



Auswertungs-Bericht

Laborvergleichsuntersuchung

DLA ptAL02 (2021)

Allergene II:

Lupine und Weizen (Gluten)

in „glutenfreiem“ Knäckebrot

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)**

<p><i>EP-Anbieter PT-Provider</i></p>	<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>
<p><i>EP-Nummer PT-Number</i></p>	<p>DLA ptAL02 (2021)</p>
<p><i>EP-Koordinator PT-Coordinator</i></p>	<p>Dr. Matthias Besler-Scharf</p>
<p><i>Status des EP-Bericht Status of PT-Report</i></p>	<p>Abschlussbericht / Final report (30. Juli 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>
<p><i>EP-Bericht Freigabe PT-Report Authorization</i></p>	<p>Dr. Matthias Besler-Scharf (Technischer Leiter / Technical Manager) - <i>gezeichnet / signed M. Besler-Scharf</i> Alexandra Scharf MSc. (QM-Beauftragte / Quality Manager) - <i>gezeichnet / signed A. Scharf</i> Datum / Date: 30. Juli 2021</p>
<p><i>Unteraufträge Subcontractors</i></p>	<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>
<p><i>Vertraulichkeit Confidentiality</i></p>	<p>Die Teilnehmerergebnisse sind im EP-Bericht in anonymisierter Form mit Auswertenummern benannt. Daten einzelner Teilnehmer werden ausschließlich nach vorheriger Zustimmung des Teilnehmers an Dritte weitergegeben. Participant result are named anonymously with evaluation numbers in the PT report. Data of individual participants will be passed on to third parties only with prior consent of the participant.</p>
<p><i>Akkreditierung Accreditation</i></p>	<p>nach / according to: ISO/IEC 17.043-2010</p> <p>Konformitätsbewertung - Allgemeine Anforderungen an Eignungsprüfungen Conformity Assessment - General Requirements for Proficiency Testing</p> <p>Die Akkreditierung gilt für den in der Urkundenanlage genannten Umfang. The accreditation is valid for the scope of the annex to the certificate of accreditation</p>



Inhalt

1. Einleitung.....	4
2. Durchführung.....	4
2.1 Untersuchungsmaterial.....	4
2.1.1 Homogenität.....	6
2.1.2 Stabilität.....	9
2.2 Probenversand und Informationen zur Untersuchung.....	9
2.3 Ergebnisübermittlung.....	9
3. Auswertung.....	10
3.1 Konsenswert der Teilnehmer (zugewiesener Wert).....	10
3.2 Robuste Standardabweichung.....	11
3.3 Ausschluss von Ergebnissen und Ausreißer.....	11
3.4 Zielstandardabweichung (für die Eignungsbeurteilung).....	12
3.4.1 Allgemeines Modell nach Horwitz.....	12
3.4.2 Auswertung eines Versuchs zur Präzision.....	12
3.4.3 Werte aus Erkenntnissen.....	15
3.5 z-Score.....	16
3.5.1 Warn- und Eingriffssignale.....	16
3.6 z'-Score.....	17
3.7 Quotient S*/opt.....	17
3.8 Standardunsicherheit und Rückführbarkeit.....	17
3.9 Graphische Darstellung der Bezugswerte.....	18
3.10 Wiederfindungsraten: Dotierung.....	18
4. Ergebnisse.....	19
4.1 Vergleichsuntersuchung Lupine.....	21
4.1.1 ELISA-Ergebnisse: Lupine (als Lupinenprotein).....	21
4.1.2 PCR-Ergebnisse: Lupine	29
4.2 Vergleichsuntersuchung Weizen (Gluten).....	32
4.2.1 ELISA-Ergebnisse: Gluten.....	32
4.2.2 PCR-Ergebnisse: Gluten-haltige Getreide (Weizen).....	42
4.3 z-Scores der Teilnehmer: Übersichtstabelle.....	45
5. Dokumentation.....	47
5.1 Angaben der Teilnehmer.....	47
5.1.1 ELISA: Lupine.....	47
5.1.2 ELISA: Gluten.....	48
5.1.3 PCR: Lupine.....	50
5.1.4 PCR: Gluten-haltige Getreide (Weizen).....	51
5.2 Homogenität.....	52
5.2.1 Mischungshomogenität vor der Abfüllung.....	52
5.3 Informationen zur Eignungsprüfung (EP).....	53
6. Verzeichnis der Teilnehmer in alphabetischer Reihenfolge.....	54
7. Verzeichnis relevanter Literatur.....	55

1. Einleitung

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

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

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

2. Durchführung

2.1 Untersuchungsmaterial

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

Bei dem Untersuchungsmaterial handelt es sich um ein handelsübliches "gluten-freies" Knäckebrot. Die Grundzusammensetzung war für beide Proben A und B gleich (s. Tabelle 1).

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

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

Als weitere Zutat wurde ein mit dem Dotierungsmaterial gebackenes Knäckebrot (195°C, 30 min), das die allergenen Zutaten Lupine und Weizen enthält (mesh <500 µm), hergestellt. Nach Trocknung (40°C, 10 h), Zerkleinerung, Sieben (mesh <500 µm) und Homogenisierung wurde diese Zutat zu einem Aliquot der Grundmatrix gegeben und die Mischung homogenisiert. Anschließend wurde erneut Grundmatrix in mehreren Schritten zugegeben und jeweils homogenisiert.

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

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

Tabelle 1: Zusammensetzung der DLA-Proben

Zutaten	Probe A	Probe B	Dotierungs- niveauprobe
Knäckebrötchen, glutenfrei Zutaten: Kartoffelstärke, Amaranthmehl, Sonnenblumenöl, Reismehl, Ballaststoffe aus Rohrzucker, Maismehl, Hirse, Zucker, Reissauerteigpulver (Reismehl, Wasser), Emulgator: Mono- und Diglyceride von Speisefettsäuren, Hefe, Verdickungsmittel: Hydroxypropylmethylcellulose, Reisprotein, Salz, Gewürze Nährwertangaben pro 100 g: Fett 8,0 g, Kohlenhydrate 73 g, Ballaststoffe 7,7 g, Eiweiß 4,0 g, Salz 1,1 g	100 g/100 g	94,1 g/100g	-
Knäckebrötchen (gebacken 195°C, 30 min) Zutaten: Reismehl, Maismehl, Hirsemehl, Buchweizenmehl, Sonnenblumenöl, Salz sowie Lupine, Weizenmehl und weitere Zutaten (siehe unten)	-	5,87 g/100 g	-
Kartoffelpulver Zutaten: Kartoffeln, E471, E304, E223, E100	-	-	99,9 g/100 g
Lupine: - als Süßlupinenmehl* - davon 36,6% Gesamtprotein**	-	46,7 mg/kg 17,1 mg/kg	37,3 mg/kg 13,7 mg/kg
Weizen: Weizenmehl-Mischung (21 Produkte aus Europa, Asien, USA) - als Weizenmehl* - davon 10,1% Gesamtprotein** - davon Gluten***	-	476 mg/kg 48,1 mg/kg 41,4 mg/kg	238 mg/kg 24,0 mg/kg 20,7 mg/kg
weitere Zutaten: Maltodextrin, Natriumsulfat und Siliciumdioxid	-	<0,2 g/100 g	<0,2 g/100 g

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

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

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

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

2.1.1 Homogenität

Die **Mischungshomogenität vor der Abfüllung** wurde in 8-fach Bestimmung mittels **Microtracer-Analyse** untersucht. Es handelt sich um eine normierte Methode, die Bestandteil des internationalen GMP-Zertifizierungssystems für Futtermittel ist [14]. Vor der Mischung werden mit Farbstoff beschichtete Eisenpartikel in 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 B und Dotierungsmaterialprobe hat eine Wahrscheinlichkeit von 33% bzw. 93% ergeben. Die Partikel-Ergebnisse wurden zusätzlich in Konzentrationen umgerechnet, statistisch als Normalverteilung ausgewertet und mit der Standardabweichung nach Horwitz verglichen. Für die Beurteilung sind HorRat-Werte zwischen 0,3 und 1,3 unter Wiederholbedingungen (Messungen innerhalb des Labors) zu akzeptieren [17]. Es wurden HorRat-Werte von 1,4 bzw. 0,88 erhalten. Der HorRat-Wert von $>1,3$ wurde akzeptiert, da die Wahrscheinlichkeit eine ausreichende Homogenität belegt. Die Ergebnisse der Microtracer-Analyse sind in der Dokumentation angegeben.

Homogenität der abgefüllten dotierten Probe B

Durchführung der Homogenitätstests

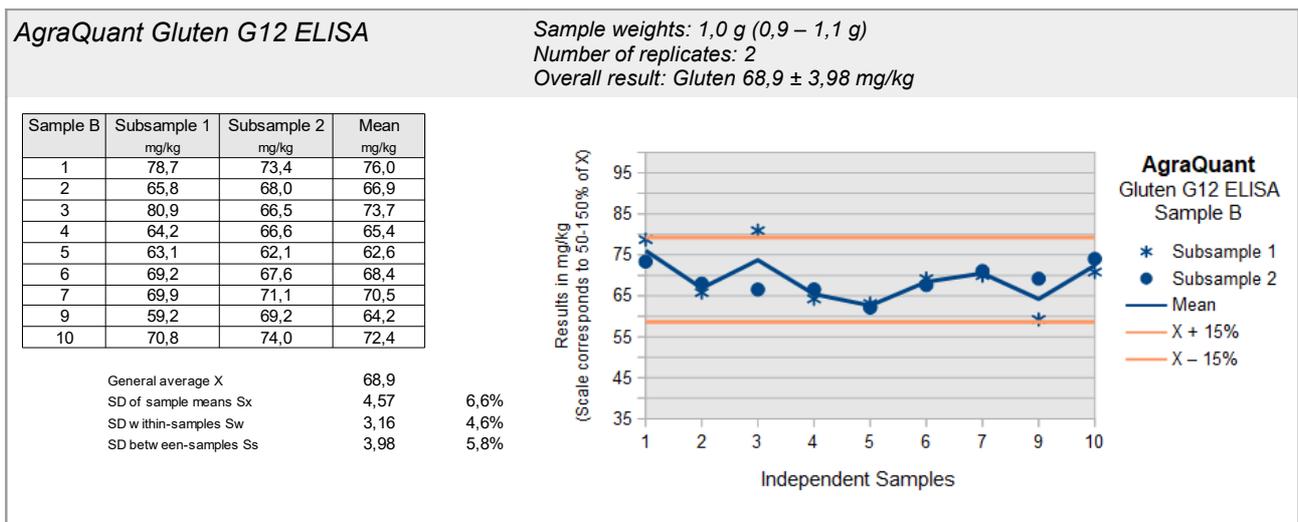
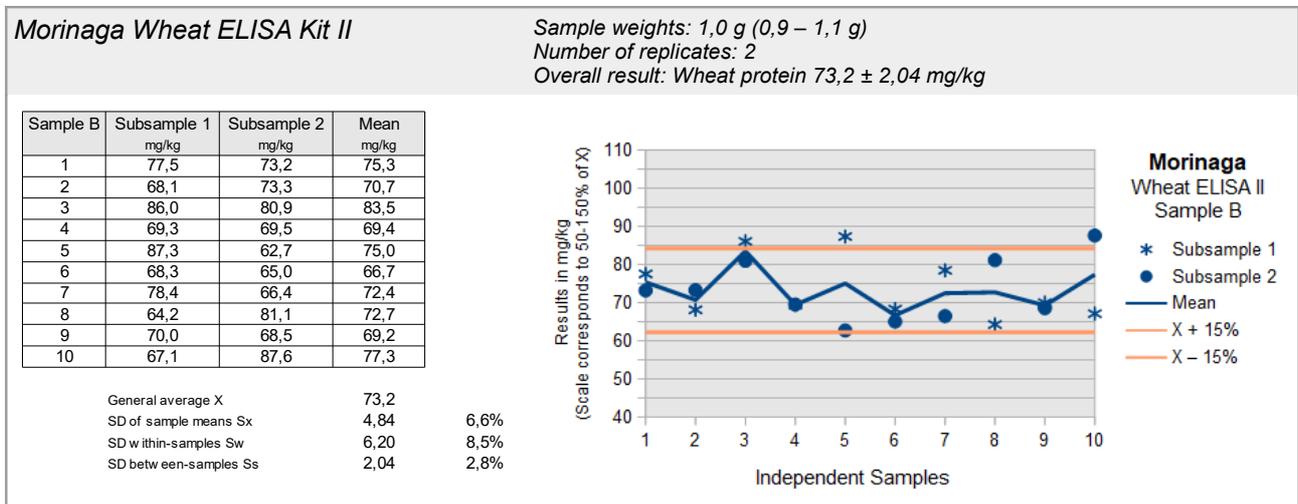
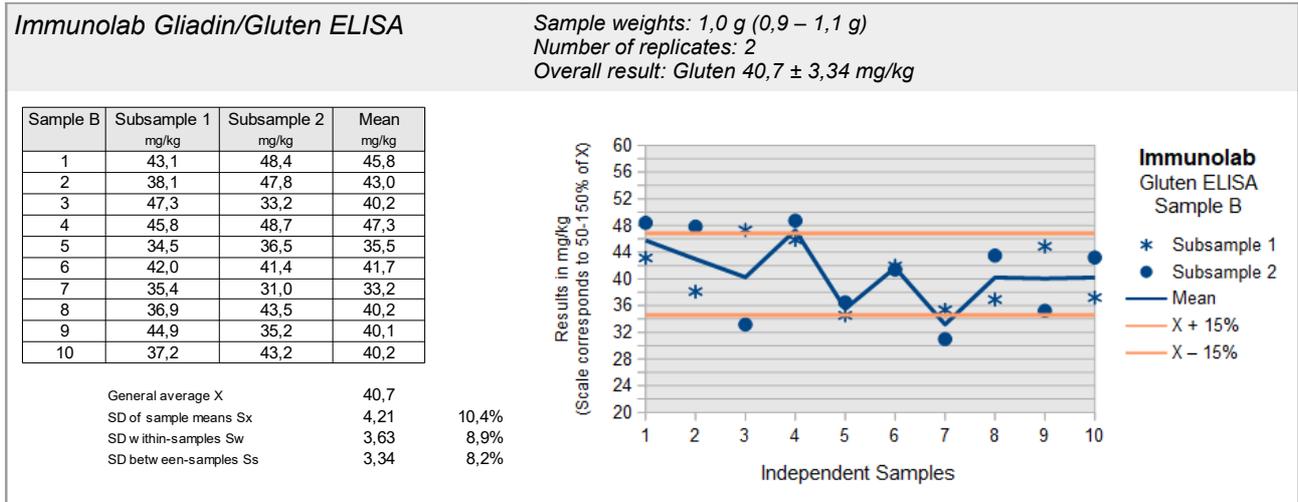
Die Homogenitätstests wurden in Kooperation mit den Labors der angegebenen Testkit-Anbieter durchgeführt. Von DLA wurden zufällig 10 Muster der abgefüllten dotierten Probe ausgewählt und davon jeweils 2 Teilproben in zuvor zufällig codierte Extraktionsbehälter eingewogen und anschließend den Labors zur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

