



**Auswertungs-Bericht**

Laborvergleichsuntersuchung

**DLA 02/2019**

**Allergene II:**

**Lupine und Weizen (Gluten)**

**in „glutenfreiem“ Brot**

***DLA - Proficiency Tests GmbH***

*Kalte Weide 21*

*24641 Sievershütten/Germany*

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

*Koordinator der LVU:*

*Dr. Matthias Besler-Scharf*

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

<i>EP-Anbieter</i> <i>PT-Provider</i>	<b>DLA - Proficiency Tests GmbH</b> Kalte Weide 21, 24641 Sievershütten, Germany  Geschäftsführer/CEO: Dr. Matthias Besler-Scharf Stellv. Leitung/Deputy Lead: Alexandra Scharf MSc.  Tel. ++49-(0)4532-9183358 Mob. ++49(0)171-1954375 Fax. ++49(0)4102-9944976 eMail. proficiency-testing@dla-lvu.de
<i>EP-Nummer</i> <i>PT-Number</i>	DLA 02/2019
<i>EP-Koordinator</i> <i>PT-Coordinator</i>	Dr. Matthias Besler-Scharf
<i>Status des EP-Bericht</i> <i>Status of PT-Report</i>	Abschlussbericht / Final report (29. Juli 2019)  Gültig ist die jeweils letzte Version/Korrektur des Berichts. Sie ersetzt alle vorangegangenen Versionen. Only the latest version/correction of the report is valid. It replaces all preceding versions.
<i>EP-Bericht Freigabe</i> <i>PT-Report Authorization</i>	Dr. Matthias Besler-Scharf (Technischer Leiter / Technical Manager) - <i>gezeichnet / signed M. Besler-Scharf</i> Alexandra Scharf MSc. (QM-Beauftragte / Quality Manager) - <i>gezeichnet / signed A. Scharf</i> Datum / Date: 29. Juli 2019
<i>Unteraufträge</i> <i>Subcontractors</i>	Falls im Rahmen der Eignungsprüfung eine Prüfung der Gehalte, Homogenität und Stabilität von EP-Parametern durchgeführt wurde, hat DLA diese im Unterauftrag vergeben. In case the analysis of the content, homogeneity and stability of PT-parameters was part of the proficiency test, the determinations were subcontracted by DLA.
<i>Vertraulichkeit</i> <i>Confidentiality</i>	Die Teilnehmerergebnisse sind im EP-Bericht in anonymisierter Form mit Auswertenummern benannt. Daten einzelner Teilnehmer werden ausschließlich nach vorheriger Zustimmung des Teilnehmers an Dritte weitergegeben. Participant result are named anonymously with evaluation numbers in the PT report. Data of individual participants will be passed on to third parties only with prior consent of the participant.

## Inhalt

1. Einleitung.....	4
2. Durchführung.....	4
2.1 Untersuchungsmaterial.....	4
2.1.1 Homogenität.....	6
2.1.2 Stabilität.....	9
2.2 Probenversand und Informationen zur Untersuchung.....	9
2.3 Ergebnisübermittlung.....	9
3. Auswertung.....	10
3.1 Konsenswert der Teilnehmer (zugewiesener Wert).....	10
3.2 Robuste Standardabweichung.....	11
3.3 Ausschluss von Ergebnissen und Ausreißer.....	11
3.4 Zielstandardabweichung (für die Eignungsbeurteilung).....	12
3.4.1 Allgemeines Modell nach Horwitz.....	12
3.4.2 Auswertung eines Versuchs zur Präzision .....	12
3.4.3 Werte aus Erkenntnissen .....	15
3.5 z-Score.....	16
3.6 z'-Score.....	17
3.7 Quotient S*/opt.....	17
3.8 Standardunsicherheit und Rückführbarkeit.....	17
3.9 Graphische Darstellung der Bezugswerte.....	18
3.10 Wiederfindungsraten: Dotierung.....	18
4. Ergebnisse.....	19
4.1 Vergleichsuntersuchung Lupine.....	21
4.1.1 ELISA-Ergebnisse: Lupine (als Lupinenprotein).....	21
4.1.2 PCR-Ergebnisse: Lupine .....	31
4.2 Vergleichsuntersuchung Weizen (Gluten).....	35
4.2.1 ELISA-Ergebnisse: Gluten.....	35
4.2.2 PCR-Ergebnisse: Gluten-haltige Getreide (Weizen).....	45
5. Dokumentation.....	49
5.1 Angaben der Teilnehmer.....	49
5.1.1 ELISA: Lupine.....	49
5.1.2 ELISA: Gluten.....	50
5.1.3 PCR: Lupine.....	51
5.1.4 PCR: Weizen (Gluten).....	52
5.2 Homogenität.....	53
5.2.1 Mischungshomogenität vor der Abfüllung.....	53
5.3 Informationen zur Eignungsprüfung (EP).....	54
6. Verzeichnis der Teilnehmer in alphabetischer Reihenfolge.....	55
7. Verzeichnis relevanter Literatur.....	56

## 1. Einleitung

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

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

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

## 2. Durchführung

### 2.1 Untersuchungsmaterial

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

Bei dem Untersuchungsmaterial handelt es sich um mit einer handelsüblichen "gluten-freien" Backmischung gebackenes Brot. Das Brot wurde bei 190°C für 60 min gebacken und anschließend ca. 10 h bei 40-50°C getrocknet. Die Grundzusammensetzung war für beide Proben A und B gleich (s. Tabelle 1).

Nach Zerkleinern und Sieben mittels Schlagmühle (mesh <1,5 mm) wurde die Grundmischung homogenisiert.

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

Als weitere Zutat wurde ein mit dem Dotierungsmaterial gebackenes Brot (190°C, 60 min), das die allergenen Zutaten Lupine und Weizen enthält (mesh <500 µm), hergestellt. Nach Trocknung (40°C, 10 h), Zerkleinerung, Sieben (mesh <1,5 mm) und Homogenisierung wurde diese Zutat zu einem Aliquot der Grundmatrix gegeben und die Mischung homogenisiert. Anschließend wurde erneut Grundmatrix zugegeben und homogenisiert.

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

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

Tabelle 1: Zusammensetzung der DLA-Proben

Zutaten	Probe A	Probe B	Dotierungs- niveauprobe
Brot, "gluten-frei" (gebacken 190°C, 90 min) <b>Brot-Backmischung, "gluten-frei"</b> Zutaten: Maisstärke, Leinsamenmehl, Buchweizenmehl, Erbsenkleie, Reiskleie, Psyllium-Pflanzenfaser, Zucker, Verdi- ckungsmittel: Guarkernmehl, Salz <b>weitere Zutaten:</b> Pflanzenöl, Hefe, Salz (Wasser) und allergene Zutaten (s. un- ten)	100 g/100g	99,4 g/100 g	-
Kartoffelpulver Zutaten: Kartoffeln, E471, E304, E223, E100	-	-	99,4 g/100 g
<b>Lupine:</b> - als Süßlupinenmehl* - davon 36,6% Gesamtprotein**	-	97,9 mg/kg 35,8 mg/kg	58,9 mg/kg 21,6 mg/kg
<b>Weizen:</b> Weizenmehl-Mischung (21 Produkte aus Europa, Asien, USA) - als Weizenmehl* - davon 10,1% Gesamtprotein** - davon Gluten***	-	582 mg/kg 58,8 mg/kg 50,6 mg/kg	349 mg/kg 35,2 mg/kg 30,4 mg/kg
weitere Zutaten: Maltodextrin, Natriumsulfat und Siliciumdioxid	-	<0,6 g/100 g	<0,6 g/100 g

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

\*\* Proteingehalte gemäß Laboranalyse des Rohstoffs (Gesamtstickstoff nach Kjeldahl mit  
F=6,25 für Lupinenprotein und F=5,7 für Weizenprotein)

\*\*\* Proteingehalte gemäß Literaturangaben berechnet (ca. 8,7% Gluten in Weizenmehlen [34,  
35, 36])

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

### 2.1.1 Homogenität

Die **Mischungshomogenität vor der Abfüllung** wurde in 8-fach Bestimmung mittels **Microtracer-Analyse** untersucht. Es handelt sich um eine normierte Methode, die Bestandteil des internationalen GMP-Zertifizierungssystems für Futtermittel ist [14]. Vor der Mischung werden mit Farbstoff beschichtete Eisenpartikel in  $\mu\text{m}$ -Größe zur Probe gegeben und die Partikelzahl wird nach der Homogenisierung in entnommenen Aliquoten bestimmt. Die Bewertung der Mischungshomogenität erfolgt auf Grundlage der Poissonverteilung anhand des chi-Quadrat-Tests. Eine Wahrscheinlichkeit von  $\geq 5\%$  ist gleichzusetzen mit einer guten homogenen Mischung und von  $\geq 25\%$  mit einer exzellenten Mischung [14, 15]. Die Microtracer-Analyse der vorliegenden LVU-Proben B und Dotierungsmaterialprobe hat eine Wahrscheinlichkeit von 92% bzw. 65% 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 0,63 bzw. 1,2 erhalten. Die Ergebnisse der Microtracer-Analyse sind in der Dokumentation angegeben.

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

#### Durchführung der Homogenitätstests

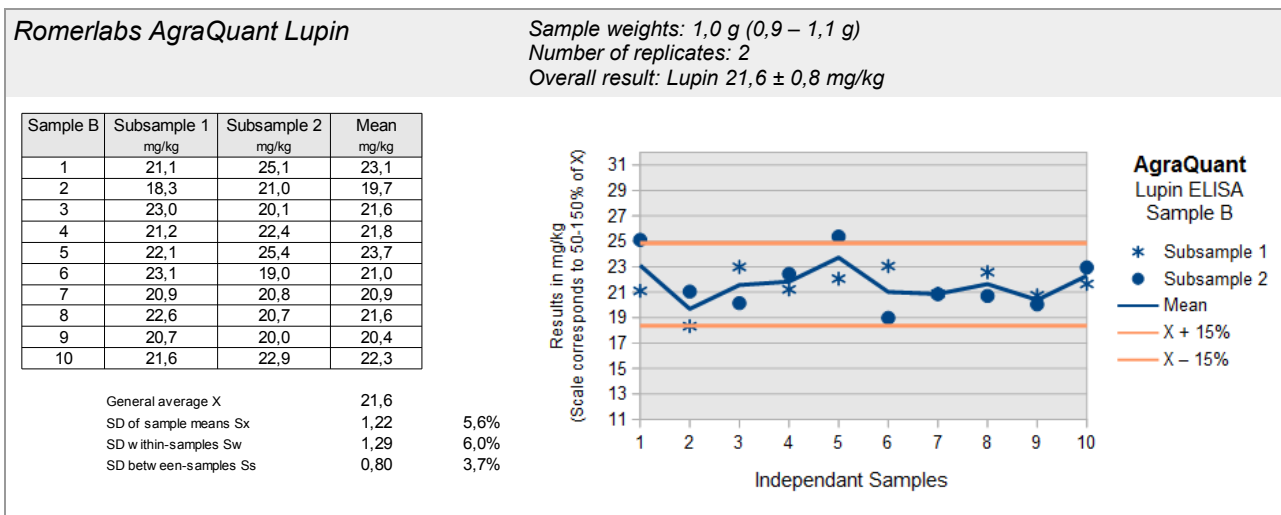
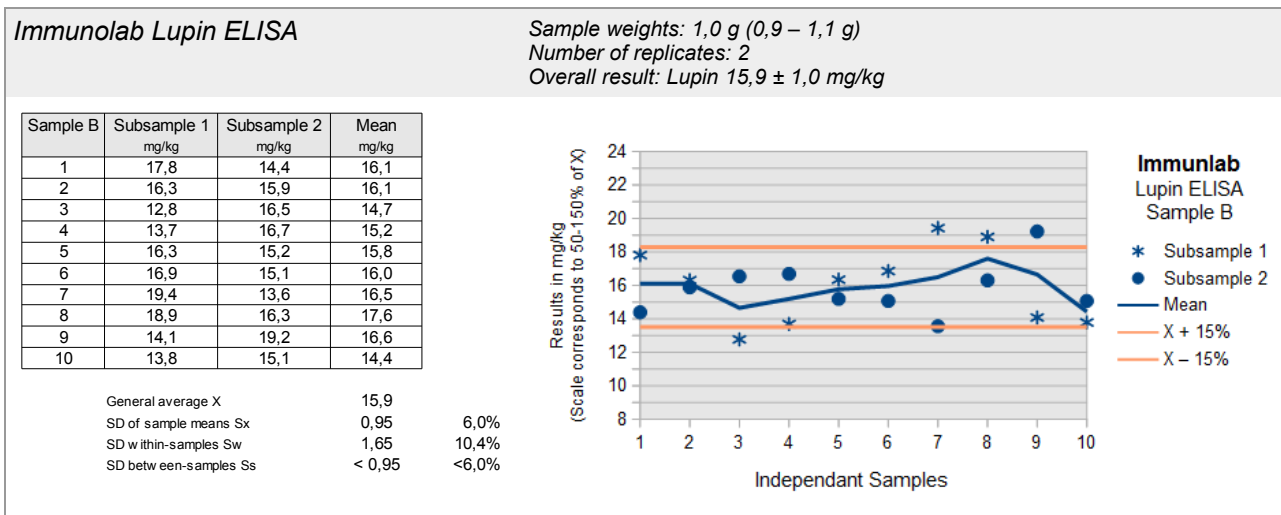
Die Homogenitätstests wurden in Kooperation mit den Labors der angegebenen Testkit-Anbieter durchgeführt. Von DLA wurden zufällig 10 Muster der abgefüllten dotierten Probe ausgewählt und davon jeweils 2 Teilproben in zuvor zufällig-coodierte Extraktionsbehälter eingewogen und anschließend den Labors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

