos/neg	pos/neg	pos/neg	pos/neg	pos/neg	pos/neg	Anzahl erfasster Proben 1-5		
7	positiv	positiv	negativ	positiv	positiv	negativ	4 (80%)	ASU	
8	positiv	positiv	positiv	positiv	positiv	negativ	5 (100%)	ASU	
3a	positiv	positiv	positiv	positiv	positiv	negativ	5 (100%)	SFA	
3b	positiv	positiv	positiv	positiv	positiv	negativ	5 (100%)	SFA	
6	positiv	positiv	positiv	positiv	positiv	negativ	5 (100%)	SFA	
9	positiv	positiv	positiv	positiv	positiv	negativ	5 (100%)	SFA	

	Probe 1	Probe 2	Probe 3	Probe 4	Probe 5	Probe 6
Anzahl positiv	6	6	5	6	6	0
Anzahl negativ	0	0	1	0	0	6
Prozent positiv	100	100	83	100	100	0
Prozent negativ	0	0	17	0	0	100
Konsenswert	positiv	positiv	positiv	positiv	positiv	negativ
Dotierung	positiv	positiv	positiv	positiv	positiv	negativ

Methoden:

ASU = ASU §64 Methode/method

SFA = Sure Food Allergen, R-Biopharm / Congen

Anmerkung:

Für die prozessierten Produkte der Proben 1, 2, 4 und 5 wurden Konsenswerte von 100% positiven Ergebnissen mittels PCR-Methoden erhalten. Für Probe 3 (Krokant) wurde ein negatives Ergebnis mit einer ASU-Methode erhalten, der Konsenswert lag entsprechend bei 83% positiven Ergebnissen.

4.1.3 Qualitative Scores: LC/MS-Methoden

Auswertenummer	Probe 1 Haselnuss, ungeröstet	Probe 2 Haselnuss, geröstet	Probe 3 Krokant	Probe 4 Nuss- Schoko- Creme	Probe 5 Nougat	Probe 6 „Null“	Score qualitativ	Methode	Hinweis
	pos/neg	pos/neg	pos/neg	pos/neg	pos/neg	pos/neg	Anzahl erfasster Proben 1-5		
2	positiv	positiv	positiv	positiv	positiv	negativ	5 (100%)	LC/MS	

	Probe 1	Probe 2	Probe 3	Probe 4	Probe 5	Probe 6
Dotierung	positiv	positiv	positiv	positiv	positiv	negativ

Methoden:

LC/MS = Flüssigchromatographie /

Massenspektrometrie

Anmerkung:

Alle prozessierten Produkte (Proben 1 bis 5) wurden von einem Teilnehmer mittels der LC/MS-Methode als positiv nachgewiesen.

4.1.4 Quantitativ: ELISA-Methoden Wiederfindungs-Scores (WFR-Scores)

Auswertenummer	Probe 1 Haselnuss, ungeröstet		Probe 2 Haselnuss, geröstet		Probe 3 Krokant		Probe 4 Nuss-Schoko-Creme		Probe 5 Nougat		WFR-Score	Methode	Hinweis	
	Ergebnis	WFR *	Ergebnis	WFR *	Ergebnis	WFR *	Ergebnis	WFR *	Ergebnis	WFR *	WFR *			
	[mg/kg]	[%]	[mg/kg]	[%]	[mg/kg]	[%]	[mg/kg]	[%]	[mg/kg]	[%]	Anzahl in AB**			
10	56,0	111	45,0	84	30,0	56	26,0	51	24,0	45	4/5 (80%)	AQ		
1	122	242	82,7	154	65,0	121	53,5	105	53,1	100	3/5 (60%)	BF		
6a	54,0	107	48,0	89	30,0	56	23,0	45	28,0	53	4/5 (80%)	EF		
8	51,0	101	35,0	65	41,0	76	29,0	57	23,0	43	4/5 (80%)	ES		
11	59,0	117	44,0	82	33,0	62	26,0	51	25,0	47	4/5 (80%)	IL		
5	78,0	155	64,1	119	51,3	96	36,3	71	34,8	65	4/5 (80%)	RS-F		
6b	66,0	131	52,0	97	38,0	71	28,0	55	32,0	60	5/5 (100%)	RS-F		
7	79,7	158	75,2	140	59,9	112	51,7	101	45,4	85	4/5 (80%)	RS-F		
4	51,0	101	39,0	73	44,0	82	31,0	61	24,0	45	4/5 (80%)	VT		
AB**		50-150 %	AB**		50-150 %	AB**		50-150 %	AB**		50-150 %			
Anzahl in AB		6	Anzahl in AB		8	Anzahl in AB		9	Anzahl in AB		8	Anzahl in AB		5
Prozent in AB		67	Prozent in AB		89	Prozent in AB		100	Prozent in AB		89	Prozent in AB		56

Methoden:

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

* Wiederfindungsrate 100% Bezugsgröße: Haselnuss, s. Seite 6

** Akzeptanzbereich der AOAC für Allergen-ELISAs

Anmerkung:

Für Probe 3 (Krokant) lagen 100% der Wiederfindungsraten der ELISA-Methoden im Akzeptanzbereich von 50-150%. Für geröstete (Probe 2, Ausnahme Methode ES) und ungeröstete Haselnüsse (Probe 1) lag die Response jeweils höher, wobei eine bzw. drei Wiederfindungsraten oberhalb von 150% erhalten wurden. Bei Probe 4 (Nuss-Schoko-Creme) und Probe 5 (Nougat) wurde dagegen eine niedrigere Response beobachtet mit einer bzw. vier Wiederfindungsraten unterhalb von 50%.

