



Auswertungs-Bericht

Laborvergleichsuntersuchung

DLA ptALM1 (2020)

ALM Verification:

Senf in Gewürz-Mischung

**5 Proben mit Senf (*Sinapis alba*)
(Gehalte: 0,5 / 2,5 / 5,0 / 12,5 / 25 mg/kg)**

DLA - Proficiency Tests GmbH

*Hauptstr. 80
23845 Oering/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 PT-Provider</i>	<p>DLA - Proficiency Tests GmbH Hauptstr. 80, 23845 Oering, Germany</p> <p>Geschäftsführer/CEO: Dr. Matthias Besler-Scharf Stellv. Leitung/Deputy Lead: Alexandra Scharf MSc.</p> <p>Tel. ++49-(0)4532-9183358 Mob. ++49(0)171-1954375 Fax. ++49(0)4102-9944976 eMail. proficiency-testing@dla-lvu.de</p>
<i>EP-Nummer PT-Number</i>	DLA ptALM1 (2020)
<i>EP-Koordinator PT-Coordinator</i>	Dr. Matthias Besler-Scharf
<i>Status des EP-Bericht Status of PT-Report</i>	<p>Abschlussbericht / Final report (9. Juni 2021)</p> <p>Gültig ist die jeweils letzte Version/Korrektur des Berichts. Sie ersetzt alle vorangegangenen Versionen. Only the latest version/correction of the report is valid. It replaces all preceding versions.</p>
<i>EP-Bericht Freigabe PT-Report Authorization</i>	<p>Dr. Matthias Besler-Scharf (Technischer Leiter / Technical Manager) - <i>gezeichnet / signed M. Besler-Scharf</i> Alexandra Scharf MSc. (QM-Beauftragte / Quality Manager) - <i>gezeichnet / signed A. Scharf</i> Datum / Date: 9. Juni 2021</p>
<i>Unteraufträge Subcontractors</i>	<p>Im Rahmen dieser Eignungsprüfung wurden nachstehende Leistungen im Unterauftrag vergeben: Homogenitätsprüfung der EP-Parameter, Proteinbestimmung As part of the present proficiency test the following services were subcontracted: Homogeneity tests of PT-parameter(s), protein determination</p>
<i>Vertraulichkeit Confidentiality</i>	<p>Die Teilnehmerergebnisse sind im EP-Bericht in anonymisierter Form mit Auswertenummern benannt. Daten einzelner Teilnehmer werden ausschließlich nach vorheriger Zustimmung des Teilnehmers an Dritte weitergegeben. Participant result are named anonymously with evaluation numbers in the PT report. Data of individual participants will be passed on to third parties only with prior consent of the participant.</p>

Inhalt

1. Einleitung.....	4
2. Durchführung.....	5
2.1 Untersuchungsmaterial.....	5
2.1.1 Charakterisierung der PT-Probenreihe.....	7
2.1.1 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 Auswertung eines Versuchs zur Präzision.....	12
3.2.2 Werte aus Erkenntnissen.....	14
3.3 z-Score (Dotierungsniveaus).....	15
3.4 z'-Score (Dotierungsniveaus).....	15
4. Ergebnisse.....	16
4.1 Vergleichsuntersuchung Senf.....	17
4.1.1 Qualitativ: Action Level Matrix-Score.....	17
4.1.1.1 ELISA-Methoden.....	17
4.1.1.2 PCR-Methoden.....	18
4.1.2 Quantitativ: Wiederfindungs-Scores und z-Scores.....	19
4.1.2.1 ELISA-Methoden.....	19
4.1.2.2 PCR-Methoden.....	20
4.1.3 Informative Angaben: Statistische Kenndaten Senf.....	22
4.1.3.1 ELISA-Methoden.....	22
4.1.3.2 PCR-Methoden.....	24
4.2 z-Scores der Teilnehmer: Übersichtstabelle.....	25
5. Dokumentation.....	26
5.1 Angaben der Teilnehmer.....	26
5.1.1 ELISA- und Lateral Flow-Methoden.....	26
5.1.2 PCR-Methoden.....	28
5.2 Homogenität.....	29
5.2.1 Mischungshomogenität vor der Abfüllung.....	29
5.3 Informationen zur Eignungsprüfung (EP).....	32
6. Verzeichnis der Teilnehmer in alphabetischer Reihenfolge.....	33
7. Verzeichnis relevanter Literatur.....	34

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 Senf (*Sinapis alba*) in der Lebensmittelmatrix Gewürzmischung zur Verfügung gestellt. Die Senf-Level der PT-Probenreihe lagen im Bereich von 0,5 mg/kg bis 25 mg/kg (als Senfsaat), der mittlere Wert stellt den „Action Level“ dar (s. Tabelle 1).

Bei dem Untersuchungsmaterial der Lebensmittelmatrixproben handelt es sich um eine Mischung von gemahlenden Gewürzen (Pulver). Die Grundzusammensetzung war für alle 6 Proben gleich (s. Tabelle 1).

Nach Homogenisierung der Grundmischung wurde ein Aliquot als Level „Null“-Probe abgenommen.

Zur Herstellung der Senf-haltigen Proben wurden die Rohstoffe für die Allergen-Vormischung mittels Zentrifugalmühle (mesh 500 µm) zerkleinert und gesiebt und anschließend homogenisiert.

Danach wurde die Reihe der **dotierten Proben** folgendermaßen hergestellt:

Nach Zerkleinerung und Homogenisierung wurde die Senf-Vormischung zu einem Aliquot der Grundmatrix gegeben und die Mischung homogenisiert. Anschließend wurde portionsweise erneut Grundmatrix in 2-3 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 von gelben Senfkörnern (*Sinapis alba*) aus insgesamt 9 Einzelprodukten (aus Deutschland, Ost-Europa und Indien) verwendet. Diese Senf-Mischung hat in den Proben (Matrix Kartoffelpulver / Maltodextrin) der Eignungsprüfung DLA ptALR1 (2020) für Senf mit diversen ELISA-Methoden* eine mittlere Wiederfindungsrate von 155 % ± 39 % (n=10) sowie von 134 % ± 21 % (n=6) mit der ELISA-Methode RS-F** ergeben.

* div. ELISA Methoden = AgraQuant (Romer Labs), Ridascreen® Fast (R-Biopharm), SensiSpec (Eurofins), Veratox (Neogen)

** ELISA Methode RS-F = Ridascreen® Fast (R-Biopharm)

Tabelle 1: Zusammensetzung der DLA-Proben

PT-Probenreihe	Level 0	Level 1	Level 2	Level 3	Level 4	Level 5
	„Null“	0,5 mg/kg	2,5 mg/kg	5,0 mg/kg	12,5 mg/kg	25 mg/kg
Zutaten	g/100 g	g/100g	g/100g	g/100g	g/100g	g/100g
Gewürz-Mischung Zutaten: Kurkuma, Paprika, schwarzer Pfeffer, Zwiebel, Majoran, Kümmel, Chillies und Knoblauch	100	>99,9	>99,9	>99,9	>99,9	>99,9
Senfkörner (<i>Sinapis alba</i>) Mischung aus 9 Produkten (Europa, Asien) und weitere Zutaten (Maltodextrin, Siliciumdioxid)	-	0,001	0,005	0,013	0,025	0,050
Allergen-Gehalte	mg/kg	mg/kg	mg/kg	mg/kg	mg/kg	mg/kg
davon Senf:	-					
- als Senf*		0,505	2,53	5,05	12,6	25,2
- mit 26,1% Gesamtprotein**		0,132	0,659	1,32	3,28	6,58
erweiterte kombinierte Unsicherheit (k=2) des Senf-Gehalts (= ± 11,3 %)		± 0,057	± 0,29	± 0,57	± 1,4	± 2,8

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

** Proteingehalt gemäß Laboranalyse des Rohstoffs (Gesamtstickstoff nach Kjeldahl mit F=5,30 für Senfprotein)

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 Senf.

