



Auswertungs-Bericht

Laborvergleichsuntersuchung

DLA 16/2019

ALM Verification:

Mandel in Keks-Matrix

**5 Proben mit Mandeln gebacken
(Gehalte: 2,0 / 10 / 20 / 50 / 100 mg/kg)**

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>	DLA - Proficiency Tests GmbH 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 16/2019
<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 (16. Dezember 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: 16. Dezember 2019
<i>Unteraufträge</i> <i>Subcontractors</i>	Im Rahmen dieser Eignungsprüfung wurden nachstehende Leistungen im Unterauftrag vergeben: Gehaltsprüfung des EP-Parameters, Proteinbestimmung As part of the present proficiency test the following services were subcontracted: Quantification of PT-parameter(s), protein determination
<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.....	5
2.1 Untersuchungsmaterial.....	5
2.1.1 Charakterisierung der PT-Probenreihe.....	7
2.1.2 Homogenität.....	8
2.1.2 Stabilität.....	8
2.2 Probenversand und Informationen zur Untersuchung.....	9
2.3 Ergebnisübermittlung.....	9
3. Auswertung.....	10
3.1 Action Level Matrix Score (ALM-Score).....	11
3.2 Wiederfindungs-Score (WFR-Score).....	11
3.2.1 Wiederfindungsraten eines Versuchs zur Präzision.....	12
3.2.2 Werte aus Erkenntnissen.....	14
4. Ergebnisse.....	15
4.1 Vergleichsuntersuchung Mandel.....	16
4.1.1 Qualitativ: Action Level Matrix-Scores.....	16
4.1.1.1 ELISA-Methoden.....	16
4.1.1.2 PCR-Methoden.....	17
4.1.2 Quantitativ: Wiederfindungs-Scores.....	18
4.1.2.1 ELISA-Ergebnisse.....	18
4.1.2.2 PCR-Ergebnisse.....	19
4.1.3 Informative Angaben: Statistische Kenndaten Mandel... .	21
4.1.3.1 ELISA-Methoden.....	21
4.1.3.2 PCR-Methoden.....	24
5. Dokumentation.....	25
5.1 Angaben der Teilnehmer.....	25
5.1.1 ELISA-Methoden.....	25
5.1.2 PCR-Methoden.....	27
5.2 Homogenität.....	28
5.2.1 Mischungshomogenität vor der Abfüllung.....	28
5.3 Informationen zur Eignungsprüfung (EP).....	31
6. Verzeichnis der Teilnehmer in alphabetischer Reihenfolge.....	32
7. Verzeichnis relevanter Literatur.....	33

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 PT-Format „**Action Level Matrix - ALM Verification**“ bietet die Möglichkeit anhand einer Art Kalibrierreihe von 5 Proben eines Allergens in einer spezifischen Lebensmittelmatrix sowie einer „Nullprobe“ nachzuweisen, dass mit der analytischen Bestimmungsmethode des teilnehmenden Labors der für die Kennzeichnung des betreffenden Allergens relevante Gehalt sicher erfasst werden kann.

Dabei reichen die Allergen-Konzentrationen der PT-Probenreihe von 1/10 bis mindestens das 5-fache des Action Levels, der i.d.R. auf die Schwellenwertdosis (VITAL Konzept 2.0) bzw. Beurteilungswerte des ALTS/ALS zurückgeht (vgl. Tabelle 3). Die Auswertung der PT-Ergebnisse erfolgt qualitativ in Scores von 1-5 (Score 3 = Action Level erfolgreich erfasst). Quantitative Ergebnisse werden unter Angabe der erzielten Wiederfindungsrate informativ im Bericht angegeben.

Zusätzlich wurde zur Information eine quantitative Bewertung der ELISA-Ergebnisse für den Action Level sowie den Level 5 mittels z-Score vorgenommen.

2. Durchführung

2.1 Untersuchungsmaterial

Zur Untersuchung wurden 6 LVU-Proben mit gleicher Lebensmittelmatrix für den qualitativen Nachweis und ggf. die quantitative Bestimmung von Mandel in der Lebensmittelmatrix Kekse zur Verfügung gestellt. Die Mandel-Level der PT-Probenreihe lagen im Bereich von 2,0 mg/kg bis 100 mg/kg (als Mandel), der mittlere Wert stellt den „Action Level“ dar (s. Tabelle 1).

Bei der Lebensmittelmatrix des Untersuchungsmaterials handelt es sich um handelsübliche Butterkekse. Die Grundzusammensetzung war für alle 6 Proben gleich (s. Tabelle 1).

Nach Zerkleinern und Sieben mittels Schlagmühle (mesh 1,5 mm) wurde die Grundmischung homogenisiert und ein Aliquot als Level „Null“-Probe abgenommen.

Zur Herstellung der mandelhaltigen Proben wurden zunächst Kekse unter Zusatz einer Mischung roher Mandeln (weitere Angaben s.u.) gebacken (150°C, 30 min) und anschließend getrocknet (40°C). Danach wurden die mandelhaltigen Kekse mittels Messermühle zerkleinert und anschließend homogenisiert.

Anschließend wurde die Reihe der **dotierten Proben** folgendermaßen hergestellt: Nach Zerkleinerung und Homogenisierung wurden die mandelhaltigen Kekse zu einem Aliquot der Grundmatrix gegeben und die Mischung homogenisiert. Anschließend wurde portionsweise erneut Grundmatrix in 3-5 weiteren Schritten zugegeben und jeweils homogenisiert bis die Gesamtmenge erreicht war.

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

Zur Dotierung wurde eine Mischung roher und gemahlener Mandeln aus insgesamt 18 Einzelprodukten aus 5 Ländern (USA, Europa, Australien, Vorderasien) verwendet. Diese Mischung der Mandeln hat in den Proben (Matrix Kartoffelpulver/Maltodextrin) der Eignungsprüfung DLA 14/2019 für Mandel mit diversen ELISA-Methoden eine mittlere Wiederfindungsrate von 121 % ± 40 % (n=10) ergeben.

Tabelle 1: Zusammensetzung der DLA-Proben

PT-Probenreihe	Level 0 „Null“	Level 1 2,0 mg/kg	Level 2 10 mg/kg	Level 3 20 mg/kg	Level 4 50 mg/kg	Level 5 100 mg/kg
Zutaten	g/100 g	g/100g	g/100g	g/100g	g/100g	g/100g
Butterkekse Zutaten: Weizenmehl, Zucker, Butter, Gerstenmalzextrakt, Magermilchpulver, Glucose, Glucosesirup, Backtriebmit- tel Ammoniumcarbonat, Salz, Emulgator Lecithine Nährwertangaben pro 100 g: Fett 12 g, Kohlenhydrate 76 g, Eiweiß 7,1 g	100	>99,9	99,8	99,7	99,1	98,3
Kekse (gebacken 150°C, 30 min) Zutaten: Weizenmehl, Zu- cker, Butter, Eier, Salz sowie Mischung roher Man- deln und weitere Zutaten (Maltodextrin, Natriumsul- fat, Siliciumdioxid)	-	0,034	0,17	0,34	0,86	1,72
Allergen-Gehalte	mg/kg	mg/kg	mg/kg	mg/kg	mg/kg	mg/kg
davon Mandel:	-					
- als Mandel*		2,01	9,98	20,0	49,7	99,9
- mit 20,5% Gesamtprotein**		0,412	2,05	4,10	10,2	20,5
erweiterte kombinierte Unsicherheit (k=2) des Man- del-Gehalts (= ± 13 %)		± 0,26	± 1,3	± 2,6	± 6,5	± 13

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

** Proteingehalt gemäß Laboranalyse des Rohstoffs (Gesamtstickstoff nach Kjeldahl mit F=5,18 für Mandelprotein)

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

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 Mandel.