Insgesamt lagen 56-100% der Wiederfindungsraten der Teilnehmerergebnisse im Akzeptanzbereich von 50-150%.

4.1.5 Quantitativ: PCR-Methoden Wiederfindungs-Scores (WFR-Scores)

Auswertenummer	Probe 1 Haselnuss, ungeröstet		Probe 2 Haselnuss, geröstet		Probe 3 Krokant		Probe 4 Nuss-Schoko-Creme		Probe 5 Nougat		WFR-Score	Methode	Hinweis
	Ergebnis	WFR *	Ergebnis	WFR *	Ergebnis	WFR *	Ergebnis	WFR *	Ergebnis	WFR *	WFR *		
	[mg/kg]	[%]	[mg/kg]	[%]	[mg/kg]	[%]	[mg/kg]	[%]	[mg/kg]	[%]	Anzahl in AB**		
7												ASU	
8												ASU	
3a	114	226	74,0	138	71,5	133	60,7	119	45,4	85	4/5 (80%)	SFA	Kalibrierung siehe Dokumentation
3b	68,5	136	47,5	88	37,0	69	40,0	78	34,0	64	5/5 (100%)	SFA	Kalibrierung siehe Dokumentation
6												SFA	
9												SFA	
AB**		50-150 %	AB**		50-150 %	AB**		50-150 %	AB**		50-150 %	Methoden:	
Anzahl in AB		1	Anzahl in AB		2	Anzahl in AB		2	Anzahl in AB		2	ASU = ASU §64 Methode/method	
Prozent in AB		50	Prozent in AB		100	Prozent in AB		100	Prozent in AB		100	SFA = Sure Food Allergen, R-Biopharm / Congen	

* Wiederfindungsrate 100% Bezugsgröße: Haselnuss, s. Seite 6

** Akzeptanzbereich der AOAC für Allergen-ELISAs

Anmerkung:

Mit einer Ausnahme lagen die Wiederfindungsraten der PCR-Methoden im Akzeptanzbereich von 50-150%. Nur für die ungerösteten Haselnüsse (Probe 1) lag eine Wiederfindungsrate deutlich über 150%.

4.1.6 Quantitativ: LC/MS-Methoden Wiederfindungs-Scores (WFR-Scores)

Auswertenummer	Probe 1 Haselnuss, ungeröstet		Probe 2 Haselnuss, geröstet		Probe 3 Krokant		Probe 4 Nuss-Schoko-Creme		Probe 5 Nougat		WFR-Score	Methode	Hinweis
	Ergebnis	WFR *	Ergebnis	WFR *	Ergebnis	WFR *	Ergebnis	WFR *	Ergebnis	WFR *	WFR *		
	[mg/kg]	[%]	[mg/kg]	[%]	[mg/kg]	[%]	[mg/kg]	[%]	[mg/kg]	[%]	Anzahl in AB**		
2	72	143	92,9	173	104,7	195	77	151	82,4	155	1/5 (20%)	LC/MS	
	AB**	50-150 %	AB**	50-150 %	AB**	50-150 %	AB**	50-150 %	AB**	50-150 %	Methoden: LC/MS = Flüssigchromatographie / Massenspektrometrie		
	Anzahl in AB	1	Anzahl in AB	0	Anzahl in AB	0	Anzahl in AB	0	Anzahl in AB	0			
	Prozent in AB	100	Prozent in AB	0	Prozent in AB	0	Prozent in AB	0	Prozent in AB	0			

* Wiederfindungsrate 100% Bezugsgröße: Haselnuss, s. Seite 6

** Akzeptanzbereich der AOAC für Allergen-ELISAs

Anmerkung:

Die Wiederfindungsraten für ungeröstete Haselnüsse (Probe 1), Nuss-Schoko-Creme (Probe 4) und Nougat (Probe 5) lagen jeweils nahe bei 150%, der oberen Grenze des Akzeptanzbereichs. Für geröstete Haselnüsse (Probe 2) und Krokant (Probe 3) wurden höhere Wiederfindungsraten erhalten.