#### Bewertung der Homogenität

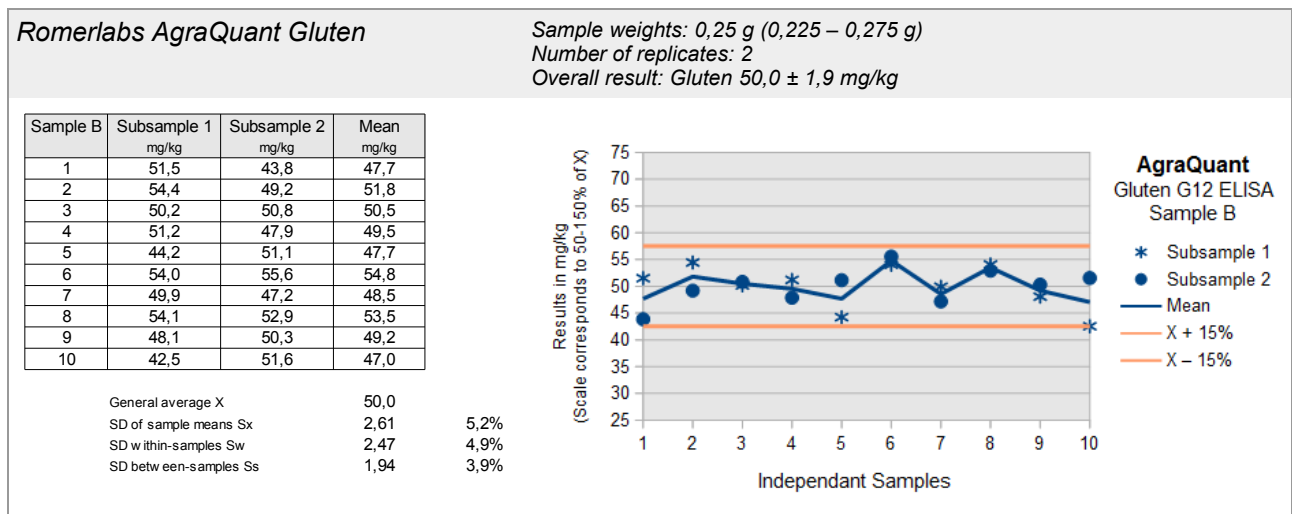
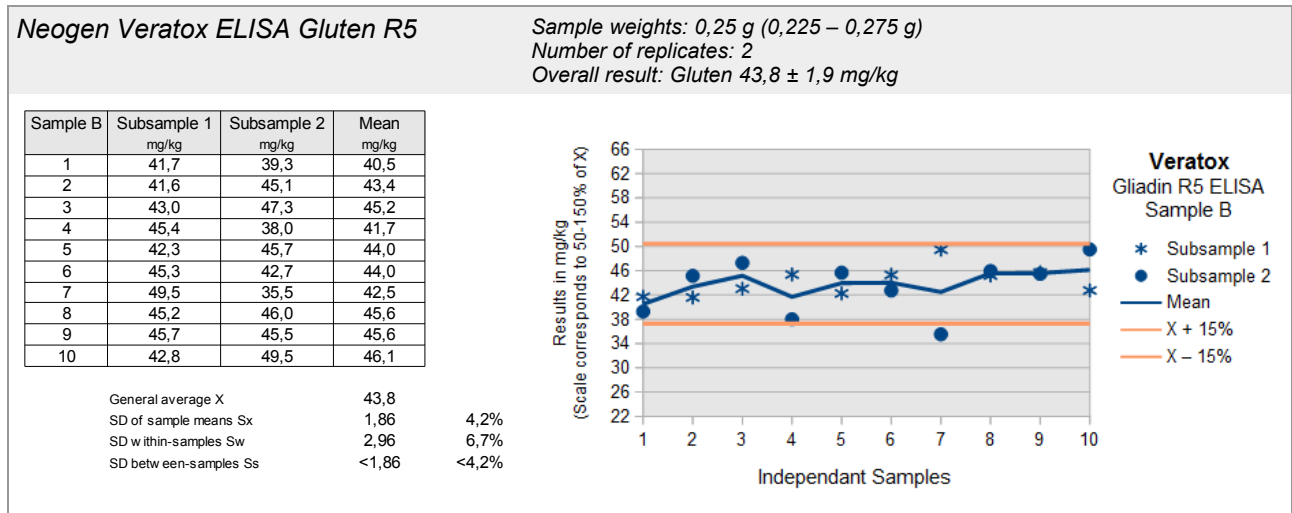
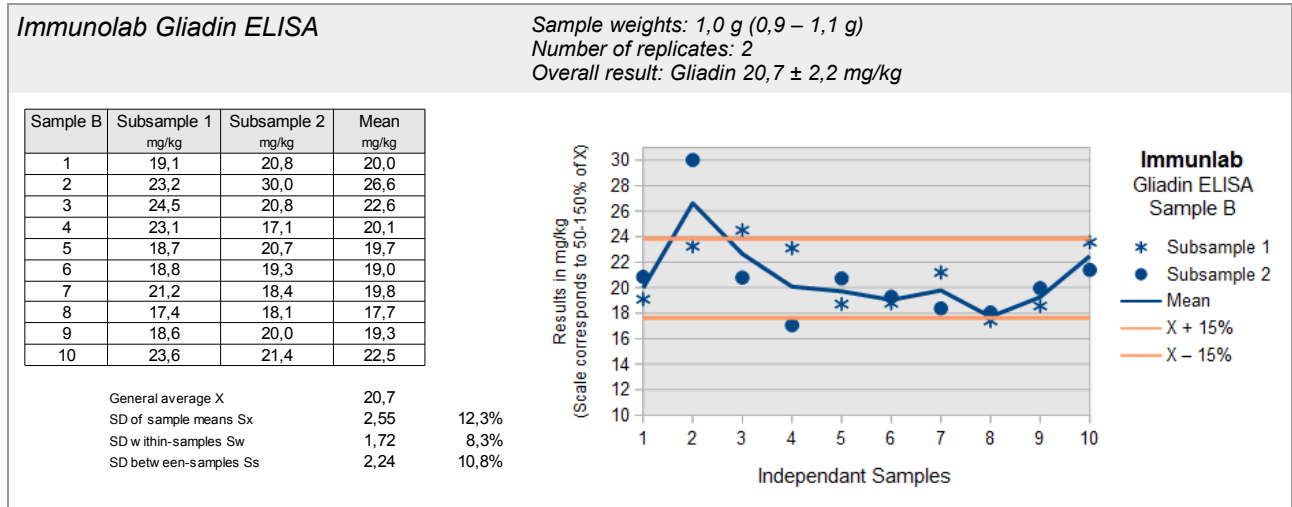
Die Homogenität wird mit einer Standardabweichung zwischen den Proben von  $S_s \leq 15\%$  („Heterogenitätsstandardabweichung“) als hinreichend gesichert angesehen. Dieses Kriterium wird für die untersuchte Probe B in allen ELISA-Tests sowohl für Lupine (Immunolab und AgraQuant) als auch für Gluten (Immunolab, Veratox und AgraQuant) erfüllt (s. Seite 7). Die Anforderung an Wiederholstandardabweichungen von ELISA- und PCR-Verfahren ist üblicherweise  $\leq 25\%$  [18, 19, 22, 23].

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

**ELISA-Tests: Homogenität Lupine / Homogeneity Lupin**



**ELISA-Tests: Homogenität Gluten / Homogeneity Gluten**





### 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.  $0,20$  ( $21,1^\circ\text{C}$ ). Die Stabilität des Probenmaterials war somit während des Untersuchungszeitraums unter den angegebenen Lagerbedingungen gewährleistet.

### 2.2 Probenversand und Informationen zur Untersuchung

An jeden Teilnehmer wurden in der 9. Kalenderwoche 2019 je eine Portion der Untersuchungsmaterialien A und B sowie eine Dotierungsmaterialprobe verschickt. Die Untersuchungsverfahren wurden freigestellt. Die Untersuchungen waren durchzuführen bis spätestens 12. April 2019.

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

*Es handelt sich um zwei unterschiedliche Proben A und B mit möglichen Gehalten an den allergenen Parametern Lupine und Weizen im mg/kg Bereichen der Matrix „glutenfreies“ Brot. Eine der beiden Proben sowie die "Dotierungsniveauprobe" wurden mit den allergenen Zutaten hergestellt. Die "Dotierungsniveauprobe" enthält die Allergene in einfacher Matrix (Kartoffelpulver) mit ähnlichen Gehalten ohne weitere Prozessierung. Die Dotierungsniveauprobe soll wie eine normale Probe untersucht werden.*

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

### 2.3 Ergebnisübermittlung

Die Ergebnisabgabe erfolgte einheitlich mittels an die teilnehmenden Labore übergebenen Übermittlungstabellen (per eMail).

Zur Auswertung kamen einerseits die Ergebnisse als positiv/negativ Angaben und andererseits angegebene Gehalte an allergenen Zutaten in mg/kg z.B. als allergenes Lebensmittel oder Protein.

Abgefragt und dokumentiert wurden die o.g. Ergebnisse sowie Angaben zu den Testmethoden wie Spezifitäten, Bestimmungsgrenzen, Testkit-Hersteller und Stichpunkte zur Durchführung der Methoden.

Falls Teilnehmer mehrere Ergebnisse für denselben Parameter abgegeben haben, die mit unterschiedlichen Methoden erhalten wurden, wurden diese Ergebnisse mit derselben Auswertenummer mit einem Buchstaben als Suffix unter Angabe der jeweiligen Methode ausgewertet.

Von 17 Teilnehmern haben 13 Teilnehmer ihre Ergebnisse fristgerecht abgegeben. Ein Teilnehmer hat keine Ergebnisse abgegeben und drei haben in Absprache mit DLA verspätet Ergebnisse eingereicht.

### 3. Auswertung

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

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

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

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

#### 3.1 Konsenswert der Teilnehmer (zugewiesener Wert)

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

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

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

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

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

Einzelergebnisse die außerhalb des angegebenen Messbereiches eines teil-

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

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

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

#### 3.4.2 Auswertung eines Versuchs zur Präzision

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

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

Die in Tabelle 2a (ELISA) und Tabelle 2b (PCR) angegebenen relativen Wiederholstandardabweichungen ( $\text{RSD}_x$ ) und relativen Vergleichsstandardabweichungen ( $\text{RSD}_R$ ) wurden in Ringversuchen mittels der angegebenen Methoden ermittelt. Die resultierenden Zielstandardabweichungen  $\sigma_{pt}$  wurden für eine Anzahl von  $m = 2$  Wiederholmessungen berechnet. Bei einer Anzahl von  $m = 1$  ist die Vergleichsstandardabweichung  $\sigma_R$  gleich der Zielstandardabweichung  $\sigma_{pt}$ .

**Tabelle 2a:** ELISA-Methoden - Relative Wiederholstandardabweichungen ( $RSD_r$ ) und relative Vergleichsstandardabweichungen ( $RSD_R$ ) gemäß ausgewählter Auswertungen von Versuchen zur Präzision und die resultierende Zielstandardabweichung  $\sigma_{pt}$  [30-31]

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

Aus den Präzisionsdaten der ASU §64 Methoden ergeben sich abhängig von Matrix bzw. Prozessierung und Konzentrationsbereich relative Zielstandardabweichungen im Bereich von 12 - 33% für die ELISA-Methoden und 21 - 45% für die PCR-Methoden (s. Tab. 2a und 2b).

Die Working Group on Prolamin Analysis and Toxicity (WGPAT) hat Ringversuche zur Validierung von zwei kommerziellen ELISA-Test-Kits zur Gluten-Bestimmung mittels monoklonalem R5 Antikörper durchgeführt [24]. Es wurden 12 Lebensmittelproben mit Gliadinegehalten im Bereich von 0 - 168 mg/kg von 20 Laboratorien untersucht. Die Wiederfindungsraten lagen zwischen 65 und 110%, die relativen Wiederholstandardabweichungen lagen bei 13 - 25% (1. Methode) bzw. 11 - 22% (2. Methode) und die relativen Vergleichsstandardabweichungen bei 23 - 47% (1. Methode) bzw. 25 - 33% (2. Methode). Laut den Autoren erfüllten beide ELISA-Test-Kits damit die Validierungskriterien für ELISA Methoden [24].

Das IRMM (Institute for Reference Materials and Measurements) hat in einem Ringversuch die Eignung fünf verschiedener ELISA-Test-Kits zur Bestimmung von Erdnuss getestet [27]. Die Mittelwerte lagen im Konzentrationsbereich von 0,3 - 16,1 mg/kg bzw. 1,2 - 20,4 mg/kg. Die jeweils niedrigsten relativen Vergleichsstandardabweichungen der fünf Test-Kits lagen für die Matrix Bitterschokolade bei 20 - 42% und für Kekse bei 23 - 61%.

Tabelle 2b: PCR-Methoden - Relative Wiederholstandardabweichungen ( $RSD_r$ ) und relative Vergleichsstandardabweichungen ( $RSD_R$ ) gemäß ausgewählter Auswertungen von Versuchen zur Präzision und die resultierende Zielstandardabweichung  $\sigma_{pt}$  [32,33]

Parameter	Matrix	Mittelwerte [mg/kg]	Wiederfindung	rob $RSD_r$	$RSD_r$	$RSD_R$	$\sigma_{pt}$	Methode / Literatur
Lupine	Reiskekse	102 17,4 9,5	102 % 87 % 95 %	-	14,6% 26,5% 39,1%	23,0% 33,1% 42,6%	20,6% 27,3% 32,3%	rt-PCR multiplex ASU 18.00-22
Lupine	Weizenkekse Soßenpulver	80,8 53,6	64,1 % 53,6 %	-	10,5% 23,9%	29,5% 48,0%	28,6% 44,8%	rt-PCR multiplex ASU 18.00-22
Weizen + Roggen	Brühwurst (100°C, 60 min)	96,1	120 %	-	21,3%	35,4%	32,0%	rt-PCR ASU 08.00-66
Weizen + Roggen	Wurst, autoklaviert	74,9	11,0 %	-	24,6%	32,7%	27,7%	rt-PCR ASU 08.00-66

### 3.4.3 Werte aus Erkenntnissen

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

Anforderungen an die Leistungsfähigkeit der Analysemethoden zur quantitativen Bestimmung von Allergenen in Lebensmitteln sind u.a. vom Ministry of Health and Welfare (MHLW) in Japan [22], von der Arbeitsgruppe 12 „Lebensmittelallergene“ des Technischen Komitees CEN/TC 275 [19-21], von einer internationalen "Food Allergen Working Group" unter der Leitung der AOAC Presidential Task Force on Food Allergens [23] und vom Codex Alimentarius Committee (CAC/GL 74-2010) [18] erarbeitet worden.

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

Tabelle 3: ELISA-Validierungskriterien

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

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

Tabelle 4: PCR-Validierungskriterien

Literatur [18]	Wiederfindungsrate	Wiederholstandard- abweichung	Vergleichsstandard- abweichung
CAC 2010	± 25% <sup>(a)</sup>	≤ 25%	≤ 35%

(a) = Trueness / Richtigkeit

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

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

### 3.5 z-Score

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

Die Berechnung erfolgt nach:

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

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

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

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

- i) **z-Score** - **z<sub>ALL</sub>** (bezogen auf alle Ergebnisse)
- ii) **z-Score** - **z<sub>METHOD i</sub>** (bezogen auf Einzelmethoden)

#### 3.5.1 Warn- und Eingriffssignale

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

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



### 3.6 z'-Score

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

Die Berechnung erfolgt nach:

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

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

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

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

Zu Warn- und Eingriffssignalen siehe 3.5.1.

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

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

### 3.8 Standardunsicherheit und Rückführbarkeit

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

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

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

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

### 3.9 Graphische Darstellung der Bezugswerte

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

### 3.10 Wiederfindungsraten: Dotierung

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

## 4. Ergebnisse

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

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

Die folgenden Ergebnisseiten sind für die allergenen Bestandteile jeweils gleich aufgebaut. Es werden zunächst die Ergebnisse aller ELISA- bzw. PCR-Methoden zu einem Parameter für die Proben A und B (qualitativ und ggf. quantitativ) und danach für die Dotierungsniveauprobe (nur quantitativ) angegeben. Die Wiederfindungsraten der Ergebnisse für die Dotierungsniveauprobe und die dotierte Probe A oder B werden anschließend behandelt.

Im Ergebnisteil werden alle quantitativen Teilnehmerergebnisse auf 3 signifikante Stellen (gültige Ziffern) formatiert dargestellt. Im Dokumentationsteil sind die Ergebnisse so angegeben wie sie von den Teilnehmern übermittelt wurden.

Um die **Vergleichbarkeit von quantitativen Ergebnissen** zu gewährleisten, wurden Teilnehmerergebnisse mit unterschiedlichen Angaben (z.B. als Protein oder allergenes Lebensmittel) soweit möglich von DLA harmonisiert.

Die ELISA-Ergebnisse, die als **Lupine** oder **Lupinenmehl** angegeben wurden, sind mit dem experimentell bestimmten Proteingehalt des Süßlupinenmehls in **Lupinenprotein** umgerechnet worden (siehe S. 5). Ein quantitatives PCR-Ergebnis wurde als Lupinenmehl abgegeben und ausgewertet.

ELISA-Ergebnisse, die als **Gliadin** angegeben wurden, sind in **Gluten** umgerechnet worden. Dabei wurde die Gliadin-Angabe mit dem Faktor 2 multipliziert.