Bewertung der Homogenität

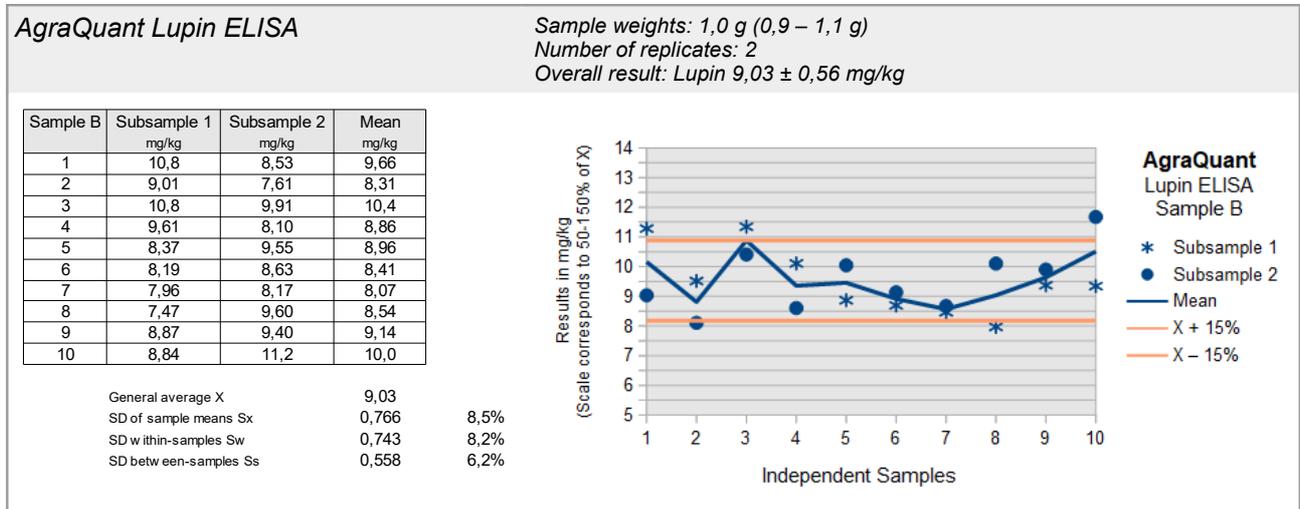
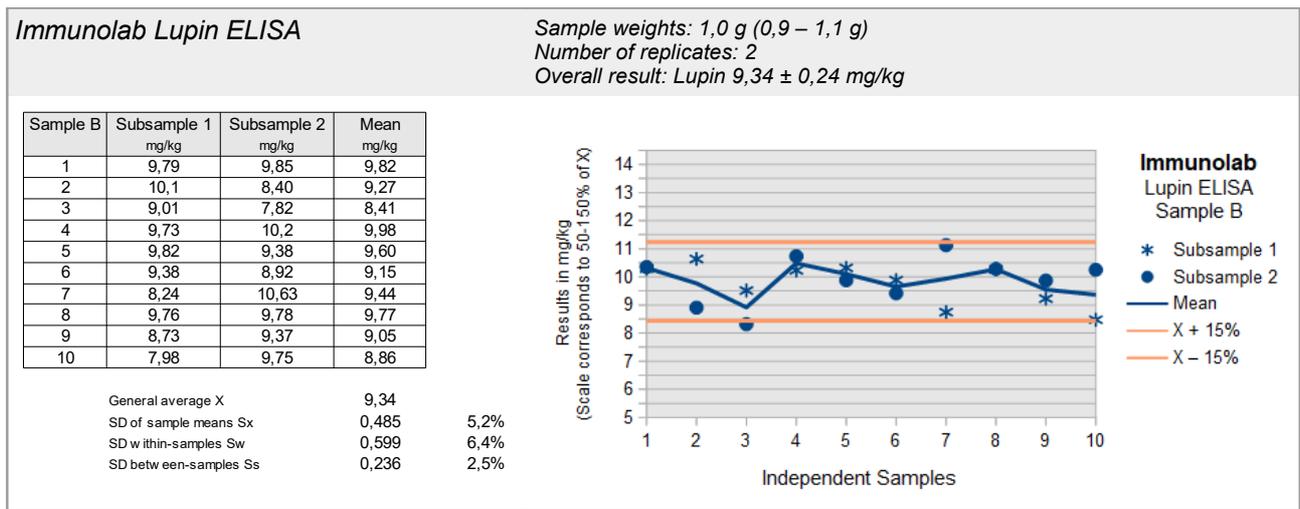
Die Homogenität wird mit einer Standardabweichung zwischen den Proben von $S_s \leq 15\%$ („Heterogenitätsstandardabweichung“) als hinreichend gesichert angesehen. Dieses Kriterium wird für die untersuchte Probe B in allen ELISA-Tests für Gluten (Immunolab und AgraQuant) und Lupine (Immunolab, Morinaga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

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

ELISA-Tests: Homogenität Gluten (Weizen) / Homogeneity Gluten (Wheat)



ELISA-Tests: Homogenität Lupine / Homogeneity Lupin



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. $0,36$ ($18,1^\circ\text{C}$). Die Stabilität des Probenmaterials war somit während des Untersuchungszeitraums unter den angegebenen Lagerbedingungen gewährleistet.

2.2 Probenversand und Informationen zur Untersuchung

An jeden Teilnehmer wurden in der 9. Kalenderwoche 2021 je eine Portion der Untersuchungsmaterialien A und B sowie eine Dotierungsmaterialprobe verschickt. Die Untersuchungsverfahren wurden freigestellt. Die Untersuchungen waren durchzuführen bis spätestens 30. April 2021.

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

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

Bitte beachten Sie die beiliegenden Informationen zur Eignungsprüfung. (siehe Dokumentation unter Punkt 5.4 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 14 Teilnehmer haben mindestens ein Ergebnis abgegeben.

3. Auswertung

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

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

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

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

3.1 Konsenswert der Teilnehmer (zugewiesener Wert)

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

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

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

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

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

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

3.2 Robuste Standardabweichung

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

Folgende robuste Standardabweichungen werden herangezogen:

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

3.3 Ausschluss von Ergebnissen und Ausreißer

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

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

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

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

3.4 Zielstandardabweichung (für die Eignungsbeurteilung)

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

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

3.4.1 Allgemeines Modell nach Horwitz

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

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

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

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

3.4.2 Auswertung eines Versuchs zur Präzision

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

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

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

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

Parameter	Matrix	Mittelwerte [mg/kg]	Wiederfindung	rob RSD_r	RSD_r	RSD_R	opt	Methode / Literatur
Erdnuss	Vollmilchschokolade	173,7	87 %	-	8,8%	31%	30,4%	ELISA Herst. A ASU 00.00-69
		33,8	85 %	-	5,2%	20%	19,7%	
		5,9	59 %	-	7,8%	31%	30,5%	
Erdnuss	Vollmilchschokolade	215,7	108 %	-	5,9%	32%	31,7%	ELISA Herst. B ASU 00.00-69
		40,1	100 %	-	7,2%	14%	13,0%	
		10,1	101 %	-	7,3%	16%	15,1%	
Erdnuss	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%	

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

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

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

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

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

3.4.3 Werte aus Erkenntnissen

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

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

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

Tabelle 3: ELISA-Validierungskriterien

Literatur [18-24]	Wiederfindungsrate	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 4: PCR-Validierungskriterien

Literatur [18]	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% fest.

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

3.5 z-Score

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

Die Berechnung erfolgt nach:

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

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

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

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

- i) **z-Score** - **z_{ALL}** (bezogen auf alle Ergebnisse)
- ii) **z-Score** - **z_{METHOD i}** (bezogen auf Einzelmethoden)

3.5.1 Warn- und Eingriffssignale

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

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

3.6 z'-Score

Der z'-Score kann u.a. zur Beurteilung der Ergebnisse der teilnehmenden Labore herangezogen werden, wenn die Standardunsicherheit des zugewiesenen Wertes berücksichtigt werden muss (s. 3.8). Der z'-Score drückt das Verhältnis der Abweichung des Ergebnisses (x_i) des betreffenden Teilnehmers vom zugewiesenen Wert zur Wurzel aus der Quadratsumme von Zielstandardabweichung (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

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

Zu Warn- und Eingriffssignalen siehe 3.5.1.

3.7 Quotient S*/ σ_{pt}

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

3.8 Standardunsicherheit und Rückführbarkeit

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

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

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

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

3.9 Graphische Darstellung der Bezugswerte

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

3.10 Wiederfindungsraten: Dotierung

Für die Ergebnisse von Dotierungsniveauprobe und dotierter Probe werden Wiederfindungsraten in Bezug auf die zugesetzten Allergene (Zusatzniveau) berechnet. Die Bezugswerte ergeben sich aus den unter 2.1 Untersuchungsmaterial in Tabelle 1 angegebenen Gehalten. Als Akzeptanzbereich AB für die Bewertung der Teilnehmerergebnisse wird der von der AOAC vorgeschlagene Bereich von 50 - 150% für die Wiederfindungsraten von Allergen-ELISAs herangezogen [23]. Für quantitative PCR- oder LC/MS-Bestimmungen wird ebenfalls dieser Akzeptanzbereich herangezogen. Die Berechnung der zugehörigen z-Scores erfolgte gemäß 3.5 mit der Zielstandardabweichung von 25% (s. 3.4.3).

4. Ergebnisse

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

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

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

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

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

Die ELISA-Ergebnisse, die als **Lupine** oder **Lupinenmehl** angegeben wurden, sind mit dem experimentell bestimmten Proteingehalt des Süßlupinenmehls in **Lupinenprotein** umgerechnet worden (siehe S. 5).

Quantitative PCR-Ergebnisse wurden als Lupine oder Lupinenmehl abgegeben und ausgewertet.

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

Quantitative PCR-Ergebnisse wurden als gluten-haltige Getreide oder Weizen abgegeben und ausgewertet.

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

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

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

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

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

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

^o Zielbereich berechnet mit z-Score oder z'-Score

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

4.1 Vergleichsuntersuchung Lupine

4.1.1 ELISA-Ergebnisse: Lupine (als Lupinenprotein)

Qualitative Auswertung der Ergebnisse: Proben A und B

Auswertenummer	Probe A	Probe A	Probe B	Probe B	Qualitative Bewertung	Methode	Hinweis
	pos/neg	[mg/kg]	pos/neg	[mg/kg]	Übereinstimmungen mit Konsenswerten		
6	negativ	<LOQ	positiv	2,56	2/2 (100%)	AQ	Ergebnis umgerechnet °
2	negativ	< 2	positiv	4,16	2/2 (100%)	EZ	Ergebnis umgerechnet °
3	negativ	<0,6	positiv	3,40	2/2 (100%)	RS-F	
9	negativ	< 1,0	positiv	4,80	2/2 (100%)	RS-F	
12	negativ	<1	positiv	3,81	2/2 (100%)	RS-F	
14	negativ	<1	positiv	7,00	2/2 (100%)	RS-F	
5	negativ	<2	positiv	2,75	2/2 (100%)	SP	Ergebnis umgerechnet °
13	negativ	<2	positiv	4,03	2/2 (100%)	SP	Ergebnis umgerechnet °

° Umrechnung S. 19

	Probe A	Probe B
Anzahl positiv	0	8
Anzahl negativ	8	0
Prozent positiv	0	100
Prozent negativ	100	0
Konsenswert	negativ	positiv

Methoden:

AQ = AgraQuant, RomerLabs
 EZ = EZ plate
 RS-F= Ridascree® Fast, R-Biopharm
 SP = SensiSpec ELISA Kit, Eurofins

Anmerkung:

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

Quantitative Auswertung ELISA: Probe B

Auswertenummer	Lupinenprotein [mg/kg]	z-Score $X_{pt_{ALL}}$	Methode	Hinweis
6	2,56	-1,4	AQ	Ergebnis umgerechnet °
2	4,16	0,28	EZ	Ergebnis umgerechnet °
3	3,40	-0,50	RS-F	
9	4,80	0,93	RS-F	
12	3,81	-0,08	RS-F	
14	7,00	3,2	RS-F	
5	2,75	-1,2	SP	Ergebnis umgerechnet °
13	4,03	0,14	SP	Ergebnis umgerechnet °

° Umrechnung S. 19

Methoden:

- AQ = AgraQuant, RomerLabs
- EZ = EZ plate
- RS-F= Ridascreen® Fast, R-Biopharm
- SP = SensiSpec ELISA Kit, Eurofins

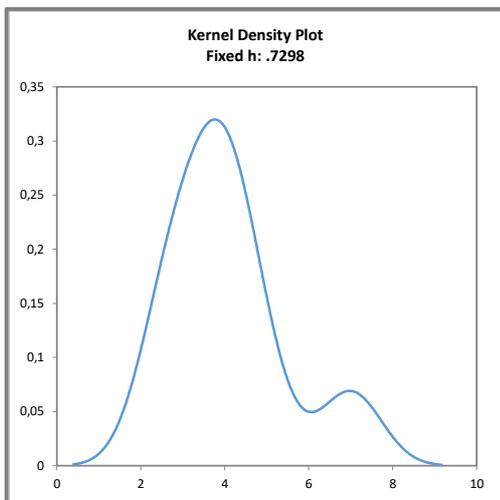


Abb. / Fig. 1:

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

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

Anmerkung:

Die Kerndichte-Schätzung zeigt annähernd eine symmetrische Verteilung der Ergebnisse mit einem kleinen Nebenpeak bei ca. 7 mg/kg, der auf einen Einzelwert außerhalb des Zielbereichs zurückgeht.