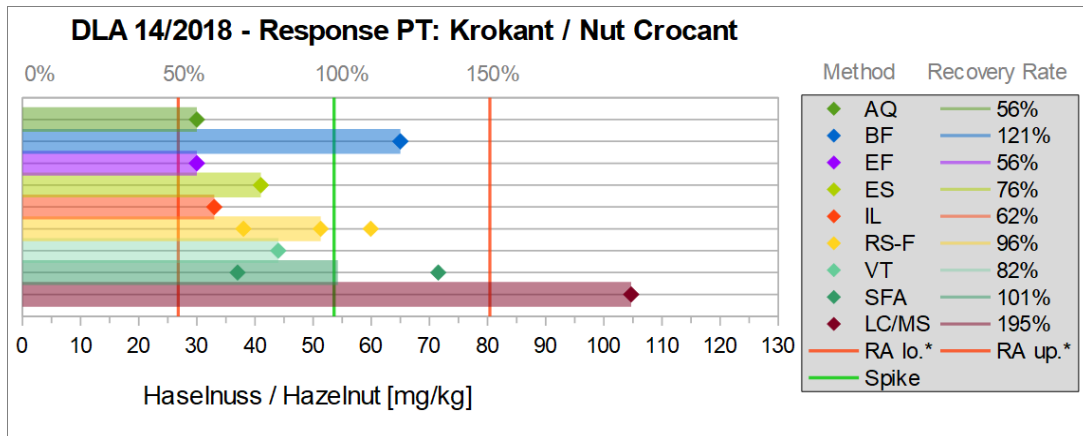
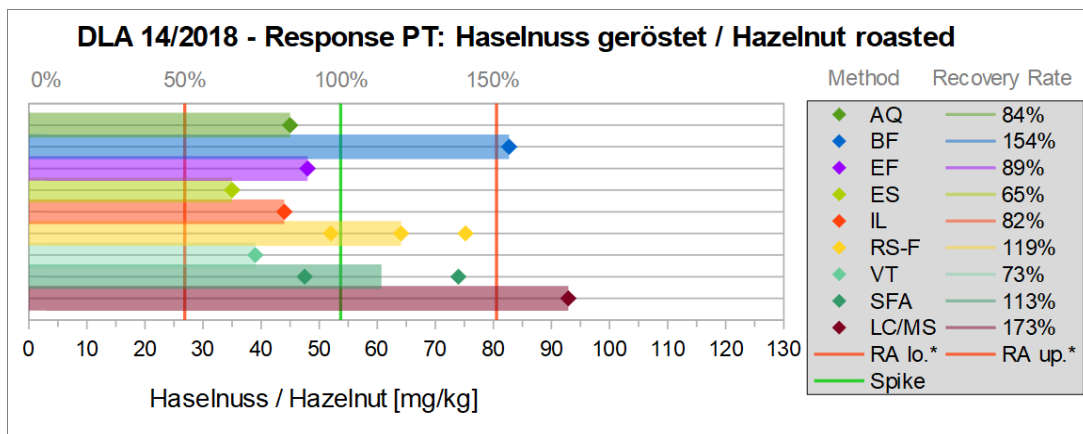
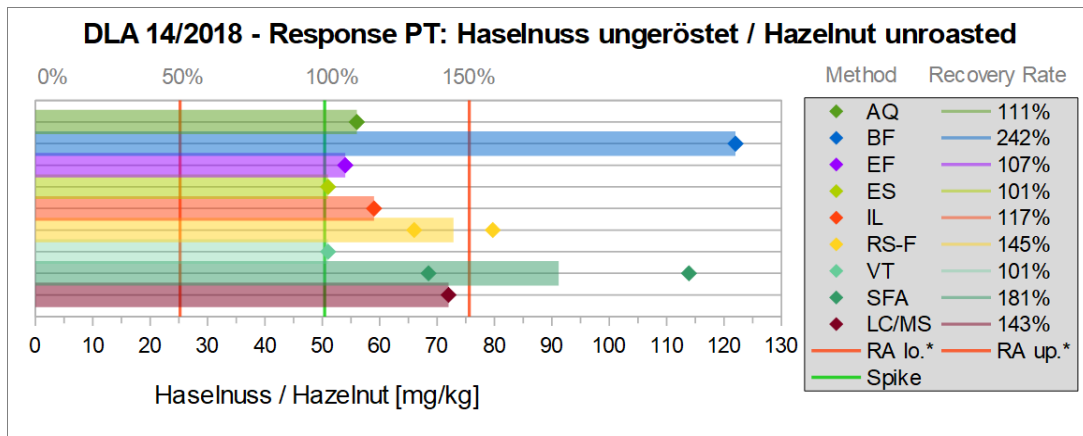


Abb./Fig. 1: Darstellung der Einzelergebnisse (Proben 1-3) getrennt nach Methoden mit Angabe der durchschnittlichen Wiederfindungsrate (Recovery Rate), untere Skala Haselnuss in mg/kg, obere Skala % Wiederfindungsrate in % mit * Akzeptanzbereich von 50% - 150% (* range of acceptance: RA lower limit bis RA upper limit)