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, 18 – 20].

2.1.1 Charakterisierung der PT-Probenreihe

Die PT-Probenreihe wurde mittels ELISA-Bestimmung charakterisiert (Veratox Mandel ELISA, n=3). Die dotierten Level korrelierten mit den aufsteigenden Mittelwerten der Ergebnisse (Mean) (s. Abb. 1). Die relativen Standardabweichungen (RSD) lagen im Bereich von ca. 1,5% bis 7% und die Wiederfindungsraten (Recovery) bei 26% bis 44% (Level 1: abgeschätzt <LOQ mit 113% WF).

Tabelle 2: Charakterisierung der PT-Probenreihe Mandel in Kekes mittels ELISA-Bestimmung (Veratox Mandel, n=3).

PT-Sample	Level 0	Level 1	Level 2	Level 3	Level 4	Level 5
	[mg/kg]	[mg/kg]	[mg/kg]	[mg/kg]	[mg/kg]	[mg/kg]
Spiking	0,0	2,01	9,98	20,0	49,7	99,9
Result 1	1,3	2,3	3,9	6,4	13,2	41,2
Result 2	1,3	2,4	4,0	6,5	12,2	44,8
Result 3	1,3	2,1	3,9	6,9	12,9	46,4
Mean [mg/kg]	1,3	2,27	3,93	6,60	12,8	44,1
SD	-	0,15	0,06	0,26	0,51	2,66
RSD [%]	-	6,7	1,5	4,0	4,0	6,0
Recovery [%]	-	113	39	33	26	44

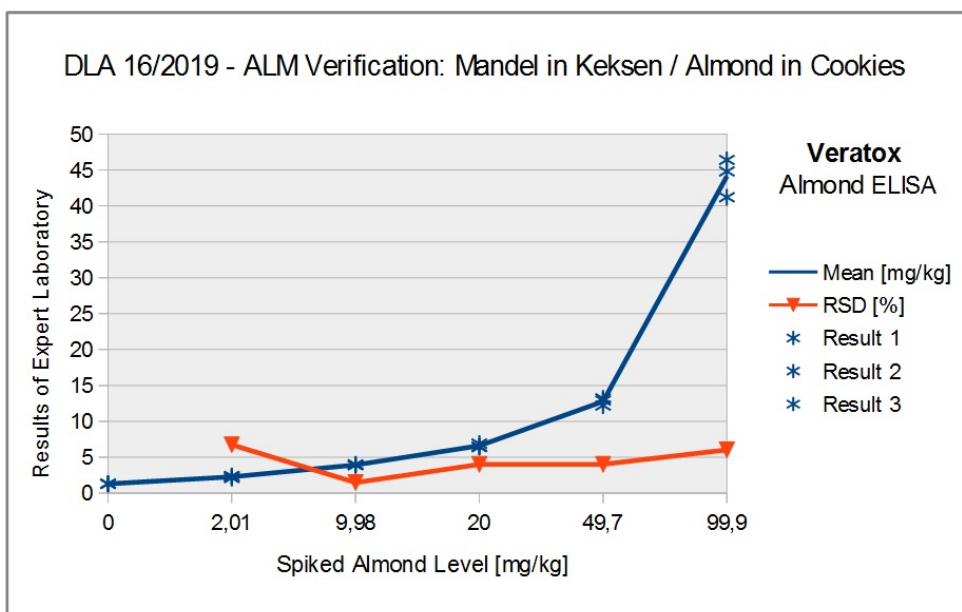


Abb./Fig. 1: Darstellung der ELISA-Ergebnisse der PT-Probenreihe Mandel in Kekes (Veratox Mandel, n=3), Anmerkung: die x-Achse ist zur besseren Erkennbarkeit der niedrigen Gehalte nicht linear dargestellt.

2.1.2 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 94%, 17%, 88%, 87% bzw. 79% 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, 1,6, 0,92, 0,84 bzw. 0,97 erhalten. Der Wert von 1,6 wurde aufgrund einer ausreichend hohen Wahrscheinlichkeit in der Poissonverteilung angenommen. 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 Degraderationsrate 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. 0,16 (21,5°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 22. Kalenderwoche 2019 je eine Portion der Proben 1 bis 6 verschickt. Die Untersuchungsverfahren wurden freigestellt. Die Untersuchungen waren durchzuführen bis spätestens 12. Juli 2019.

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

Die Eignungsprüfung Action Level Matrix (ALM) - Verification umfasst fünf unterschiedliche Proben mit definierten Gehalten an Mandel sowie eine „Nullprobe“ in der Matrix Kekse.

- *Die 6 Proben sind in zufälliger Reihenfolge nummeriert.*
- *Es soll qualitativ mit einer geeigneten Methode nachgewiesen werden, dass der sogenannte „Action Level“ von 20 mg/kg Mandel erfasst werden kann (= Action Level 1 (VITAL Konzept 2.0) bzw. Beurteilungswert des ALTS/ALS).*
- *Soweit möglich ist die Angabe quantitativer Ergebnisse erwünscht, um einen Vergleich zu den Zusatzniveaus darstellen zu können.*

Bitte beachten Sie die beiliegenden Informationen zur Eignungsprüfung. (siehe Dokumentation unter Punkt 5.2 EP-Informationen)

2.3 Ergebnisübermittlung

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

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

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

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

Alle 11 Teilnehmer haben 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 [31-34]. 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 wurde die allergene Zutat in einer speziellen Lebensmatrix in einer Art Kalibrierreihe mit Konzentrationen um den sogenannten Action Level herum zur Analyse zur Verfügung gestellt. Der hier als „Action Level“ bezeichnete Allergengehalt ist in Tabelle 3 farbig unterlegt.

Die Teilnehmer-Ergebnisse werden *qualitativ* mit einem Action Level Matrix Score (*ALM-Score*) bewertet, der angibt wie viele Konzentrations-Level 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.

Tabelle 3: Schwellenwerte, Beurteilungswerte und gesetzliche Höchstwerte (farbig unterlegt: Action Level in der vorliegenden LVU) [21-23, 32]

Allergen	Schwellenwert-dosis * (Vital Konzept 2.0)	Beurteilungswert ALTS/ALS	Gesetzliche Höchstwerte zur Kennzeichnung
	mg/kg	mg/kg	mg/kg
Gluten	100	> 80	20 **
Ei (als Volleipulver)	0,66	> 1	
Erdnuss	8	> 5	
Soja (als Sojamehl)	25	> 20	
Milch (als ent fettetes Milchpulver)	2,8	> 2,5	
Haselnuss	6,4	> 5	
Cashew	106	> 50	
Mandel , Walnuss, Pekannuss, Paranuss, Pistazie, Macadamia	-	> 20	
Sesam, ungeschält	11,8	> 10	
Lupine	100	> 50	
Selleriesaat	-	> 20	
Senfsaat	1,9	> 5	

* berechnet aus Schwellenwert bei Verzehr von 100 g Lebensmittel [22, 23]

** Höchstwert zur Kennzeichnung als „glutenfrei“ gemäß EU-VO 828/2014 [21]

3.1 Action Level Matrix Score (ALM-Score)

Die qualitative Bewertung der Ergebnisse jedes Teilnehmers erfolgt mit sogenannten ALM-Scores von 1 - 5 anhand der Anzahl der Übereinstimmungen der Angaben „positiv“ oder „negativ“ mit den Dotierungen der LVU-Probenreihe (siehe Tab. 4). Ein ALM-Score von ≥ 3 bedeutet, dass der Action Level erfolgreich erfasst wurde.