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 (Immunolab Senf ELISA, mit Extraktionsadditiv). Die dotierten Level korrelierten mit den aufsteigenden Werten der Messergebnisse (s. Abb. 1). Die Wiederfindungsraten (Recovery) lagen bei 57% bis 88% für die Level 3-5. Die Level 0-2 wurden unterhalb der Bestimmungsgrenze informativ abgeschätzt. Die relative Standardabweichung (RSD) des Action Levels (Level 3) lag bei ca. 12,4%.

Tabelle 2: Charakterisierung der PT-Probenreihe Senf in Gewürzmischung mittels ELISA-Bestimmung (Immunolab ELISA).

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	0,51	2,53	5,05	12,6	25,2
Result 1	0,08	0,39	1,11	3,71	5,77	18,8
Result 2	0,11	0,45	1,07	2,91	6,64	32,5
Result 3	0,46°	0,44	1,27	3,18	8,53	16,6
Result 4	0,17	0,39	1,60	11,3°	7,89	20,6
Mean		0,42	1,26	3,27	7,21	22,1
SD	-	0,03	0,24	0,41	1,24	7,12
RSD [%]	-	8,1	19,4	12,4	17,2	32,2
Recovery [%]	-	83	50	65	57	88

* Level 0-2: Werte unterhalb LOQ

°Ausreißer ausgeschlossen

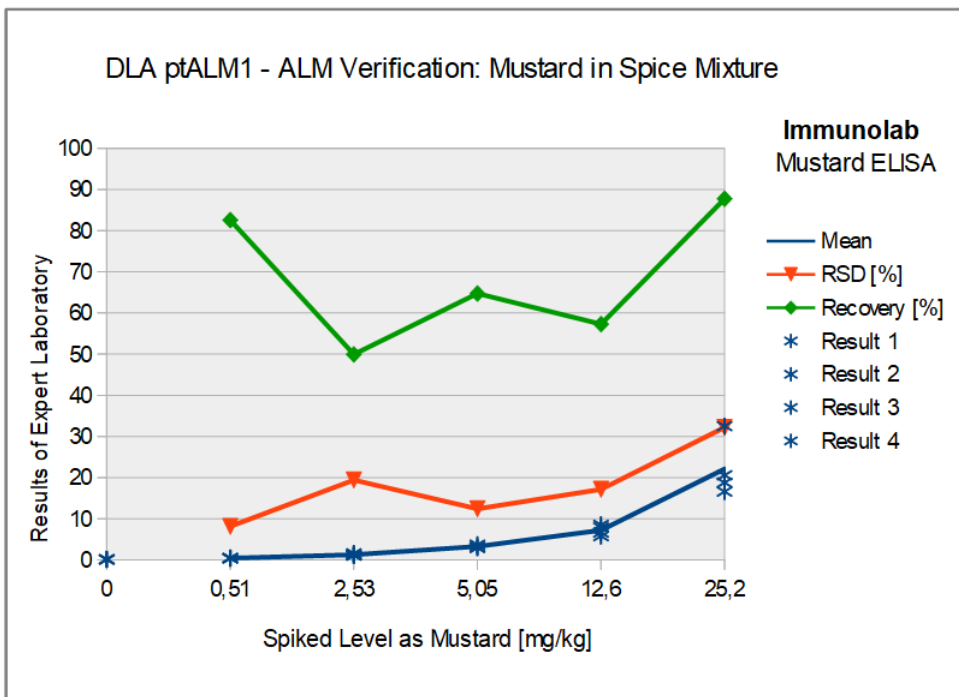


Abb./Fig. 1: Darstellung der ELISA-Ergebnisse der PT-Probenreihe Senf in Gewürzmischung (Immunolab ELISA Kit), Anmerkung: die x-Achse ist zur besseren Erkennbarkeit der niedrigen Gehalte nicht linear dargestellt.

2.1.1 Homogenität

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

Die Microtracer-Analyse der dotierten LVU-Proben 1, 2, 3, 5 und 6 hat eine Wahrscheinlichkeit von 65%, 15%, 97%, 99% bzw. 98% 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 0,95, 1,4, 0,70, 0,52 bzw. 0,56 erhalten. Der Wert von 1,4 wurde akzeptiert, da die Wahrscheinlichkeit der Poissonverteilung ausreichend war. Die Ergebnisse der Microtracer-Analyse sind in der Dokumentation angegeben.

2.1.2 Stabilität

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

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

Der a_w -Wert der EP-Proben lag bei ca. 0,45 ($18,7^\circ\text{C}$). 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 47. Kalenderwoche 2020 je eine Portion der Proben 1 bis 6 verschickt. Die Untersuchungsverfahren wurden freigestellt. Die Untersuchungen waren durchzuführen bis spätestens 29. Januar 2021 (verlängert).

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 Senf sowie eine „Nullprobe“ in der Matrix Gewürzmischung.

- *Die 6 Proben sind in zufälliger Reihenfolge nummeriert.*
- *Es soll qualitativ mit einer geeigneten Methode nachgewiesen werden, dass der sogenannte „Action Level“ von 5 mg/kg Senf 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 5.3 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.

7 Teilnehmer haben fristgerecht Ergebnisse abgegeben. Ein Teilnehmer hat keine Ergebnisse übermittelt.

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 [32-35]. 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) [21-24, 33]

Allergen	Schwellenwert-dosis *		Schwellenwert-dosis *		Beurteilungswert ALTS/ALS	Gesetzliche Höchstwerte zur Kennzeichnung mg/kg
	(Vital Konzept 2.0, 2014)		(Vital Konzept 3.0, 2019)			
	Protein mg/kg	Food mg/kg	Protein mg/kg	Food mg/kg	Food mg/kg	
Ei (als Volleipulver)	0,3	0,66	2	4,4	> 1	
Milch (als ent fettetes Milchpulver)	1	2,8	2	5,6	> 2,5	
Fisch (Frischfisch)	-	-	13	65	-	
Krustentiere (Shrimps, gekocht)	100	440	250	1100	-	
Erdnuss	2	8	2	8	> 5	
Lupine	40	100	26	65	> 50	
Soja (als Sojamehl)	10	25	5	13	> 20	
Cashew / Pistazie	-	-	0,5	2,6	> 50	
Haselnuss und andere Nüsse (Mandel, Paranuss, Macadamia)	1	6,4 (4-10)	1	6,4 (4-10)	> 20	
Walnuss / Pekannuss	-	-	0,3	-	-	
Selleriesaat	-	-	0,5	-	> 20	
Senfsaat	0,5	1,9	0,5	1,9	> 5	
Sesam, ungeschält	2	11,8	1	5,9	> 10	
Weizen	10	100	7	70	> 80	20 (Gluten)**

* berechnet aus Schwellenwert bei Verzehr von 100 g Lebensmittel, Proteingehalte aus [22] bzw. Nährwerttabellen Souci/Fachmann/Kraut [22, 23, 24]

** 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 0,5 mg/kg	Level 2 2,5 mg/kg	Level 3 (Action Level) 5,0 mg/kg	Level 4 12,5 mg/kg	Level 5 25 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 [30]. 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 Auswertung 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 12 - 176% für die PCR-Methoden (Senf) 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 [37-38]

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 [31]. 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 [31].