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

Kenndaten	Alle Ergebnisse [mg/kg]
Zugewiesener Wert (X_{pt})	X_{pt_ALL}
Anzahl der Messergebnisse	8
Anzahl der Ausreißer	0
Mittelwert	4,06
Median	3,92
Robuster Mittelwert (X_{pt})	3,89
Robuste Standardabweichung (S^*)	1,15
Zielkenndaten:	
Zielstandardabweichung σ_{pt}	0,97
Untere Grenze des Zielbereichs	1,95
Obere Grenze des Zielbereichs	5,84
Quotient S^*/σ_{pt}	1,2
Standardunsicherheit $U(X_{pt})$	0,509
Ergebnisse im Zielbereich	7
Prozent im Zielbereich	88

Anmerkungen zu den Kenndaten und Vergleich der Bezugswerte:

Die Kerndichte-Schätzung zeigte annähernd eine symmetrische Verteilung ohne eindeutige methodenabhängige Unterschiede.

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

Der robuste Mittelwert der Auswertung lag mit 23% (X_{ALL}) vom Zusatzniveau von Lupine zu Probe B unterhalb der relevanten Anforderungen für die eingesetzten Methoden (s. 3.4.3 und "Wiederfindungsraten für Lupinenprotein" S.28).

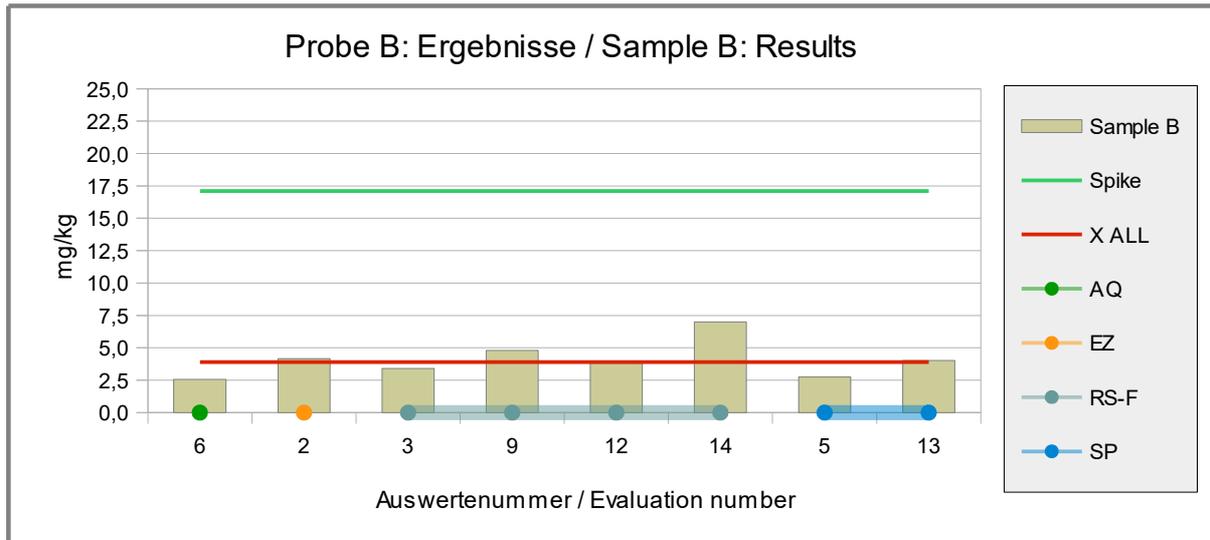


Abb./Fig. 2: ELISA-Ergebnisse Lupinenprotein
 grüne Linie = Zusatzniveau (Spike)
 rote Linie = robuster Mittelwert aller Ergebnisse
 runde Symbole = Zuordnung der Methoden (s. Legende)

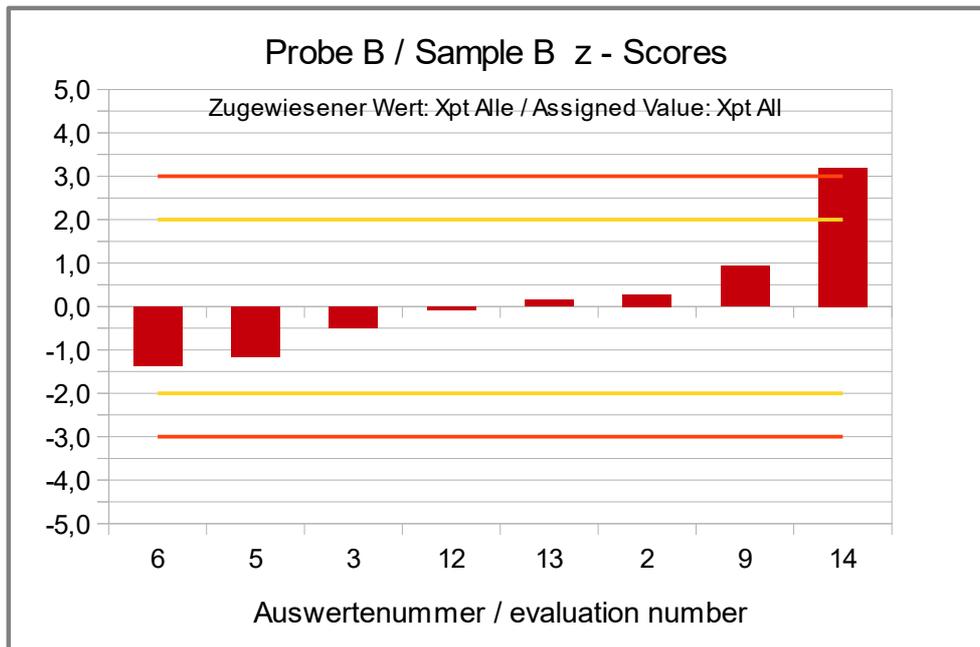


Abb./Fig. 3:
 z-Scores (ELISA-Ergebnisse als Lupinenprotein)
 Zugewiesener Wert: robuster Mittelwert aller Ergebnisse

Quantitative Auswertung ELISA: Dotierungsniveauprobe

Auswertenummer	Lupinenprotein [mg/kg]	z-Score X_{ptALL}	Methode	Hinweis
6	18,3	-0,29	AQ	Ergebnis umgerechnet °
2	22,7	0,60	EZ	Ergebnis umgerechnet °
3	10,1	-2,0	RS-F	
9	15,4	-0,88	RS-F	
12	19,5	-0,04	RS-F	
14	23,0	0,66	RS-F	
5	22,0	0,46	SP	Ergebnis umgerechnet °
13	23,8	0,83	SP	Ergebnis umgerechnet °

° Umrechnung S. 19

Methoden:

- AQ = AgraQuant, RomerLabs
- EZ = EZ plate
- RS-F= Ridascreen® Fast, R-Biopharm
- SP = SensiSpec ELISA Kit, Eurofins

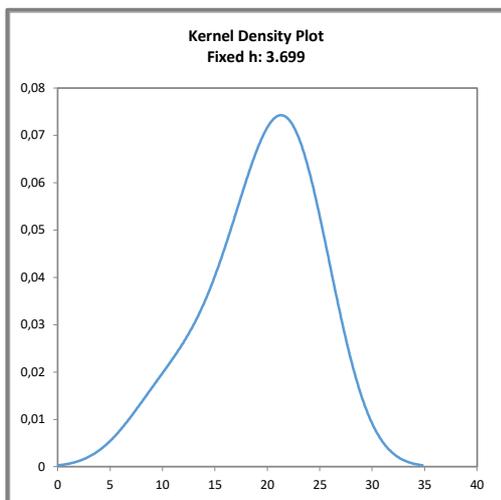


Abb. / Fig. 4:

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

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

Anmerkung:

Die Kerndichte-Schätzung zeigt annähernd eine symmetrische Verteilung mit einer leichten Schulter bei ca. 10 mg/kg.

Kenndaten: Quantitative Auswertung ELISA Lupinenprotein**Dotierungsniveauprobe**

Kenndaten	Alle Ergebnisse [mg/kg]
Zugewiesener Wert (X_{pt})	X_{pt_ALL}
Anzahl der Messergebnisse	8
Anzahl der Ausreißer	0
Mittelwert	19,4
Median	20,8
Robuster Mittelwert (X_{pt})	19,7
Robuste Standardabweichung (S^*)	4,41
<i>Zielkenndaten:</i>	
Zielstandardabweichung σ_{pt}	4,93
Untere Grenze des Zielbereichs	9,86
Obere Grenze des Zielbereichs	29,59
Quotient S^*/σ_{pt}	0,89
Standardunsicherheit $U(X_{pt})$	1,95
Ergebnisse im Zielbereich	8
Prozent im Zielbereich	100

Anmerkungen zu den Kenndaten und Vergleich der Bezugswerte:

Die Kerndichte-Schätzung zeigte annähernd eine symmetrische Verteilung ohne eindeutige methodenabhängige Unterschiede.

Die Verteilung der Ergebnisse aller Methoden zeigte eine geringe Variabilität. Der Quotient S^*/σ_{pt} lag unter 1,0. Die robuste Standardabweichung liegt im Bereich von etablierten Werten für die Wiederhol- und Vergleichsstandardabweichung der eingesetzten Bestimmungsmethoden (vgl. 3.4.2 Auswertung eines Versuchs zur Präzision und 3.4.3 Werte aus Erkenntnissen). Die Vergleichbarkeit der Ergebnisse ist gegeben. Diese Aussage ist für die methodenübergreifende Auswertung nur eingeschränkt gültig, da für einige Methoden nur wenige Ergebnisse vorlagen.

Der robuste Mittelwert der Auswertung lag mit 144 (X_{ALL}) vom Zusatzniveau von Lupine zur Dotierungsniveauprobe innerhalb der relevanten Anforderungen für die eingesetzten Methoden (s. 3.4.3 und "Wiederfindungsraten für Lupinenprotein" S.28).

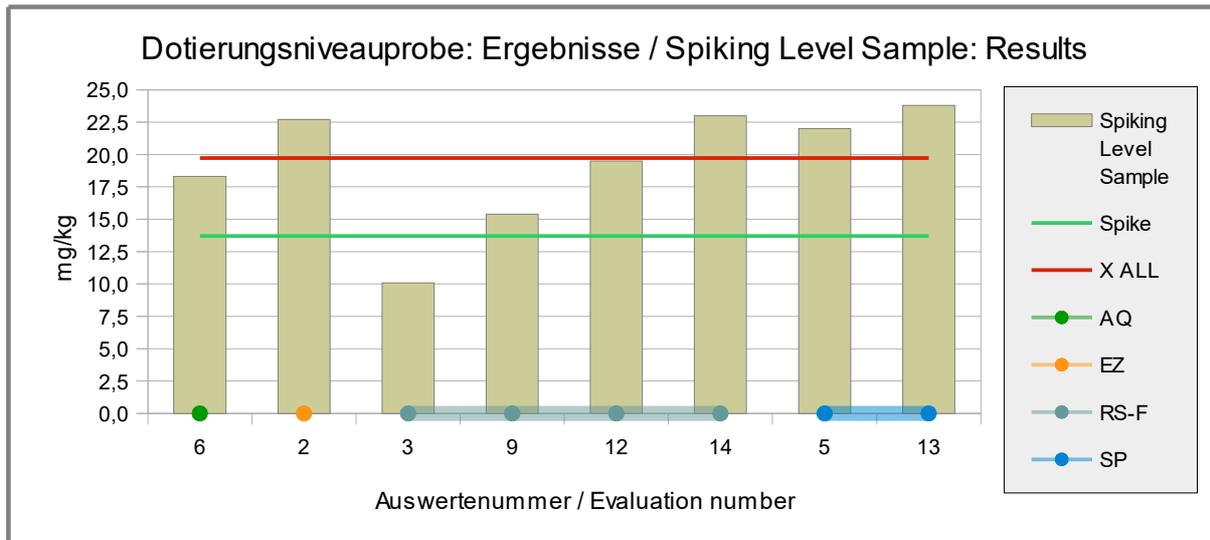


Abb./Fig. 5: ELISA-Ergebnisse Lupinenprotein
 grüne Linie = Zusatzniveau (Spike)
 rote Linie = robuster Mittelwert aller Ergebnisse
 runde Symbole = Zuordnung der Methoden (s. Legende)

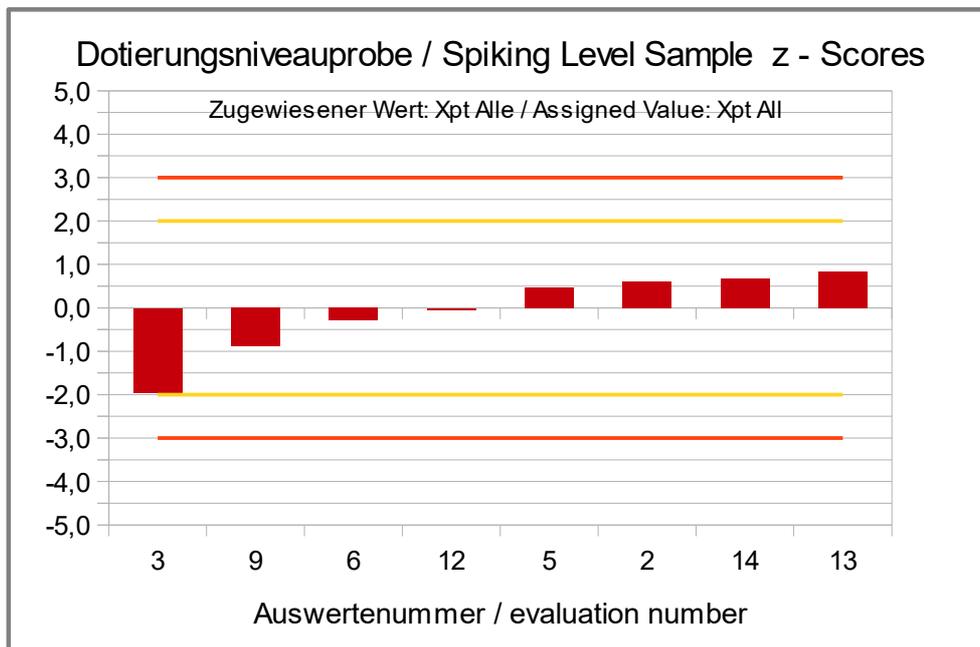


Abb./Fig. 6:
 z-Scores (ELISA-Ergebnisse als Lupinenprotein)
 Zugewiesener Wert: robuster Mittelwert aller Ergebnisse

**Wiederfindungsraten mit z-Scores ELISA für Lupinenprotein:
Dotierungsniveauprobe und Probe B**

Auswertenummer	Dotierungsniveauprobe	Wiederfindungsrate*		Probe B	Wiederfindungsrate*		Methode	Hinweis
	[mg/kg]	[%]	[Z _{RR}]	[mg/kg]	[%]	[Z _{RR}]		
6	18,3	134	1,3	2,56	15	-3,4	AQ	Ergebnis umgerechnet °
2	22,7	166	2,6	4,16	24	-3,0	EZ	Ergebnis umgerechnet °
3	10,1	74	-1,1	3,40	20	-3,2	RS-F	
9	15,4	112	0,50	4,80	28	-2,9	RS-F	
12	19,5	142	1,7	3,81	22	-3,1	RS-F	
14	23,0	168	2,7	7,00	41	-2,4	RS-F	
5	22,0	161	2,4	2,75	16	-3,4	SP	Ergebnis umgerechnet °
13	23,8	174	2,9	4,03	24	-3,1	SP	Ergebnis umgerechnet °

° Umrechnung S. 19

AB**	50-150 %	AB**	50-150 %
Anzahl im AB	4	Anzahl im AB	0
Prozent im AB	50	Prozent im AB	0

Methoden:

AQ = AgraQuant, RomerLabs
 EZ = EZ plate
 RS-F= Ridascreen® Fast, R-Biopharm
 SP = SensiSpec ELISA Kit, Eurofins

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

** Akzeptanzbereich der AOAC für Allergen-ELISAs

* Recovery rate 100% relative size: Lupin protein, s. page 5

** Range of acceptance of AOAC for allergen ELISAS

Anmerkung:

50% (4) der Teilnehmer haben mit der Dotierungsniveauprobe mittels ELISA eine Wiederfindungsrate im Bereich der AOAC-Anforderung von 50-150% erhalten. Für die prozessierte dotierte Lebensmittelmatrix-Probe B lagen alle Wiederfindungsraten unterhalb des Akzeptanzbereichs. Die zugehörigen z-Scores basieren auf der Zielstandardabweichung von 25%.