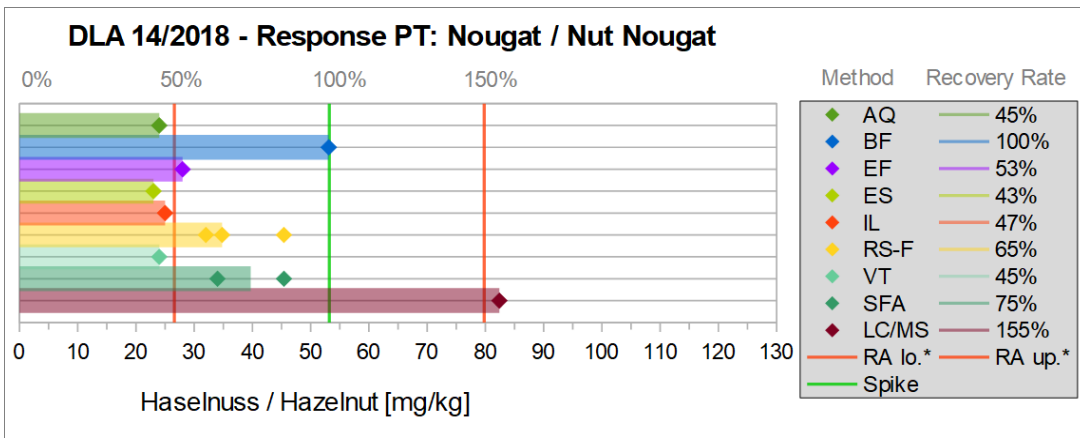
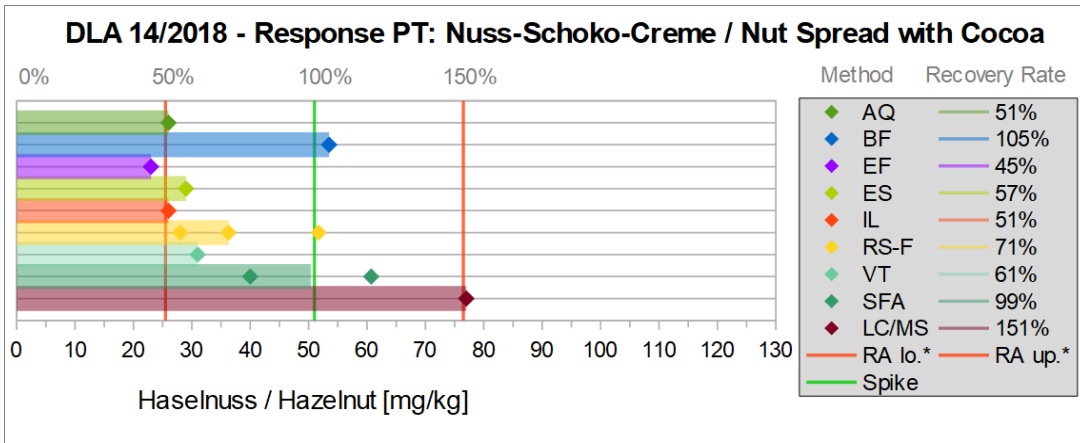


Abb./Fig. 2: Darstellung der Einzelergebnisse (Proben 4 und 5) getrennt nach Methoden mit Angabe der durchschnittlichen Wiederfindungsrate (Recovery Rate), untere Skala Haselnuss in mg/kg, obere Skala % Wiederfindungsrate in % mit * Akzeptanzbereich von 50% - 150% (* range of acceptance: RA lower limit bis RA upper limit)

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-Methoden

Meth. Abk.	Auswertenummer	Datum der Analyse Tag/Monat	Ergebnis Probe 1		Ergebnis Probe 2		Ergebnis Probe 3		Ergebnis Probe 4		Ergebnis Probe 5		Ergebnis Probe 6		NWG / LOD *	BG / LOQ *	MU*	Angabe quantitatives Ergebnis als bevorzugt als Haselnuss
			qualitativ	mg/kg	qualitativ	mg/kg	qualitativ	mg/kg	qualitativ	mg/kg	qualitativ	mg/kg	qualitativ	mg/kg				
AQ	10	03.12.18	-	56	-	45	-	30	-	26	-	24	negativ		0,3	1		Haselnuss
BF	1	11.01.19	-	122	positiv	82,7	positiv	65	positiv	53,5	positiv	53,1	negativ	0	1	0,04		Haselnuss
EF	6a	12.12.18	-	54	-	48	-	30	-	23	-	28	-	<0.3	0,3			Haselnuss
ES	8	12.12.18	-	51	positiv	35	positiv	41	positiv	29	positiv	23	negativ	<3,7	1,85	3,7		Haselnuss
IL	11	10.12.18	-	59	positiv	44	positiv	33	positiv	26	positiv	25	negativ	<0.3	0.3	1		Haselnuss
RS-F	5	17.12.	positiv	78,0	positiv	64,1	positiv	51,3	positiv	36,3	positiv	34,8	negativ	< 2,5	0,19	2,5		Haselnuss
RS-F	6b	12.12.18	-	66		52		38	-	28	-	32	-	<1.5	1,5			Haselnuss
RS-F	7	14.12.18	-	79,7	positiv	75,2	positiv	59,9	positiv	51,7	positiv	45,4	negativ		2,5	2,5	0,38	Haselnuss
VT	4	20.12.18	-	51	positiv	39	positiv	44	positiv	31	positiv	24	negativ	0		2,5		Haselnuss