Das IRMM (Institute for Reference Materials and Measurements) hat in einem Ringversuch die Eignung fünf verschiedener ELISA-Test-Kits zur Bestimmung von Erdnuss getestet [34]. 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} [40, 41, 43-46]

Parameter	Matrix	Mittelwerte [mg/kg]	Wiederfindung	rob RSD_r	RSD_r	RSD_R	σ_{pt}	Methode / Literatur
Sesam	Reiskekse	94,6	95 %	-	22,5%	27,5%	22,4%	rt-PCR ASU 18.00-19
		15,7	79 %		26,0%	39,5%	35,0%	
		9,8	98 %		20,9%	33,5%	30,0%	
Sesam	Weizenkekse Soßenpulver	96,9	79 %	-	21,8%	33,0%	29,2%	rt-PCR ASU 18.00-19
		59,8	60 %		22,2%	43,2%	40,2%	
Sesam	Reiskekse	88,9	89 %	-	18,2%	30,5%	27,7%	rt-PCR ^{multiplex} ASU 18.00-22
		17,8	89 %		34,2%	37,8%	29,1%	
		9,8	98 %		26,2%	37,0%	32,0%	
Sesam	Weizenkekse Soßenpulver	115	93 %	-	16,7%	41,1%	39,4%	rt-PCR ^{multiplex} ASU 18.00-22
		58,5	59 %		30,8%	44,4%	38,7%	
Senf, braun / schwarz	Wurst, auto- klaviert	146,7	147 %	-	12,3%	22,0%	20,2%	rt-PCR ASU 08.00-64
		50,0	125 %		17,2%	31,6%	29,2%	
		15,8	158 %		15,4%	27,1%	24,8%	
Senf, braun / schwarz	Wurst, auto- klaviert	168,3	168 %	-	11,4%	31,6%	29,5%	rt-PCR ASU 08.00-65
		52,9	132 %		10,0%	23,1%	21,9%	
		17,6	176 %		23,1%	46,3%	43,3%	
Senf, weiß	Brühwurst (100°C, 60min)	79,9	80 %	-	13,6%	23,6%	21,6%	rt-PCR ASU 08.00-59
		37,0	93 %		15,7%	29,2%	27,0%	
		18,0	90 %		14,4%	30,6%	28,9%	
		8,0	80 %		15,4%	26,1%	23,7%	
Senf, weiß	Brühwurst (100°C, 60 min)	103,3	103 %	-	11,8%	17,1%	14,9%	rt-PCR ASU 08.00-65
		45,9	115 %	-	14,7%	21,8%	19,2%	
Senf, weiß	Wurst, autoklaviert	11,7	11,7 %	-	24,1%	34,3%	29,8%	rt-PCR ASU 08.00-65

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 [29], von der Arbeitsgruppe 12 „Lebensmittelallergene“ des Technischen Komitees CEN/TC 275 [26-28], von einer internationalen "Food Allergen Working Group" unter der Leitung der AOAC Presidential Task Force on Food Allergens [30] und vom Codex Alimentarius Committee (CAC/GL 74-2010) [25] erarbeitet worden.

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

Tabelle 6: ELISA-Validierungskriterien

Literatur [25-30]	Wiederfindungsrate	Wiederholstandardabweichung	Vergleichsstandardabweichung
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 [25]	Wiederfindungsrate	Wiederholstandardabweichung	Vergleichsstandardabweichung
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.

3.3 z-Score (Dotierungsniveaus)

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

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

Die Berechnung der z-Scores zu den Wiederfindungen erfolgte mit der Zielstandardabweichung von 25% (s. 3.2.2).

3.4 z'-Score (Dotierungsniveaus)

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

Die Berechnung erfolgt nach:

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

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

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

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

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 Eignungsprüfung wurden alle ELISA-Ergebnisse als Gesamtlebensmittel (Senfsaat) angegeben, sodass 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	Level 4	Level 5	ALM-Score qualitativ	Methode	Hinweis
	„Null“	0,5 mg/kg	2,5 mg/kg	(Action Level) 5,0 mg/kg	12,5 mg/kg	25 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 – 0,5 mg/kg			Level 2 – 2,5 mg/kg			Level 3 – 5,0 mg/kg (Action Level)			Level 4 – 12,5 mg/kg			Level 5 – 25 mg/kg			WFR-Score	Methode	Hinweis
	Ergebnis		WFR *	Ergebnis		WFR *	Ergebnis		WFR *	Ergebnis		WFR *	Ergebnis		WFR *			
	[mg/kg]	[%]	[Z _{WFR}]	[mg/kg]	[%]	[Z _{WFR}]	[mg/kg]	[%]	[Z _{WFR}]	[mg/kg]	[%]	[Z _{WFR}]	[mg/kg]	[%]	[Z _{WFR}]	Anzahl im AB**		

* WFR = Wiederfindungsrate

4.1 Vergleichsuntersuchung Senf

4.1.1 Qualitativ: Action Level Matrix-Score

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“	0,5 mg/kg	2,5 mg/kg	5,0 mg/kg	12,5 mg/kg	25 mg/kg			
	pos/neg	pos/neg	pos/neg	pos/neg	pos/neg	pos/neg	Anzahl erfasster Level 1-5		
2	negativ	negativ	negativ	negativ	positiv	positiv	2 (40%)	AQ	
1a	negativ	negativ	positiv	positiv	positiv	positiv	4 (80%)	NL	
7	negativ	positiv	positiv	positiv	positiv	positiv	5 (100%)	RS-F	
1b	negativ	negativ	positiv	positiv	positiv	positiv	4 (80%)	RS-F	
6a	negativ	negativ	positiv	positiv	positiv	positiv	4 (80%)	RS-F	
6b	negativ	negativ	positiv	positiv	positiv	positiv	4 (80%)	RS-F	
4	negativ	positiv	positiv	positiv	positiv	positiv	5 (100%)	SP	
5	negativ	negativ	negativ	positiv	positiv	positiv	3 (60%)	SP	

	Level 0	Level 1	Level 2	Level 3	Level 4	Level 5
Anzahl positiv	0	2	6	7	8	8
Anzahl negativ	8	6	2	1	0	0
Prozent positiv	0	25	75	88	100	100
Prozent negativ	100	75	25	13	0	0
Konsenswert	negativ	negativ	positiv	positiv	positiv	positiv
Dotierung	negativ	positiv	positiv	positiv	positiv	positiv

Methoden:

AQ = AgraQuant, RomerLabs

NL = nutriLinia® Allergen-ELISA

RS-F= Ridascreen® Fast, R-Biopharm

SP = SensiSpec ELISA Kit, Eurofins

Anmerkung:

Mit einer Ausnahme haben alle Teilnehmer den Action Level von 5,0 mg/kg und die höheren Level 4 und 5 erfolgreich erfasst. Der Level 2 wurde von 75% (6) der Teilnehmer und Level 1 nur noch von 25% (2) der Teilnehmer als positiv erfasst. Die Bestimmungsgrenzen der eingesetzten ELISA Methoden lagen laut Testkit-Anleitungen bei 0,5 mg/kg (RS-F) bzw. 2 mg/kg (AQ, NL, SP).