Die Ergebnisse der Matrixprobe Level 0 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 4: Bewertung der Ergebnisse anhand von ALM-Scores

Level 0 „Null“	Level 1 2,0 mg/kg	Level 2 10 mg/kg	Level 3 (Action Level) 20 mg/kg	Level 4 50 mg/kg	Level 5 100 mg/kg	ALM-Score qualitativ	Bestimmung Action Level
pos/neg	pos/neg	pos/neg	pos/neg	pos/neg	pos/neg	Anzahl erfasster Level 1 - 5	
negativ	negativ	negativ	negativ	negativ	positiv	1 (20%)	nicht erfolgreich
negativ	negativ	negativ	negativ	positiv	positiv	2 (40%)	nicht erfolgreich
negativ	negativ	negativ	positiv	positiv	positiv	3 (60%)	erfolgreich
negativ	negativ	positiv	positiv	positiv	positiv	4 (80%)	erfolgreich
negativ	positiv	positiv	positiv	positiv	positiv	5 (100%)	erfolgreich

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 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 zugesetzte Allergen (Zusatzniveau) berechnet. Die Bezugswerte ergeben sich aus den unter 2.1 Untersuchungsmaterial in Tabelle 1 angegebenen Gehalten der Level 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 [29]. Für quantitative PCR-Bestimmungen 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 Matrix- und/oder 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 48 - 105% für die PCR-Methoden erhalten (s. Tab. 5a und 5b). Die angegebenen Zielstandardabweichungen σ_{pt} wurden für eine Anzahl von $m = 2$ Wiederholmessungen berechnet.

Tabelle 5a: ELISA-Methoden - Wiederfindungsraten und Präzisionsdaten ausgewählter Auswertungen von Versuchen zur Präzision [36-37]

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 5b: PCR-Methoden - Relative Wiederholstandardabweichungen (RSD_r) und relative Vergleichsstandardabweichungen (RSD_R) gemäß ausgewählter Auswertungen von Versuchen zur Präzision und die resultierende Zielstandardabweichung σ_{pt} [39-40]

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 multiplex 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 multiplex 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 multiplex 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 multiplex 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 [28], von der Arbeitsgruppe 12 „Lebensmittelallergene“ des Technischen Komitees CEN/TC 275 [25-27], von einer internationalen "Food Allergen Working Group" unter der Leitung der AOAC Presidential Task Force on Food Allergens [29] und vom Codex Alimentarius Committee (CAC/GL 74-2010) [24] erarbeitet worden.

Die hier relevanten ELISA- bzw. PCR-Validierungskriterien der Gremien sind in den Tabellen 6 und 7 angegeben.

Tabelle 6: ELISA-Validierungskriterien

Literatur [24-29]	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 7: PCR-Validierungskriterien

Literatur [24]	Wiederfindungsrate	Wiederholstandard- abweichung	Vergleichsstandard- abweichung
CAC 2010	± 25% ^(a)	≤ 25%	≤ 35%

(a) = Trueness / Richtigkeit

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

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

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

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

In der vorliegenden LVU wurden alle ELISA-Ergebnisse einheitlich als Mandel angegeben, so dass keine Umrechnungen erforderlich waren.

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

Auswertenummer	Level 0	Level 1	Level 2	Level 3 (Action Level)	Level 4	Level 5	ALM-Score qualitativ	Methode	Hinweis
	„Null“	2,0 mg/kg	10 mg/kg	20 mg/kg	50 mg/kg	100 mg/kg			
	pos/neg	pos/neg	pos/neg	pos/neg	pos/neg	pos/neg	Anzahl erfasster Level 1 - 5		

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

Auswertenummer	Level 1 – 2,0 mg/kg		Level 2 – 10 mg/kg		Level 3 – 20 mg/kg (Action Level)		Level 4 - 50 mg/kg		Level 5 - 100 mg/kg		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**		

4.1 Vergleichsuntersuchung Mandel

4.1.1 Qualitativ: Action Level Matrix-Scores

4.1.1.1 ELISA-Methoden

Auswertenummer	Level 0	Level 1	Level 2	Level 3 (Action Level)	Level 4	Level 5	ALM-Score qualitativ	Methode	Hinweis
	„Null“	2,0 mg/kg	10 mg/kg	20 mg/kg	50 mg/kg	100 mg/kg			
	pos/neg	pos/neg	pos/neg	pos/neg	pos/neg	pos/neg	Anzahl erfasster Level 1 - 5		
1	= LOD	positiv	positiv	positiv	positiv	positiv	5 (100%)	AQ	
3	positiv	positiv	positiv	positiv	positiv	positiv	5 (100%)	AQ	
7	positiv	positiv	positiv	positiv	positiv	positiv	5 (100%)	AQ	
2	negativ	positiv	positiv	positiv	positiv	positiv	5 (100%)	BF	
10	negativ	positiv	positiv	positiv	positiv	positiv	5 (100%)	IL	
4	negativ	positiv	positiv	positiv	positiv	positiv	5 (100%)	RS-F	
9	negativ	positiv	positiv	positiv	positiv	positiv	5 (100%)	RS-F	
6	negativ	negativ	positiv	positiv	positiv	positiv	4 (80%)	VT	
8	negativ	> LOD	positiv	positiv	positiv	positiv	5 (100%)	VT	
11	< LOQ	positiv	positiv	positiv	positiv	positiv	5 (100%)	VT	

	Level 0	Level 1	Level 2	Level 3	Level 4	Level 5
Anzahl positiv	2	8	10	10	10	10
Anzahl negativ	6	1	0	0	0	0
Prozent positiv	25	89	100	100	100	100
Prozent negativ	75	11	0	0	0	0
Konsenswert	negativ	positiv	positiv	positiv	positiv	positiv
Dotierung	negativ	positiv	positiv	positiv	positiv	positiv

Methoden:

AQ = AgraQuant, RomerLabs
 BF = MonoTrace ELISA, BioFront Technologies
 IL = Immunolab
 RS-F= Ridascreen® Fast, R-Biopharm
 VT = Veratox, Neogen

Anmerkung:

Alle Teilnehmer haben den Level 2 (10 mg/kg) sowie den Action Level von 20 mg/kg und die Level 4 und 5 erfolgreich erfasst. Der Level 1 wurde von 89% (8) der Teilnehmer erfasst. Das negative Ergebnis steht in Übereinstimmung mit den Bestimmungsgrenzen laut Testkit-Anleitung (VT mit 2,5 mg/kg als Mandel). Mit der Methode AQ wurden für den Null-Level positive Ergebnisse im Bereich bis 1 mg/kg angegeben.