4.1.2 PCR-Ergebnisse: Lupine

Qualitative Auswertung der Ergebnisse: Proben A und B

Auswertenummer	Probe A	Probe A	Probe B	Probe B	Qualitative Bewertung	Methode	Hinweis
	pos/neg	[mg/kg]	pos/neg	[mg/kg]	Übereinstimmungen mit Konsenswerten		
5	negativ		positiv		2/2 (100%)	ASU	
1	negativ	NA	positiv	NA	2/2 (100%)	SFA-ID	
3	negativ		positiv		2/2 (100%)	SFA-ID	
9	negativ		positiv		2/2 (100%)	SFA-ID	
12	negativ	<1	positiv	26,7	2/2 (100%)	SFA-ID	
11	negativ		positiv		2/2 (100%)	div	
14	negativ		positiv		2/2 (100%)	div	

	Probe A	Probe B
Anzahl positiv	0	7
Anzahl negativ	7	0
Prozent positiv	0	100
Prozent negativ	100	0
Konsenswert	negativ	positiv

Methoden:

ASU = ASU §64 Methode/method
 SFA-ID = Sure Food Allergen ID, R-Biopharm / Congen
 div = keine genaue Angabe / andere Methode
 div = not indicated / other method

Anmerkung:

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

Quantitative Auswertung PCR: Probe B

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

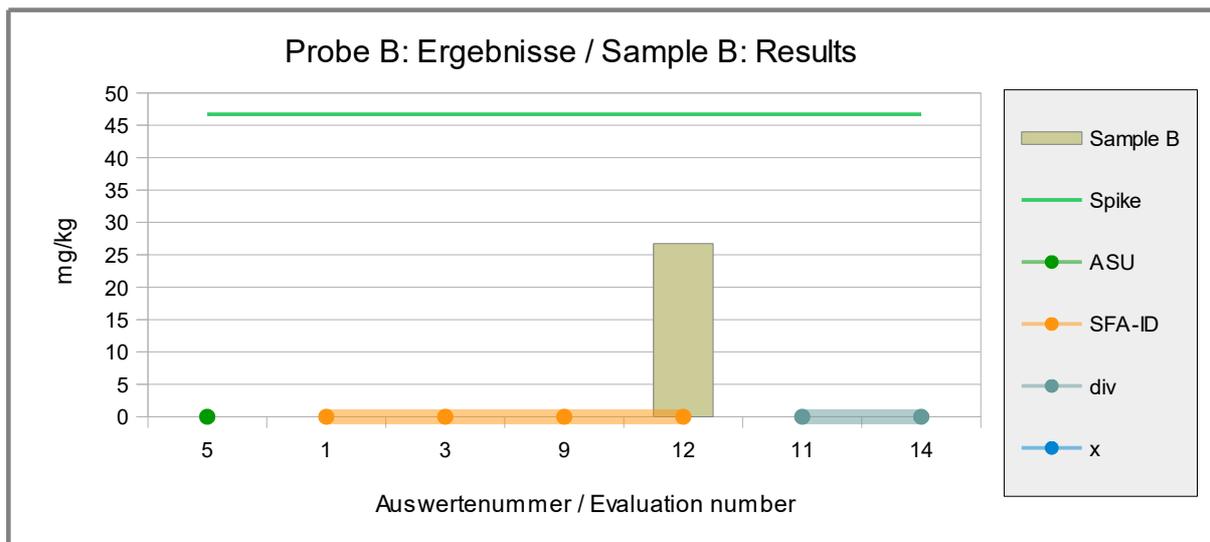


Abb./Fig. 7: PCR-Ergebnisse Lupine
 grüne Linie = Zusatzniveau (Spike)
 runde Symbole = Zuordnung der Methoden (s. Legende)

Qualitative Auswertung PCR: Dotierungsniveauprobe

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

Auswertenummer	Lupine pos/neg	Lupine [mg/kg]	z-Score Xpt _{ALL}	Methode	Hinweis
5	positiv			ASU	
1	positiv	NA		SFA-ID	
3	positiv			SFA-ID	
9	positiv			SFA-ID	
12	positiv	29,3		SFA-ID	
11	positiv			div	
14	positiv			div	

Anzahl positiv	7
Anzahl negativ	0
Prozent positiv	100
Prozent negativ	0
Konsenswert	positiv

Methoden:

ASU = ASU §64 Methode/method
 SFA-ID = Sure Food Allergen ID, R-Biopharm / Congen
 div = keine genaue Angabe / andere Methode
 div = not indicated / other method

Anmerkung:

Für die Dotierungsniveauprobe wurden 100% positive Ergebnisse erhalten.

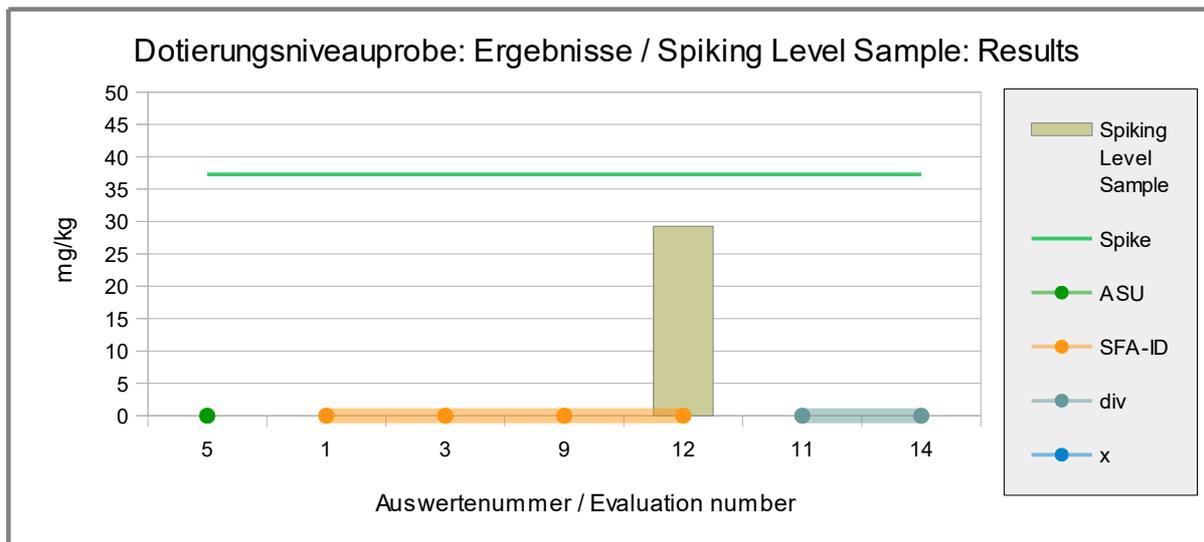


Abb./Fig. 8: PCR-Ergebnisse Lupine
 grüne Linie = Zusatzniveau (Spike)
 runde Symbole = Zuordnung der Methoden (s. Legende)

**Wiederfindungsraten mit z-Scores PCR für Lupine:
Dotierungsniveauprobe und Probe B**

Auswertenummer	Dotierungsniveauprobe	Wiederfindungsrate*		Probe B	Wiederfindungsrate*		Methode	Hinweis
	[mg/kg]	[%]	[Z _{RR}]	[mg/kg]	[%]	[Z _{RR}]		
5							ASU	
1	NA			NA			SFA-ID	
3							SFA-ID	
9							SFA-ID	
12	29,3	78	-0,86	26,7	57	-1,7	SFA-ID	
11							div	
14							div	

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

Methoden:

ASU = ASU §64 Methode/method
 SFA-ID = Sure Food Allergen ID, R-Biopharm / Congen
 div = keine genaue Angabe / andere Methode
 div = not indicated / other method

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

** Akzeptanzbereich der AOAC für Allergen-ELISAs

* Recovery rate 100% relative size: Lupin protein, s. page 5

** Range of acceptance of AOAC for allergen ELISAS

Anmerkung:

Ein Teilnehmer hat quantitative Ergebnisse mittels PCR bestimmt. Sowohl für die Dotierungsniveauprobe als auch für die prozessierte dotierte Lebensmittelmatrix-Probe B lagen die Wiederfindungsraten im Bereich der AOAC-Anforderung von 50-150%.

Die zugehörigen z-Scores basieren auf der Zielstandardabweichung von 25%.

4.2 Vergleichsuntersuchung Weizen (Gluten)

4.2.1 ELISA-Ergebnisse: Gluten

Qualitative Auswertung der Ergebnisse: Proben A und B

Auswertenummer	Probe A	Probe A	Probe B	Probe B	Qualitative Bewertung	Methode	Hinweis
	pos/neg	[mg/kg]	pos/neg	[mg/kg]	Übereinstimmungen mit Konsenswerten		
6	positiv	<LOQ	positiv	65,0	1/2 (50%)	AQ-G12	
13	negativ	< 4	positiv	42,0	2/2 (100%)	IL	
1	negativ	NA	positiv	58,4	2/2 (100%)	RS	
2	negativ	< 5	positiv	69,2	2/2 (100%)	RS	
3	negativ	< 5	positiv	> 80	2/2 (100%)	RS	
4	negativ	< 5,0	positiv	52,0	2/2 (100%)	RS	
5a	negativ	< 5	positiv	58,0	2/2 (100%)	RS	
7	negativ	< 5,0	positiv	53,9	2/2 (100%)	RS	
12	negativ	< 3	positiv	67,7	2/2 (100%)	RS	
8	negativ	< 5,0	positiv	59,2	2/2 (100%)	RS-F	
10	negativ	< 10	positiv	27,7	2/2 (100%)	RS-F	
5b	negativ	< 3,12	positiv	46,0	2/2 (100%)	SP-R5	
14	negativ	< 5	positiv	72,0	2/2 (100%)	VT-R5	

	Probe A	Probe B
Anzahl positiv	1	13
Anzahl negativ	12	0
Prozent positiv	8	100
Prozent negativ	92	0
Konsenswert	negativ	positiv

Methoden:

AQ-G12 = AgraQuant, RomerLabs
 IL = Immunolab
 RS = Ridascreen®, R-Biopharm
 RS-F= Ridascreen® Fast, R-Biopharm
 SP-R5 = SensiSpec Ingezim Gluten R5, Eurofins
 VT-R5 = Veratox, Neogen

Anmerkung:

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

Ein positives Ergebnis für Probe A wurde mit der Methode AQ-G12 (Romer Labs) unterhalb der Bestimmungsgrenze erhalten.

Quantitative Auswertung ELISA: Probe B

Auswertenummer	Gluten [mg/kg]	z-Score $X_{pt_{ALL}}$	z-Score $X_{pt_{RS}}$	Methode	Hinweis
6	65,0	0,58		AQ-G12	
13	42,0	-1,0		IL	
1	58,4	0,11	0,01	RS	
2	69,2	0,87	0,06	RS	
3	> 80			RS	
4	52,0	-0,34	-0,02	RS	
5a	58,0	0,08	0,01	RS	
7	53,9	-0,20	-0,01	RS	
12	67,7	0,77	0,05	RS	
8	59,2	0,17		RS-F	
10	27,7	-2,1		RS-F	
5b	46,0	-0,76		SP-R5	
14	72,0	1,1		VT-R5	

Methoden:

- AQ-G12 = AgraQuant, RomerLabs
- IL = Immunolab
- RS = Ridascreen®, R-Biopharm
- RS-F= Ridascreen® Fast, R-Biopharm
- SP-R5 = SensiSpec Ingezim Gluten R5, Eurofins
- VT-R5 = Veratox, Neogen

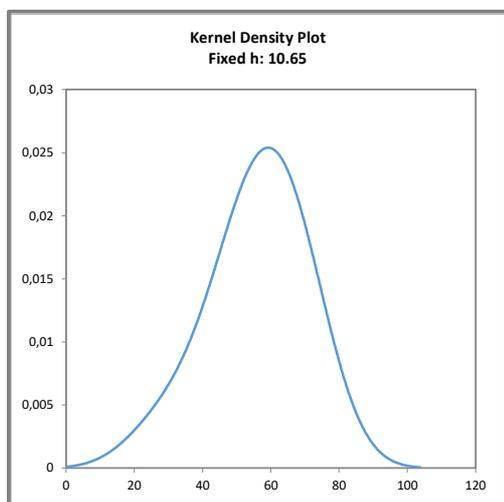


Abb. / Fig. 9:

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

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

Anmerkung:

Die Kerndichte-Schätzung zeigt annähernd eine symmetrische Verteilung der Ergebnisse.