4.1.1.2 PCR-Methoden

Auswertenummer	Level 0 „Null“	Level 1 0,5 mg/kg	Level 2 2,5 mg/kg	Level 3 (Action Level) 5,0 mg/kg	Level 4 12,5 mg/kg	Level 5 25 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	negativ	negativ	positiv	positiv	positiv	positiv	4 (80%)	ASU	
7	negativ	positiv	positiv	positiv	positiv	positiv	5 (100%)	SFA	„Nullprobe“ negativ (<1 mg/kg)
3a	negativ	positiv	positiv	positiv	positiv	positiv	5 (100%)	SFA	„Nullprobe“ negativ (1 mg/kg)
3b	negativ	positiv	positiv	positiv	positiv	positiv	5 (100%)	SFA-4p	„Nullprobe“ negativ (1 mg/kg)
2	positiv	positiv	positiv	positiv	positiv	positiv	5 (100%)	SFA-Q	„Nullprobe“ positiv (0,1 mg/kg)

	Level 0	Level 1	Level 2	Level 3	Level 4	Level 5
Anzahl positiv	1	4	5	5	5	5
Anzahl negativ	4	1	0	0	0	0
Prozent positiv	20	80	100	100	100	100
Prozent negativ	80	20	0	0	0	0
Konsenswert	negativ	negativ	positiv	positiv	positiv	positiv
Dotierung	negativ	positiv	positiv	positiv	positiv	positiv

Methoden:

ASU = ASU §64 Methode/method

SFA = Sure Food ALLERGEN, R-Biopharm / Congen

SFA-4p = Sure Food Allergen 4plex, R-Biopharm / Congen

SFA-Q = Sure Food Allergen Quant, R-Biopharm / Congen

Anmerkung:

Vier Teilnehmer haben den Action Level von 5,0 mg/kg sowie den niedrigeren Level 2 und die höheren Level 4 und 5 erfolgreich erfasst. Der Level 1 wurde noch von drei Teilnehmern erfasst. Ein Teilnehmer hat zwei verschiedene Methoden verwendet.

Für die „Nullprobe“ wurde ein positives Ergebnis mit einem Gehalt von 0,1 mg/kg angegeben, während Teilnehmer 3 die „Nullprobe“ unter Angabe von Gehalten von 1 mg/kg als negativ eingestuft hat.

4.1.2 Quantitativ: Wiederfindungs-Scores und z-Scores

4.1.2.1 ELISA-Methoden

Auswertenummer	Level 1 – 0,5 mg/kg			Level 2 – 2,5 mg/kg			Level 3 – 5,0 mg/kg (Action Level)			Level 4 – 12,5 mg/kg			Level 5 – 25 mg/kg			WFR-Score	Methode	Hinweis
	Ergebnis		WFR *	Ergebnis		WFR *	Ergebnis		WFR *	Ergebnis		WFR *	Ergebnis		WFR *	WFR *		
	[mg/kg]	[%]	[Z _{WFR}]	[mg/kg]	[%]	[Z _{WFR}]	[mg/kg]	[%]	[Z _{WFR}]	[mg/kg]	[%]	[Z _{WFR}]	[mg/kg]	[%]	[Z _{WFR}]	Anzahl im AB**		
2	< 2			< 2			< 2			6,80	54	-1,8	11,6	46	-2,2	1/5 (20%)	AQ	
1a	0			1,60	63	-1,5	1,75	35	-2,6	2,90	23	-3,1	3,64	14	-3,4	1/5 (20%)	NL	
7	0,33	65	-1,4	0,76	30	-2,8	1,85	37	-2,5	3,93	31	-2,8	7,31	29	-2,8	1/5 (20%)	RS-F	
1b	0			1,60	63	-1,5	1,30	26	-3,0	2,90	23	-3,1	5,40	21	-3,1	1/5 (20%)	RS-F	
6a	<0,50																RS-F	ohne Extraktionsadditiv
6b				4,08	162	2,5	8,99	178	3,1	>13,5			6,50	26	-3,0	0	RS-F	mit Extraktionsadditiv
4	0,42	83	-0,67	1,26	50	-2,0	3,27	65	-1,4	7,21	57	-1,7	21,98	87	-0,51	5/5 (100%)	SP	Extraktionsadditiv
5	<2			<2			<2			3,50	28	-2,9	5,60	22	-3,1	0	SP	

AB**	50-150 %	AB**	50-150 %	AB**	50-150 %	AB**	50-150 %	AB**	50-150 %
Anzahl im AB	2	Anzahl im AB	3	Anzahl im AB	1	Anzahl im AB	2	Anzahl im AB	1
Prozent im AB	100	Prozent im AB	60	Prozent im AB	20	Prozent im AB	33	Prozent im AB	14

Methoden:

AQ = AgraQuant, RomerLabs
 NL = nutrilinia® Allergen-ELISA
 RS-F= Ridascreen® Fast, R-Biopharm
 SP = SensiSpec ELISA Kit, Eurofins

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

** Akzeptanzbereich der AOAC für Allergen-ELISAs

Anmerkung:

Mit einer Ausnahme (Ergebnisse Nr. 4) lagen für die Level 1 bis 5 nur sehr wenige Wiederfindungsraten der Teilnehmerergebnisse im Bereich der AOAC-Anforderungen von 50-150%.

4.1.2.2 PCR-Methoden

Auswertenummer	Level 1 – 0,5 mg/kg			Level 2 – 2,5 mg/kg			Level 3 – 5,0 mg/kg (Action Level)			Level 4 – 12,5 mg/kg			Level 5 – 25 mg/kg			WFR-Score	Methode	Hinweis
	Ergebnis		WFR *	Ergebnis		WFR *	Ergebnis		WFR *	Ergebnis		WFR *	Ergebnis		WFR *	WFR *		
	[mg/kg]	[%]	[Z _{WFR}]	[mg/kg]	[%]	[Z _{WFR}]	[mg/kg]	[%]	[Z _{WFR}]	[mg/kg]	[%]	[Z _{WFR}]	[mg/kg]	[%]	[Z _{WFR}]	Anzahl im AB**		
5																	ASU	
7	0,56	111	0,44	2,46	97	-0,10	5,04	100	0,00	12,1	96	-0,15	23	92	-0,32	5/5 (100%)	SFA	
3a	11,0	2178	83	16,5	653	22	37,5	743	26	76,0	604	20	133	528	17	0	SFA	
3b	7,00	1386	51	10,0	396	12	17,5	347	9,9	31,0	246	5,9	76	302	8,1	0	SFA-4p	
2	0,20	40	-2,4	1,00	40	-2,4	3,00	59	-1,6	13,6	108	0,32	7,3	29	-2,8	2/5 (40%)	SFA-Q	
	AB**			AB**			AB**			AB**			AB**					
	50-150 %			50-150 %			50-150 %			50-150 %			50-150 %					
	Anzahl im AB		1	Anzahl im AB		1	Anzahl im AB		2	Anzahl im AB		2	Anzahl im AB		1			
	Prozent im AB		25	Prozent im AB		25	Prozent im AB		50	Prozent im AB		50	Prozent im AB		25			

Methoden:

ASU = ASU §64 Methode/method
 SFA = Sure Food ALLERGEN, R-Biopharm / Congen
 SFA-4p = Sure Food Allergen 4plex, R-Biopharm / Congen
 SFA-Q = Sure Food Allergen Quant, R-Biopharm / Congen

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

** Akzeptanzbereich der AOAC für Allergen-ELISAs

Anmerkung:

Mit einer Ausnahme (Ergebnisse Nr. 7) lagen für die Level 1 bis 5 nur sehr wenige Wiederfindungsraten der Teilnehmerergebnisse im Bereich der AOAC-Anforderungen von 50-150%.