4.1.1.2 PCR-Methoden

Auswertenummer	Level 0 „Null“	Level 1 2,0 mg/kg	Level 2 10 mg/kg	Level 3 (Action Level) 20 mg/kg	Level 4 50 mg/kg	Level 5 100 mg/kg	ALM-Score qualitativ	Methode	Hinweis
	pos/neg	pos/neg	pos/neg	pos/neg	pos/neg	pos/neg	Anzahl erfasster Level 1 - 5		
5	positiv	negativ	positiv	positiv	positiv	positiv	4 (80%)	MS	zu Level 1 s. Dokumentation

	Level 0	Level 1	Level 2	Level 3	Level 4	Level 5
Dotierung	negativ	positiv	positiv	positiv	positiv	positiv

Methoden:
MS = Microsynth

Anmerkung:

Ein Teilnehmer hat die LVU-Proben mittels PCR qualitativ untersucht. Die Level 2 bis 5 inklusive dem Action Level von 20 mg/kg wurden erfolgreich erfasst.

Der "Null"-Level wurde allerdings positiv bewertet, während der Level 1 als negativ angegeben wurde.

4.1.2 Quantitativ: Wiederfindungs-Scores

4.1.2.1 ELISA-Ergebnisse

Auswertenummer	Level 1 – 2,0 mg/kg		Level 2 – 10 mg/kg		Level 3 – 20 mg/kg (Action Level)		Level 4 - 50 mg/kg		Level 5 - 100 mg/kg		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 im AB**			
1	0,65	32	3,13	31	4,88	24	8,08	16	34,8	35	0/5 (0%)	AQ		
3	1,30	65	6,30	63	8,40	42	27,0	54	46,3	46	3/5 (60%)	AQ		
7	1,30	65	4,70	47	14,0	70	20,0	40	42,0	42	2/5 (40%)	AQ		
2	2,36	117	5,70	57	7,40	37	18,1	36	58,6	59	3/5 (60%)	BF		
10	1,30	65	6,00	60	9,00	45	21,0	42	52,0	52	3/5 (60%)	IL		
4	4,30	214	12,0	120	21,0	105	49,0	99	87,0	87	4/5 (80%)	RS-F		
9	4,08	203	9,23	92	19,7	99	42,9	86	99,2	99	4/5 (80%)	RS-F		
6	<2.5		4,80	48	7,80	39	15,2	31	56,9	57	1/5 (20%)	VT		
8	2,27	113	3,93	39	6,60	33	12,8	26	44,1	44	1/5 (20%)	VT		
11	3,55	177	6,12	61	9,84	49	22,5	45	55,0	55	2/5 (40%)	VT		
AB**		50-150 %	AB**	50-150 %	AB**	50-150 %	AB**	50-150 %	AB**	50-150 %				
Anzahl im AB		5	Anzahl im AB		6	Anzahl im AB		3	Anzahl im AB		3	Anzahl im AB		6
Prozent im AB		56	Prozent im AB		60	Prozent im AB		30	Prozent im AB		30	Prozent im AB		60

Methoden:
 AQ = AgraQuant, RomerLabs
 BF = MonoTrace ELISA, BioFront Technologies
 IL = Immunolab
 RS-F= Ridascreen® Fast, R-Biopharm
 VT = Veratox, Neogen

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

** Akzeptanzbereich der AOAC für Allergen-ELISAs

Anmerkung:

Für die Level 2 bis 5 lagen die Wiederfindungsraten der beiden Teilnehmerergebnisse der Methode RS-F im Bereich der AOAC-Anforderungen von 50-150%. Mit den anderen Methoden wurden für bis zu drei Level Wiederfindungsraten im Akzeptanzbereich erhalten.

4.1.2.2 PCR-Ergebnisse

Es wurden keine quantitativen PCR-Ergebnisse eingereicht.

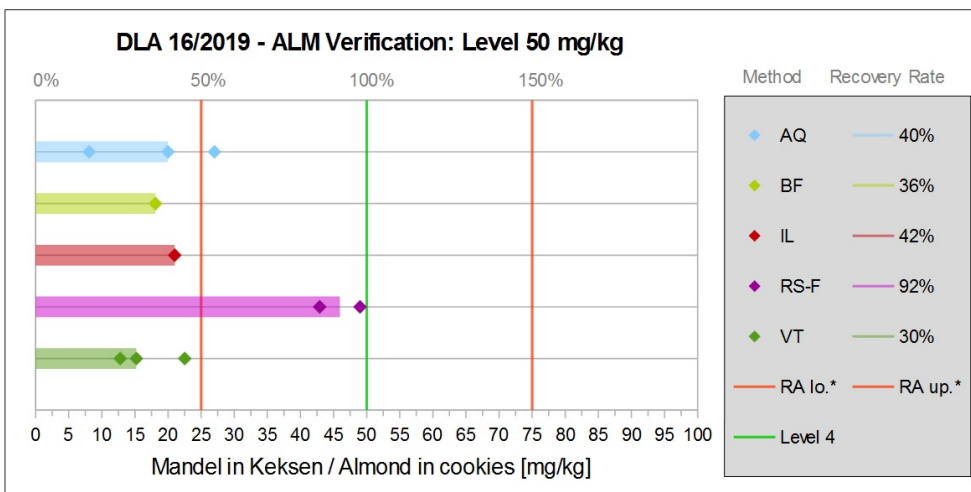
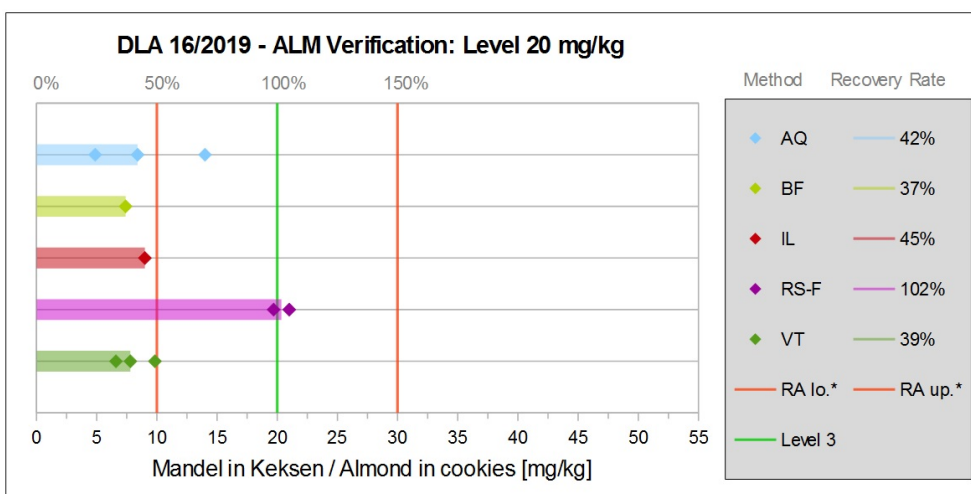
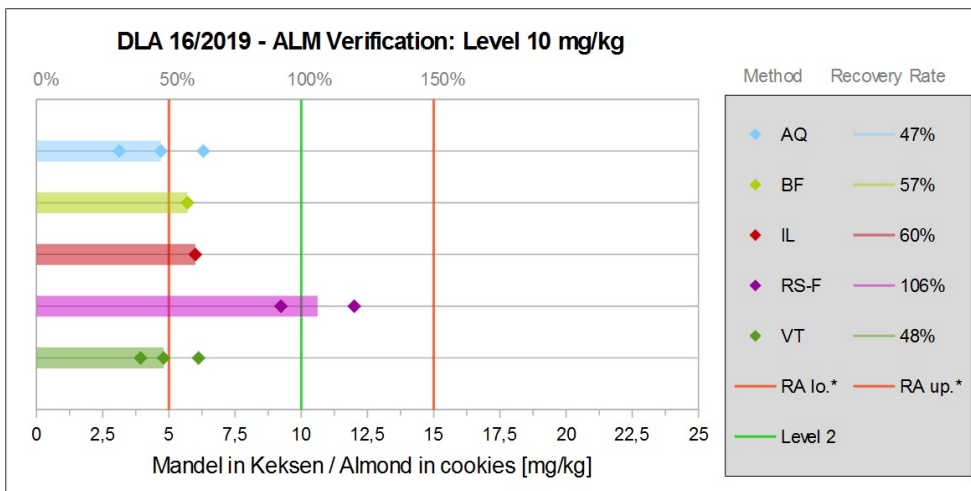