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

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

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

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

Im Anschluss erfolgt die Darstellung der Wiederfindungsraten für die Ergebnisse von Dotierungsniveauprobe und dotierter Probe. Die Anzahl der Ergebnisse im Akzeptanzbereich von 50-150% wird aufsummiert.

### 4.1 Vergleichsuntersuchung Lupine

#### 4.1.1 ELISA-Ergebnisse: Lupine (als Lupinenprotein)

#### 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]			
5	negativ	0	positiv	2,31	1/1 (100%)	BF	Ergebnis umgerechnet °
12	negativ	< 0,72	positiv	4,38	1/1 (100%)	EF	Ergebnis umgerechnet °
14	negativ	< 0,72	positiv	5,86	1/1 (100%)	EF	Ergebnis umgerechnet °
1	negativ		positiv	5,40	1/1 (100%)	IL	Ergebnis umgerechnet °
2	positiv	< 0,72	positiv	3,92	1/1 (100%)	IL	Ergebnis umgerechnet °
9	negativ	< 1	positiv	8,00	1/1 (100%)	RS	
3	positiv	2,40	positiv	9,50	1/1 (100%)	RS-F	
6	negativ	< 1	positiv	6,75	1/1 (100%)	RS-F	
7	positiv	1,01	positiv	8,23	1/1 (100%)	RS-F	Ergebnis umgerechnet °
8	positiv	1,90	positiv	11,9	1/1 (100%)	RS-F	
16	positiv	1,30	positiv	9,00	1/1 (100%)	RS-F	

° Umrechnung S. 19

	Probe A	Probe B
Anzahl positiv	5	11
Anzahl negativ	6	0
Prozent positiv	45	100
Prozent negativ	55	0
Konsenswert	keiner	positiv

**Methoden:**

BF = MonoTrace ELISA, BioFront Technologies  
 EF = SensiSpec ELISA Kit, Eurofins  
 IL = Immunolab  
 RS = Ridascreen®, R-Biopharm  
 RS-F= Ridascreen® Fast, R-Biopharm

Anmerkung:

Der Konsenswert für Probe B steht in qualitativer Übereinstimmung mit der Dotierung von Probe B.

Für die Probe A (ohne Zusatz von Lupine) konnte kein Konsenswert für die qualitative Bewertung festgestellt werden, da weniger als 75% positive bzw. negative Ergebnisse vorlagen. Die positiven Ergebnisse lagen wenig oberhalb der Bestimmungsgrenzen.

**Quantitative Auswertung ELISA: Probe B**

Auswertenummer	Lupinenprotein [mg/kg]	z-Score X <sub>pt</sub> <sup>ALL</sup>	z-Score X <sub>pt</sub> <sup>PEAK 4</sup>	z-Score X <sub>pt</sub> <sup>RS-F</sup>	Methode	Hinweis
5	2,31	-2,6	-1,9		BF	Ergebnis umgerechnet °
12	4,38	-1,4	0,01		EF	Ergebnis umgerechnet °
14	5,86	-0,55	1,4		EF	Ergebnis umgerechnet °
1	5,40	-0,82	0,94		IL	Ergebnis umgerechnet °
2	3,92	-1,7	-0,42		IL	Ergebnis umgerechnet °
9	8,00	0,71			RS	
3	9,50	1,6		0,19	RS-F	
6	6,75	-0,03		-1,0	RS-F	
7	8,23	0,84		-0,37	RS-F	Ergebnis umgerechnet °
8	11,9	3,0		1,2	RS-F	
16	9,00	1,3		-0,04	RS-F	

° Umrechnung S. 19

**Methoden:**

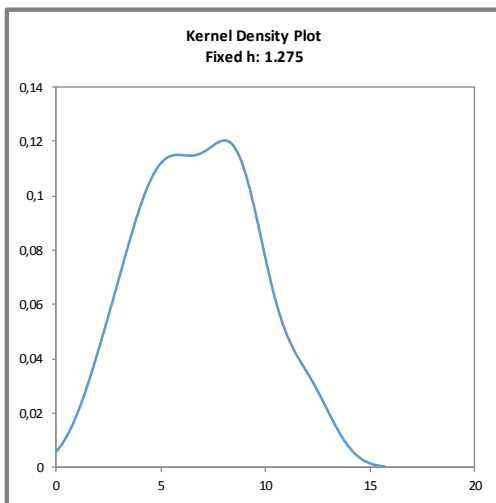
BF = MonoTrace ELISA, BioFront Technologies

EF = SensiSpec ELISA Kit, Eurofins

IL = Immunolab

RS = Ridascreen®, R-Biopharm

RS-F= Ridascreen® Fast, R-Biopharm



**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 breite Verteilung der Ergebnisse mit zwei angedeuteten Maxima bei ca. 4-5 mg/kg und 8 mg/kg.

Kenndaten: Quantitative Auswertung ELISA Lupinenprotein**Probe B**

<b>Kenndaten</b>	<b>Alle Ergebn.</b> [mg/kg]	<b>Meth. Peak 4</b> [mg/kg]	<b>Methode RS-F</b> [mg/kg]
	$X_{pt_{ALL}}$	$X_{pt_{PEAK 4}}$	$X_{pt_{METHOD RS-F}}$
Zugewiesener Wert ( $X_{pt}$ )			
Anzahl der Messergebnisse	11	5	5
Anzahl der Ausreißer	0	0	0
Mittelwert	6,84	4,37	9,08
Median	6,75	4,38	9,00
<b>Robuster Mittelwert (<math>X_{pt}</math>)</b>	<b>6,80</b>	<b>4,37</b>	<b>9,08</b>
<b>Robuste Standardabweichung (<math>S^*</math>)</b>	<b>3,09</b>	<b>1,58</b>	<b>2,14</b>
<i>Zielkenndaten:</i>			
<b>Zielstandardabweichung <math>\sigma_{pt}</math></b>	<b>1,70</b>	<b>1,09</b>	<b>2,27</b>
<b>Untere Grenze des Zielbereichs</b>	<b>3,40</b>	<b>2,19</b>	<b>4,54</b>
<b>Obere Grenze des Zielbereichs</b>	<b>10,2</b>	<b>6,56</b>	<b>13,6</b>
Quotient $S^*/\sigma_{pt}$	1,8	1,4	0,94
Standardunsicherheit $U(X_{pt})$	1,16	0,88	1,20
Ergebnisse im Zielbereich	9	5	5
Prozent im Zielbereich	82	100	100

**Methoden:**

Meth. Peak 4 = BF (BioFront), EF (Eurofins), IL (Immunolab)

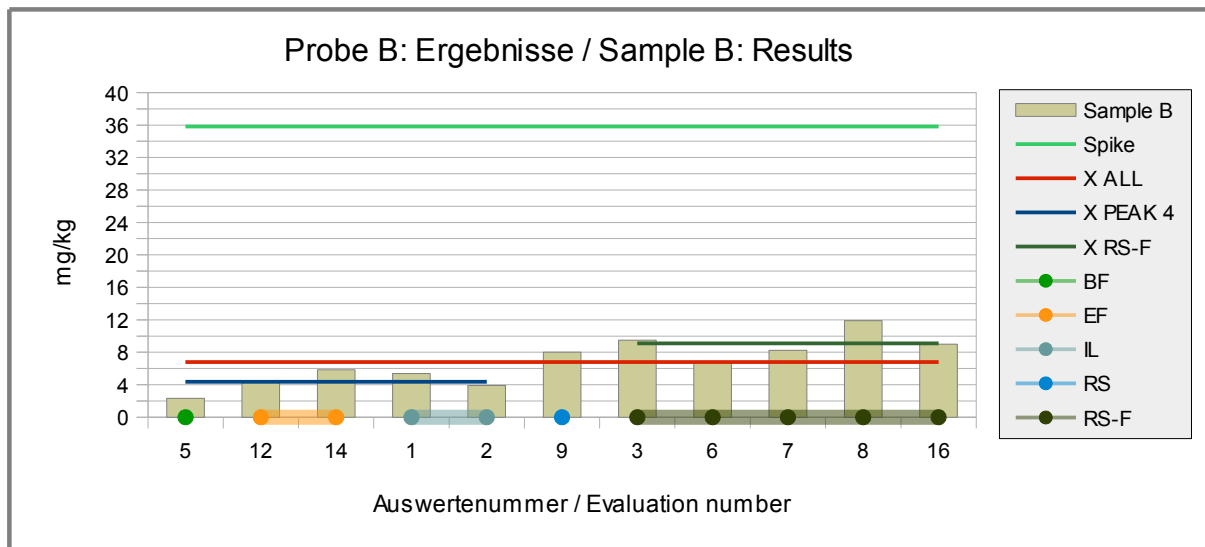
RS-F = R-Biopharm, Ridascreen® Fast

Anmerkungen zu den Kenndaten und Vergleich der Bezugswerte:

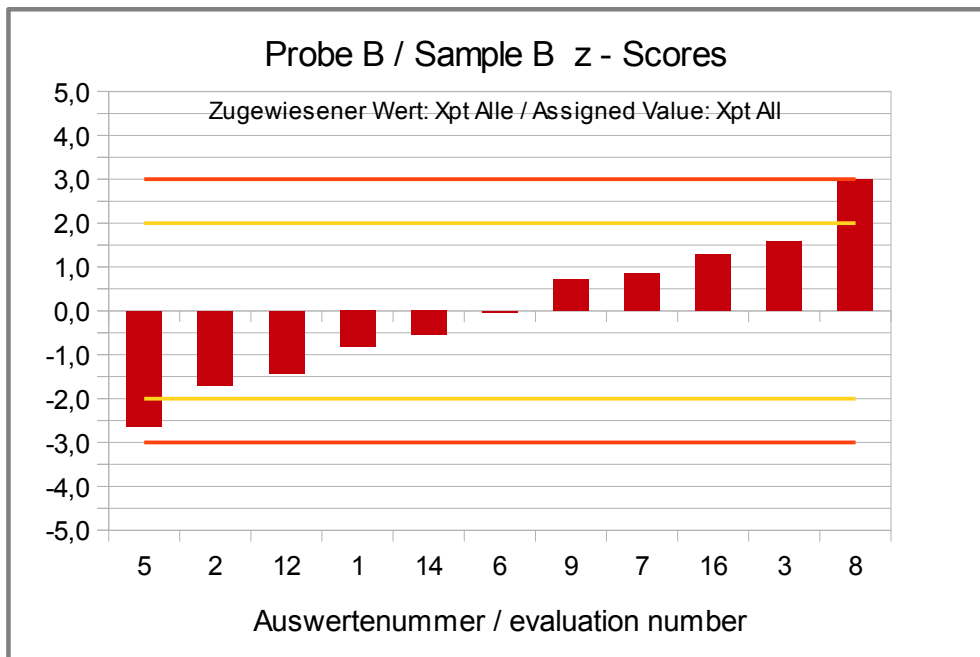
Die Kerndichte-Schätzung zeigte eine Verteilung mit zwei ineinander übergehenden Maxima. Da sich das zweite Maximum den Ridascreen-Methoden zuordnen lässt, wurde zusätzlich eine separate Auswertung des ersten Maximums ohne Ridascreen-Methoden ("Peak 4") vorgenommen.

Die Auswertungen der Ergebnisse aller Methoden, der Methoden "Peak 4" und von Methode RS-F zeigten eine normale bis geringe Variabilität der Ergebnisse. Der Quotient  $S^*/\sigma_{pt}$  lag jeweils unter 2,0. Die robuste Standardabweichung liegt im Bereich von etablierten Werten für die Wiederhol- und Vergleichsstandardabweichung der eingesetzten Bestimmungsmethoden (vgl. 3.4.2 Auswertung eines Versuchs zur Präzision und 3.4.3 Werte aus Erkenntnissen). Die Vergleichbarkeit der Ergebnisse ist gegeben. Diese Aussage ist für die methodenübergreifende Auswertung nur eingeschränkt gültig, da für einige Methoden nur wenige Ergebnisse vorlagen.

Die robusten Mittelwerte der Auswertungen lagen mit 19%, 12% und 25% vom Zusatzniveau von Lupine zu Probe B unterhalb der relevanten Anforderungen für die eingesetzten Methoden (s. 3.4.3 und "Wiederfindungsraten für Lupinenprotein" S.30).

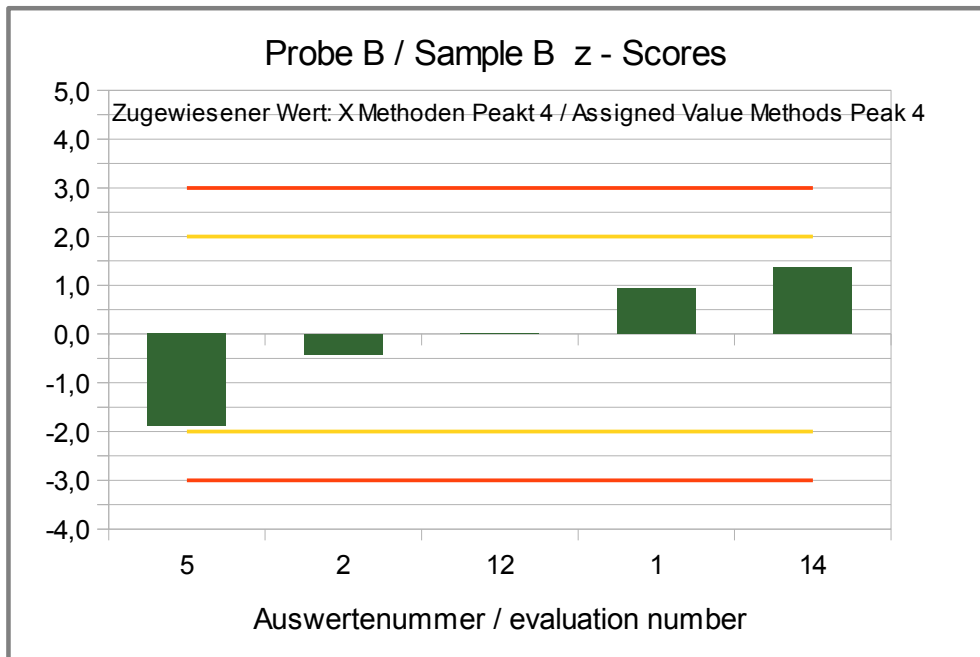


**Abb./Fig. 2:** ELISA-Ergebnisse Lupinenprotein  
 grüne Linie = Zusatzniveau (Spike)  
 rote Linie = robuster Mittelwert aller Ergebnisse  
 blaue Linie = robuster Mittelwert Ergebnisse Methoden Peak 4  
 dunkelgrüne Linie = robuster Mittelwert Ergebnisse Methode RS-F  
 runde Symbole = Zuordnung der Methoden (s. Legende)