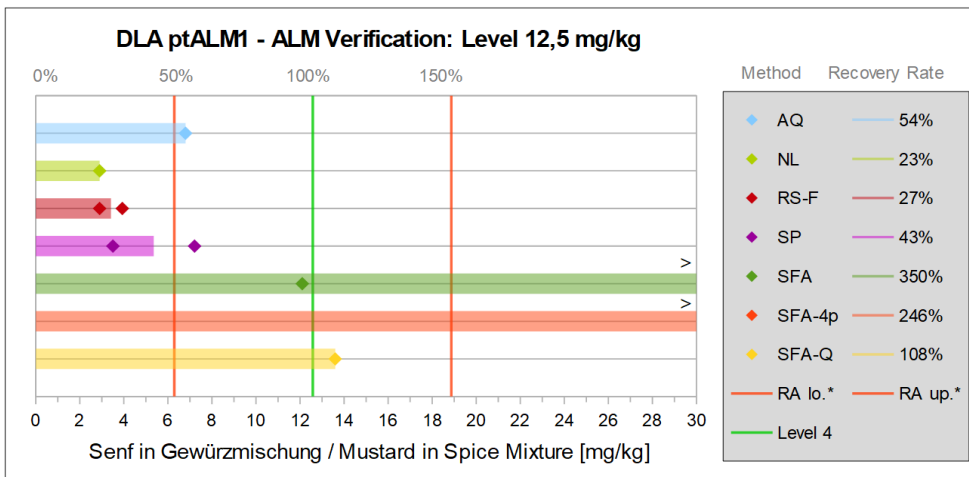
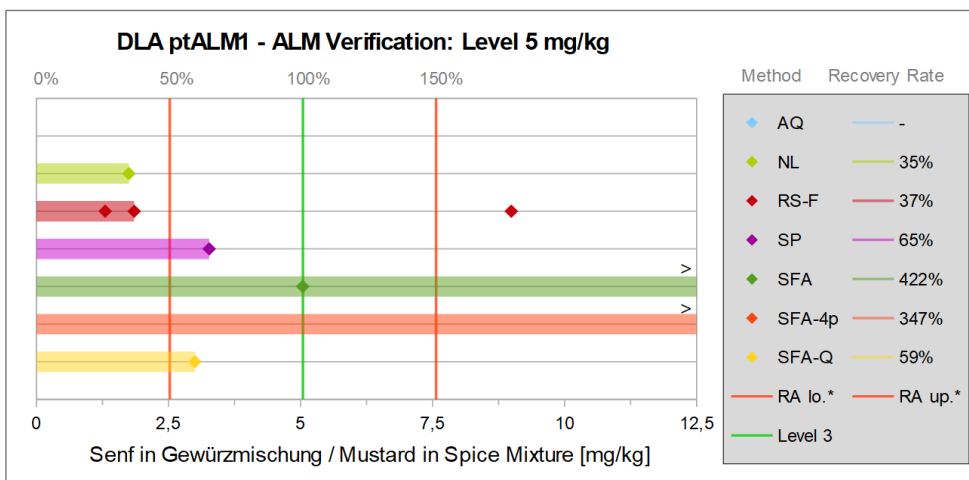
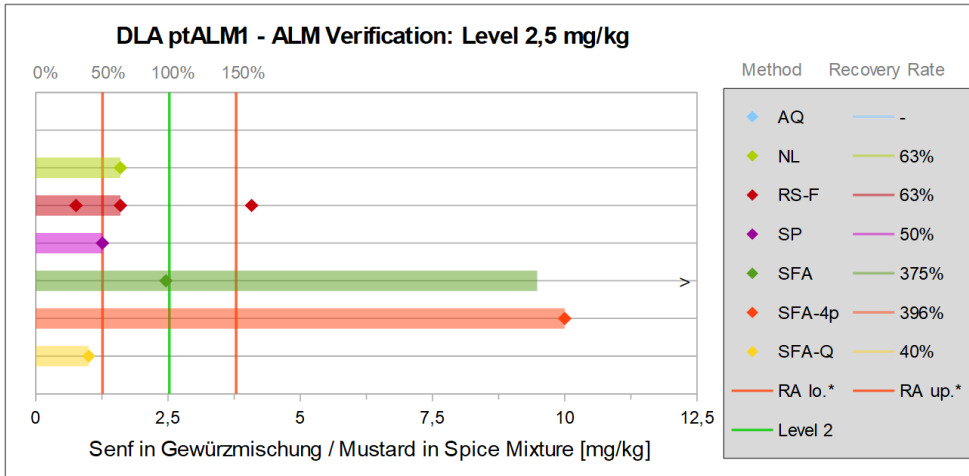


Abb./Fig. 2: Darstellung der Einzelergebnisse (Level 2-4 getrennt nach Methoden mit Angabe der durchschnittlichen Wiederfindungsrate (Recovery Rate), untere Skala Senfgehalt in mg/kg, obere Skala % Wiederfindungsrate in % mit * Akzeptanzbereich von 50% - 150% (* range of acceptance: RA lower limit bis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

4.1.3 Informative Angaben: Statistische Kenndaten Senf

4.1.3.1 ELISA-Methoden

Probe: Action Level 12,5 mg/kg

Kenndaten	Alle Ergebnisse [mg/kg]
Zugewiesener Wert (X_{pt})	$X_{pt}^t_{ALL}$
Anzahl der Messergebnisse	6
Anzahl der Ausreißer	0
Mittelwert	4,54
Median	3,72
Robuster Mittelwert (X_{pt})	4,54
Robuste Standardabweichung (S^*)	2,21
<i>Zielkenndaten:</i>	
Zielstandardabweichung σ_{pt}'	1,60
Untere Grenze des Zielbereichs	1,34
Obere Grenze des Zielbereichs	7,74
Quotient S^*/σ_{pt}'	1,4
Standardunsicherheit $U_{(X_{pt})}$	1,13
Ergebnisse im Zielbereich	6
Prozent im Zielbereich	100

Anmerkungen zu den Kenndaten:

Als zugewiesener Wert wurde der robuste Mittelwert der Ergebnisse aller Methoden verwendet.

Für die Ermittlung der z-Scores wurde eine Zielstandardabweichung von 25% zugrunde gelegt (s. Abb. 3, S.23). Auf Grund der erhöhten Variabilität unter Berücksichtigung der Standardunsicherheit mittels z'-Score ausgewertet.

Alle Angaben haben rein informativen Charakter.

Wichtiger Hinweis:

Da für keine Methode wenigstens 5 Ergebnisse vorlagen, wurde ausschließlich zur Information eine gemeinsame Auswertung der Ergebnisse vorgenommen. Es wird darauf hingewiesen, dass der sich ergebende Zielbereich für eine einzelne ELISA-Methode nicht gültig ist.