Abb./Fig. 2: Darstellung der Einzelergebnisse (Level 2-4 getrennt nach Methoden mit Angabe der durchschnittlichen Wiederfindungsrate (Recovery Rate), untere Skala Mandelgehalt in mg/kg, obere Skala % Wiederfindungsrate in % mit * Akzeptanzbereich von 50% - 150% (* range of acceptance: RA lower limit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

4.1.3 Informative Angaben: Statistische Kenndaten Mandel

4.1.3.1 ELISA-Methoden

Probe: Action Level 20,0 mg/kg

Kenndaten	Alle Ergebnisse [°] [mg/kg]
Zugewiesener Wert (X_{pt})	$X_{pt_{ALL}}$
Anzahl der Messergebnisse	8
Anzahl der Ausreißer	0
Mittelwert	8,49
Median	8,10
Robuster Mittelwert (X_{pt})	8,21
Robuste Standardabweichung (S^*)	2,36
<i>Zielkenndaten:</i>	
Zielstandardabweichung σ_{pt}	2,05
Untere Grenze des Zielbereichs	4,10
Obere Grenze des Zielbereichs	12,3
Quotient S^*/σ_{pt}	1,2
Standardunsicherheit $U(X_{pt})$	1,04
Ergebnisse im Zielbereich	7
Prozent im Zielbereich	88

[°] ohne Methode RS-F

Anmerkungen zu den Kenndaten:

Als zugewiesener Wert wurde der robuste Mittelwert aller Ergebnisse der Methoden AQ, BF, IL und VT verwendet.

Für die Ermittlung der z-Scores wurde eine Zielstandardabweichung von 25% zugrunde gelegt (s. Abb. 3, S.23).

Alle Angaben haben rein informativen Charakter.

Hinweis: Die beiden Ergebnisse der Methode RS-F wurden nicht berücksichtigt, da sie in der Kerndichteschätzung einen separaten Peak darstellen. Zur Bewertung dieser Ergebnisse ist der robuste Mittelwert aller Ergebnisse daher nicht geeignet.

Probe: Level 10 mg/kg

Kenndaten	Alle Ergebnisse° [mg/kg]
Zugewiesener Wert (X_{pt})	X_{pt_ALL}
Anzahl der Messergebnisse	8
Anzahl der Ausreißer	0
Mittelwert	5,09
Median	5,25
Robuster Mittelwert (X_{pt})	5,09
Robuste Standardabweichung (S^*)	1,29
<i>Zielkenndaten:</i>	
Zielstandardabweichung σ_{pt}	1,27
Untere Grenze des Zielbereichs	2,54
Obere Grenze des Zielbereichs	7,63
Quotient S^*/σ_{pt}	1,0
Standardunsicherheit $U(X_{pt})$	0,57
Ergebnisse im Zielbereich	8
Prozent im Zielbereich	100

° ohne Methode RS-F

Anmerkungen zu den Kenndaten:

Als zugewiesener Wert wurde der robuste Mittelwert aller Ergebnisse der Methoden AQ, BF, IL und VT verwendet.

Für die Ermittlung der z-Scores wurde eine Zielstandardabweichung von 25% zugrunde gelegt (s. Abb. 4, S.23).

Alle Angaben haben rein informativen Charakter.

Hinweis: Die beiden Ergebnisse der Methode RS-F wurden nicht berücksichtigt, da sie in der Kerndichteschätzung einen separaten Peak darstellen. Zur Bewertung dieser Ergebnisse ist der robuste Mittelwert aller Ergebnisse daher nicht geeignet.

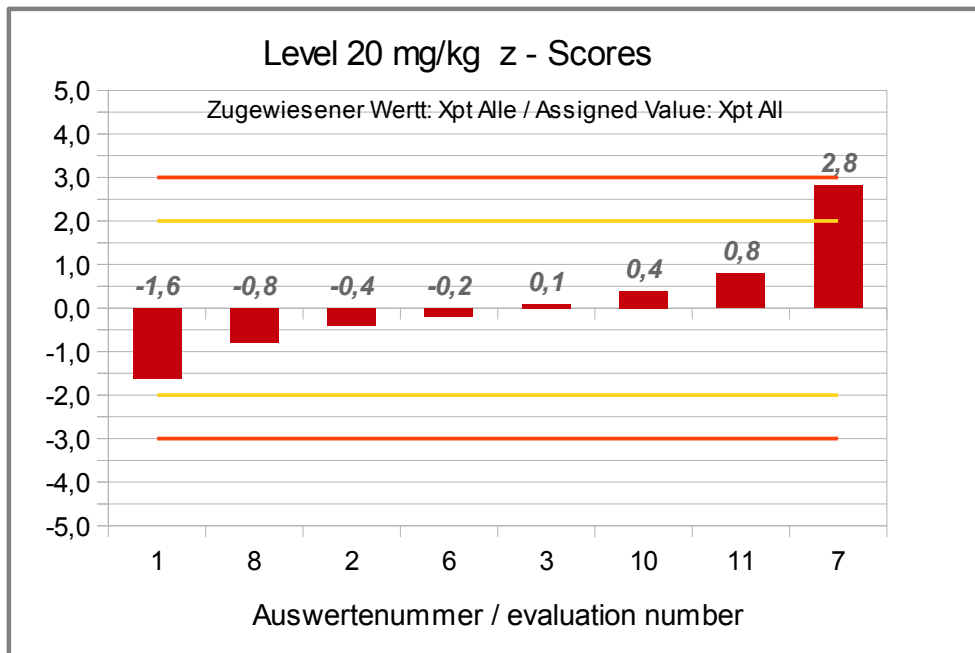


Abb./Fig. 3:

z-Scores Action Level 20 mg/kg (ELISA-Ergebnisse als Mandel)
 Zugewiesener Wert: Median aller Ergebnisse