* NWG Nachweisgrenze / BG Bestimmungsgrenze

* LOD limit of detection / LOQ limit of quantitation

* MU Messunsicherheit / MU measurement uncertainty

Weitere Angaben zu den Methoden

Meth. Abk.	Auswertenummer	Methode	Spezifität	Gehalt Gesamt-Protein in Haselnuss (Gemäß Methodenvorschrift)	Umrechnung für prozessierte Haselnuss	Hinweise zur Methode (Extraktion und Bestimmung)	Methode akkreditiert nach ISO/IEC 17025	Sonstige Hinweise
		Test-Kit + Anbieter	Antikörper	%	Umrechnung von X in Y (Faktor oder %)	z.B. Extraktionslösung / Zeit / Temperatur	ja/nein	
AQ	10	AgraQuant ELISA Hazelnut COKAL0348, RomerLabs					ja	
BF	1	MonoTrace Hazelnut ELISA kit, BioFront Technologies	Kit basierend auf monoklonalen Antikörpern	1:20 Extraktionsverhältnis, 10 Minuten bei 60°C	nicht vorgesehen	1:20 Extraktionsverhältnis, 10 Minuten bei 60°C	nein	
EF	6a	Eurofins SensiSpec Hazelnut ELISA Kit					nein	
ES	8	ELISA Systems Hazelnut ESHRD-48	erkennt Haselnussproteine	12-15		lt. Herstellerangaben	ja	Probe 1 qualitativ: positiv (lässt sich nicht eintragen), 1mg/kg Haselnussprotein entspricht 7,4mg/kg Haselnuss lt. Kit Hersteller
IL	11	Immunolab Hazelnut ELISA	polyclonal					
RS-F	5	Ridascreen® FAST Hazelnut R6802, R-Biopharm				nach Herstelleranleitung, mit Magermilchpulver	ja	
RS-F	6b	Ridascreen® FAST Hazelnut R6802, R-Biopharm					ja	
RS-F	7	Ridascreen® FAST Hazelnut R6802, R-Biopharm		unbekannt	keine Umrechnung	gemäß Handbuch mit Zugabe von Milchpulver	ja	Für Probe 1 ist das Feld der qualitativen Ergebnisangabe gesperrt. MU der methode angegeben.
VT	4	Veratox Hazelnut, Neogen				Phosphat gepufferte Salzlösung / 15 Min / 60°C	ja	Einzelergebnis

5.1.2 PCR-Methoden

Meth. Abk.	Auswertenummer	Datum der Analyse	Ergebnis Probe 1		Ergebnis Probe 2		Ergebnis Probe 3		Ergebnis Probe 4		Ergebnis Probe 5		Ergebnis Probe 6		NWG / LOD *	BG / LOQ *	MU*	Angabe quantitatives Ergebnis als
			qualitativ	mg/kg	qualitativ	mg/kg	qualitativ	mg/kg	qualitativ	mg/kg	qualitativ	mg/kg	qualitativ	mg/kg	mg/kg	mg/kg	mg/kg	mg/kg
ASU	7	14.12.18	positiv		positiv		negativ		positiv		positiv		negativ					Haselnuss-DNA
ASU	8	06.12.18	positiv		positiv		positiv		positiv		positiv		negativ		10			Haselnuss-DNA
SFA	3a	17.12.18	+	113,88	+	73,97	+	71,51	+	60,72	+	45,41	-	0	< 0,4	1		
SFA	3b	17.12.18	+	68,5	+	47,5	+	37	+	40	+	34	-	0	< 0,4	1		
SFA	6	12.12.18	positiv		positiv		positiv		positiv		positiv		negativ		0,4			Haselnuss DNA
SFA	9	28.12.18	positiv		positiv		positiv		positiv		positiv		negativ		0,4	1	0,3	Haselnuss

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

Meth. Abk.	Auswertenummer	Methode	Spezifität	Gehalt Gesamt-Protein in Haselnuss (Gemäß Methodenvorschrift)	Umrechnung für prozessierte Haselnuss	Hinweise zur Methode (Extraktion und Bestimmung)	Methode akkreditiert nach ISO/IEC 17025	Sonstige Hinweise
		Test-Kit + Anbieter	Target-Sequenz / -DNA		Umrechnung von X in Y (Faktor oder %)	z. B. Extraktion / Enzyme / Clean-Up / Real Time PCR / Gelelektrophorese / Cyclen	ja/nein	
ASU	7	ASU §64 Methode/method	Cor a 1			Extraktion mit 2 g Lyse mit dem Maxwell FFS Kit.	ja	auf ASU Methode basierende PCR als Multiplex mit anderen Nüssen. Probe 3 nicht reproduzierbar positiv.
ASU	8	ASU §64 Methode/method				CTAB / Proteinase K / Promega Wizard DNA CleanUp / Real-time PCR / 45 Zyklen	ja	§ 64 LFGB L 44.00-08:2010-01
SFA	3a	Sure Food Allergen, R-Biopharm / Congen				CTAB / Quiaquick	ja	Quantitative Auswertung mittels Kopienstandard
SFA	3b	Sure Food Allergen, R-Biopharm / Congen				CTAB / Quiaquick	ja	Quantitative Auswertung mittels Quantard Allergen 40 Verdünnungen
SFA	6	Sure Food Allergen, R-Biopharm / Congen					ja	
SFA	9	Sure Food Allergen, R-Biopharm / Congen	Corylus			Sure Food Prep Advanced Protokoll 1	ja	Artikelnr. S3602