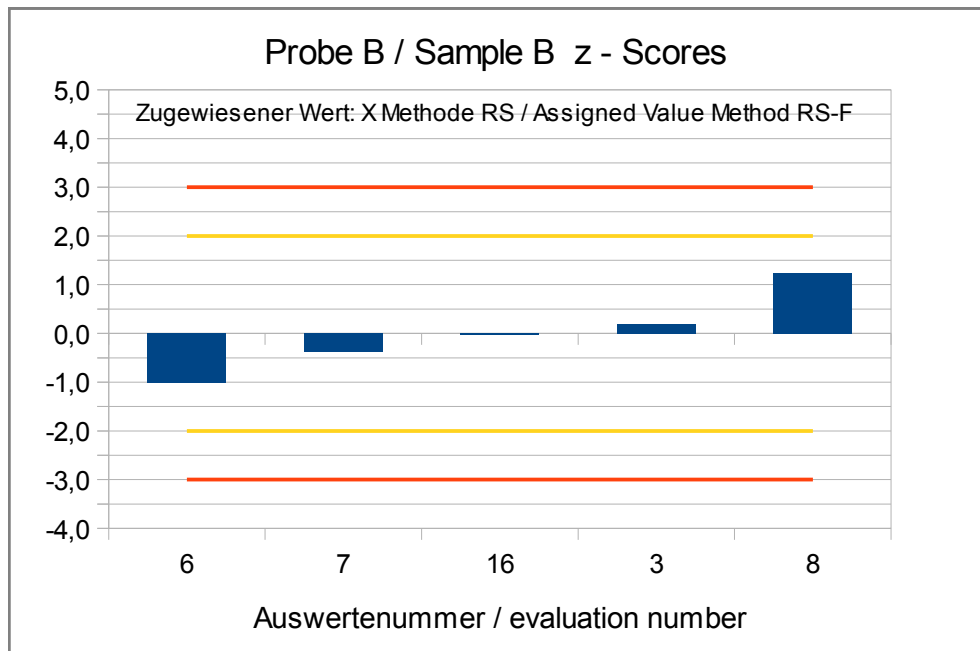
**Abb./Fig. 3:**  
 z-Scores (ELISA-Ergebnisse als Lupinenprotein)  
 Zugewiesener Wert: robuster Mittelwert aller Ergebnisse





**Abb./Fig. 4:**

z-Scores (ELISA-Ergebnisse als Lupinenprotein) Bezugswert robuster Mittelwert Ergebnisse Methoden Peak 4 (BF, EF, IL)



**Abb./Fig. 5:**

z-Scores (ELISA-Ergebnisse als Lupinenprotein) Bezugswert robuster Mittelwert Ergebnisse Methode RS-F (R-Biopharm, Ridascreen® Fast)

**Quantitative Auswertung ELISA: Dotierungsniveauprobe**

Auswertenummer	Lupinenprotein [mg/kg]	z-Score $X_{pt,ALL}$	z-Score $X_{pt,RS-F}$	Methode	Hinweis
5	15,3	-2,1		BF	Ergebnis umgerechnet °
12	47,6	2,0		EF	Ergebnis umgerechnet °
14	32,9	0,16		EF	Ergebnis umgerechnet °
1	40,0	1,0		IL	Ergebnis umgerechnet °
2	25,6	-0,78		IL	Ergebnis umgerechnet °
9				RS	
3	18,1	-1,7	-1,7	RS-F	
6	34,9	0,40	0,43	RS-F	
7	31,3	-0,05	-0,03	RS-F	Ergebnis umgerechnet °
8	38,0	0,79	0,83	RS-F	
16	33,0	0,16	0,19	RS-F	

° Umrechnung S. 19

**Methoden:**

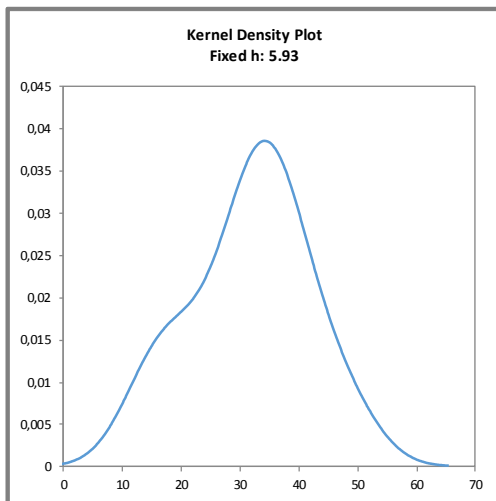
BF = MonoTrace ELISA, BioFront Technologies

EF = SensiSpec ELISA Kit, Eurofins

IL = Immunolab

RS = Ridascreen®, R-Biopharm

RS-F= Ridascreen® Fast, R-Biopharm



**Abb. / Fig. 6:**

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

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

**Anmerkung:**

Die Kerndichte-Schätzung zeigt annähernd eine symmetrische Verteilung mit einer Schulter bei 15-20 mg/kg.

**Kenndaten: Quantitative Auswertung ELISA Lupinenprotein****Dotierungsniveauprobe**

<b>Kenndaten</b>	<b>Alle Ergebnisse</b> [mg/kg]	<b>Methode RS-F</b> [mg/kg]
Zugewiesener Wert ( $X_{pt}$ )	$X_{pt}_{ALL}$	$X_{pt}_{METHOD\ RS-F}$
Anzahl der Messergebnisse	10	5
Anzahl der Ausreißer	0	0
Mittelwert	31,7	31,1
Median	33,0	33,0
<b>Robuster Mittelwert (<math>X_{pt}</math>)</b>	<b>31,7</b>	<b>31,5</b>
<b>Robuste Standardabweichung (<math>S^*</math>)</b>	<b>11,1</b>	<b>7,5</b>
<i>Zielkenndaten:</i>		
<b>Zielstandardabweichung <math>\sigma_{pt}</math></b>	<b>7,91</b>	<b>7,89</b>
<b>Untere Grenze des Zielbereichs</b>	<b>15,8</b>	<b>15,8</b>
<b>Obere Grenze des Zielbereichs</b>	<b>47,5</b>	<b>47,3</b>
Quotient $S^*/\sigma_{pt}$	1,4	1,0
Standardunsicherheit $U(X_{pt})$	4,39	4,20
Ergebnisse im Zielbereich	8	5
Prozent im Zielbereich	80	100

**Methoden:**

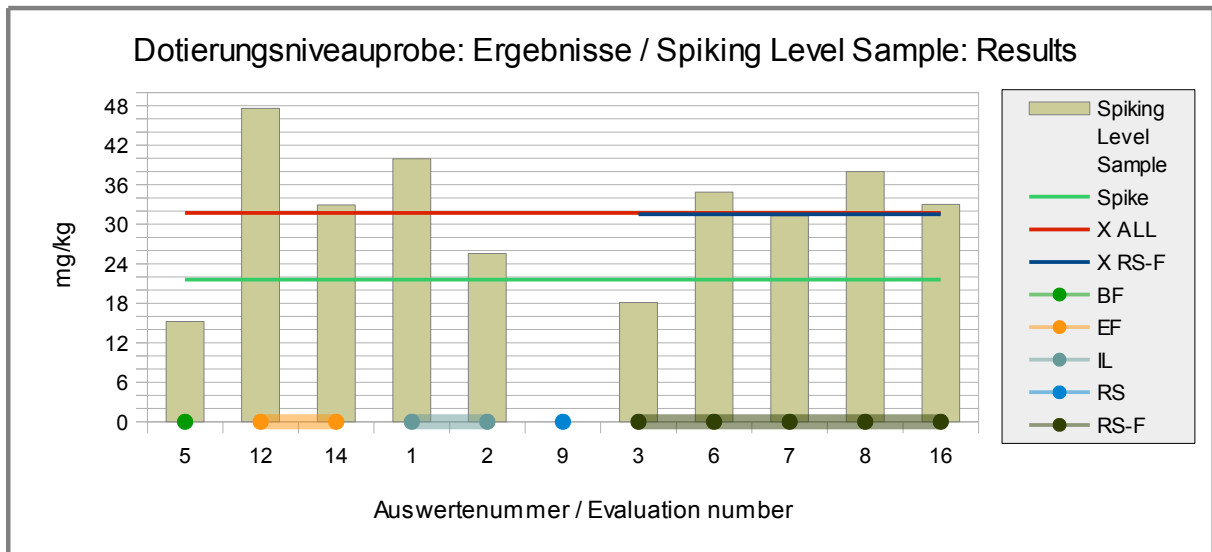
RS-F = R-Biopharm, Ridascreen® Fast

Anmerkungen zu den Kenndaten und Vergleich der Bezugswerte:

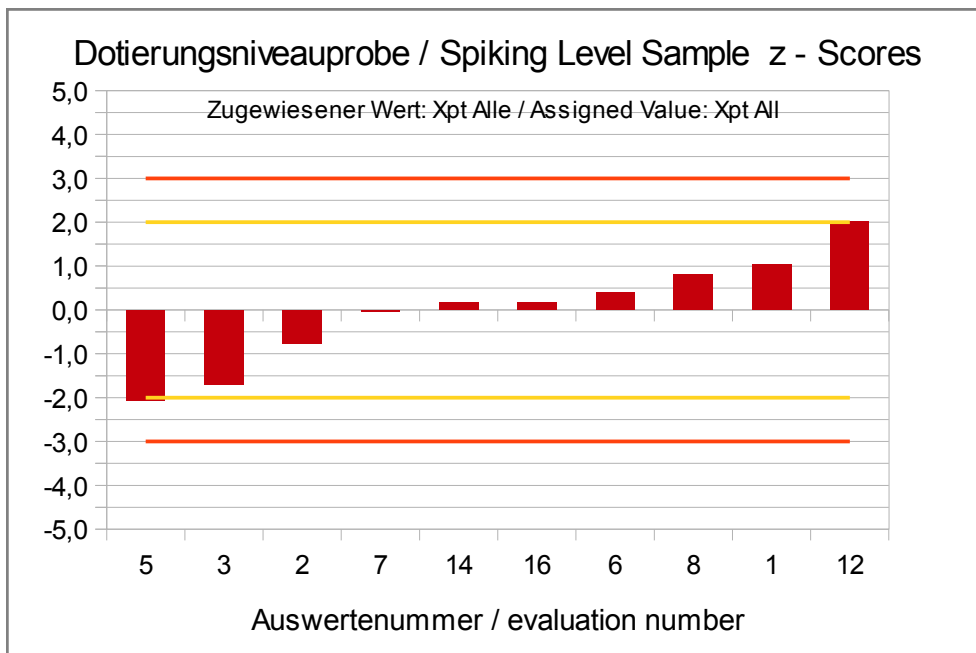
Die Kerndichte-Schätzung zeigte keine eindeutigen methodenabhängigen Unterschiede.

Die Verteilung der Ergebnisse aller Methoden sowie für Methode RS-F zeigte jeweils eine normale Variabilität. Die Quotienten  $S^*/\sigma_{pt}$  lagen unter 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 gegeben. Diese Aussage ist für die methodenübergreifende Auswertung nur eingeschränkt gültig, da für einige Methoden nur wenige Ergebnisse vorlagen.

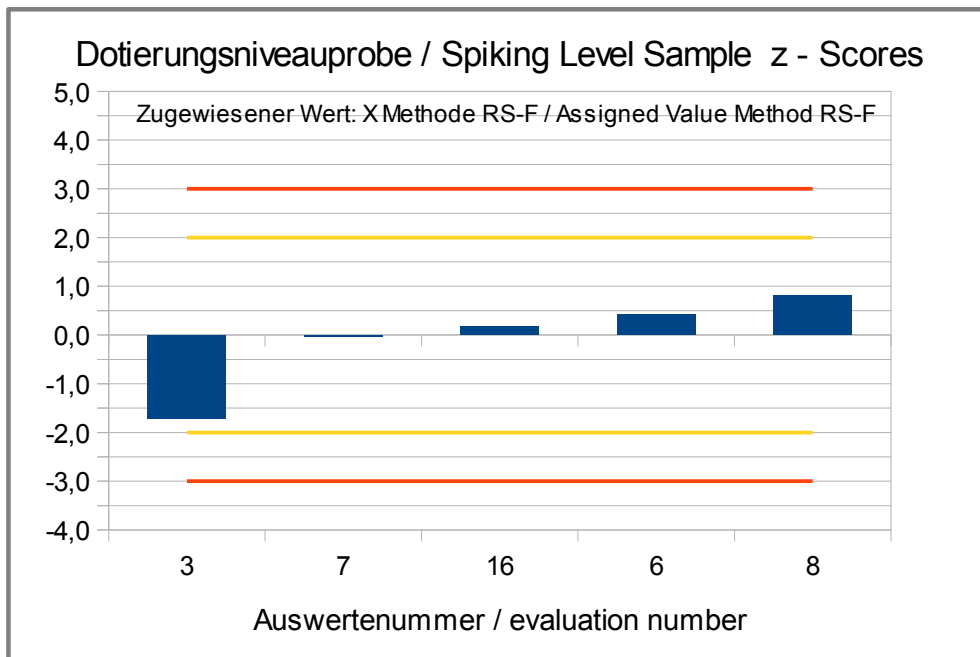
Die robusten Mittelwerte der Auswertungen lagen mit 147% bzw. 146% vom Zusatzniveau von Lupine zur Dotierungsniveauprobe innerhalb der relevanten Anforderungen für die eingesetzten Methoden (s. 3.4.3 und "Wiederfindungsraten für Lupinenprotein", s. S.30).



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



**Abb./Fig. 8:**  
 z-Scores (ELISA-Ergebnisse als Lupinenprotein)  
 Zugewiesener Wert: robuster Mittelwert aller Ergebnisse



**Abb./Fig. 9:**

z-Scores (ELISA-Ergebnisse als Lupinenprotein) Bezugswert robuster Mittelwert Ergebnisse Methode RS-F (R-Biopharm, Ridascreen Fast)

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

Auswertenummer	Dotierungsniveauprobe	Wiederfindungsrate*	Probe B	Wiederfindungsrate*	Methode	Hinweis
	[mg/kg]	[%]	[mg/kg]	[%]		
5	15,3	<b>71</b>	2,31	6,5	BF	Ergebnis umgerechnet °
12	47,6	220	4,38	12	EF	Ergebnis umgerechnet °
14	32,9	153	5,86	16	EF	Ergebnis umgerechnet °
1	40,0	185	5,40	15	IL	Ergebnis umgerechnet °
2	25,6	<b>118</b>	3,92	11	IL	Ergebnis umgerechnet °
9			8,00	22	RS	
3	18,1	<b>84</b>	9,50	27	RS-F	
6	34,9	161	6,75	19	RS-F	
7	31,3	<b>145</b>	8,23	23	RS-F	Ergebnis umgerechnet °
8	38,0	176	11,9	33	RS-F	
16	33,0	153	9,00	25	RS-F	

° Umrechnung S. 19

AB**	50-150 %	AB**	50-150 %
Anzahl im AB	<b>4</b>	Anzahl im AB	<b>0</b>
Prozent im AB	<b>40</b>	Prozent im AB	<b>0</b>

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

\*\* Akzeptanzbereich der AOAC für Allergen-ELISAs

**Methoden:**

BF = MonoTrace ELISA, BioFront Technologies

EF = SensiSpec ELISA Kit, Eurofins

IL = Immunolab

RS = Ridascreen®, R-Biopharm

RS-F= Ridascreen® Fast, R-Biopharm

Anmerkung:

40% (4) der Teilnehmer haben mit der Dotierungsniveauprobe mittels ELISA eine Wiederfindungsrate im Bereich der AOAC-Anforderung von 50-150% erhalten. Für die prozessierte dotierte Lebensmittelmatrix-Probe B lagen alle Wiederfindungsraten unterhalb des Akzeptanzbereichs.