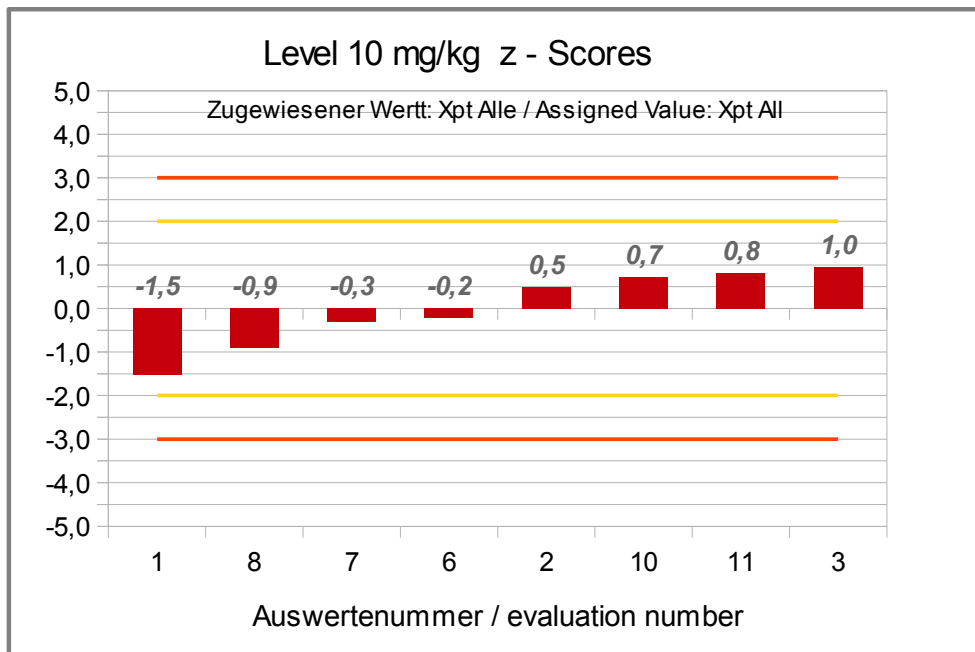


Abb./Fig. 4:

z-Scores Level 10 mg/kg (ELISA-Ergebnisse als Mandel)
 Zugewiesener Wert: robuster Mittelwert (Alg. A) aller Ergebnisse

4.1.3.2 PCR-Methoden

Es lagen keine quantitativen Ergebnisse von PCR-Methoden vor, sodass keine statistische Auswertung vorgenommen wurde.

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 Level 10 mg/kg		Ergebnis Probe 2 Level 20 mg/kg		Ergebnis Probe 3 Level 100 mg/kg		Ergebnis Probe 4 Level 2,0 mg/kg		Ergebnis Probe 5 Level 50mg/kg		Ergebnis Probe 6 Nullprobe		NWG / LOD *	BG / LOQ *	MU*	Quantitatives Ergebnis als	Methode
			qualitativ	mg/kg	qualitativ	mg/kg	qualitativ	mg/kg	qualitativ	mg/kg	qualitativ	mg/kg	qualitativ	mg/kg					
AQ	1	08.07.19	-	3,13	-	4,88	-	34,75	-	0,65	-	8,08	-	0,2	0,2	0,4		Mandel	AgraQuant ELISA Almond COKAL0748, RomerLabs
AQ	3	18.06.19	positiv	6,3	positiv	8,4	positiv	46,3	positiv	1,3	positiv	27	positiv	0,6	0,2	0,4	50	Mandel	AgraQuant ELISA Almond COKAL0748, RomerLabs
AQ	7	06.06.19	positiv	4,7	positiv	14	positiv	42	positiv	1,3	positiv	20	positiv	1	0,2	0,4	40	Mandel	AgraQuant ELISA Almond COKAL0748, RomerLabs
BF	2	12.07.19	positiv	5,7	positiv	7,4	positiv	58,6	positiv	2,36	positiv	18,1	negativ	0	0,15	1		Mandel	MonoTrace Almond ELISA kit, BioFront Technologies
IL	10	12.06.19	positiv	6	positiv	9	positiv	52	positiv	1,3	positiv	21	negativ	<0,4				Mandel	Immunolab Almond ELISA
RS-F	4	21.06.19	positiv	12	positiv	21	positiv	87	positiv	4,3	positiv	49	negativ	<2,5	1,7	1,5		Mandel	Ridascreen® FAST Almond R6901, R-Biopharm
RS-F	9	17.06.	positiv	9,23	positiv	19,7	positiv	99,2	positiv	4,08	positiv	42,9	negativ	< 2,5	0,1	2,5		Mandel	Ridascreen® FAST Almond R6901, R-Biopharm
VT	6	26.06.19	positiv	4,8	-		positiv	56,9	negativ	<2.5	-				2,5	2,5		Mandel	Veratox Almond, Neogen
VT	6	05.07.19	-		positiv	7,8	-		-		positiv	15,2	negativ	<2.5	2,5	2,5		Mandel	Veratox Almond, Neogen
VT	8	17.06.19	-	3,93	-	6,60	positiv	44,13	-	2,27	-	12,77	-	1,30	2,5	2,5		Mandel	Veratox Almond, Neogen
VT	11	19/6/2019	-	6,12	-	9,84	-	55,03	-	3,55	-	22,52	-	BLQ		2,5		ppm ganze Mandel	Veratox Almond, Neogen

* NWG Nachweisgrenze / BG Bestimmungsgrenze

* LOD limit of detection / LOQ limit of quantitation

* MU Messunsicherheit / MU measurement uncertainty

Fortsetzung Angaben der Teilnehmer:

Meth. Abk.	Auswertenummer	Spezifität	Hinweise zur Methode (Extraktion und Bestimmung)	Methode akkreditiert nach ISO/IEC 17025	Sonstige Hinweise
		Antikörper	z.B. Extraktionslösung / Zeit / Temperatur	ja/nein	
AQ	1			yes\	
AQ	3	Almond	Zugabe Additiv	ja	
AQ	7	Mandel	wässriger Puffer, Wasserbad 60°C für 15 Minuten	nein	
BF	2	monoclonal antibody-based kit	1:10 extraction ratio, 10 minutes at 60C	no	
IL	10				
RS-F	4	Mandelproteine	lt. Herstellerangaben	ja	
RS-F	9		nach Herstelleranleitung, mit Magermilchpulver	ja	Standards weiter verdünnt, Deshalb wäre eine Angabe bei Probe 6 mit <1,25 möglich!
VT	6		PBS/15/60C	Yes	
VT	6		PBS/15/60C	Yes	
VT	8				
VT	11	Not known	125 mL PBS, 15 minutes, 60 C shaker waterbath	no	Read on Biotek reader. R2 = 0.997. Sample # 3 was diluted 1:5 to obtain result.

5.1.2 PCR-Methoden

Meth. Abk.	Auswertenummer	Datum der Analyse	Ergebnis Probe 1 Level 10 mg/kg		Ergebnis Probe 2 Level 20 mg/kg		Ergebnis Probe 3 Level 100 mg/kg		Ergebnis Probe 4 Level 2,0 mg/kg		Ergebnis Probe 5 Level 50mg/kg		Ergebnis Probe 6 Nullprobe		NWG / LOD *	BG / LOQ *	MU*	Angabe quantitatives Ergebnis als	Methode
			qualitativ	mg/kg	qualitativ	mg/kg	qualitativ	mg/kg	qualitativ	mg/kg	qualitativ	mg/kg	qualitativ	mg/kg	mg/kg	mg/kg	mg/kg	z.B. Lebensmittel / Protein	Test-Kit + Anbieter
MS	5		pos	2	pos	20	pos	50	neg*		pos	100	pos	10	0,005%Mandel DNA		50% an der NWG	Mandel/Lebensmittel	Microsynth Primer/Sonden + Qiagen MasterMix

* NWG Nachweisgrenze / BG Bestimmungsgrenze

* LOD limit of detection / LOQ limit of quantitation

* MU Messunsicherheit / MU measurement uncertainty

Fortsetzung Angaben der Teilnehmer:

Meth. Abk.	Auswertenummer	Spezifität	Hinweise zur Methode (Extraktion und Bestimmung)	Methode akkreditiert nach ISO/IEC 17025	Sonstige Hinweise
		Target-Sequenz / -DNA	z.B. Extraktion / Enzyme / Clean-Up / Real Time PCR / Gelelektrophorese / Cyclen	ja/nein	
MS	5	PruA1 Gen	DNA Extraktion mit Proteinase K, Clean Up mit Chloroform und Säulchen / Amplif m RealTime PCR 45 Zyklen	ja	Allergenanalytik führen wir qualitativ durch. Real Time PCR Lauf enthält immer die rel Standard Eichgerade aus frischem Material, die der Bewertung des kompletten Laufs und der darin gemessenen Werte dient. Hier waren daher die quantitativen Konz. Angaben in ppm* anhand der gemessenen Ct Werte zugeordnet. Ergebnis Probe 4: in einem Ansatz war die Amplifikation zu sehen, allerdings erst im 40. Zyklus (nach Beseitigung der PCR Inhibition)

5.2 Homogenität

5.2.1 Mischungshomogenität vor der Abfüllung

Microtracer Homogenitätstest

DLA 16-2019 Probe 1

Gewicht Gesamtprobe	1,01	kg
Microtracer	FSS-rot lake	
Teilchengröße	75 – 300	µm
Gewicht pro Partikel	2,0	µg
Tracerzugabe	26,8	mg/kg

Analysenergebnisse:

Probe	Einwaage [g]	Partikel Anzahl	Partikel [mg/kg]
1	5,02	90	35,9
2	5,04	93	36,9
3	5,05	102	40,4
4	4,99	95	38,1
5	5,05	93	36,8
6	5,00	101	40,4
7	4,99	86	34,5
8	5,01	89	35,5

Poisson-Verteilung

Probenanzahl	8	
Freiheitsgrad	7	
Mittelwert	93,6	Partikel
Standardabweichung	5,48	Partikel
χ^2 (CHI-Quadrat)	2,25	
Wahrscheinlichkeit	94	%
Wiederfindungsrate	139	%

Normalverteilung

Probenanzahl	8	
Mittelwert	37,3	mg/kg
Standardabweichung	2,18	mg/kg
rel. Standardabweichung	5,86	%
Horwitz Standardabweichung	9,28	%
HorRat-Wert	0,63	
Wiederfindungsrate	139	%

Microtracer Homogenitätstest

DLA 16-2019 Probe 2

Gewicht Gesamtprobe	1,00	kg
Microtracer	FSS-rot lake	
Teilchengröße	75 – 300	µm
Gewicht pro Partikel	2,0	µg
Tracerzugabe	29,9	mg/kg

Analysenergebnisse:

Probe	Einwaage [g]	Partikel Anzahl	Partikel [mg/kg]
1	4,99	63	25,3
2	5,02	52	20,7
3	5,05	53	21,0
4	5,02	77	30,7
5	5,03	75	29,8
6	4,99	54	21,6
7	5,00	61	24,4
8	5,05	64	25,3

Poisson-Verteilung

Probenanzahl	8	
Freiheitsgrad	7	
Mittelwert	62,4	Partikel
Standardabweichung	9,56	Partikel
χ^2 (CHI-Quadrat)	10,3	
Wahrscheinlichkeit	17	%
Wiederfindungsrate	83	%

Normalverteilung

Probenanzahl	8	
Mittelwert	24,9	mg/kg
Standardabweichung	3,81	mg/kg
rel. Standardabweichung	15,3	%
Horwitz Standardabweichung	9,86	%
HorRat-Wert	1,6	
Wiederfindungsrate	83	%

Microtracer Homogenitätstest

DLA 16-2019 Probe 3

Gewicht Gesamtprobe	1,35	kg
Microtracer	FSS-rot lake	
Teilchengröße	75 – 300	µm
Gewicht pro Partikel	2,0	µg
Tracerzugabe	28,2	mg/kg

Analysenergebnisse:

Probe	Einwaage [g]	Partikel Anzahl	Partikel [mg/kg]
1	5,03	51	20,3
2	5,05	48	19,0
3	5,00	56	22,4
4	5,03	48	19,1
5	5,02	57	22,7
6	4,98	45	18,1
7	4,99	44	17,6
8	5,01	50	20,0

Poisson-Verteilung		
Probenanzahl	8	
Freiheitsgrad	7	
Mittelwert	49,9	Partikel
Standardabweichung	4,66	Partikel
χ ² (CHI-Quadrat)	3,05	
Wahrscheinlichkeit	88	%
Wiederfindungsrate	71	%

Normalverteilung		
Probenanzahl	8	
Mittelwert	19,9	mg/kg
Standardabweichung	1,86	mg/kg
rel. Standardabweichung	9,35	%
Horwitz Standardabweichung	10,2	%
HorRat-Wert	0,92	
Wiederfindungsrate	71	%

Microtracer Homogenitätstest

DLA 16-2019 Probe 4

Gewicht Gesamtprobe	1,00	kg
Microtracer	FSS-rot lake	
Teilchengröße	75 – 300	µm
Gewicht pro Partikel	2,0	µg
Tracerzugabe	22,3	mg/kg

Analysenergebnisse:

Probe	Einwaage [g]	Partikel Anzahl	Partikel [mg/kg]
1	5,02	60	23,9
2	4,97	70	28,2
3	4,99	72	28,9
4	5,06	61	24,1
5	5,02	73	29,1
6	4,99	63	25,3
7	4,99	61	24,4
8	5,00	65	26,0

Poisson-Verteilung		
Probenanzahl	8	
Freiheitsgrad	7	
Mittelwert	65,6	Partikel
Standardabweichung	5,42	Partikel
χ ² (CHI-Quadrat)	3,14	
Wahrscheinlichkeit	87	%
Wiederfindungsrate	118	%

Normalverteilung		
Probenanzahl	8	
Mittelwert	26,2	mg/kg
Standardabweichung	2,17	mg/kg
rel. Standardabweichung	8,26	%
Horwitz Standardabweichung	9,79	%
HorRat-Wert	0,84	
Wiederfindungsrate	118	%

Microtracer Homogenitätstest**DLA 16-2019 Probe 5**

Gewicht Gesamtprobe	1,01	kg
Microtracer	FSS-rot lake	
Teilchengröße	75 – 300	µm
Gewicht pro Partikel	2,0	µg
Tracerzugabe	22,9	mg/kg

Analysenergebnisse:

Probe	Einwaage [g]	Partikel Anzahl	Partikel [mg/kg]
1	5,02	68	27,1
2	5,04	57	22,6
3	5,06	63	24,9
4	4,99	59	23,6
5	5,01	58	23,2
6	5,05	63	25,0
7	4,97	63	25,4
8	4,96	48	19,4

Poisson-Verteilung

Probenanzahl	8	
Freiheitsgrad	7	
Mittelwert	59,9	Partikel
Standardabweichung	5,79	Partikel
χ^2 (CHI-Quadrat)	3,92	
Wahrscheinlichkeit	79	%
Wiederfindungsrate	104	%

Normalverteilung

Probenanzahl	8	
Mittelwert	23,9	mg/kg
Standardabweichung	2,31	mg/kg
rel. Standardabweichung	9,67	%
Horwitz Standardabweichung	9,92	%
HorRat-Wert	0,97	
Wiederfindungsrate	104	%