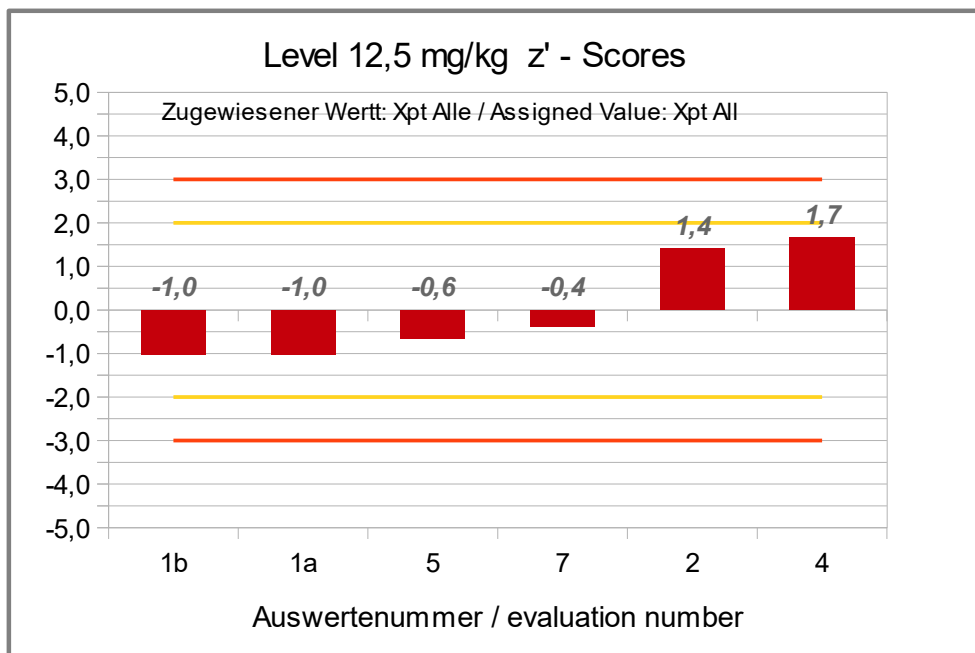


Abb./Fig. 3:

z'-Scores Level 12,5 mg/kg (ELISA-Ergebnisse als Senf)

Zugewiesener Wert: robuster Mittelwert aller Ergebnisse

4.1.3.2 PCR-Methoden

Es lagen jeweils nur vier quantitative Ergebnisse von PCR-Methoden vor, sodass keine statistische Auswertung vorgenommen wurde.

4.2 z-Scores der Teilnehmer: Übersichtstabelle

Z-Scores für die zugewiesenen Werte der Zusatzniveaus (Wiederfindungsraten)

Auswertenummer	ELISA Senf					PCR Senf				
	Level 1	Level 2	Level 3	Level 4	Level 5	Level 1	Level 2	Level 3	Level 4	Level 5
1a		-1,5	-2,6	-3,1	-3,4					
1b		-1,5	-3,0	-3,1	-3,1					
2				-1,8	-2,2	-2,4	-2,4	-1,6	0,32	-2,8
3a						83	22	26	20	17
3b						51	12	9,9	5,9	8,1
4	-0,67	-2,0	-1,4	-1,7	-0,51					
5				-2,9	-3,1					
6a										
6b		2,5	3,1		-3,0					
7	-1,4	-2,8	-2,5	-2,8	-2,8	0,44	-0,10	0,0	-0,15	-0,32

Bewertung des z-Scores / valuation of z-score (DIN ISO 13528:2009-01):

- 2 ≤ z-score ≤ 2 erfolgreich / successful (in green)
- 2 > z-score > 2 „Warnsignal“ / warning signal (in yellow)
- 3 > z-score > 3 „Eingriffssignal“ / action signal (in red)

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- und Lateral Flow-Methoden

Meth. Abk.	Auswertenummer	Datum der Analyse	Ergebnis Probe 1 Level 5,0 mg/kg		Ergebnis Probe 2 Level 0,5 mg/kg		Ergebnis Probe 3 Level 25 mg/kg		Ergebnis Probe 4 Nullprobe		Ergebnis Probe 5 Level 2,5 mg/kg		Ergebnis Probe 6 Level 12,5 mg/kg		NWG / LOD *	BG / LOQ *	MU*	Angabe quantitatives Ergebnis als z.B. Lebensmittel / Protein	Methode
			qualitativ	mg/kg	qualitativ	mg/kg	qualitativ	mg/kg	qualitativ	mg/kg	qualitativ	mg/kg	qualitativ	mg/kg					
AQ	2	03.12.20	negativ	< 2	negativ	< 2	positiv	11,6	negativ	< 2	negativ	< 2	positiv	6,8	2	2		Senf	AgraQuant ELISA Mustard COKAL2148, RomerLabs
NL	1a	09.12.20	positiv	1,75	negativ	0	positiv	3,64	negativ	0	positiv	1,6	positiv	2,9	1	2		Senf	NutriLinia
RS-F	7	18.01.	positiv	1,85	positiv	0,327	positiv	7,31	negativ	< 0,5	positiv	0,759	positiv	3,93	0,1	0,5		Senf	Ridascreen® FAST Mustard R6152, R-Biopharm
RS-F	1b	09.12.	positiv	1,3	negativ	0	positiv	5,4	negativ	0	positiv	1,6	positiv	2,9	0,1	0,5		Senf	Ridascreen® FAST Mustard R6152, R-Biopharm
RS-F	6a	07.12.20	positiv		negativ	<0,50	positiv		negativ	<0,5	positiv		positiv		0,1	0,5		Senf	Ridascreen® FAST Mustard R6152, R-Biopharm
RS-F	6b	07.01.21	positiv	8,99	-		positiv	6,5	-		positiv	4,08	positiv	>13,5	0,1	0,5		Senf	Ridascreen® FAST Mustard R6152, R-Biopharm
SP	4	15.12.20	positiv	3,27	positiv	0,42	positiv	21,98	negativ	0,12	positiv	1,26	positiv	7,21	1	2		Senf	SensiSpec ELISA Mustard, Eurofins
SP	5	01.12.20	positiv	<2	negativ	<2	positiv	5,6	negativ	<2	negativ	<2	positiv	3,5	1	2		Senf	SensiSpec ELISA Mustard, Eurofins

* NWG Nachweisgrenze / BG Bestimmungsgrenze

* LOD limit of detection / LOQ limit of quantitation

* MU Messunsicherheit / MU measurement uncertainty

Fortsetzung Angaben der Teilnehmer zu ELISA Methoden:

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	2		gemäß Kit-Manual	nein	
NL	1a	Senfproteine	Allergenextraktionspuffer / 15 min/ 60°C	ja	Zugabe von Magermilch; Probe 1 und Probe 5: schwach positiv
RS-F	7		nach Herstelleranleitung	ja	Standardreihe durch Verdünnung des Std. 2 (0,5mg/kg) erweitert.
RS-F	1b	Senfproteine	Allergenextraktionspuffer / 10 min/ 60°C	ja	Zugabe von Magermilch
RS-F	6a		nach Testanweisung	ja	
RS-F	6b		nach Testanweisung mit Magermilchpulver	ja	deutlich höhere Ergebnisse bei Zusatz von 1g Magermilchpulver pro Probe
SP	4				Zugabe von vertraulichem Extraktionsadditiv
SP	5	Senfprotein	laut Herstellerangaben	ja	