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

Kenndaten	Alle Ergebnisse [mg/kg]	Methode RS [mg/kg]
Zugewiesener Wert (X_{pt})	X_{pt_ALL}	$X_{pt_METHOD\ RS}$
Anzahl der Messergebnisse	12	6
Anzahl der Ausreißer	0	0
Mittelwert	55,9	59,9
Median	58,2	58,2
Robuster Mittelwert (X_{pt})	56,8	59,9
Robuste Standardabweichung (S^*)	12,3	8,05
<i>Zielkenndaten:</i>		
Zielstandardabweichung σ_{pt}	14,2	15,0
Untere Grenze des Zielbereichs	28,4	29,9
Obere Grenze des Zielbereichs	85,2	89,8
Quotient S^*/σ_{pt}	0,86	0,54
Standardunsicherheit $U(X_{pt})$	4,42	4,11
Ergebnisse im Zielbereich	11	6
Prozent im Zielbereich	92	100

Methoden:

RS = R-Biopharm, Ridascreen®

Anmerkungen zu den Kenndaten und Vergleich der Bezugswerte:

Die Kerndichte-Schätzung zeigte annähernd eine symmetrische Verteilung ohne eindeutige methodenabhängige Unterschiede.

Die Auswertungen der Ergebnisse aller Methoden und von Methode RS zeigten eine geringe Variabilität der Ergebnisse. Der Quotient S^*/σ_{pt} lag jeweils unter 1,0. Die robusten Standardabweichungen liegen im Bereich von etablierten Werten für die Wiederhol- und Vergleichsstandardabweichung der eingesetzten Bestimmungsmethoden (vgl. 3.4.2 Auswertung eines Versuchs zur Präzision und 3.4.3 Werte aus Erkenntnissen). Die Vergleichbarkeit der Ergebnisse ist gegeben. Diese Aussage ist für die methodenübergreifende Auswertung nur eingeschränkt gültig, da für einige Methoden nur wenige Ergebnisse vorlagen.

Die robusten Mittelwerte der Auswertungen lagen mit 137% (X_{ALL}) und 145% (X_{RS}) vom Zusatzniveau von Gluten zu Probe B innerhalb der relevanten Anforderungen für die eingesetzten Methoden (s. 3.4.3 und "Wiederfindungsraten für Gluten" S.41).

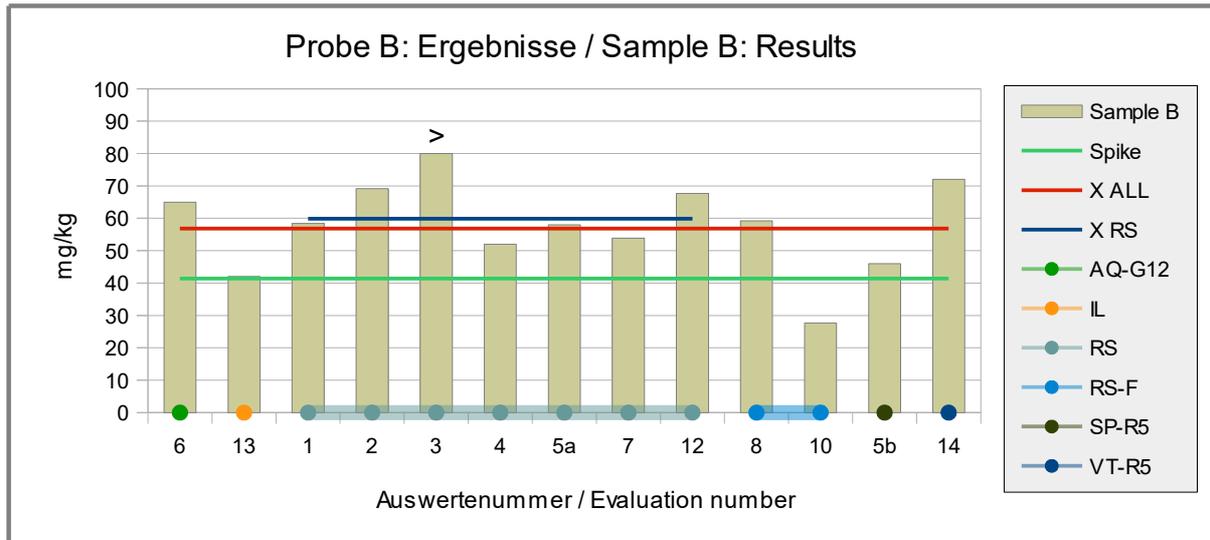


Abb./Fig. 10: ELISA-Ergebnisse Gluten
 grüne Linie = Zusatzniveau (Spike)
 rote Linie = robuster Mittelwert aller Ergebnisse
 blaue Linie = robuster Mittelwert Ergebnisse Methode RS
 runde Symbole = Zuordnung der Methoden (s. Legende)

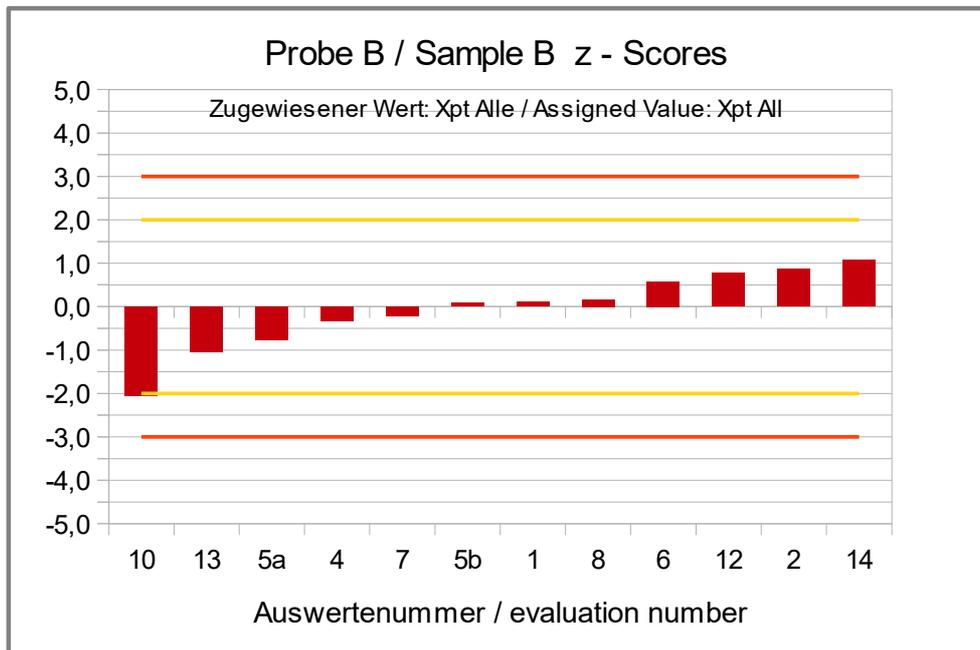


Abb./Fig. 11: z-Scores (ELISA-Ergebnisse als Gluten) Zugewiesener Wert: robuster Mittelwert aller Ergebnisse

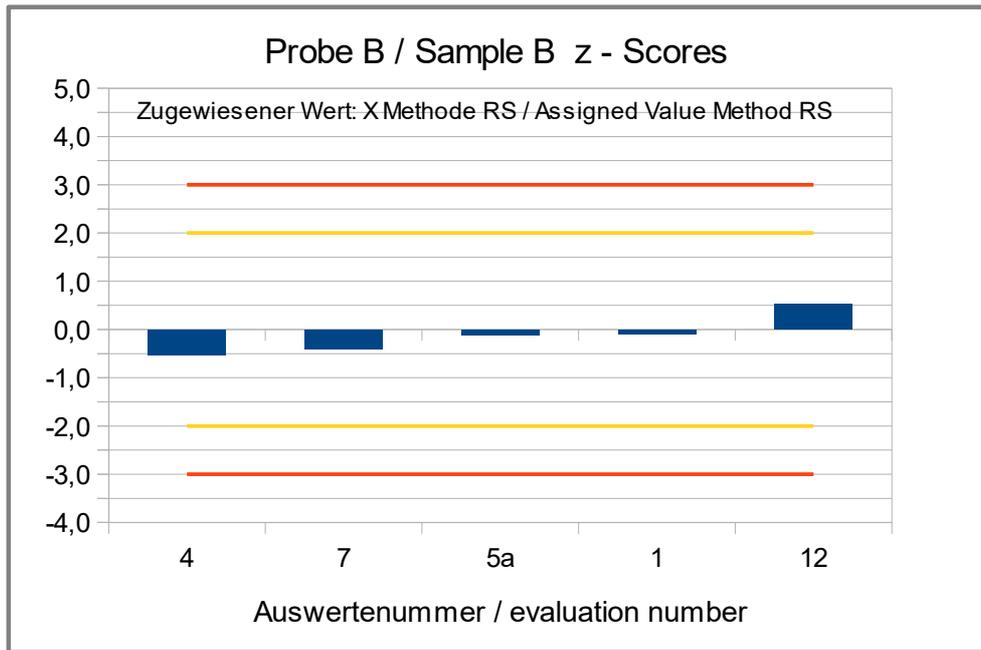


Abb./Fig. 12:

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

Quantitative Auswertung ELISA: Dotierungsniveauprobe

Auswertenummer	Gluten [mg/kg]	z-Score Xpt _{ALL}	z-Score Xpt _{RS}	Methode	Hinweis
6	23,0	-0,93		AQ-G12	
13	46,0	2,1		IL	
1	19,5	-1,4	-0,19	RS	
2	34,1	0,55	0,07	RS	
3				RS	
4	32,7	0,37	0,05	RS	
5a	32,0	0,27	0,04	RS	
7	25,5	-0,60	-0,08	RS	
12	35,8	0,77	0,10	RS	
8	23,6	-0,85		RS-F	
10	15,8	-1,9		RS-F	
5b	28,0	-0,26		SP-R5	
14	44,0	1,9		VT-R5	

Methoden:

AQ-G12 = AgraQuant, RomerLabs

IL = Immunolab

RS = Ridascreen®, R-Biopharm

RS-F= Ridascreen® Fast, R-Biopharm

SP-R5 = SensiSpec Ingezim Gluten R5, Eurofins

VT-R5 = Veratox, Neogen

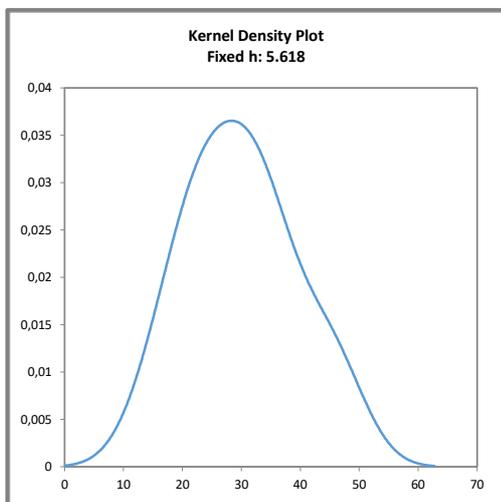


Abb. / Fig. 13:

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

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

Anmerkung:

Die Kerndichte-Schätzung zeigt annähernd eine symmetrische Verteilung der Ergebnisse.

Kenndaten: Quantitative Auswertung ELISA Gluten**Dotierungsniveauprobe**

Kenndaten	Alle Ergebnisse [mg/kg]	Methode RS [mg/kg]
Zugewiesener Wert (X_{pt})	X_{pt}_{ALL}	$X_{pt}_{METHOD RS}$
Anzahl der Messergebnisse	12	6
Anzahl der Ausreißer	0	0
Mittelwert	30,0	29,9
Median	30,0	32,4
Robuster Mittelwert (X_{pt})	30,0	30,0
Robuste Standardabweichung (S^*)	10,4	6,94
<i>Zielkenndaten:</i>		
Zielstandardabweichung σ_{pt}	7,49	7,5
Untere Grenze des Zielbereichs	15,0	15,0
Obere Grenze des Zielbereichs	44,9	44,9
Quotient S^*/σ_{pt}	1,4	0,93
Standardunsicherheit $U_{(X_{pt})}$	3,75	3,54
Ergebnisse im Zielbereich	11	6
Prozent im Zielbereich	92	100

Methoden:

RS = R-Biopharm, Ridascreen®

Anmerkungen zu den Kenndaten und Vergleich der Bezugswerte:

Die Kerndichte-Schätzung zeigte annähernd eine symmetrische Verteilung ohne eindeutige methodenabhängige Unterschiede.

Die Auswertungen der Ergebnisse aller Methoden und von Methode RS zeigten eine normale bis geringe Variabilität der Ergebnisse. Die Quotienten S^*/σ_{pt} lagen unter 2,0 bzw. 1,0. Die robusten Standardabweichungen liegen im Bereich von etablierten Werten für die Wiederhol- und Vergleichsstandardabweichung der eingesetzten Bestimmungsmethoden (vgl. 3.4.2 Auswertung eines Versuchs zur Präzision und 3.4.3 Werte aus Erkenntnissen). Die Vergleichbarkeit der Ergebnisse ist gegeben. Diese Aussage ist für die methodenübergreifende Auswertung nur eingeschränkt gültig, da für einige Methoden nur wenige Ergebnisse vorlagen.

Die robusten Mittelwerte der Auswertungen lagen mit 145% (X_{ALL}) und 145% (X_{RS}) vom Zusatzniveau von Gluten zur Dotierungsniveauprobe innerhalb der relevanten Anforderungen für die eingesetzten Methoden (s. 3.4.3 und "Wiederfindungsraten für Gluten", s. S.41).