5.3 Informationen zur Eignungsprüfung (EP)

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

EP-Nummer	DLA 16-2019
EP-Name	ALM-Verification Mandel: 5 Proben mit Mandeln in Keks-Matrix
Probenmatrix (Prozessierung)	Proben 1-6: Butterkekse (gebacken ca. 150°)/ Zutaten: Weizenmehl, Zucker, Butter, Gerstenmalzextrakt, Magermilchpulver, Glucose, Glucosesirup, Backtriebmittel Ammoniumcarbonat, Salz, Emulgator Lecithine, weitere Zusatzstoffe, Ei und Mandeln (außer "Null-Probe")
Probenzahl und Probenmenge	5 unterschiedliche Proben je 20 g + 1 „ Null-Probe“ 20 g
Lagerungsinformation	Proben : Raumtemperatur (Langzeit 2 - 10°C)
Verwendungszweck	Ausschließlich für Laboruntersuchungen (Qualitätskontrollproben)
Parameter	qualitativ (optional: quantitativ): Mandel / Mandelprotein / DNA Gehalte (Mandel) 2,0 / 10 / 20 / 50 / 100 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 Analyseeinwaagen, eine repräsentative Probenmenge entsprechend guter Laborpraxis zu homogenisieren. Vorzugsweise ist die Gesamtmenge zu homogenisieren.
Ergebnisangabe	Je ein qualitatives Ergebnis (und optional quantitativ) wird für die Proben 1-6 ermittelt. Die Einzelergebnisse sind in die Ergebnisabgabe-Datei einzutragen.
Einheiten	positiv / negativ (optional: mg/kg)
Anzahl von Stellen	mindestens 2 signifikante Stellen
Ergebnisabgabe	Die Ergebnisabgabe-Datei wird per eMail übermittelt an: pt@dla-lvu.de
Abgabetermin	spätestens 12. Juli 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. Die Prüfung der Gehalte, Homogenität und Stabilität von EP-Parametern wird von DLA im Unterauftrag vergeben.

6. Verzeichnis der Teilnehmer in alphabetischer Reihenfolge

Teilnehmer / Participant	Ort / Town	Land / Country
		Deutschland
		USA
		Deutschland
		Deutschland
		ÖSTERREICH
		Schottland, UK
		Schottland, UK
		USA
		ÖSTERREICH
		ÖSTERREICH
		USA

[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 Methodenvalidierung / DIN ISO 5725 series part 1, 2 and 6 Accuracy (trueness and precision) of measurement methods and results
5. Verordnung / Regulation 882/2004/EU; Verordnung über über amtliche Kontrollen zur Überprüfung der Einhaltung des Lebensmittel- und Futtermittelrechts sowie der Bestimmungen über Tiergesundheit und Tierschutz / Regulation on official controls performed to ensure the verification of compliance with feed and food law, animal health and animal welfare rules
6. Evaluation of analytical methods used for regulation of food and drugs; W. Horwitz; *Analytical Chemistry*, 54, 67-76 (1982)
7. The International Harmonised Protocol for the Proficiency Testing of Analytical Laboratories ; *J.AOAC Int.*, 76(4), 926 - 940 (1993)
8. A Horwitz-like funktion describes precision in proficiency test; M. Thompson, P.J. Lowthian; *Analyst*, 120, 271-272 (1995)
9. Protocol for the design, conduct and interpretation of method performance studies; W. Horwitz; *Pure & Applied Chemistry*, 67, 331-343 (1995)
10. Recent trends in inter-laboratory precision at ppb and sub-ppb concentrations in relation to fitness for purpose criteria in proficiency testing; M. Thompson; *Analyst*, 125, 385-386 (2000)
11. The International Harmonised Protocol for the Proficiency Testing of Analytical Chemistry Laboratories; *Pure Appl Chem*, 78, 145 - 196 (2006)
12. AMC Kernel Density - Representing data distributions with kernel density estimates, amc technical brief, Editor M Thompson, Analytical Methods Committee, AMCTB No 4, Revised March 2006 and Excel Add-in Kernel.xla 1.0e by Royal Society of Chemistry
13. EURACHEM/CITAC Leitfaden, Ermittlung der Messunsicherheit bei analytischen Messungen (2003); *Quantifying Uncertainty in Analytical Measurement* (1999)
14. GMP+ Feed Certification scheme, Module: Feed Safety Assurance, chapter 5.7 Checking procedure for the process accuracy of compound feed with micro tracers in GMP+ BA2 Control of residues, Version: 1st of January 2015 GMP+ International B.V.
15. MTSE SOP No. 010.01 (2014): Quantitative measurement of mixing uniformity and carry-over in powder mixtures with the rotary detector technique, MTSE Micro Tracers Services Europe GmbH
16. Homogeneity and stability of reference materials; Linsinger et al.; *Accred Qual Assur*, 6, 20-25 (2001)
17. AOAC Official Methods of Analysis: Guidelines for Standard Method Performance Requirements, Appendix F, p. 2, AOAC Int (2016)
18. 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. DAKS 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. 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
22. Taylor et al. (2014) Establishment of reference doses for residues of allergenic foods: report of the VITAL Expert Panel, *Food Chem Toxicol* 63: 9-17
 23. Demmel et al. (2015) Kap. 4.1 Existierende Aktionswerte, in: *Allergene in Lebensmitteln*, Behr's Verlag, Hamburg [Chapter 4.1 Existing Action Levels, in *Allergens in Foods*]
 24. 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
 25. 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
 26. 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
 27. 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
 28. Ministry of Health and Welfare, JSM, Japan 2006
 29. 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)
 30. 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)
 31. 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)
 32. 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
 33. 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
 34. 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
 35. 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]
 36. 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]
 37. 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]
 38. 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]
 39. ASU §64 LFGB L 18.00-21 Untersuchung von Lebensmitteln - Nachweis und Bestimmung von Paranuss (*Bertholletia exceisa*) in Reis- und Weizenkeksen sowie

in Soßenpulver mittels real-time PCR (2014) [Foodstuffs, detection and determination of brazil nut (*Bertholletia exceisa*) in rice and wheat cookies and sauce powders by PCR]

- 40.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 16/2019 - ALM Verification: Mandel

Alle 11 Teilnehmer haben mindestens ein Ergebnis eingereicht. Es wurden 5 Proben mit unterschiedlichen Mandelgehalten von 2,0 bis 100 mg/kg in der Matrix Kekse, sowie eine Matrix-„Nullprobe“ mit ELISA- und PCR-Methoden untersucht. Als „Action Level“ wurde ein Gehalt von 20 mg/kg gewählt. Das Dotierungsmaterial bestand aus einer Mischung von Mandeln (18 Produkte aus 5 Ländern).

100% der Teilnehmerergebnisse haben die „Action Level“-Probe als „positiv“ erfasst und eine Bewertung in Form von ALM-Scores (1-5) erhalten. Zusätzlich wurden für jeden Teilnehmer Wiederfindungsraten für alle quantitativen Ergebnisse ermittelt (WFR-Scores). Statistische Kenndaten der Action Level Probe und des höchsten Levels wurden informativ für die ELISA-Methoden angegeben. Weitere Details sind dem Auswertebereicht zu entnehmen.

6 Teilnehmer hatten ihren Sitz im Europäischen Ausland (Österreich, Schottland) und zwei Teilnehmer in den USA.