5.1.2 PCR-Methoden

Meth. Abk.	Auswertenummer	Datum der Analyse	Ergebnis Probe 1 Level 5,0 mg/kg		Ergebnis Probe 2 Level 0,5 mg/kg		Ergebnis Probe 3 Level 25 mg/kg		Ergebnis Probe 4 Nullprobe		Ergebnis Probe 5 Level 2,5 mg/kg		Ergebnis Probe 6 Level 12,5 mg/kg		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					
			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
ASU	5	02.12.20	positiv		negativ		positiv		negativ		positiv		positiv		2			Senf-DNA	ASU §64 Methode/method
SFA	7	25.01.	positiv	5,04	positiv	0,56	positiv	23,2	negativ	< 1,0	positiv	2,46	positiv	12,1	0,4	1		Senf	Sure Food ALLERGEN, R-Biopharm / Congen
SFA	3a		positiv	37,5	positiv	11	positiv	133	negativ	1	positiv	16,5	positiv	76	0,1	1		Senf	Sure Food ALLERGEN, R-Biopharm / Congen
SFA-4p	3b		positiv	17,5	positiv	7	positiv	76	negativ	1	positiv	10	positiv	31				Senf	Sure Food Allergen 4plex, R-Biopharm / Congen
SFA-Q	2	30.11.20	positiv	3	positiv	0,2	positiv	7,3	positiv	0,1	positiv	1	positiv	13,6	0,1	4		Senf	Sure Food Allergen Quant, R-Biopharm / Congen

* NWG Nachweisgrenze / BG Bestimmungsgrenze

* LOD limit of detection / LOQ limit of quantitation

* MU Messunsicherheit / MU measurement uncertainty

Fortsetzung Angaben der Teilnehmer zu PCR-Methoden:

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	
ASU	5		CTAB / Proteinase K / RNase A / Promega Maxwell / Real-Time PCR / 45 Zyklen	ja	§ 64 LFGB L 08.00-65:2017-10; Probe 6: Spuren an der Nachweisgrenze
SFA	7		DNA-Isolierung über SureFood PREP Advanced, RealTime PCR nach Herstelleranleitung	ja	Bei mehrfacher DNA-Isolierung und Messung = stark schwankende Ergebnisse! Probe 2 und 4 zeigten eindeutige Kurvenverläufe. Bei Probe 4 lagen die CT-Werte bei über 30.
SFA	3a				
SFA-4p	3b				
SFA-Q	2		SureFood Prep Basic	nein	

5.2 Homogenität

5.2.1 Mischungshomogenität vor der Abfüllung

Microtracer Homogenitätstest

DLA ptALM1 Sample 1

Gewicht Gesamtprobe	1,10	kg
Microtracer	FSS-rot lake	
Teilchengröße	75 – 300	µm
Gewicht pro Partikel	2,0	µg
Tracerzugabe	28,0	mg/kg

Analysenergebnisse:

Probe	Einwaage [g]	Partikel Anzahl	Partikel [mg/kg]
1	5,01	100	39,9
2	4,97	80	32,2
3	5,03	80	31,8
4	4,98	90	36,1
5	5,03	101	40,2
6	4,96	96	38,7
7	5,02	96	38,2
8	5,03	96	38,2

Poisson-Verteilung

Probenanzahl	8
Freiheitsgrad	7
Mittelwert	92,4 Partikel
Standardabweichung	8,19 Partikel
χ^2 (CHI-Quadrat)	5,09
Wahrscheinlichkeit	65 %
Wiederfindungsrate	132 %

Normalverteilung

Probenanzahl	8
Mittelwert	36,9 mg/kg
Standardabweichung	3,28 mg/kg
rel. Standardabweichung	8,87 %
Horwitz Standardabweichung	9,29 %
HorRat-Wert	0,95
Wiederfindungsrate	132 %

Microtracer Homogenitätstest

DLA ptALM1 Sample 2

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

Analysenergebnisse:

Probe	Einwaage [g]	Partikel Anzahl	Partikel [mg/kg]
1	4,99	77	30,9
2	4,98	65	26,1
3	5,01	89	35,5
4	4,98	94	37,8
5	4,98	85	34,1
6	5,01	99	39,5
7	5,00	85	34,0
8	5,00	100	40,0

Poisson-Verteilung

Probenanzahl	8
Freiheitsgrad	7
Mittelwert	86,7 Partikel
Standardabweichung	11,59 Partikel
χ^2 (CHI-Quadrat)	10,83
Wahrscheinlichkeit	15 %
Wiederfindungsrate	157 %

Normalverteilung

Probenanzahl	8
Mittelwert	34,7 mg/kg
Standardabweichung	4,64 mg/kg
rel. Standardabweichung	13,4 %
Horwitz Standardabweichung	9,38 %
HorRat-Wert	1,4
Wiederfindungsrate	157 %

Microtracer Homogenitätstest

DLA ptALM1 Sample 3

Gewicht Gesamtprobe	1,40	kg
Microtracer	FSS-rot lake	
Teilchengröße	75 – 300	µm
Gewicht pro Partikel	2,0	µg
Tracerzugabe	21,3	mg/kg

Analysenergebnisse:

Probe	Einwaage [g]	Partikel Anzahl	Partikel [mg/kg]
1	4,97	60	24,1
2	4,98	53	21,3
3	4,98	51	20,5
4	5,03	56	22,3
5	5,02	52	20,7
6	5,03	50	19,9
7	5,05	49	19,4
8	4,96	54	21,8

Poisson-Verteilung		
Probenanzahl	8	
Freiheitsgrad	7	
Mittelwert	53,1	Partikel
Standardabweichung	3,76	Partikel
χ^2 (CHI-Quadrat)	1,86	
Wahrscheinlichkeit	97	%
Wiederfindungsrate	100	%

Normalverteilung		
Probenanzahl	8	
Mittelwert	21,2	mg/kg
Standardabweichung	1,50	mg/kg
rel. Standardabweichung	7,08	%
Horwitz Standardabweichung	10,1	%
HorRat-Wert	0,70	
Wiederfindungsrate	100	%

Microtracer Homogenitätstest

DLA ptALM1 Sample 5

Gewicht Gesamtprobe	1,00	kg
Microtracer	FSS-rot lake	
Teilchengröße	75 – 300	µm
Gewicht pro Partikel	2,0	µg
Tracerzugabe	21,7	mg/kg

Analysenergebnisse:

Probe	Einwaage [g]	Partikel Anzahl	Partikel [mg/kg]
1	5,05	70	27,7
2	4,99	74	29,7
3	4,98	78	31,3
4	5,01	68	27,1
5	5,01	70	27,9
6	4,95	72	29,1
7	4,99	72	28,9
8	5,03	68	27,0

Poisson-Verteilung		
Probenanzahl	8	
Freiheitsgrad	7	
Mittelwert	71,5	Partikel
Standardabweichung	3,61	Partikel
χ^2 (CHI-Quadrat)	1,28	
Wahrscheinlichkeit	99	%
Wiederfindungsrate	132	%

Normalverteilung		
Probenanzahl	8	
Mittelwert	28,6	mg/kg
Standardabweichung	1,44	mg/kg
rel. Standardabweichung	5,05	%
Horwitz Standardabweichung	9,66	%
HorRat-Wert	0,52	
Wiederfindungsrate	132	%

Microtracer Homogenitätstest

DLA ptALM1 Sample 6

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

Analysenergebnisse:

Probe	Einwaage [g]	Partikel Anzahl	Partikel [mg/kg]
1	4,97	74	29,8
2	4,98	72	28,9
3	4,97	79	31,8
4	5,03	81	32,2
5	4,98	70	28,1
6	5,03	72	28,6
7	5,04	80	31,7
8	4,97	73	29,4

Poisson-Verteilung		
Probenanzahl	8	
Freiheitsgrad	7	
Mittelwert	75,1	Partikel
Standardabweichung	4,02	Partikel
χ^2 (CHI-Quadrat)	1,51	
Wahrscheinlichkeit	98	%
Wiederfindungsrate	142	%