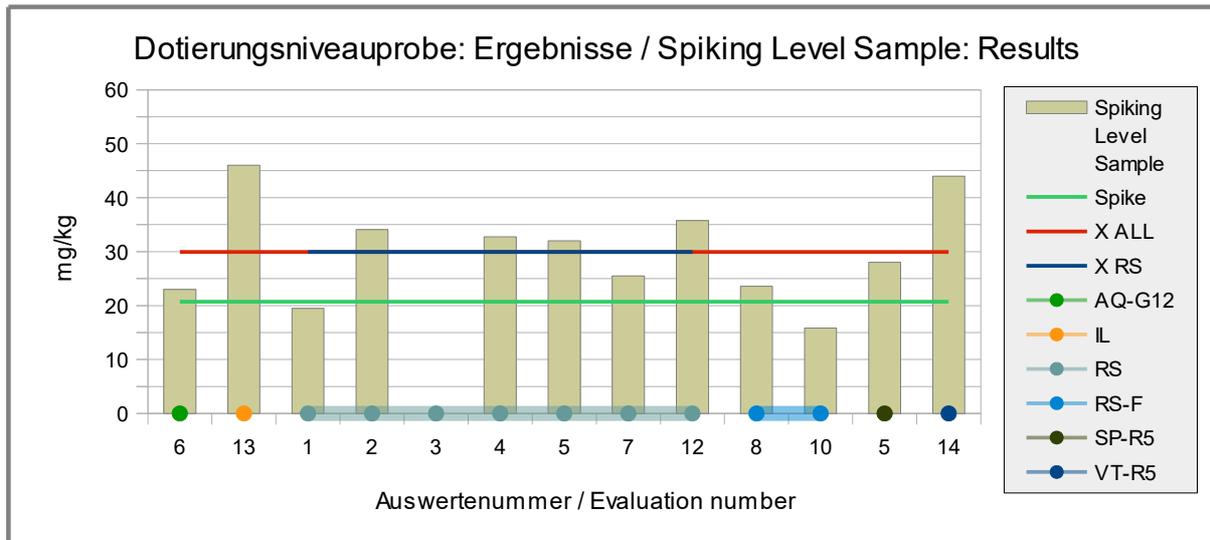


Abb./Fig. 14: ELISA-Ergebnisse Gluten
 grüne Linie = Zusatzniveau (Spike)
 rote Linie = robuster Mittelwert aller Ergebnisse
 blaue Linie = robuster Mittelwert Ergebnisse Methode RS
 runde Symbole = Zuordnung der Methoden (s. Legende)

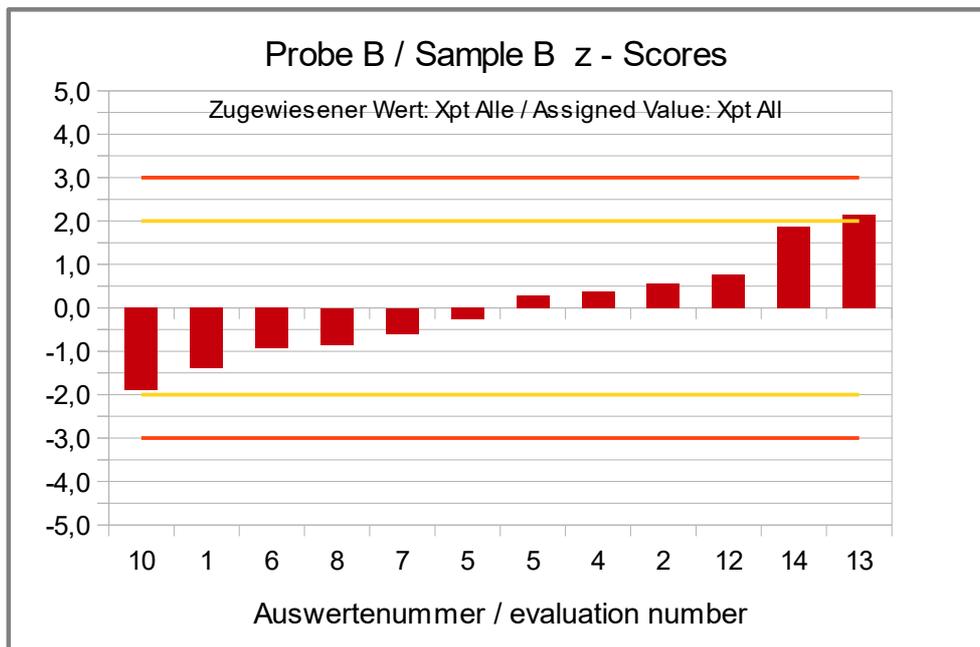


Abb./Fig. 15:
 z-Scores (ELISA-Ergebnisse als Gluten)
 Zugewiesener Wert: robuster Mittelwert aller Ergebnisse

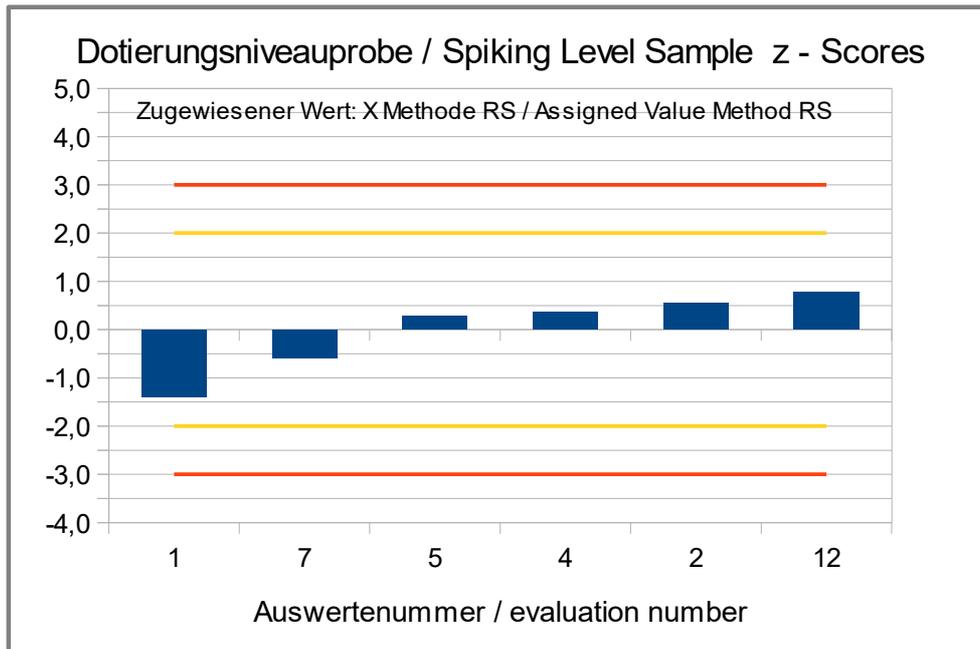


Abb./Fig. 16:
z-Scores (ELISA-Ergebnisse als Gluten) Bezugswert robuster Mittelwert
Ergebnisse Methode RS (R-Biopharm, Ridascreen)

**Wiederfindungsraten mit z-Scores ELISA für Gluten:
Dotierungsniveauprobe und Probe B**

Auswertenummer	Dotierungsniveauprobe	Wiederfindungsrate*		Probe B	Wiederfindungsrate*		Methode	Hinweis
		[mg/kg]	[%] [Z _{RR}]		[mg/kg]	[%] [Z _{RR}]		
6	23,0	111	0,44	65,0	157	2,3	AQ-G12	
13	46,0	222	4,9	42,0	101	0,06	IL	
1	19,5	94	-0,23	58,4	141	1,6	RS	
2	34,1	165	2,6	69,2	167	2,7	RS	
3				80,0			RS	
4	32,7	158	2,3	52,0	126	1,0	RS	
5a	32,0	155	2,2	58,0	140	1,6	RS	
7	25,5	123	0,93	53,9	130	1,2	RS	
12	35,8	173	2,9	67,7	164	2,5	RS	
8	23,6	114	0,56	59,2	143	1,7	RS-F	
10	15,8	76	-0,94	27,7	67	-1,3	RS-F	
5b	28,0	135	1,4	46,0	111	0,44	SP-R5	
14	44,0	213	4,5	72,0	174	3,0	VT-R5	

AB**	50-150 %	AB**	50-150 %
Anzahl im AB	6	Anzahl im AB	8
Prozent im AB	50	Prozent im AB	67

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

** Akzeptanzbereich der AOAC für Allergen-ELISAs

* Recovery rate 100% relative size: Gluten, s. page 5

** Range of acceptance of AOAC for allergen ELISAs

Methoden:

AQ-G12 = AgraQuant, RomerLabs

IL = Immunolab

RS = Ridascreen®, R-Biopharm

RS-F= Ridascreen® Fast, R-Biopharm

SP-R5 = SensiSpec Ingezim Gluten R5, Eurofins

VT-R5 = Veratox, Neogen

Anmerkung:

50% (6) der Teilnehmer haben mit der Dotierungsniveauprobe mittels ELISA eine Wiederfindungsrate im Bereich der AOAC-Anforderung von 50-150% erhalten. Für die prozessierte dotierte Lebensmittelmatrix-Probe B lagen 67% (8) der Wiederfindungsraten in diesem Akzeptanzbereich. Die zugehörigen z-Scores basieren auf der Zielstandardabweichung von 25%.

4.2.2 PCR-Ergebnisse: Gluten-haltige Getreide (Weizen)

Qualitative Auswertung der Ergebnisse: Proben A und B

Auswertenummer	Probe A	Probe A	Probe B	Probe B	Qualitative Bewertung	Methode	Hinweis
	pos/neg	[mg/kg]	pos/neg	[mg/kg]			
3	negativ		positiv		2/2 (100%)	SFA-ID	
12a	negativ	<10	positiv	447	2/2 (100%)	SFA-ID	Gluten-haltige Getreide
12b	negativ	<10	positiv	543	2/2 (100%)	SFA-4p	Weizen
14a	negativ		positiv		2/2 (100%)	div	
14b	negativ		positiv		2/2 (100%)	div	

	Probe A	Probe B
Anzahl positiv	0	5
Anzahl negativ	5	0
Prozent positiv	0	100
Prozent negativ	100	0
Konsenswert	negativ	positiv

Methoden:

SFA-ID = Sure Food Allergen ID, R-Biopharm / Congen
 SFA-4p = Sure Food Allergen 4plex, R-Biopharm / Congen
 div = keine genaue Angabe / andere Methode
 div = not indicated / other method

Anmerkung:

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

Quantitative Auswertung PCR: Probe B

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

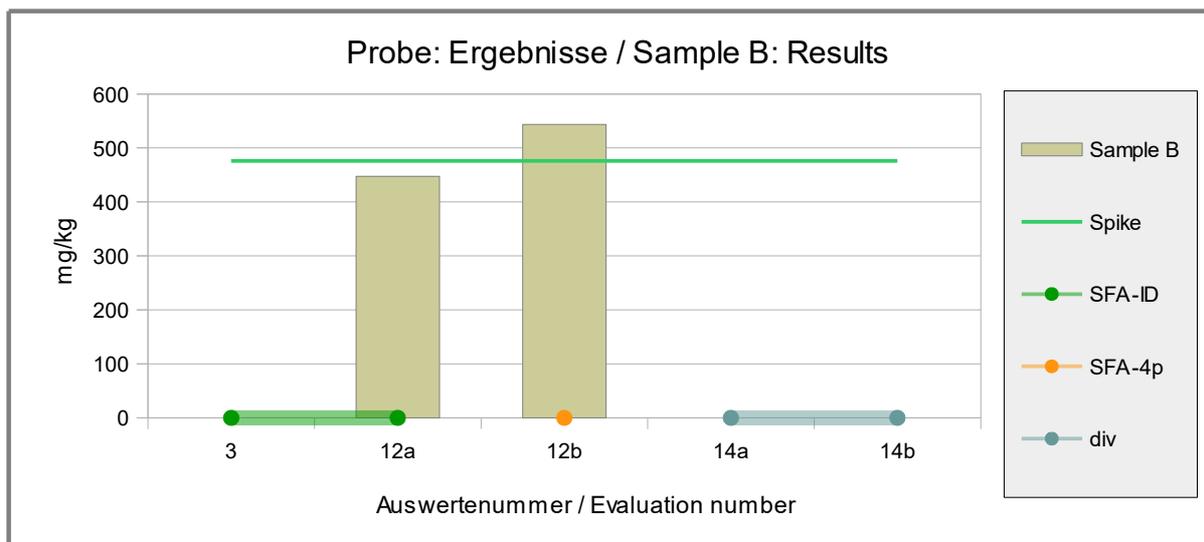


Abb./Fig. 17: PCR-Ergebnisse Gluten-haltige Getreide (Weizen)

grüne Linie = Zusatzniveau (Spike)
 runde Symbole = Zuordnung der Methoden (s. Legende)

Qualitative Auswertung PCR: Dotierungsniveauprobe

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

Auswertenummer	Gluten-hlt. Getreide	Gluten-hlt. Getreide	z-Score X _{ptALL}	Methode	Hinweis
	pos/neg	[mg/kg]			
3	positiv			SFA-ID	
12a	positiv	363		SFA-ID	Gluten-haltige Getreide
12b	positiv	519		SFA-4p	Weizen
14a	positiv			div	
14b	positiv			div	

Anzahl positiv	5
Anzahl negativ	0
Prozent positiv	100
Prozent negativ	0
Konsenswert	positiv

Methoden:

SFA-ID = Sure Food Allergen ID, R-Biopharm / Congen
 SFA-4p = Sure Food Allergen 4plex, R-Biopharm / Congen
 div = keine genaue Angabe / andere Methode
 div = not indicated / other method

Anmerkung:

Für die Dotierungsniveauprobe wurden 100% positive Ergebnisse erhalten.