## 4.1.2 PCR-Ergebnisse: Lupine

## Qualitative Auswertung der Ergebnisse: Proben A und B

Auswertenummer	Probe A	Probe A	Probe B	Probe B	Qualitative Bewertung	Methode	Hinweis
	pos/neg	[mg/kg]	pos/neg	[mg/kg]	Übereinstimmungen mit Konsenswerten		
7	negativ		positiv		2/2 (100%)	ASU	
8	negativ		positiv		2/2 (100%)	ASU	
12	negativ		positiv		2/2 (100%)	ASU	
13	negativ		positiv	9,9	2/2 (100%)	ASU	Ergebnis als Lupinenmehl
16	negativ		positiv		2/2 (100%)	ASU	
9	negativ	< 0,4	positiv		2/2 (100%)	SFA-ID	
4	negativ		negativ		1/2 (50%)	div	
11	negativ		positiv		2/2 (100%)	div	
15	positiv		negativ		0/2 (0%)	div	

	Probe A		Probe B	
Anzahl positiv	1		7	
Anzahl negativ	8		2	
Prozent positiv	11		78	
Prozent negativ	89		22	
Konsenswert	negativ		positiv	

**Methoden:**

ASU = ASU §64 Methode/method

SFA-ID = Sure Food Allergen ID, R-Biopharm / Congen

div = keine genaue Angabe / andere Methode

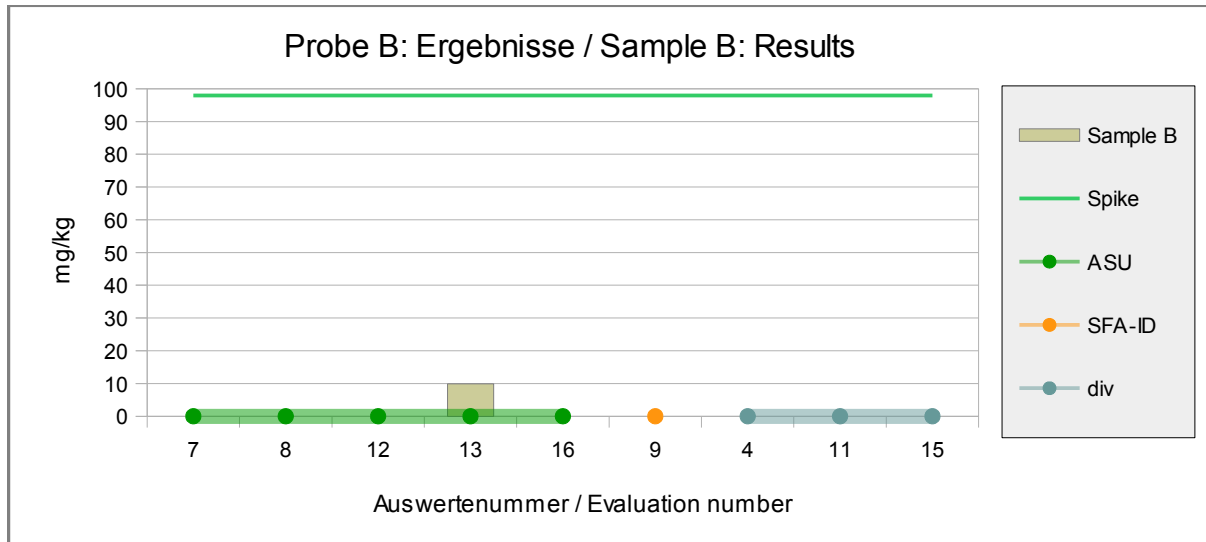
Anmerkung:

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

Ein positives Ergebnis wurde für Probe A und zwei negative Ergebnisse für Probe B mit nicht genauer beschriebenen Methoden bzw. Hausmethoden der Teilnehmer erhalten.

**Quantitative Auswertung PCR: Probe B**

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



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



**(Quantitative) Auswertung PCR: Dotierungsniveauprobe**

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

Auswertenummer	Lupine	Lupine	z-Score Xpt <sub>ALL</sub>	Methode	Hinweis
	pos/neg	[mg/kg]			
7	positiv			ASU	
8	positiv			ASU	
12	positiv			ASU	
13	positiv	28,6		ASU	Ergebnis als Lupinenmehl
16	positiv			ASU	
9	positiv			SFA-ID	
4	positiv			div	
11	positiv			div	
15	positiv			div	

Anzahl positiv	9
Anzahl negativ	0
Prozent positiv	100
Prozent negativ	0
Konsenswert	positiv

**Methoden:**

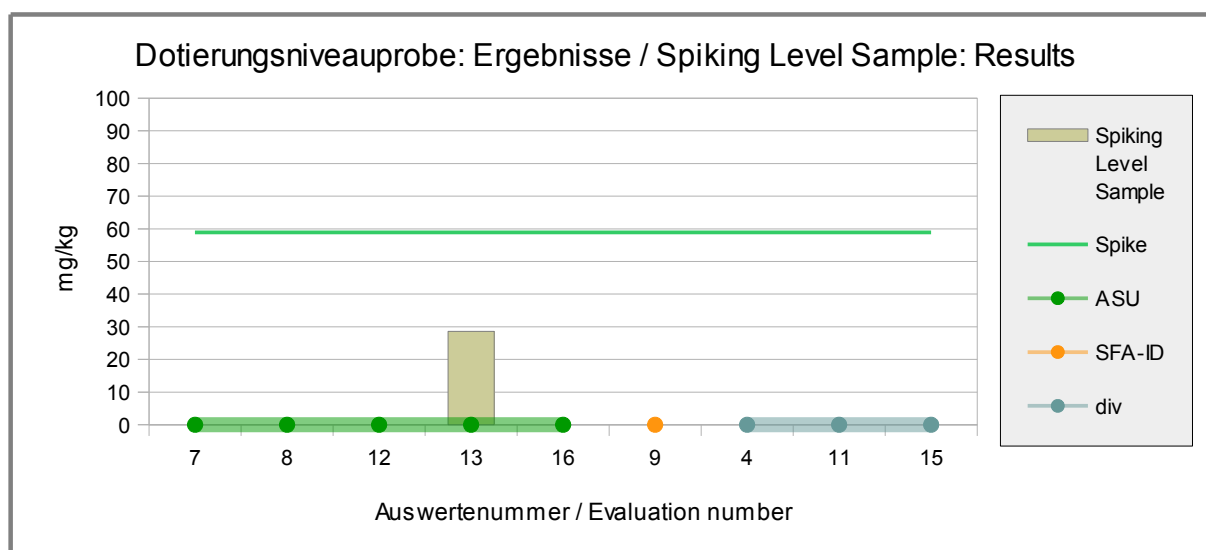
ASU = ASU §64 Methode/method

SFA-ID = Sure Food Allergen ID, R-Biopharm / Congen

div = keine genaue Angabe / andere Methode

Anmerkung:

Für die Dotierungsniveauprobe wurden 100% positive Ergebnisse erhalten.



**Abb./Fig. 11:** PCR-Ergebnisse Lupine  
 grüne Linie = Zusatzniveau (Spike)  
 runde Symbole = Zuordnung der Methoden (s. Legende)

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

Auswertenummer	Dotierungsniveauprobe	Wiederfindungsrate*	Probe B	Wiederfindungsrate*	Methode	Hinweis
	[mg/kg]	[%]	[mg/kg]	[%]		
7					ASU	
8					ASU	
12					ASU	
13	28,6	49	9,9	10	ASU	Ergebnis als Lupinenmehl
16					ASU	
9					SFA-ID	
4					div	
11					div	
15					div	

° Umrechnung S. 19

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

**Methoden:**

ASU = ASU §64 Methode/method

SFA-ID = Sure Food Allergen ID, R-Biopharm / Congen

div = keine genaue Angabe / andere Methode

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

\*\* Akzeptanzbereich der AOAC für Allergen-ELISAs

Anmerkung:

Ein Teilnehmer hat quantitative Ergebnisse mittels PCR bestimmt. Für die Dotierungsniveauprobe lag die Wiederfindungsrate mit 49% knapp unterhalb des Bereichs der AOAC-Anforderung von 50-150%. Für die prozessierte dotierte Lebensmittelmatrix-Probe B lag die Wiederfindungsrate deutlich niedriger.

## 4.2 Vergleichsuntersuchung Weizen (Gluten)

### 4.2.1 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]			
5	negativ	0	positiv	49,8	2/2 (100%)	BF	
12a	negativ	<3,1	positiv	72,0	2/2 (100%)	EF-R5	
2	positiv	<4,0	positiv	51,6	1/2 (50%)	IL	
14	negativ	<4,0	positiv	30,0	2/2 (100%)	IL	Ergebnis umgerechnet °
1	negativ	<6,6	positiv	49,7	2/2 (100%)	RS	
6	negativ	<5,0	positiv	50,4	2/2 (100%)	RS	
7	negativ	< BG	positiv	49,7	2/2 (100%)	RS	
8	negativ	<5,0	positiv	51,0	2/2 (100%)	RS	
10	negativ	<5,0	positiv	29,4	2/2 (100%)	RS	
13	negativ		positiv	30,7	2/2 (100%)	RS	
12b	negativ	<5,0	positiv	55,0	2/2 (100%)	RS	
16	negativ		positiv	43,0	2/2 (100%)	RS	
11	negativ	<10	positiv	60,0	2/2 (100%)	RS-F	
15	negativ		positiv	40,0	2/2 (100%)	VT-R5	

° Umrechnung S. 19

	Probe A	Probe B
Anzahl positiv	1	14
Anzahl negativ	13	0
Prozent positiv	7	100
Prozent negativ	93	0
Konsenswert	negativ	positiv

#### Methoden:

BF = MonoTrace ELISA, BioFront Technologies  
 EF-R5 = SensiSpec Ingezim Gluten R5, Eurofins  
 IL = Immunolab  
 RS = Ridascreen®, R-Biopharm  
 RS-F = Ridascreen® Fast, R-Biopharm  
 VT-R5 = Veratox, Neogen

#### Anmerkung:

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

Ein positives Ergebnis für Probe A wurde mit der Methode IL (Immunolab) unterhalb der Bestimmungsgrenze erhalten.

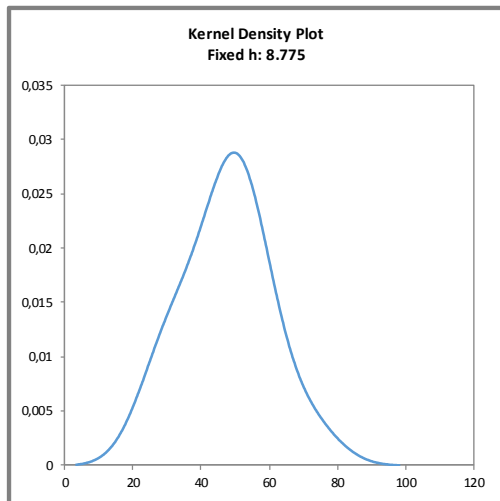
**Quantitative Auswertung ELISA: Probe B**

Auswertenummer	Gluten [mg/kg]	z-Score Xpt <sub>ALL</sub>	z-Score Xpt <sub>RS</sub>	Methode	Hinweis
5	49,8	0,26		BF	
12a	72,0	2,2		EF-R5	
2	51,6	0,41		IL	
14	30,0	-1,4		IL	Ergebnis umgerechnet °
1	49,7	0,25	0,00	RS	
6	50,4	0,31	0,06	RS	
7	49,7	0,24	0,00	RS	
8	51,0	0,36	0,10	RS	
10	29,4	-1,5	-1,6	RS	
13	30,7	-1,4	-1,5	RS	
12b	55,0	0,70	0,43	RS	
16	43,0	-0,32	-0,54	RS	
11	60,0	1,1		RS-F	
15	40,0	-0,58		VT-R5	

° Umrechnung S. 19

**Methoden:**

- BF = MonoTrace ELISA, BioFront Technologies
- EF-R5 = SensiSpec Ingezim Gluten R5, Eurofins
- IL = Immunolab
- RS = Ridascreen®, R-Biopharm
- RS-F= Ridascreen® Fast, R-Biopharm
- VT-R5 = Veratox, Neogen



**Abb. / Fig. 12:**

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

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

**Anmerkung:**

Die Kerndichte-Schätzung zeigt annähernd eine symmetrische Verteilung der Ergebnisse mit einer leichten Schulter bei ca. 30 mg/kg.

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

<b>Kenndaten</b>	<b>Alle Ergebnisse</b> [mg/kg]	<b>Methode RS</b> [mg/kg]
Zugewiesener Wert ( $X_{pt}$ )	$X_{pt}_{ALL}$	$X_{pt}_{METHOD RS}$
Anzahl der Messergebnisse	14	8
Anzahl der Ausreißer	0	0
Mittelwert	47,3	44,9
<b>Median (<math>X_{pt}</math>)<sup>+</sup></b>	49,8	<b>44,9</b>
<b>Robuster Mittelwert (<math>X_{pt}</math>)<sup>++</sup></b>	<b>46,8</b>	49,7
<b>Robuste Standardabweichung (S*)</b>	<b>12,4</b>	<b>11,0</b>
<i>Zielkenndaten:</i>		
<b>Zielstandardabweichung <math>\sigma_{pt}</math></b>	<b>11,7</b>	<b>12,4</b>
<b>Untere Grenze des Zielbereichs</b>	<b>23,4</b>	<b>24,8</b>
<b>Obere Grenze des Zielbereichs</b>	<b>70,2</b>	<b>74,5</b>
Quotient $S^*/\sigma_{pt}$	1,1	0,89
Standardunsicherheit $U(X_{pt})$	4,16	4,87
Ergebnisse im Zielbereich	13	8
Prozent im Zielbereich	93	100

<sup>+</sup> Bezugswert ( $X_{pt}$ ) für Methode RS: Median

<sup>++</sup> Bezugswert ( $X_{pt}$ ) für alle Ergebnisse: rob. Mittelwert

**Methoden:**

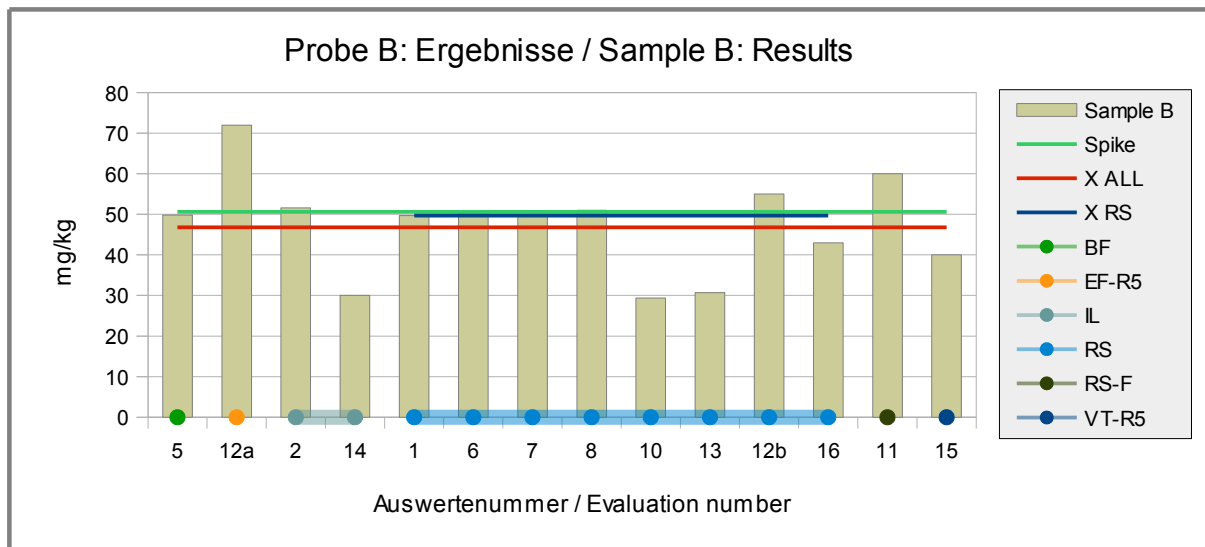
RS = R-Biopharm, Ridascreen®

Anmerkungen zu den Kenndaten und Vergleich der Bezugswerte:

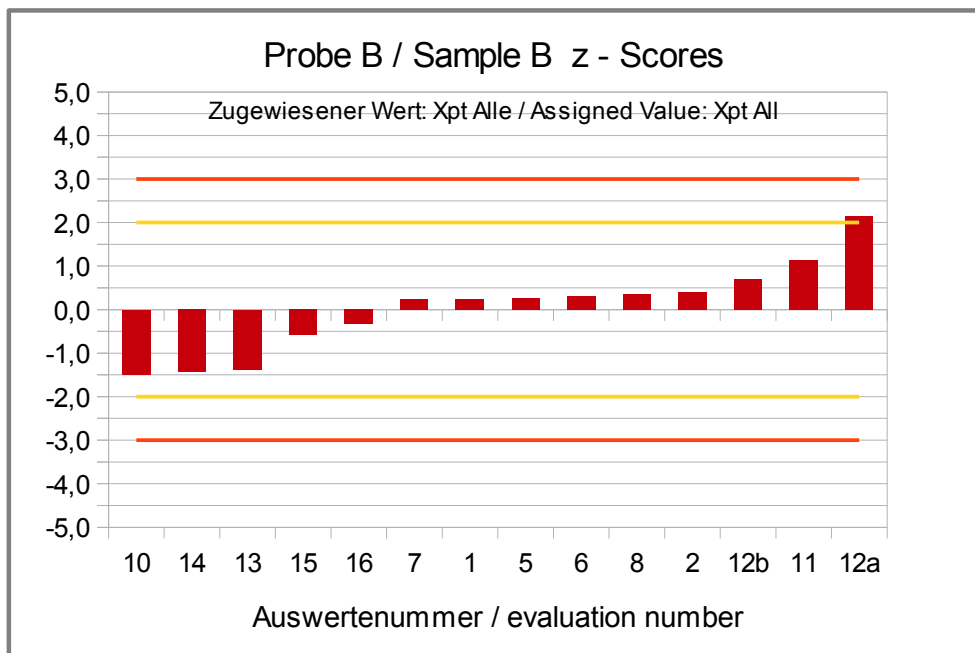
Als zugewiesener Wert für die Methode RS wurde der Median verwendet (s. oben Tabelle, vgl. 3.1).