Normalverteilung		
Probenanzahl	8	
Mittelwert	30,1	mg/kg
Standardabweichung	1,61	mg/kg
rel. Standardabweichung	5,35	%
Horwitz Standardabweichung	9,59	%
HorRat-Wert	0,56	
Wiederfindungsrate	142	%

5.3 Informationen zur Eignungsprüfung (EP)

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

<i>EP-Nummer</i>	DLA ptALM1 (2020)
<i>EP-Name</i>	ALM-Verification Senf: 5 Proben mit Senf (<i>Sinapis alba</i>) in Gewürzmischung-Matrix (sowie eine „Nullprobe“)
<i>Probenmatrix (Prozessierung)</i>	Proben 1-6: Gewürzmischung/ Zutaten: Paprika, Kurkuma, Pfeffer, Zwiebeln, Majoran, Kümmel, Chillies, Knoblauch weitere Zusatzstoffe und Senf (außer "Null-Probe")
<i>Probenzahl und Probenmenge</i>	5 unterschiedliche Proben je 20 g + 1 „ Null-Probe“ 20 g
<i>Lagerungsinformation</i>	Proben : Raumtemperatur (Langzeit 2 - 10°C)
<i>Verwendungszweck</i>	Ausschließlich für Laboruntersuchungen (Qualitätskontrollproben)
<i>Parameter</i>	qualitativ (optional: quantitativ): Senf/Senfprotein / DNA Gehalte (als Senf) 0,50 / 2,5 / 5,0 / 12,5 / 25 mg/kg
<i>Untersuchungsmethoden</i>	Methode ist freigestellt
<i>Hinweis zur Analyse</i>	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.
<i>Ergebnisangabe</i>	Je ein qualitatives Ergebnis (und optional quantitativ) wird für die Proben 1-6 ermittelt. Die Einzelergebnisse sind in die Ergebnisabgabe-Datei einzutragen.
<i>Einheiten</i>	positiv / negativ (optional: mg/kg)
<i>Anzahl von Stellen</i>	mindestens 2 signifikante Stellen
<i>Ergebnisabgabe</i>	Die Ergebnisabgabe-Datei wird per eMail übermittelt an: pt@dla-lvu.de
<i>Abgabetermin</i>	spätestens 29. Januar 2021
<i>Auswertebericht</i>	Der Auswertebericht wird voraussichtlich 6 Wochen nach Abgabetermin der Ergebnisse fertiggestellt und per eMail als PDF-Datei zugesandt.
<i>Koordinator und Ansprechpartner der EP</i>	Dr. Matthias Besler-Scharf

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

6. Verzeichnis der Teilnehmer in alphabetischer Reihenfolge

Teilnehmer / Participant	Ort / Town	Land / Country
		Deutschland
		USA
		Deutschland
		Deutschland
		Deutschland
		Deutschland
		Deutschland
		Deutschland

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

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

7. Verzeichnis relevanter Literatur

1. DIN EN ISO/IEC 17025:2005; Allgemeine Anforderungen an die Kompetenz von Prüf- und Kalibrierlaboratorien / General requirements for the competence of testing and calibration laboratories
2. DIN EN ISO/IEC 17043:2010; Konformitätsbewertung – Allgemeine Anforderungen an Eignungsprüfungen / Conformity assessment – General requirements for proficiency testing
3. ISO 13528:2015 & DIN ISO 13528:2009; Statistische Verfahren für Eignungsprüfungen durch Ringversuche / Statistical methods for use in proficiency testing by interlaboratory comparisons
4. ASU §64 LFGB: Planung und statistische Auswertung von Ringversuchen zur 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. DAkkS 71 SD 1/4 016; Ermittlung und Angabe der Messunsicherheit nach Forderungen der DIN EN ISO/IEC 17025 (2011) [Estimation and indication of the measurement uncertainty]
21. 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. VSEP (2019) Summary of the 2019 VITAL Scientific Expert Panel Recommendations, The Allergen Bureau Limited 2019, www.allergenbureau.net
 25. 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
 26. 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
 27. 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
 28. 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
 29. Ministry of Health and Welfare, JSM, Japan 2006
 30. 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)
 31. 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)
 32. 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)
 33. 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
 34. 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
 35. 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
 36. 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]
 37. 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]
 38. 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]
 39. ASU §64 LFGB L 16.01-9 Untersuchung von Lebensmitteln – Bestimmung von Soja (Glycine max) in Getreidemehl mittels real-time PCR (2016) [Foodstuffs, determination of soya (Glycine max) in cereal flour by real-time PCR]
 40. ASU §64 LFGB L 18.00-19 Untersuchung von Lebensmitteln – Nachweis und Bestimmung von Sesam (Sesamum indicum) in Reis- und Weizenkeksen sowie in Soßenpulver mittels real-time PCR (2014) [Foodstuffs, detection and determination of sesame (Sesamum

- indicum) in rice and wheat cookies and sauce powders by PCR]
41. 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]
 42. 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]
 43. 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]
 44. ASU §64 LFGB L 08.00-59 Untersuchung von Lebensmitteln - Nachweis und Bestimmung von Senf (*Sinapis alba*) sowie Soja (*Glycine max*) in Brühwürsten mittels real-time PCR (2013) [Foodstuffs, detection and determination of mustard (*Sinapis alba*) and soya (*Glycine max*) in boiled sausages by real-time PCR]
 45. ASU §64 LFGB L 08.00-64 Untersuchung von Lebensmitteln - Nachweis und Bestimmung von schwarzem Senf (*Brassica nigra* L.) und braunem Senf (*Brassica juncea* L.) in Brühwurst mittels real-time PCR (2016) [Foodstuffs, detection and determination of black mustard (*Brassica nigra* L.) and brown mustard (*Brassica juncea* L.) in boiled sausages by real-time PCR]
 46. ASU §64 LFGB L 08.00-65 Untersuchung von Lebensmitteln - Simultaner Nachweis und Bestimmung von schwarzem Senf (*Brassica nigra* L.), braunem Senf (*Brassica juncea* L.), weißem Senf (*Sinapis alba*), Sellerie (*Apium graveolens*) und Soja (*Glycine max*) in Brühwurst mittels real-time PCR (2017) [Foodstuffs, simultaneous detection and determination of black mustard (*Brassica nigra* L.), brown mustard (*Brassica juncea* L.), white mustard (*Sinapis alba*), celery (*Apium graveolens*) and soya (*Glycine max*) in boiled sausages by real-time PCR]
 47. 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]

DLA ptALM1 (2020) - ALM Verification: Senf

7 Teilnehmer haben mindestens ein Ergebnis eingereicht. Es wurden 5 Proben mit unterschiedlichen Senfgehalten von 0,5 bis 25 mg/kg in der Matrix Gewürzmischung sowie eine Matrix-„Nullprobe“ mit ELISA- und PCR-Methoden untersucht. Als „Action Level“ wurde ein Gehalt von 5,0 mg/kg gewählt. Das Dotierungsmaterial bestand aus einer Mischung von gelbem Senf (9 Produkte, Europa, Asien).

Mit einer Ausnahme haben die Teilnehmerergebnisse 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) und die zugehörigen z-Scores angegeben. Statistische Kenndaten wurden für Level 4 rein informativ für die ELISA-Methoden angegeben. Weitere Details sind dem Auswertbericht zu entnehmen.

1 Teilnehmer hatte seinen in den USA.