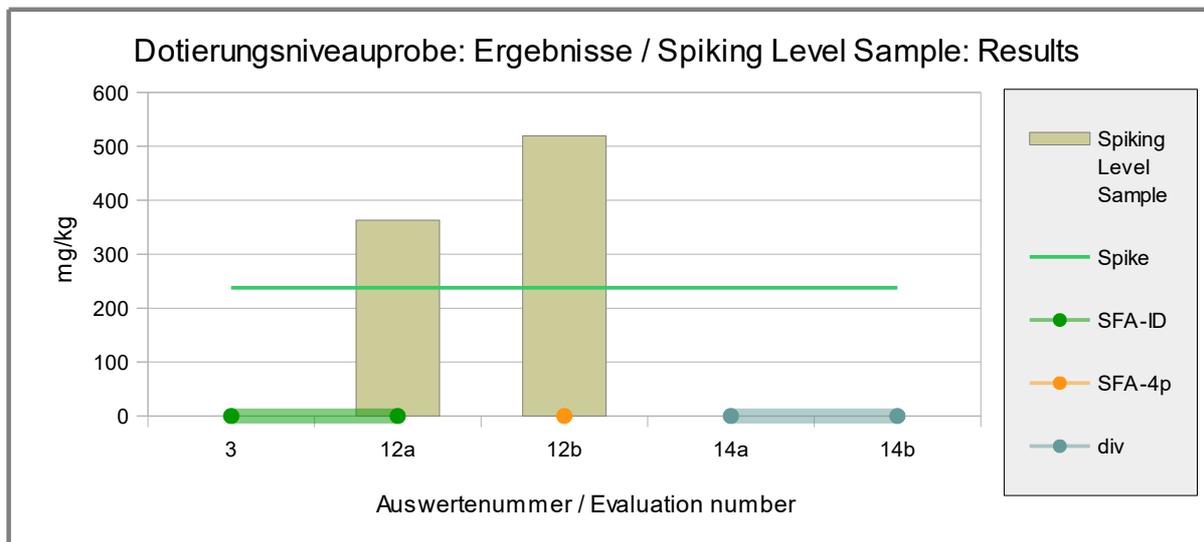


Abb./Fig. 18: PCR-Ergebnisse Gluten-haltige Getreide (Weizen)
 grüne Linie = Zusatzniveau (Spike)
 runde Symbole = Zuordnung der Methoden (s. Legende)

Wiederfindungsraten mit z-Scores PCR für Gluten-haltige Getreide (Weizen): Dotierungsniveauprobe und Probe B

Auswertenummer	Dotierungsniveauprobe	Wiederfindungsrate*		Probe B	Wiederfindungsrate*		Methode	Hinweis
	[mg/kg]	[%]	[Z _{RR}]	[mg/kg]	[%]	[Z _{RR}]		
3							SFA-ID	
12a	363	153	2,1	447	94	-0,24	SFA-ID	Gluten-haltige Getreide
12b	519	218	4,7	543	114	0,57	SFA-4p	Weizen
14a							div	
14b							div	

AB**	50-150 %	AB**	50-150 %
Anzahl im AB	0	Anzahl im AB	2
Prozent im AB	0	Prozent im AB	100

Methoden:

SFA-ID = Sure Food Allergen ID, R-Biopharm / Congen
 SFA-4p = Sure Food Allergen 4plex, R-Biopharm / Congen
 div = keine genaue Angabe / andere Methode
 div = not indicated / other method

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

** Akzeptanzbereich der AOAC für Allergen-ELISAs

* Recovery rate 100% relative size: Gluten, s. page 5

** Range of acceptance of AOAC for allergen ELISAS

Anmerkung:

Zwei Teilnehmer haben quantitative Ergebnisse mittels PCR bestimmt. Für die prozessierte dotierte Lebensmittelmatrix-Probe B lagen die Wiederfindungsraten im Bereich der AOAC-Anforderung von 50-150%, für die Dotierungsniveauprobe lagen die Wiederfindungsraten knapp darüber bzw. deutlich darüber.

Die zugehörigen z-Scores basieren auf der Zielstandardabweichung von 25%.

4.3 z-Scores der Teilnehmer: Übersichtstabelle

Z-Scores für die zugewiesenen Werte der Teilnehmer-Ergebnisse (Konsenswerte)

Auswertenummer	ELISA Lupinenprotein: Xpt (div. Methoden)		ELISA Gluten: Xpt (div. Methoden)		ELISA Gluten: Xpt (Methode: RS)	
	Probe B	Dot. Probe	Probe B	Dot. Probe	Probe B	Dot. Probe
1			0,11	-1,4	0,01	-0,19
2	0,28	0,60	0,87	0,55	0,06	0,07
3	-0,50	-2,0				
4			-0,34	0,37	-0,02	0,05
5a	-1,2	0,46	0,08	0,27	0,01	0,04
5b			-0,76	-0,26		
6	-1,4	-0,29	0,58	-0,60		
7			-0,20		-0,01	-0,08
8			0,17	-0,85		
9	0,93	-0,88				
10			-2,1	-1,9		
11						
12	-0,08	-0,04	0,77	0,77	0,05	0,10
13	0,14	0,83	-1,0	2,1		
14	3,2	0,66	1,10	1,9		

Methoden: RS = Ridascreen®, R-Biopharm

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)*

**Z-Scores für die zugewiesenen Werte des Zusatzniveaus
(Wiederfindungsraten)**

Auswertenummer	ELISA Lupinenprotein		ELISA Gluten		PCR Lupine		PCR Gluten-haltige Getreide (Weizen)	
	Probe B	Dot. Probe	Probe B	Dot. Probe	Probe B	Dot. Probe	Probe B	Dot. Probe
1			1,6	-0,23				
2	-3,0	2,6	2,7	2,6				
3	-3,2	-1,1						
4			1,0	2,3				
5/5a	-3,4	2,4	1,6	2,2				
5b			0,44	1,4				
6	-3,4	1,3	2,3	0,44				
7			1,2	0,93				
8			1,7	0,56				
9	-2,9	0,50						
10			-1,3	-0,94				
11								
12/12a	-3,1	1,7	2,5	2,9	-1,7	-0,86	-0,24	2,1
12b							0,57	4,7
13	-3,1	2,9	0,06	4,9				
14	-2,4	2,7	3,0	4,5				

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

$-2 \leq z\text{-score} \leq 2$ erfolgreich / successful (in green)

$-2 > z\text{-score} > 2$ „Warnsignal“ / warning signal (in yellow)

$-3 > z\text{-score} > 3$ „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: Lupine

Meth. Abk.	Auswertenummer	Datum der Analyse	Ergebnis Probe A		Ergebnis Probe B		Ergebnis Dotierungsprobe		NWG / LOD *	BG / LOQ *	MU*	Quantitatives Ergebnis als	Methode
			qualitativ	mg/kg	qualitativ	mg/kg	qualitativ	mg/kg	mg/kg	mg/kg	%		
		Tag/Monat											Test-Kit + Anbieter
AQ	6	20.04.21	negativ	<LOQ	positiv	7	positiv	50	0,2	2	50	Lupine	AgraQuant ELISA Lupin COKAL 1548, RomerLabs
EZ	2	06.04.21	negativ	< 2	positiv	11,36	positiv	62		2		Lupine	other: please fill in!
RS-F	3		negativ	<0,6	positiv	3,4	positiv	10,1		0,6		Lupinenprotein	4.2 Kit RIDASCREEN®FAST Lupine Art. No. R6102
RS-F	9	06.04.21	-	< 1,0	-	4,8	-	15,4	0,7	1	31	Lupinenprotein	Ridascreen Fast Lupine R6102
RS-F	12	12.03.21	negativ	<1	positiv	3,81	positiv	19,51	1	1	27,32	Lupinenprotein	other: please fill in!
RS-F	14	30.04.21, 11.05.21	negativ	<1	positiv	7	positiv	23	1	1		Lupinenprotein	Ridascreen Fast Lupine, r-Biopharm
SP	5	19.03.21	negativ	<2	positiv	7,5	positiv	60	1,5	2		Lupine	SensiSpec ELISA Lupin, Eurofins
SP	13	05.03.21	negativ	<2	positiv	11	positiv	65	0,2	2		Lupine	SensiSpec ELISA Lupin, Eurofins

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

Meth. Abk.	Auswertenummer	Spezifität	Hinweise zur Methode (Extraktion und Bestimmung)	Methode akkreditiert ISO/IEC 17025	Sonstige Hinweise
		Antikörper	z.B. Extraktionslösung / Zeit / Temperatur	ja/nein	
AQ	6			nein	
EZ	2		1g in Extraktionspuffer (in Kit enthalten) / 15 min / 60°C	ja	Test-Kit: EZ PLATE LUPIN 2-30 ppm
RS-F	3			nein	
RS-F	9			ja	los 24310
RS-F	12	lt. Herstellerangaben	lt. Herstellerangaben	ja	Kit - Ridascreen FAST Lupine Kit
RS-F	14			ja	
SP	5	erkennt Lupinenproteine	lt. Herstellerangaben	ja	
SP	13				

5.1.2 ELISA: Gluten

Meth. Abk.	Auswertenummer	Datum der Analyse	Ergebnis Probe A		Ergebnis Probe B		Ergebnis Dotierungsprobe		NWG / LOD *	BG / LOQ *	MU*	Quantitatives Ergebnis als	Methode
			qualitativ	mg/kg	qualitativ	mg/kg	qualitativ	mg/kg	mg/kg	mg/kg	%		
		Tag/Monat											Test-Kit + Anbieter
AQ-G12	6	21.04.21	positiv	<LOQ	positiv	65	positiv	23	2	4	50	Gluten	AgraQuant ELISA Gluten G12 COKAL0200, RomerLabs
IL	13	05.03.21	negativ	<4	positiv	42	positiv	46	0,6	4		Gluten	Immunolab Gliadin/Gluten ELISA
RS	1		negativ	NA	positiv	58,4	positiv	19,5	3	10		Gluten	Ridascreen® Gliadin R7001, R-Biopharm
RS	2	22.03.21	negativ	< 5	positiv	69,18	positiv	34,07		5		Gluten	Ridascreen® Gliadin R7001, R-Biopharm
RS	3		negativ	< 5	positiv	> 80	-			5		Gluten	Ridascreen® Gliadin R7001, R-Biopharm
RS	4	09.04.21	-	<5,00	-	51,96	-	32,73	1	5		Gluten	Ridascreen® Gliadin R7001, R-Biopharm
RS	5a	11.03.21	negativ	<5	positiv	58	positiv	32	3	5		Gluten	Ridascreen® Gliadin R7001, R-Biopharm
RS	7		-	<5,0	-	53,9	-	25,5	1	5		Gluten	Ridascreen® Gliadin R7001, R-Biopharm
RS	12	09.03.21	negativ	<3	positiv	67,7	positiv	35,75	3	3	30,6	Gluten	Ridascreen® Gliadin R7001, R-Biopharm
RS-F	8		-	<5,0	-	59,2	-	23,6	1	5		Gluten	Ridascreen® FAST Gliadin R7002, R-Biopharm
RS-F	10	09.04.21	negativ	<10,00	positiv	27,68	positiv	15,82	1	10		Gluten	Ridascreen® FAST Gliadin R7002, R-Biopharm
SP-R5	5b	09.03.21	negativ	<3,12	positiv	46	positiv	28	3,12	3,12		Gluten	SENSISpec Ingezim Gluten R5 30.GLU.K2, Eurofins
VT-R5	14	27.04.21, 05.05.21, 07.05.21	negativ	<5	positiv	72	positiv	44	5	5		Gluten	Veratox Gliadin R5, Neogen

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

Fortsetzung ELISA Gluten:

Meth. Abk.	Auswertenummer	Spezifität	Hinweise zur Methode (Extraktion und Bestimmung)	Methode akkreditiert ISO/IEC 17025	Sonstige Hinweise
		Antikörper	z.B. Extraktionslösung / Zeit / Temperatur	ja/nein	
AQ-G12	6		Probe A war <LOQ, abgeschätzt 3 mg/kg	ja	
IL	13				
RS	1				
RS	2		0,25 g in Cocktail-Lösung (im Kit enthalten) / 40 min / 50°C	ja	
RS	3			ja	
RS	4	R5		ja	Probe B: Mittelwert wurde gebildet aus den Einzelergebnissen 55,20 und 56,35 und 44,33 mg Gluten/kg.
RS	5a	R5 Antikörper von Mendez erkennt Prolamine (Gliadine) aus Weizen, Roggen und Gerste	lt. Herstellerangaben	ja	
RS	7	R5	1 g Probe + 10 ml Eco Cocktail -> 10 min bei 50°C // 10 min abkühlen // + 30 ml Ethanol 80% -> 10 min schütteln // 5 min zentrifugieren // mit Verd.Puffer verdünnen // 0,1 ml zum Test einsetzen	nein	Es wurde der ECO Cocktail (nicht der patened) benutzt.
RS	12	lt. Herstellerangaben	lt. Herstellerangaben	ja	
RS-F	8	R5	1 g Probe + 10 ml Eco Cocktail -> 10 min bei 50°C // 10 min abkühlen // + 30 ml Ethanol 80% -> 10 min schütteln // 5 min zentrifugieren // mit Verd.Puffer verdünnen // 0,1 ml zum Test einsetzen	nein	Es wurde der ECO Cocktail (nicht der patened) benutzt.
RS-F	10	Peroxidase-gekoppeltes R5 Antikörper	Rida Extraction Solution (colorless) Art. Nr R7098 / Methode nach Arbeitsanweisung von R-biopharm	nein	
SP-R5	5b	R5 Antikörper von Mendez erkennt Prolamine (Gliadine) aus Weizen, Roggen und Gerste	lt. Herstellerangaben	ja	
VT-R5	14	GliadinR5		ja	Berechnung von Gluten durchgeführt: 2-facher Wert von Gliadin

5.1.3 PCR: Lupine

Meth. Abk.	Auswertenummer	Datum der Analyse	Ergebnis Probe A		Ergebnis Probe B		Ergebnis Dotierungsprobe		NWG / LOD *	BG / LOQ *	MU*	Quantitatives Ergebnis als	Methode
			qualitativ	mg/kg	qualitativ	mg/kg	qualitativ	mg/kg	mg/kg	mg/kg	%		
		Tag/Monat											Test-Kit + Anbieter
ASU	5	08.04.21	negativ		positiv		positiv					Lupinen-DNA	ASU §64 Methode/method
SFA-ID	1		negativ	NA	positiv	NA	positiv	NA	0,4			Bitte auswählen!	Sure Food Allergen ID, R-Biopharm / Congen
SFA-ID	3		negativ		positiv		positiv		0,4			Lupinen-DNA	Sure Food Allergen ID, R-Biopharm / Congen
SFA-ID	9	31.03.21	negativ		positiv		positiv		0,4			Lupinen-DNA	Sure Food Allergen ID, R-Biopharm / Congen
SFA-ID	12	11.03.21	negativ	<1	positiv	26,72	positiv	29,28	1	1	40	Lupine	Sure Food Allergen ID, R-Biopharm / Congen
div	11	28.04.21	negativ		positiv		positiv		100			Bitte auswählen!	IN HOUSE QUALITATIV METHOD
div	14	30.04.21;	negativ		positiv		positiv					Lupinen-DNA	inhouse method