Die Auswertungen der Ergebnisse aller Methoden und von Methode RS zeigten eine normale bis geringe Variabilität der Ergebnisse. Der Quotient  $S^*/\sigma_{pt}$  lag jeweils unter 2,0. Die robuste Standardabweichung liegt im Bereich von etablierten Werten für die Wiederhol- und Vergleichsstandardabweichung der eingesetzten Bestimmungsmethoden (vgl. 3.4.2 Auswertung eines Versuchs zur Präzision und 3.4.3 Werte aus Erkenntnissen). Die Vergleichbarkeit der Ergebnisse ist gegeben. Diese Aussage ist für die methodenübergreifende Auswertung nur eingeschränkt gültig, da für einige Methoden nur wenige Ergebnisse vorlagen.

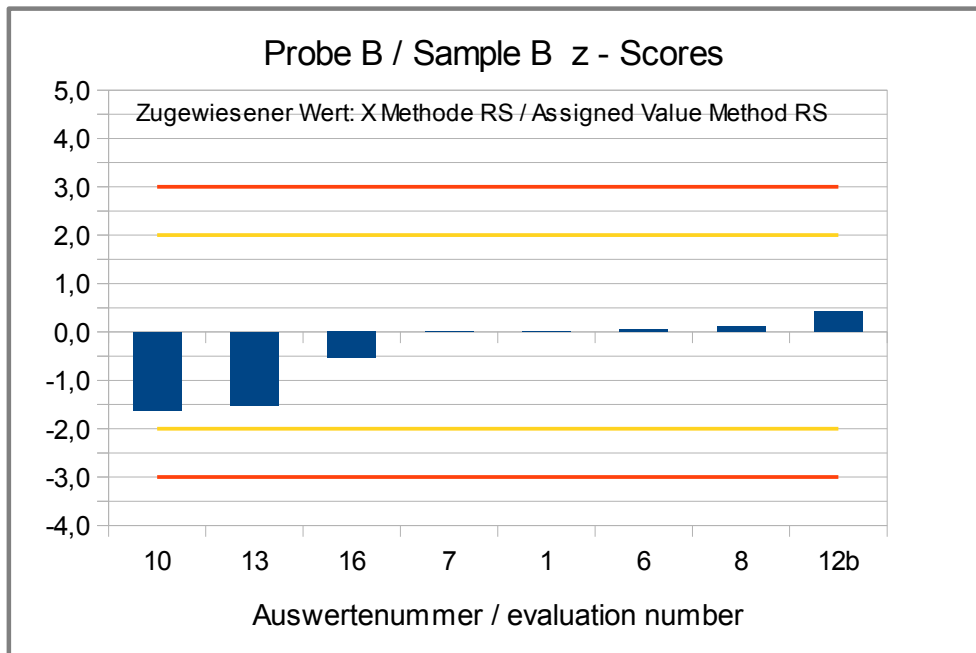
Der robuste Mittelwert der Auswertung aller Ergebnisse sowie der Median der Auswertung der Methode RS lagen mit 93% bzw. 89% vom Zusatzniveau von Gluten zu Probe B, innerhalb der relevanten Anforderungen für die eingesetzten Methoden (s. 3.4.3 und "Wiederfindungsraten für Gluten" S.44).



**Abb./Fig. 13:** ELISA-Ergebnisse Gluten  
 grüne Linie = Zusatzniveau (Spike)  
 rote Linie = robuster Mittelwert aller Ergebnisse  
 blaue Linie = robuster Mittelwert Ergebnisse Methode RS  
 runde Symbole = Zuordnung der Methoden (s. Legende)



**Abb./Fig. 14:** z-Scores (ELISA-Ergebnisse als Gluten) Zugewiesener Wert: robuster Mittelwert aller Ergebnisse



**Abb./Fig. 15:**

z-Scores (ELISA-Ergebnisse als Gluten) Bezugswert: Median Ergebnisse Methode RS (R-Biopharm, Ridascreen)

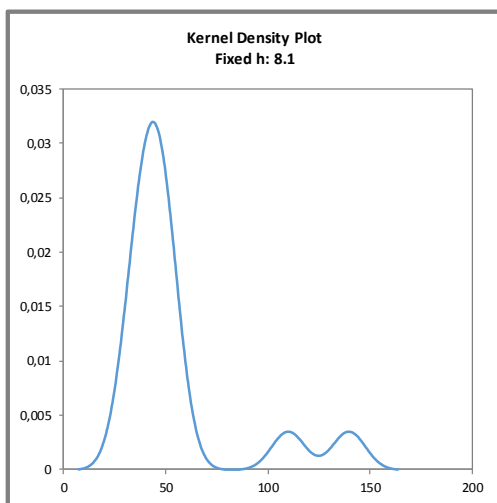
**Quantitative Auswertung ELISA: Dotierungsniveauprobe**

Auswertenummer	Gluten [mg/kg]	z-Score $X_{pt\_ALL}$	z-Score $X_{pt\_RS}$	Methode	Hinweis
5	50,1	0,6		BF	
12a	54,0	1,0		EF-R5	
2	140	8,9		IL	Ausreißer $X_{Alle}$ , ausgeschlossen
14	110,0	6,1		IL	Ergebnis umgerechnet, Ausreißer $X_{Alle}$ , ausgeschlossen
1	49,5	0,6	0,7	RS	
6	44,1	0,1	0,2	RS	
7	38,0	-0,5	-0,4	RS	
8	48,0	0,4	0,5	RS	
10	46,7	0,3	0,4	RS	
13	31,4	-1,1	-1,0	RS	
12b	45,0	0,1	0,2	RS	
16	36,0	-0,7	-0,6	RS	
11	40,0	-0,3		RS-F	
15	37,0	-0,6		VT-R5	

° Umrechnung S. 19

**Methoden:**

- BF = MonoTrace ELISA, BioFront Technologies
- EF-R5 = SensiSpec Ingezim Gluten R5, Eurofins
- IL = Immunolab
- RS = Ridascreen®, R-Biopharm
- RS-F= Ridascreen® Fast, R-Biopharm
- VT-R5 = Veratox, Neogen



**Abb. / Fig. 16:**

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

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

Anmerkung:

Die Kerndichte-Schätzung zeigt annähernd eine symmetrische Verteilung der Ergebnisse mit zwei kleinen Nebenpeaks > 100 mg/kg (Methode IL).



**Kenndaten: Quantitative Auswertung ELISA Weizen (als Gluten)****Dotierungsniveauprobe**

<b>Kenndaten</b>	<b>Alle Ergebnisse</b> [mg/kg]	<b>Methode RS</b> [mg/kg]
Zugewiesener Wert ( $X_{pt}$ )	$X_{pt\_ALL}$	$X_{pt\_METHOD\ RS}$
Anzahl der Messergebnisse*	12	8
Anzahl der Ausreißer	2	
Mittelwert	43,3	42,3
Median	44,5	44,5
<b>Robuster Mittelwert (<math>X_{pt}</math>)</b>	<b>43,4</b>	<b>42,4</b>
<b>Robuste Standardabweichung (<math>S^*</math>)</b>	<b>7,62</b>	<b>7,31</b>
<i>Zielkenndaten:</i>		
<b>Zielstandardabweichung <math>\sigma_{pt}</math></b>	<b>10,8</b>	<b>10,6</b>
<b>Untere Grenze des Zielbereichs</b>	<b>21,7</b>	<b>21,2</b>
<b>Obere Grenze des Zielbereichs</b>	<b>65,1</b>	<b>63,6</b>
Quotient $S^*/\sigma_{pt}$	0,70	0,70
Standardunsicherheit $U(X_{pt})$	2,75	3,23
Ergebnisse im Zielbereich	12	8
Prozent im Zielbereich	100	100

\* ohne Ergebnisse Nr. 2 u. 14 (vorab ausgeschlossen)

**Methoden:**

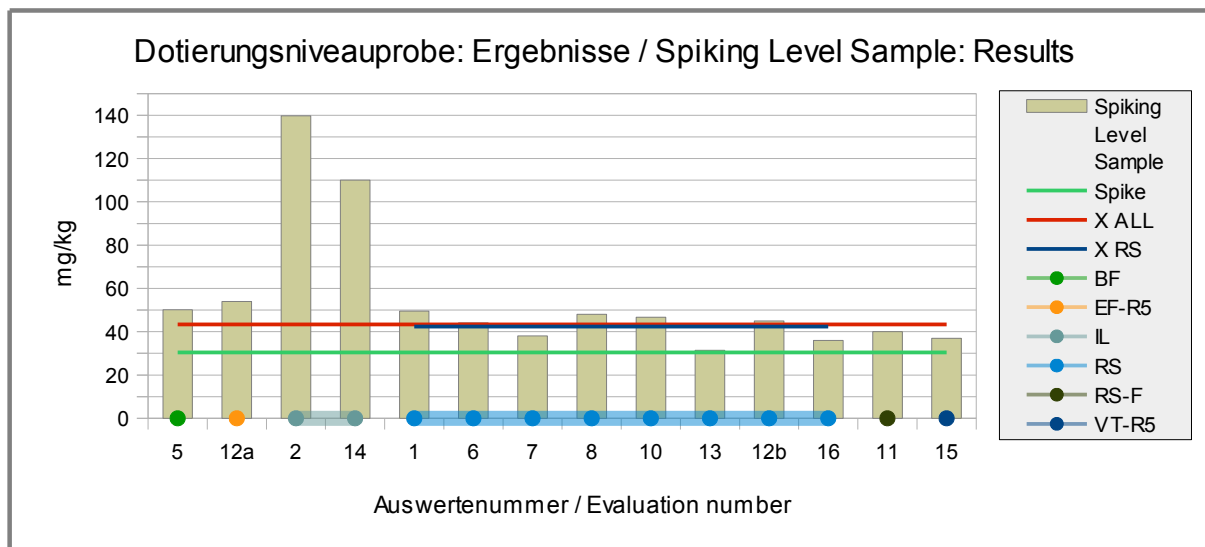
RS = R-Biopharm, Ridascreen®

**Anmerkungen zu den Kenndaten und Vergleich der Bezugswerte:**

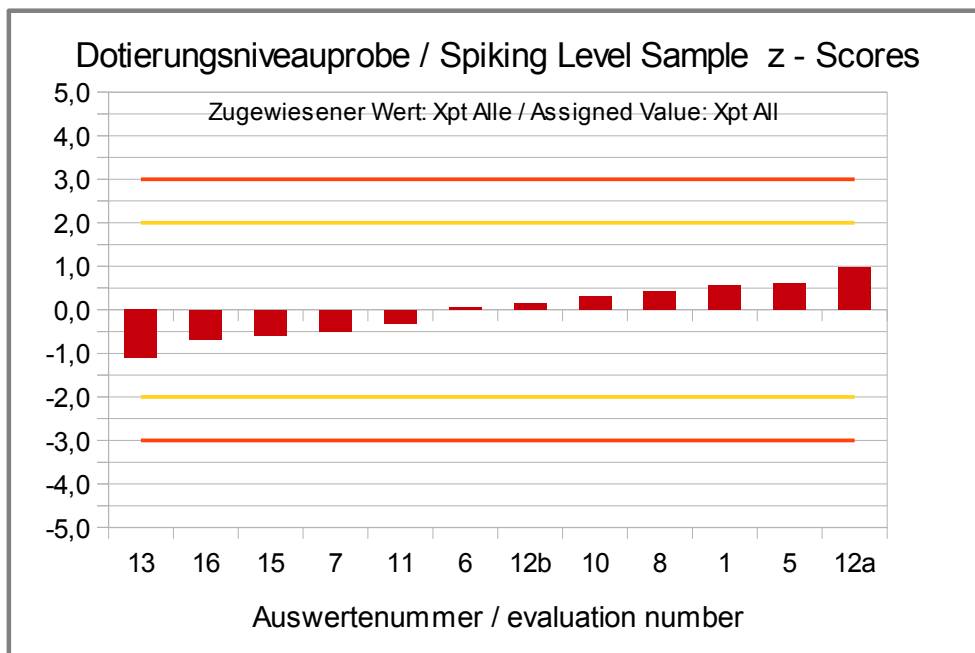
Die Kerndichte-Schätzung zeigte mit Ausnahme der ausgeschlossenen Werte keine eindeutigen methodenabhängigen Unterschiede.

Die Verteilung der Ergebnisse aller Methoden sowie für Methode RS zeigte jeweils eine geringe Variabilität. Die Quotienten  $S^*/\sigma_{pt}$  lagen unter 1,0. 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 gegeben. Diese Aussage ist für die methodenübergreifende Auswertung nur eingeschränkt gültig, da für einige Methoden nur wenige Ergebnisse vorlagen.

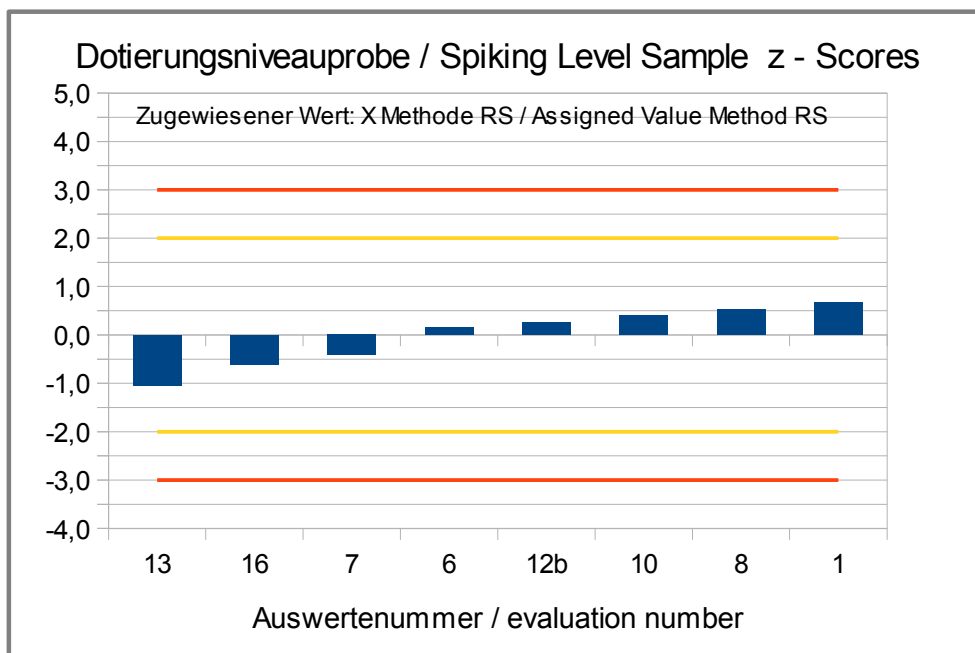
Die robusten Mittelwerte der Auswertungen lagen mit 143% bzw. 140% vom Zusatzniveau von Gluten zur Dotierungsniveauprobe innerhalb der relevanten Anforderungen für die eingesetzten Methoden (s. 3.4.3 und "Wiederfindungsraten für Gluten", s. S.44).