5.1.3 LC/MS-Methoden

Meth. Abk.	Auswertenummer	Datum der Analyse	Ergebnis Probe 1		Ergebnis Probe 2		Ergebnis Probe 3		Ergebnis Probe 4		Ergebnis Probe 5		Ergebnis Probe 6		NWG / LOD *	BG / LOQ *	MU*	Angabe quantitatives Ergebnis als
			qualitativ	mg/kg	qualitativ	mg/kg	qualitativ	mg/kg	qualitativ	mg/kg	qualitativ	mg/kg	qualitativ	mg/kg	mg/kg	mg/kg	mg/kg	bevorzugt als Haselnuss
LC/MS	2		positiv	72	positiv	92,9	positiv	104,7	positiv	77	positiv	82,4	negativ	< 10	3	10	0,2	Haselnuss

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

Meth. Abk.	Auswertenummer	Methode	Spezifität	Gehalt Gesamt-Protein in Haselnuss (Gemäß Methodenvorschrift)	Umrechnung für prozessierte Haselnuss	Hinweise zur Methode (Extraktion und Bestimmung)	Methode akkreditiert nach ISO/IEC 17025	Sonstige Hinweise
		Test-Kit + Anbieter / Literatur			Umrechnung von X in Y (Faktor oder %)			
LC/MS	2	UHPLC-MS/MS	spezifische Peptidsequenzen				ja	

5.2 Homogenität

5.2.1 Mischungshomogenität vor der Abfüllung

Microtracer Homogenitätstest

DLA 14-2018 Probe 1

Gewicht Gesamtprobe	1,00	kg
Microtracer	FSS-rot lake	
Teilchengröße	75 – 300	µm
Gewicht pro Partikel	2,0	µg
Tracerzugabe	21,1	mg/kg

Analysenergebnisse:

Probe	Einwaage [g]	Partikel Anzahl	Partikel [mg/kg]
1	5,04	77	30,6
2	4,97	71	28,6
3	5,54	72	26,0
4	4,99	79	31,7
5	5,06	58	22,9
6	5,05	69	27,3
7	5,02	61	24,3
8	4,99	77	30,9

Poisson-Verteilung

Probenanzahl	8
Freiheitsgrad	7
Mittelwert	70,6 Partikel
Standardabweichung	8,15 Partikel
χ^2 (CHI-Quadrat)	6,58
Wahrscheinlichkeit	47 %
Wiederfindungsrate	132 %

Normalverteilung

Probenanzahl	8
Mittelwert	27,8 mg/kg
Standardabweichung	3,21 mg/kg
rel. Standardabweichung	11,5 %
Horwitz Standardabweichung	9,70 %
HorRat-Wert	1,2
Wiederfindungsrate	132 %

Microtracer Homogenitätstest

DLA 14-2018 Probe 2

Gewicht Gesamtprobe	1,010	kg
Microtracer	FSS-rot lake	
Teilchengröße	75 – 300	µm
Gewicht pro Partikel	2,0	µg
Tracerzugabe	29,4	mg/kg

Analysenergebnisse:

Probe	Einwaage [g]	Partikel Anzahl	Partikel [mg/kg]
1	4,97	82	33,0
2	5,06	83	32,8
3	5,05	78	30,9
4	5,00	80	32,0
5	4,96	70	28,2
6	5,02	84	33,5
7	5,03	72	28,6
8	5,02	83	33,1

Poisson-Verteilung

Probenanzahl	8
Freiheitsgrad	7
Mittelwert	79,0 Partikel
Standardabweichung	5,18 Partikel
χ^2 (CHI-Quadrat)	2,38
Wahrscheinlichkeit	94 %
Wiederfindungsrate	107 %

Normalverteilung

Probenanzahl	8
Mittelwert	31,5 mg/kg
Standardabweichung	2,07 mg/kg
rel. Standardabweichung	6,55 %
Horwitz Standardabweichung	9,52 %
HorRat-Wert	0,69
Wiederfindungsrate	107 %

Microtracer Homogenitätstest

DLA 14-2018 Probe 3

Gewicht Gesamtprobe	1,000	kg
Microtracer	FSS-rot lake	
Teilchengröße	75 – 300	µm
Gewicht pro Partikel	2,0	µg
Tracerzugabe	35,1	mg/kg

Analysenergebnisse:

Probe	Einwaage [g]	Partikel Anzahl	Partikel [mg/kg]
1	5,07	63	24,9
2	5,02	66	26,3
3	5,05	71	28,1
4	5,00	73	29,2
5	5,03	55	21,9
6	5,03	63	25,0
7	4,96	66	26,6
8	4,98	69	27,7

Poisson-Verteilung		
Probenanzahl	8	
Freiheitsgrad	7	
Mittelwert	65,8	Partikel
Standardabweichung	5,77	Partikel
χ^2 (CHI-Quadrat)	3,55	
Wahrscheinlichkeit	83	%
Wiederfindungsrate	75	%

Normalverteilung		
Probenanzahl	8	
Mittelwert	26,2	mg/kg
Standardabweichung	2,30	mg/kg
rel. Standardabweichung	8,78	%
Horwitz Standardabweichung	9,79	%
HorRat-Wert	0,90	
Wiederfindungsrate	75	%

Microtracer Homogenitätstest

DLA 14-2018 Probe 4

Gewicht Gesamtprobe	1,00	kg
Microtracer	FSS-rot lake	
Teilchengröße	75 – 300	µm
Gewicht pro Partikel	2,0	µg
Tracerzugabe	29,3	mg/kg

Analysenergebnisse:

Probe	Einwaage [g]	Partikel Anzahl	Partikel [mg/kg]
1	4,97	76	30,6
2	4,99	86	34,5
4	5,01	101	40,3
5	4,96	83	33,5
6	4,98	90	36,1
8	5,01	100	39,9
9	4,99	102	40,9
10	5,04	78	31,0

Poisson-Verteilung		
Probenanzahl	8	
Freiheitsgrad	7	
Mittelwert	89,5	Partikel
Standardabweichung	10,39	Partikel
χ^2 (CHI-Quadrat)	8,45	
Wahrscheinlichkeit	29	%
Wiederfindungsrate	122	%

Normalverteilung		
Probenanzahl	8	
Mittelwert	35,8	mg/kg
Standardabweichung	4,16	mg/kg
rel. Standardabweichung	11,6	%
Horwitz Standardabweichung	9,3	%
HorRat-Wert	1,2	
Wiederfindungsrate	122	%

Microtracer Homogenitätstest

DLA 14-2018 Probe 5

Gewicht Gesamtprobe	1,00	kg
Microtracer	FSS-rot lake	
Teilchengröße	75 – 300	µm
Gewicht pro Partikel	2,0	µg
Tracerzugabe	24,7	mg/kg

Analysenergebnisse:

Probe	Einwaage [g]	Partikel Anzahl	Partikel [mg/kg]
1	5,04	98	38,9
2	4,99	99	39,7
3	5,01	92	36,7
4	4,99	96	38,5
5	5,06	101	39,9
6	5,05	99	39,2
7	4,99	105	42,1
8	5,00	94	37,6

Poisson-Verteilung

Probenanzahl	8	
Freiheitsgrad	7	
Mittelwert	98,0	Partikel
Standardabweichung	4,05	Partikel
χ^2 (CHI-Quadrat)	1,17	
Wahrscheinlichkeit	99	%
Wiederfindungsrate	158	%

Normalverteilung

Probenanzahl	8	
Mittelwert	39,1	mg/kg
Standardabweichung	1,61	mg/kg
rel. Standardabweichung	4,1	%
Horwitz Standardabweichung	9,2	%
HorRat-Wert	0,4	
Wiederfindungsrate	158	%

5.3 Informationen zur Eignungsprüfung (EP)

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

EP-Nummer	DLA 14-2018
EP-Name	Response PT Haselnuss: Prozessierte Proben Haselnuss (ungeröstet), Nussmus (geröstet), Nuss-Schokocreme, Nuss-Nougat und Nuss-Krokant in Kartoffelpulver-Matrix
Probenmatrix (Prozessierung)	Proben 1-6: Zutaten: Kartoffelpulver (ca. 75%), Maltodextrin (ca. 25%) sowie weitere Zusatzstoffe und Allergene Lebensmittel (nur in Proben 1-5)
Probenzahl und Probenmenge	5 unterschiedliche Proben je 20 g + 1 „Null-Probe“ 20 g
Lagerungsinformation	Proben 1-6: Raumtemperatur (Langzeit gekühlt 2 - 10 °C)
Verwendungszweck	Ausschließlich für Laboruntersuchungen (Qualitätskontrollproben)
Parameter	qualitativ + quantitativ: Haselnuss / Haselnussprotein / DNA aus Haselnuss (ungeröstet), Nussmus (geröstet), Nuss-Schokocreme, Nuss-Nougat und Nuss-Krokant Proben 1-5: ca. 25 - 150 mg/kg (als Gesamt-Haselnuss)
Untersuchungsmethoden	Methode ist freigestellt
Hinweis zur Analyse	Die Untersuchung der Eignungsprüfung soll entsprechend einer laborüblichen Routineanalyse vorgenommen werden. Generell empfehlen wir vor der Analyse, insbesondere bei kleinen Analyseneinwaagen, eine repräsentative Probenmenge entsprechend guter Laborpraxis zu homogenisieren. Am besten wird jeweils die gesamte Probenmenge homogenisiert.
Ergebnisangabe	Es werden für jede Probe 1 - 6 je ein Ergebnis ermittelt. Die Einzelergebnisse sind in die Ergebnisabgabe-Datei einzutragen, bei Mehrfachbestimmungen der Mittelwert.
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 11. Januar 2019
Auswertebericht	Der Auswertebericht wird voraussichtlich 6 Wochen nach Abgabetermin der Ergebnisse fertiggestellt und per eMail als PDF-Datei zugesandt.
Koordinator und Ansprechpartner der EP	Dr. Matthias Besler-Scharf