**Abb./Fig. 17:** ELISA-Ergebnisse Gluten  
 grüne Linie = Zusatzniveau (Spike)  
 rote Linie = robuster Mittelwert aller Ergebnisse  
 blaue Linie = robuster Mittelwert Ergebnisse Methode RS  
 runde Symbole = Zuordnung der Methoden (s. Legende)



**Abb./Fig. 18:** z-Scores (ELISA-Ergebnisse als Gluten)  
 Zugewiesener Wert: robuster Mittelwert aller Ergebnisse



**Abb./Fig. 19:**

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

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

Auswertenummer	Dotierungsniveauprobe	Wiederfindungsrate*	Probe B	Wiederfindungsrate*	Methode	Hinweis
	[mg/kg]	[%]	[mg/kg]	[%]		
5	50,1	165	49,8	<b>98</b>	BF	
12a	54,0	178	72,0	<b>142</b>	EF-R5	
2	140	460	51,6	<b>102</b>	IL	
14	110	362	30,0	<b>59</b>	IL	Ergebnis umgerechnet °
1	49,5	163	49,7	<b>98</b>	RS	
6	44,1	<b>145</b>	50,4	<b>100</b>	RS	
7	38,0	<b>125</b>	49,7	<b>98</b>	RS	
8	48,0	158	51,0	<b>101</b>	RS	
10	46,7	154	29,4	<b>58</b>	RS	
13	31,4	<b>103</b>	30,7	<b>61</b>	RS	
12b	45,0	<b>148</b>	55,0	<b>109</b>	RS	
16	36,0	<b>118</b>	43,0	<b>85</b>	RS	
11	40,0	<b>132</b>	60,0	<b>119</b>	RS-F	
15	37,0	<b>122</b>	40,0	<b>79</b>	VT-R5	

° Umrechnung S. 19

AB**	50-150 %	AB**	50-150 %
Anzahl im AB	<b>7</b>	Anzahl im AB	<b>14</b>
Prozent im AB	<b>50</b>	Prozent im AB	<b>100</b>

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

\*\* Akzeptanzbereich der AOAC für Allergen-ELISAs

**Methoden:**

BF = MonoTrace ELISA, BioFront Technologies  
 EF-R5 = SensiSpec Ingezim Gluten R5, Eurofins  
 IL = Immunolab  
 RS = Ridascreen®, R-Biopharm  
 RS-F= Ridascreen® Fast, R-Biopharm  
 VT-R5 = Veratox, Neogen

Anmerkung:

50% (7) der Teilnehmer haben mit der Dotierungsniveauprobe mittels ELISA eine Wiederfindungsrate im Bereich der AOAC-Anforderung von 50-150% erhalten. Für die prozessierte dotierte Lebensmittelmatrix-Probe B lagen 100% (14) der Wiederfindungsraten in diesem Akzeptanzbereich.

4.2.2 PCR-Ergebnisse: Gluten-haltige Getreide (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		
13	negativ		positiv	150	2/2 (100%)	ASU	Ergebnis als Weizen
8	negativ		positiv		2/2 (100%)	div	
15	negativ		positiv		2/2 (100%)	div	

° Umrechnung S. 19

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

Methoden:

ASU = ASU §64 Methode/method

div = keine genaue Angabe / andere Methode

Anmerkung:

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

Quantitative Auswertung PCR: Probe B

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

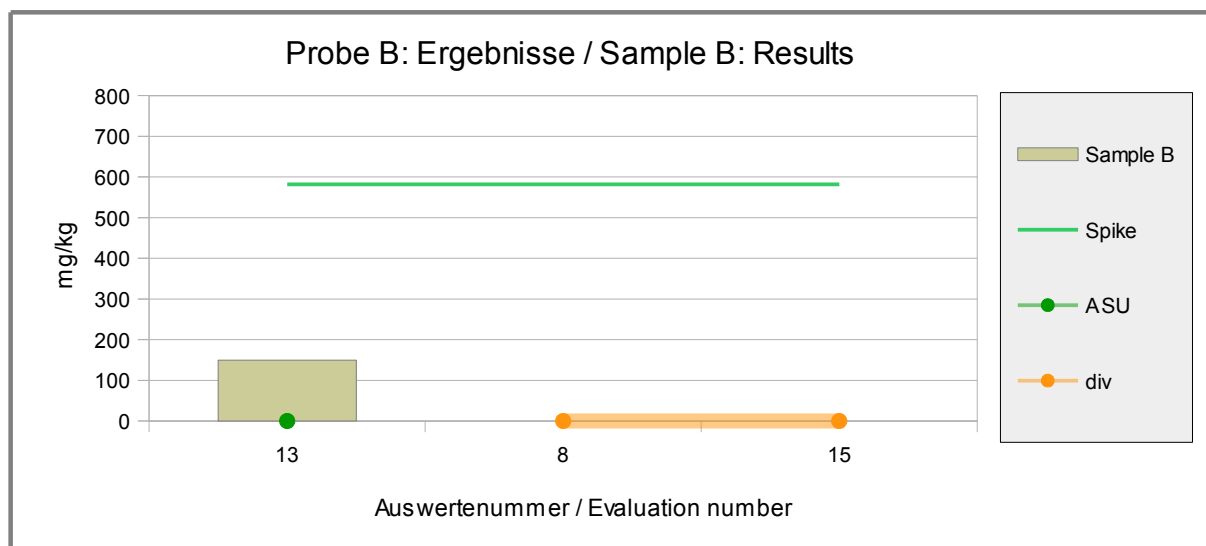


Abb./Fig. 20:

PCR-Ergebnisse Weizen

grüne Linie = Zusatzniveau (Spike)

runde Symbole = Zuordnung der Methoden (s. Legende)

**(Quantitative) Auswertung PCR: Dotierungsniveauprobe**

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

Auswertenummer	Weizen pos/neg	Weizen [mg/kg]	z-Score Xpt <sub>ALL</sub>	Methode	Hinweis
13	positiv	321		ASU	Ergebnis als Weizen
8	positiv			div	
15	positiv			div	

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

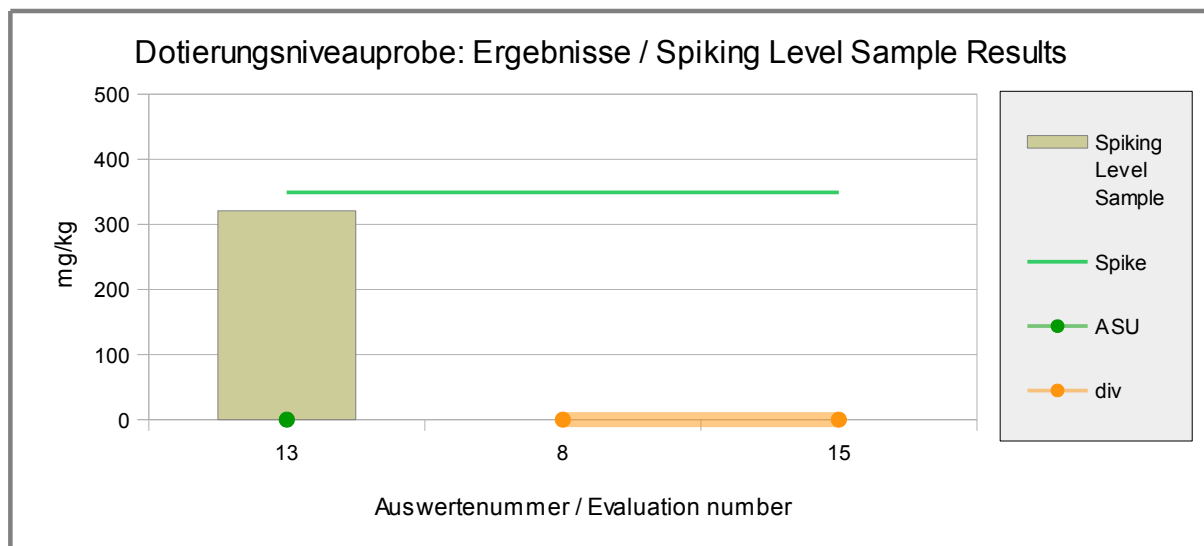
**Methoden:**

ASU = ASU §64 Methode/method

div = keine genaue Angabe / andere Methode

Anmerkung:

Für die Dotierungsniveauprobe wurden 100% positive Ergebnisse erhalten.



**Abb./Fig. 21:** PCR-Ergebnisse Weizen

grüne Linie = Zusatzniveau (Spike)

runde Symbole = Zuordnung der Methoden (s. Legende)

**Wiederfindungsraten PCR für Gluten-haltige Getreide (als Weizen):  
Dotierungsniveauprobe und Probe B**

Auswertenummer	Dotierungsniveauprobe	Wiederfindungsrate*	Probe B	Wiederfindungsrate*	Methode	Hinweis
	[mg/kg]	[%]	[mg/kg]	[%]		
13	321	92	150	26	ASU	Ergebnis als Weizen
8					div	
15					div	

° Umrechnung S. 19

AB**	50-150 %	AB**	50-150 %
Anzahl im AB	1	Anzahl im AB	0
Prozent im AB	100	Prozent im AB	0

**Methoden:**

ASU = ASU §64 Methode/method

div = keine genaue Angabe / andere Methode

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

\*\* Akzeptanzbereich der AOAC für Allergen-ELISAs

Anmerkung:

Ein Teilnehmer hat quantitative Ergebnisse mittels PCR bestimmt. Für die Dotierungsniveauprobe lag die Wiederfindungsrate innerhalb der AOAC-Anforderung von 50-150%. Für die prozessierte dotierte Lebensmittelmatrix-Probe B lag die Wiederfindungsrate deutlich niedriger.

## 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: Lupine

Meth. Abk.	Auswertenummer	Datum der Analyse	Ergebnis Probe A		Ergebnis Probe B		Ergebnis Dotierungsprobe		NWG / LOD *	BG / LOQ *	MU*	Quantitatives Ergebnis als	Methode
			qualitativ	mg/kg	qualitativ	mg/kg	qualitativ	mg/kg	mg/kg	mg/kg	%		
		Tag/Monat											Test-Kit + Anbieter
BF	5	04.04.19	negativ	0	positiv	6,3	positiv	41,7	0,13	1		Lupinenmehl	MonoTrace Lupine ELISA kit, BioFront Technologies
EF	12	12.3.	negativ	< 2	positiv	12	positiv	130	1,5	2		Lupine	SensiSpec ELISA Lupine, Eurofins
EF	14	04.03.19	negativ	< 2	positiv	16	positiv	90	0,2	2		Lupine	SensiSpec ELISA Lupine, Eurofins
IL	1	10.04.19	negativ		positiv	14,79	positiv	109,15	0,3	2		Lupine	Immunolab Lupine ELISA
IL	2	05.03.19	positiv	< 2	positiv	10,7	positiv	69,8	0,3	2		Lupine	Immunolab Lupine ELISA
RS	9		negativ	< 1	positiv	8	>27			1		Lupinenprotein	Ridascreen Lupin R-Biopharm
RS-F	3	07.03.	positiv	2,4	positiv	9,5	positiv	18,1	0,7	1	11,5	Lupinenprotein	Ridascreen FAST Lupine R6102
RS-F	6	10.03.19	negativ	< 1	positiv	6,75	positiv	34,86	1	1	31,94	Lupinenprotein	
RS-F	7	20.03.19		2,75		22,48		85,49		2,5		Lebensmittel (Lupine)	RIDASCREEN® Fast Lupine R6102, r-biopharm
RS-F	8	11.03.19	positiv	1,9	positiv	11,9	positiv	38	0,7	1	20	Protein	Fast Lupine; r-biopharm
RS-F	16	06.03.19	positiv	1,3	positiv	9	positiv	33	1	1	47	Lupinenprotein	

\* NWG Nachweisgrenze / BG Bestimmungsgrenze

\* LOD limit of detection / LOQ limit of quantitation

\* MU Messunsicherheit / MU measurement uncertainty

Meth. Abk.	Auswertenummer	Spezifität	Hinweise zur Methode (Extraktion und Bestimmung)	Methode akkreditiert ISO/IEC 17025	Sonstige Hinweise
		Antikörper	z.B. Extraktionslösung / Zeit / Temperatur	ja/nein	
BF	5	auf monoklonalem Antikörper basierender Test	1:20 Extraktion für 10 Minuten @ 60°C	nein	
EF	12	erkennt Lupinenproteine	lt. Herstellerangaben	ja	HU0030011:2
EF	14				
IL	1			nein	keine weitere Verdünnung benötigt
IL	2			ja	
RS	9			nein	
RS-F	3	Lupinus albus, L. luteus, L. angustifolius	gemäß Testkit	ja	
RS-F	6	gemäß Testkit	gemäß Testkit	ja	R-Biopharm FAST Lupine R6102
RS-F	7	Antikörper erkennt spezifisch alle Proteine der Lupine, inklusive des gamma-Conglutin sowie Lupinus albus, luteus und angustifolius.	nach Testanleitung	ja	
RS-F	8	g-Conglutin	Allergen-Extraktionspuffer/10min/60°C	ja	
RS-F	16		RIDASCREEN FAST Lupine	ja	



**5.1.2 ELISA: Gluten**

Meth. Abk.	Auswertenummer	Datum der Analyse	Ergebnis Probe A		Ergebnis Probe B		Ergebnis Dotierungsprobe		NWG / LOD *	BG / LOQ *	MU*	Quantitatives Ergebnis als	Methode
			qualitativ	mg/kg	qualitativ	mg/kg	qualitativ	mg/kg	mg/kg	mg/kg	mg/kg		
		Tag/Monat											Test-Kit + Anbieter
BF	5	04.04.19	negativ	0	positiv	49,8	positiv	50,1	0,36	2			MonoTrace Gluten ELISA kit, BioFront Technologies
EF-R5	12a	7.3.	negativ	< 3,12	positiv	72	positiv	54	3,12	3,12		Gluten	SENSISpec Ingezim Gluten R5 30.GLU.K2, Eurofins
IL	2	05.03.19	positiv	<4	positiv	51,6	positiv	139,7	0,6	4		Gluten	Immunolab Gliadin/Gluten ELISA
IL	14	04.03.19	negativ	< 2	positiv	15	positiv	55	0,3	2		Gluten	Immunolab Gliadin/Gluten ELISA
RS	1	16.04.19	negativ	< 6,6	positiv	49,7	positiv	49,5	2,5	6,6		Gluten	Ridascreen® Gliadin R7001, R-Biopharm
RS	6	08.03.19	negativ	<5	positiv	50,4	positiv	44,08	5	5	23,59	Gluten	Ridascreen® Gliadin R7001, R-Biopharm
RS	7	26/03/19 27/03/19 09/04/19	-	< BG	-	49,66	-	38,02		5		Gluten	Ridascreen® Gliadin R7001, R-Biopharm
RS	8	14.03.19	negativ	< 5,00	positiv	51	positiv	48	1	5	20	Protein	Ridasreen Gliadin; r-biopharm
RS	10	05.04.19	negativ	< 5.0	positiv	29,4	positiv	46,7	5	5	20	Gluten	Ridascreen® Gliadin R7001, R-Biopharm
RS	13	13.03.19	negativ		positiv	30,7	positiv	31,4	2	5	50	Gluten	Ridascreen® Gliadin R7001, R-Biopharm
RS	12b	6.3.	negativ	< 5	positiv	55	positiv	45	3	5		Gluten	Ridascreen® Gliadin R7001, R-Biopharm
RS	16	05.03.19	negativ		positiv	43	positiv	36	5	5	43	Gluten	Ridascreen® Gliadin R7001, R-Biopharm
RS-F	11		negativ	<10	positiv	60	positiv	40	1	10		Gluten	Ridascreen® FAST Gliadin R7002, R-Biopharm
VT-R5	15	11.04.19	negativ		positiv	40	positiv	37	5	5		Gluten	Veratox Gliadin R5, Neogen

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

Meth. Abk.	Auswertenummer	Spezifität	Hinweise zur Methode (Extraktion und Bestimmung)	Methode akkreditiert ISO/IEC 17025	Sonstige Hinweise
		Antikörper	z.B. Extraktionslösung / Zeit / Temperatur	ja/nein	
BF	5	auf monoklonalem Antikörper basierender Test	1:40 Extraktionsverhältnis für 1 Stunde bei 60°C	nein	
EF-R5	12a	R5 Mendez, erkennt Prolamine aus Weizen, Roggen und Hafer	lt. Herstellerangaben	ja	
IL	2			ja	
IL	14				
RS	1			ja	keine weitere Verdünnung benötigt
RS	6	nach Testanleitung	nach Testanleitung	ja	
RS	7	Monoklonale R5 Antikörper	nach Testanleitung	ja	
RS	8	R5; Prolamine	Coctaillösung/40 min/50°C/ 60% ETOH/60 min/RT	ja	
RS	10			ja	
RS	13	Gliadin	Cocktail-Extraktionslösung	ja	1 g Einwage
RS	12b	R5 Mendez, erkennt Prolamine aus Weizen, Roggen und Hafer	lt. Herstellerangaben	ja	
RS	16	R5 Antikörper	Extraktion mit Milchpulver bei Probe A und B	ja	
RS-F	11			ja	
VT-R5	15			ja	

**5.1.3 PCR: Lupine**

Meth. Abk.	Auswertenummer	Datum der Analyse	Ergebnis Probe A		Ergebnis Probe B		Ergebnis Dotierungsprobe		NWG / LOD *	BG / LOQ *	MU*	Quantitatives Ergebnis als	Methode
			qualitativ	mg/kg	qualitativ	mg/kg	qualitativ	mg/kg	mg/kg	mg/kg	%		
		Tag/Monat											Test-Kit + Anbieter
ASU	7	21.03.19	negativ		positiv		positiv					Lupinen-DNA	ASU §64 Methode/method
ASU	8	10.04.19	negativ		positiv		positiv		0,005 %			Lupinen-DNA in Mais-DNA	Hausmethode (entspr. ASU §64 LFGB L 08.00-58(V))
ASU	12	6.3.	negativ		positiv		positiv		0,5			Lupinen-DNA	ASU §64 Methode/method
ASU	13	13.03.19	negativ		positiv	9,9	positiv	28,6	5	10	50	Lupinenmehl	ASU §64 Methode/method
ASU	16	25.03.19	negativ		positiv		positiv					Lupinen-DNA	ASU §64 Methode/method
SFA-ID	9		negativ	< 0,4	positiv		positiv		0,4			Lupinen-DNA	Sure Food Allergen ID, R-Biopharm / Congen
div	4	21.03.19	negativ		negativ		positiv		100				In House Method
div	11		negativ		positiv		positiv						In House AllAIC, rt-PCR, Demmel et al.
div	15	16.04.19	positiv		negativ		positiv		10			Lupinen-DNA	

\* 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	
ASU	7	ITS 1 der nukleären rDNA	Extraktion: SureFood Prep Advanced r-biopharm/ Proteinase K/ Real Time PCR/ 45 Zyklen	ja	
ASU	8	Lupine spp.	CTAB-Extraktion / Proteinase K / Dneasy Mericon Food Kit (Qiagen) / RT-PCR (45 Zyklen)	ja	
ASU	12		CTAB / Proteinase K / Promega Wizard DNA CleanUp / Real-time PCR 45 Zyklen	ja	§ 64 LFGB L 08.00-58 (V):2011-06
ASU	13	Intern transkribierter Spacer 1 (ITS-1) Gen (multicopy-Sequenz) (129bp)	Extraktion: CTAB-Präzipitationsmethode, s. z.B. ASU L 18.00-22 Bestimmung: ASU L 08.00-59 : 2013-01	ja	Kalibrierung/Quantifizierung mittels Matrix-Standards, dotiertes Material: Lupinenmehl (Lupinus albus)
ASU	16	ITS-1 (multicopy-Sequenz)	Extraktion mit Machery & Nagel NucleoSpin Food Kit	ja	
SFA-ID	9			no	
div	4	L1PR10.1A(Y pro10.1a) gen	Phenol/Chloroform Extraktion gefolgt von Dneasy Plant mini kit, Endpunkt PCR, 45 Zyklen, PAGE	yes	
div	11	ITS	CTAB-Wizard, rt-PCR / 45 Zyklen	ja	
div	15			ja	

**5.1.4 PCR: Weizen (Gluten)**

Meth. Abk.	Auswertenummer	Datum der Analyse	Ergebnis Probe A		Ergebnis Probe B		Ergebnis Dotierungsprobe		NWG / LOD *	BG / LOQ *	MU*	Quantitatives Ergebnis als	Methode
			qualitativ	mg/kg	qualitativ	mg/kg	qualitativ	mg/kg	mg/kg	mg/kg	%		
		Tag/Monat											Test-Kit + Anbieter
ASU	13	20.03.19	negativ		positiv	150	positiv	321	50	100	50	Weizen	
div	8	10.04.19	negativ		positiv		positiv		0,001 %			Weizen-DNA in Mais-DNA	Hausmethode
div	15	16.04.19	negativ		positiv		positiv		10			Weizen-DNA	

\* 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	
ASU	13	Lipid-Transferprotein- Gen (ltp) (61 bp)	Extraktion: CTAB-Präzipitationsmethode, s. z.B. ASU L 18.00-22 Bestimmung: ASU L 08.00-59 : 2013-02	ja	Kalibrierung/Quantifizierung mittels Matrix-Standards, dotiertes Material: Weizenmehl
div	8	w-gliadin (Weizen)	CTAB-Extraktion / Proteinase K / Dneasy Mericon Food Kit(Qiagen) / RT-PCR (45 Zyklen)	ja	
div	15			ja	

## 5.2 Homogenität

### 5.2.1 Mischungshomogenität vor der Abfüllung

#### Microtracer Homogenitätstest

##### DLA 02-2019 Probe B

Gewicht Gesamtprobe	1,75	kg
Microtracer	FSS-rot lake	
Teilchengröße	75 – 300	µm
Gewicht pro Partikel	2,0	µg
Tracerzugabe	44,5	mg/kg

#### Analysenergebnisse:

Probe	Einwaage [g]	Partikel Anzahl	Partikel [mg/kg]
1	3,46	84	48,6
2	5,05	115	45,5
3	5,00	122	48,8
4	5,04	117	46,4
5	5,02	130	51,8
6	4,99	131	52,5
7	5,00	115	46,0
8	4,99	128	51,3

#### Poisson-Verteilung

Probenanzahl	8	
Freiheitsgrad	7	
Mittelwert	117,7	Partikel
Standardabweichung	6,63	Partikel
$\chi^2$ (CHI-Quadrat)	2,61	
<b>Wahrscheinlichkeit</b>	<b>92</b>	%
Wiederfindungsrate	110	%

#### Normalverteilung

Probenanzahl	8	
Mittelwert	48,9	mg/kg
Standardabweichung	2,75	mg/kg
rel. Standardabweichung	5,6	%
Horwitz Standardabweichung	8,9	%
<b>HorRat-Wert</b>	<b>0,63</b>	
Wiederfindungsrate	110	%

#### Microtracer Homogenitätstest

##### DLA 02-2019 Dotierungsniveauprobe

Gewicht Gesamtprobe	1,52	kg
Microtracer	FSS-rot lake	
Teilchengröße	75 – 300	µm
Gewicht pro Partikel	2,0	µg
Tracerzugabe	14,8	mg/kg

#### Analysenergebnisse:

Probe	Einwaage [g]	Partikel Anzahl	Partikel [mg/kg]
1	4,99	54	21,6
2	4,97	40	16,1
3	5,01	39	15,6
4	5,09	43	16,9
5	5,12	50	19,5
6	5,03	39	15,5
7	5,03	47	18,7
8	5,14	51	19,8

#### Poisson-Verteilung

Probenanzahl	8	
Freiheitsgrad	7	
Mittelwert	45,4	Partikel
Standardabweichung	5,76	Partikel
$\chi^2$ (CHI-Quadrat)	5,12	
<b>Wahrscheinlichkeit</b>	<b>65</b>	%
Wiederfindungsrate	121	%

#### Normalverteilung

Probenanzahl	8	
Mittelwert	18,0	mg/kg
Standardabweichung	2,28	mg/kg
rel. Standardabweichung	12,7	%
Horwitz Standardabweichung	10,4	%
<b>HorRat-Wert</b>	<b>1,2</b>	
Wiederfindungsrate	121	%

**5.3 Informationen zur Eignungsprüfung (EP)**

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

EP-Nummer	<b>DLA 02-2019</b>
EP-Name	<b>Allergene II: Lupine und Weizen in „glutenfreiem“ Brot mit „Dotierungsniveauprobe“</b>
Probenmatrix	<b>Proben A + B:</b> „Glutenfreies“ Brot (gebacken bei 190°C) / Zutaten: Backmischung (Maisstärke, Leinsamenmehl 12%, Buchweizenmehl 8%, Erbsenkleie, Reiskleie, pflanzliche Faser (Psyllium), Zucker, Verdickungsmittel: Guarkernmehl, Salz), Wasser, Hefe, Salz, weitere Zusatzstoffe und Allergene Lebensmittel (eine der beiden Proben) <b>Dotierungsniveauprobe:</b> Kartoffelpulver, weitere Zusatzstoffe und Allergene Lebensmittel
Probenzahl und Probenmenge	2 unterschiedliche Proben A + B: je 25 g + 1 Dotierungsniveauprobe: 15 g
Lagerungsinformation	Proben A + B: Raumtemperatur (Langzeit gekühlt 2 - 10 °C) Dotierungsniveauprobe: Raumtemperatur
Verwendungszweck	Ausschließlich für Laboruntersuchungen (Qualitätskontrollproben)
Parameter	qualitativ + quantitativ: Lupine (Lupinenprotein, DNA), Weizen (Gluten, DNA) Proben A + B: < 500 mg/kg Dotierungsniveauprobe: < 500 mg/kg
Untersuchungsmethoden	Methode ist freigestellt
Hinweis zur Analyse	Die Untersuchung der Eignungsprüfung soll entsprechend einer laborüblichen Routineanalyse vorgenommen werden. Generell empfehlen wir vor der Analyse, insbesondere bei kleinen Analyseneinwaagen, eine repräsentative Probenmenge entsprechend guter Laborpraxis zu homogenisieren. Vorzugsweise wird jeweils die gesamte Probenmenge homogenisiert.
Ergebnisangabe	Es werden für jede Probe A , B und Dotierungsniveauprobe je ein Ergebnis ermittelt. Die Einzelergebnisse sind in die Ergebnisabgabe-Datei einzutragen.
Einheiten	mg/kg
Anzahl von Dezimalstellen	mindestens 2
Ergebnisabgabe	Die Ergebnisabgabe-Datei wird per eMail übermittelt an: <b>pt@dla-lvu.de</b>
Abgabetermin	<b><u>spätestens 12. April 2019</u></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
		SCHWEIZ
		Deutschland
		USA
		SCHWEIZ
		ITALIEN
		Deutschland
		Deutschland
		Deutschland
		Deutschland
		Deutschland
		Deutschland
		Deutschland
		GROSSBRITANNIEN
		Deutschland
		GROSSBRITANNIEN
		Deutschland
		GRIECHENLAND

*[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. ASU §64 LFGB L 06.00-56 Bestimmung von Sojaprotein in Fleisch und Fleischerzeugnissen Enzymimmunologisches Verfahren (2007) [Determination of soyprotein in meat and meat products by enzyme immunoassay]
  30. ASU §64 LFGB L 00.00-69 Bestimmung von Erdnuss-Kontaminationen in Lebensmitteln mittels ELISA im Mikrotiterplattensystem (2003) [Foodstuffs, determination of peanut contaminations in foodstuffs by ELISA in microtiterplates]
  31. ASU §64 LFGB L 44.00-7 Bestimmung von Haselnuss-Kontaminationen in Schokolade und Schokoladenwaren mittels ELISA im Mikrotiterplattensystem (2006) [Foodstuffs, determination of hazelnut contaminations in chocolate and chocolate products by ELISA in microtiterplates]
  32. ASU §64 LFGB L 18.00-22 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]
  33. ASU §64 LFGB L 08.00-66 Untersuchung von Lebensmitteln - Nachweis und Bestimmung von Weizen (Triticum L.) und Roggen (Secale cereale) in Brühwurst mittels real-time PCR (2016) [Foodstuffs, detection and determination of wheat (Triticum L.) and rye (Secale cereale) in boiled sausages by real-time PCR]
  34. Durchführungsverordnung der Kommission/ Commission Implementing Regulation EU 828/2014; über die Anforderungen an die Bereitstellung von Informationen für Verbraucher über das Nichtvorhandensein oder das reduzierte Vorhandensein von Gluten in Lebensmitteln / on the requirements for the provision of information to consumers on the absence or reduced presence of gluten in food
  35. Bruins-Slot et al. (2015) Evaluating the performance of gluten ELISA test kits: The numbers do not tell the tale, Cereal Chem 92(5):513-521
  36. Köhler & Andersen (2014) Analyse von Glutengehalten in Getreide und getreidehaltigen Produkten, Tabellenwerk zum Nährstoffgehalt von Lebensmitteln 3.1.5.1, Deutsche Forschungsanstalt für Lebensmittelchemie Leibniz Institut Jahresbericht 2014 [Analysis of gluten contents in cereals and cereal products, nutrient tables of foods]



**DLA 02/2019 - Allergene II**

16 Teilnehmer haben mindestens ein Ergebnis eingereicht. Die Auswertung erfolgte für ELISA-Methoden hinsichtlich der Parameter Lupine und Gluten qualitativ und quantitativ. Die Ergebnisse der PCR-Methoden wurden qualitativ bewertet. Zusätzlich wurden für jeden Teilnehmer Wiederfindungsraten für die Dotierungsniveauprobe und die dotierte Probe ermittelt. Details zu den einzelnen Parametern inklusive separater Auswertung nach Testkit-Herstellern sind dem Auswertebereich zu entnehmen.

6 Teilnehmer hatten ihren Sitz im Europäischen Ausland (Großbritannien, Italien, Schweiz) und ein Teilnehmer in den USA.