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

6. Verzeichnis der Teilnehmer in alphabetischer Reihenfolge

Teilnehmer / Participant	Ort / Town	Land / Country
		Deutschland
		USA
		Deutschland
		Deutschland
		Deutschland
		Deutschland
		ITALIEN
		Deutschland
		Deutschland
		CANADA
		ÖSTERREICH

[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. EN ISO/IEC 17034:2016; Konformitätsbewertung - Allgemeine Anforderungen an die Kompetenz von Referenzmaterialherstellern / General requirements for the competence of reference material producers
19. ISO Guide 34:2000; General requirements for the competence of reference material producers
20. DAkkS 71 SD 1/4 016; Ermittlung und Angabe der Messunsicherheit nach Forderungen der DIN EN ISO/IEC 17025 (2011) [Estimation and indication of the measurement uncertainty]
21. 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
22. 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
 23. 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
 24. 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
 25. Ministry of Health and Welfare, JSM, Japan 2006
 26. 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)
 27. 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)
 28. 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)
 29. 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
 30. 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
 31. 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
 32. ASU §64 LFGB L 06.00-56 Bestimmung von Sojaprotein in Fleisch und Fleischzeugnissen Enzymimmunologisches Verfahren (2007) [Determination of soyprotein in meat and meat products by enzyme immunoassay]
 33. ASU §64 LFGB L 00.00-69 Bestimmung von Erdnuss-Kontaminationen in Lebensmitteln mittels ELISA im Mikrotiterplattensystem (2003) [Foodstuffs, determination of peanut contaminations in foodstuffs by ELISA in microtiterplates]
 34. ASU §64 LFGB L 44.00-7 Bestimmung von Haselnuss-Kontaminationen in Schokolade und Schokoladenwaren mittels ELISA im Mikrotiterplattensystem (2006) [Foodstuffs, determination of hazelnut contaminations in chocolate and chocolate products by ELISA in microtiterplates]
 35. ASU §64 LFGB L 18.00-20 Untersuchung von Lebensmitteln - Nachweis und Bestimmung von Mandel (Prunus dulcis) in Reis- und Weizenkeksen sowie in Soßenpulver mittels real-time PCR (2014) [Foodstuffs, detection and determination of almond (Prunus dulcis) in rice and wheat cookies and sauce powders by PCR]
 36. ASU §64 LFGB L 18.00-21 Untersuchung von Lebensmitteln - Nachweis und Bestimmung von Paranuss (Bertholletia excelsa) in Reis- und Weizenkeksen sowie in Soßenpulver mittels real-time PCR (2014) [Foodstuffs, detection and determination of brazil nut (Bertholletia excelsa) in rice and wheat cookies and sauce powders by PCR]
 37. ASU §64 LFGB L 18.00-22 Untersuchung von Lebensmitteln - Simultaner Nachweis und Bestimmung von Lupine, Mandel, Paranuss und Sesam in Reis- und Weizenkeksen sowie Soßenpulver mittels real-time PCR (2014) [Foodstuffs, simultaneous detection and determination of lupin, almond, brazil nut and sesame in rice and wheat cookies and sauce powders by PCR]

DLA 14/2018 - Response PT Haselnuss

Alle 11 Teilnehmer haben Ergebnisse eingereicht. Es wurden 6 LVU-Proben für den qualitativen Nachweis und die quantitative Bestimmung von Haselnuss (ungeröstet und geröstet), Krokant, Nuss-Schoko-Creme und Nougat in einer Trägermatrix sowie eine „Null“-Probe zur Verfügung gestellt. Die Teilnehmer-Ergebnisse wurden *qualitativ* mit einem Score von 1-5 bewertet, der angibt wie viele prozessierte Produkte erfolgreich erfasst wurden. Die quantitativen Ergebnisse wurden mit einem Wiederfindungs-Score (*WFR-Score*) bewertet, der angibt wie viele Ergebnisse im Bereich einer Wiederfindungsrate von 50 - 150% des Dotierungs-Levels liegen. Die Auswertung erfolgte getrennt nach ELISA-, PCR- und LC/MS-Methoden. Details sind dem Auswertebereicht zu entnehmen.

2 Teilnehmer hatten ihren Sitz im Europäischen Ausland (Italien, Österreich), ein Teilnehmer in Kanada und ein Teilnehmer in den USA.