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

Meth. Abk.	Auswertenummer	Spezifität	Hinweise zur Methode (Extraktion und Bestimmung)	Methode akkreditiert ISO/IEC 17025	Sonstige Hinweise
		Target-Sequenz / -DNA	z.B. Extraktion / Enzyme / Clean-Up / Real Time PCR / Gelelektrophorese / Cyclen	ja/nein	
ASU	5		CTAB / Proteinase K / RNase A / Promega Maxwell / Real-Time PCR / 45 Zyklen		
SFA-ID	1				
SFA-ID	3			ja	
SFA-ID	9			ja	cod. Kit S3611 Los 22220
SFA-ID	12	lt. Herstellerangaben	lt. Herstellerangaben	nein	
div	11	L1PR10.1A (Ypro10.1a)	Phenol/Chloroform Extraktion, qiagen dneasy kit, end point PCR, 45 Zyklen,	ja	
div	14				

5.1.4 PCR: Gluten-haltige Getreide (Weizen)

Meth. Abk.	Auswertenummer	Datum der Analyse	Ergebnis Probe A		Ergebnis Probe B		Ergebnis Dotierungsprobe		NWG / LOD *	BG / LOQ *	MU*	Quantitatives Ergebnis als	Methode
			qualitativ	mg/kg	qualitativ	mg/kg	qualitativ	mg/kg	mg/kg	mg/kg	%		
		Tag/Monat											Test-Kit + Anbieter
SFA-ID	3		negativ		positiv		positiv		0,4			Gluten	Sure Food Allergen ID, R-Biopharm / Congen
SFA-ID	12a	10.03.21	negativ	<10	positiv	447,49	positiv	363,22	10	10	40	Gluten-haltige Getreide	Sure Food Allergen ID, R-Biopharm / Congen
SFA-4p	12b	10.03.21	negativ	<10	positiv	543,46	positiv	519,41	10	10	40	Weizen	Sure Food Allergen 4plex, R-Biopharm / Congen
div	14a	30.04.21; 03.05.21	negativ		positiv		positiv					Weizen-DNA und andere Getreide mit Gliadin-Gen	inhouse method
div	14b	03.05.21;	negativ		positiv		positiv					Weizen-, Dinkel-, Kamut-, Roggen-DNA	inhouse method

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

Meth. Abk.	Auswertenummer	Spezifität	Hinweise zur Methode (Extraktion und Bestimmung)	Methode akkreditiert ISO/IEC 17025	Sonstige Hinweise
		Target-Sequenz / -DNA	z.B. Extraktion / Enzyme / Clean-Up / Real Time PCR / Gelelektrophorese / Cyclen	ja/nein	
SFA-ID	3			ja	
SFA-ID	12a	lt. Herstellerangaben	lt. Herstellerangaben	nein	mittels Q40 Batch 25290
SFA-4p	12b	lt. Herstellerangaben	lt. Herstellerangaben	nein	mittels Q40 Batch 25290
div	14a				
div	14b				

5.2 Homogenität

5.2.1 Mischungshomogenität vor der Abfüllung

Microtracer Homogenitätstest

DLA ptAL02 Probe B

Gewicht Gesamtprobe	2,34	kg
Microtracer	FSS-rot lake	
Teilchengröße	75 – 300	µm
Gewicht pro Partikel	2,0	µg
Tracerzugabe	26,9	mg/kg

Analysenergebnisse:

Probe	Einwaage [g]	Partikel Anzahl	Partikel [mg/kg]
1	5,04	49	19,4
2	5,00	54	21,6
3	4,99	56	22,4
4	4,97	45	18,1
5	4,98	51	20,5
6	4,99	67	26,9
7	4,98	49	19,7
8	4,98	65	26,1

Poisson-Verteilung		
Probenanzahl	8	
Freiheitsgrad	7	
Mittelwert	54,5	Partikel
Standardabweichung	7,89	Partikel
χ ² (CHI-Quadrat)	7,99	
Wahrscheinlichkeit	33	%
Wiederfindungsrate	81	%

Normalverteilung		
Probenanzahl	8	
Mittelwert	21,8	mg/kg
Standardabweichung	3,16	mg/kg
rel. Standardabweichung	14,5	%
Horwitz Standardabweichung	10,1	%
HorRat-Wert	1,4	
Wiederfindungsrate	81	%

Microtracer Homogenitätstest

DLA ptAL02 Dotierungsniveauprobe

Gewicht Gesamtprobe	1,50	kg
Microtracer	FSS-rot lake	
Teilchengröße	75 – 300	µm
Gewicht pro Partikel	2,0	µg
Tracerzugabe	18,9	mg/kg

Analysenergebnisse:

Probe	Einwaage [g]	Partikel Anzahl	Partikel [mg/kg]
1	5,00	45	18,0
2	4,99	40	16,0
3	5,00	41	16,4
4	4,98	38	15,3
5	4,98	49	19,7
6	5,02	40	15,9
7	5,01	47	18,8
8	4,95	45	18,2

Poisson-Verteilung		
Probenanzahl	8	
Freiheitsgrad	7	
Mittelwert	43,1	Partikel
Standardabweichung	3,95	Partikel
χ ² (CHI-Quadrat)	2,53	
Wahrscheinlichkeit	93	%
Wiederfindungsrate	91	%

Normalverteilung		
Probenanzahl	8	
Mittelwert	17,3	mg/kg
Standardabweichung	1,58	mg/kg
rel. Standardabweichung	9,15	%
Horwitz Standardabweichung	10,4	%
HorRat-Wert	0,88	
Wiederfindungsrate	91	%

5.3 Informationen zur Eignungsprüfung (EP)

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

EP-Nummer	ptAL02 - 2021
EP-Name	Allergene II: Lupine und Weizen (Gluten) in „glutenfreiem“ Gebäck mit „Dotierungsniveauprobe“
Probenmatrix (Prozessierung)	Proben A + B: Knäckebrot (gebacken) / Zutaten: Kartoffelstärke, Amaranthmehl, Sonnenblumenöl, Reismehl, Ballaststoffe aus Rohrzucker, Maismehl, Hirse, Zucker, Reissauerteigpulver (Reismehl, Wasser), Emulgator: Mono- und Diglyceride von Speisefettsäuren, Hefe, Verdickungsmittel: Hydroxypropylmethylcellulose, Reisprotein, Salz, Gewürze, weitere Zusatzstoffe und Allergene Lebensmittel (eine der beiden Proben) Dotierungsniveauprobe: Kartoffelpulver, weitere Zusatzstoffe und Allergene Lebensmittel
Probenzahl und Probenmenge	2 unterschiedliche Proben A + B: je 25 g + 1 Dotierungsniveauprobe: 15 g
Lagerungsinformation	Proben A, B + Dotierungsniveauprobe: Raumtemperatur (EP-Zeitraum), gekühlt 2 - 10 °C (Langzeit)
Verwendungszweck	Ausschließlich für Laboruntersuchungen (Qualitätskontrollproben)
Parameter	qualitativ + quantitativ: Lupine (Lupinenprotein, DNA), Weizen (Gluten, DNA) Proben A + B: < 500 mg/kg Dotierungsniveauprobe: < 500 mg/kg
Untersuchungsmethoden	Methode ist freigestellt
Hinweis zur Analyse	Die Untersuchung der Eignungsprüfung soll entsprechend einer laborüblichen Routineanalyse vorgenommen werden. Generell empfehlen wir vor der Analyse, insbesondere bei kleinen Analyseeinwaagen, eine repräsentative Probenmenge entsprechend guter Laborpraxis zu homogenisieren. Vorzugsweise wird jeweils die gesamte Probenmenge homogenisiert.
Ergebnisangabe	Es werden für jede Probe A, B und Dotierungsniveauprobe je ein Ergebnis ermittelt. Die Einzelergebnisse sind in die Ergebnisabgabe-Datei einzutragen.
Einheiten	mg/kg
Anzahl von Stellen	mindestens 2 signifikante Stellen
Ergebnisabgabe	Die Ergebnisabgabe-Datei wird per eMail übermittelt an: pt@dla-lvu.de
Letzter Abgabetermin	spätestens 30. April 2021
Auswertebericht	Der Auswertebericht wird voraussichtlich 6 Wochen nach Abgabetermin der Ergebnisse fertiggestellt und per eMail als PDF-Datei zugesandt.
Koordinator und Ansprechpartner der EP	Dr. Matthias Besler-Scharf

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

6. Verzeichnis der Teilnehmer in alphabetischer Reihenfolge

Teilnehmer / Participant	Ort / Town	Land / Country
		SCHWEIZ
		ITALIEN
		Deutschland
		ITALIEN
		Deutschland
		FRANKREICH
		Deutschland
		Deutschland
		ITALIEN
		GROSSBRITANNIEN
		ÖSTERREICH
		GROSSBRITANNIEN
		ÖSTERREICH
		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 inter-laboratory 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 amtliche Kontrollen zur Überprüfung der Einhaltung des Lebensmittel- und Futtermittelrechts sowie der Bestimmungen über Tiergesundheit und Tierschutz / Regulation on official controls performed to ensure the verification of compliance with feed and food law, animal health and animal welfare rules
6. Evaluation of analytical methods used for regulation of food and drugs; W. Horwitz; Analytical Chemistry, 54, 67-76 (1982)
7. The International Harmonised Protocol for the Proficiency Testing of Analytical Laboratories ; J.AOAC Int., 76(4), 926 – 940 (1993)
8. A Horwitz-like funktion describes precision in proficiency test; M. Thompson, P.J. Lowthian; Analyst, 120, 271-272 (1995)
9. Protocol for the design, conduct and interpretation of method performance studies; W. Horwitz; Pure & Applied Chemistry, 67, 331-343 (1995)
10. Recent trends in inter-laboratory precision at ppb and sub-ppb concentrations in relation to fitness for purpose criteria in proficiency testing; M. Thompson; Analyst, 125, 385-386 (2000)
11. The International Harmonised Protocol for the Proficiency Testing of Analytical Chemistry Laboratories; Pure Appl Chem, 78, 145 – 196 (2006)
12. AMC Kernel Density – Representing data distributions with kernel density estimates, amc technical brief, Editor M Thompson, Analytical Methods Committee, AMCTB No 4, Revised March 2006 and Excel Add-in Kernel.xla 1.0e by Royal Society of Chemistry
13. EURACHEM/CITAC Leitfaden, Ermittlung der Messunsicherheit bei analytischen Messungen (2003); Quantifying Uncertainty in Analytical Measurement (1999)
14. GMP+ Feed Certification scheme, Module: Feed Safety Assurance, chapter 5.7 Checking procedure for the process accuracy of compound feed with micro tracers in GMP+ BA2 Control of residues, Version: 1st of January 2015 GMP+ International B.V.
15. MTSE SOP No. 010.01 (2014): Quantitative measurement of mixing uniformity and carry-over in powder mixtures with the rotary detector technique, MTSE Micro Tracers Services Europe GmbH
16. Homogeneity and stability of reference materials; Linsinger et al.; Accred Qual Assur, 6, 20-25 (2001)
17. AOAC Official Methods of Analysis: Guidelines for Standard Method Performance Requirements, Appendix F, p. 2, AOAC Int (2016)
18. Codex Alimentarius Commission (2010) – Guidelines on performance criteria and validation of methods for detection, identification and quantification of specific DNA sequences and specific proteins in foods, CAC/GL 74-2010
19. DIN EN ISO 15633-1:2009; Nachweis von Lebensmittelallergenen mit immunologischen Verfahren – Teil 1: Allgemeine Betrachtungen / Foodstuffs – Detection of food allergens by immunological methods – Part 1: General considerations
20. DIN EN ISO 15634-1:2009; Nachweis von Lebensmittelallergenen mit molekularbiologischen Verfahren – Teil 1: Allgemeine Betrachtungen / Foodstuffs – Detection of food allergens by molecular biological methods – Part 1: General considerations
21. DIN EN ISO 15842:2010 Lebensmittel – Nachweis von Lebensmittelallergenen – Allgemeine Betrachtungen und Validierung von Verfahren / Foodstuffs – Detection of food allergens – General considerations and validation of methods
22. Ministry of Health and Welfare, JSM, Japan 2006
23. Working Group Food Allergens, Abbott et al., Validation Procedures for

- Quantitative Food Allergen ELISA Methods: Community Guidance and Best Practices JAOAC Int. 93:442-50 (2010)
24. Working Group on Prolamin Analysis and Toxicity (WGPAT): Méndez et al. Report of a collaborative trial to investigate the performance of the R5 enzyme linked immunoassay to determine gliadin in gluten-free food. Eur J Gastroenterol Hepatol. 17:1053-63 (2005)
 25. DLA Publikation: Performance of ELISA and PCR methods for the determination of allergens in food: an evaluation of six years of proficiency testing for soy (*Glycine max* L.) and wheat gluten (*Triticum aestivum* L.); Scharf et al.; J Agric Food Chem. 61(43):10261-72 (2013)
 26. EFSA (2014) Scientific Opinion on the evaluation of allergenic foods and food ingredients for labelling purposes¹, EFSA Panel on Dietetic Products, Nutrition and Allergies (NDA), European Food Safety Authority (EFSA), Parma, Italy, EFSA Journal 2014;12(11):3894
 27. IRMM, Poms et al.; Inter-laboratory validation study of five different commercial ELISA test kits for determination of peanut residues in cookie and dark chocolate; European Commission, Joint Research Centre, Belgium; GE/R/FSQ/D08/05/2004
 28. Jayasena et al. (2015) Comparison of six commercial ELISA kits for their specificity and sensitivity in detecting different major peanut allergens. J Agric Food Chem. 2015 Feb 18;63(6):1849-55
 29. ASU §64 LFGB L 06.00-56 Bestimmung von Sojaprotein in Fleisch und Fleischerzeugnissen Enzymimmunologisches Verfahren (2007) [Determination of soyprotein in meat and meat products by enzyme immunoassay]
 30. ASU §64 LFGB L 00.00-69 Bestimmung von Erdnuss-Kontaminationen in Lebensmitteln mittels ELISA im Mikrotiterplattensystem (2003) [Foodstuffs, determination of peanut contaminations in foodstuffs by ELISA in microtiterplates]
 31. ASU §64 LFGB L 44.00-7 Bestimmung von Haselnuss-Kontaminationen in Schokolade und Schokoladenwaren mittels ELISA im Mikrotiterplattensystem (2006) [Foodstuffs, determination of hazelnut contaminations in chocolate and chocolate products by ELISA in microtiterplates]
 32. ASU §64 LFGB L 18.00-22 Untersuchung von Lebensmitteln - Simultaner Nachweis und Bestimmung von Lupine, Mandel, Paranuss und Sesam in Reis- und Weizenkeksen sowie Soßpulver mittels real-time PCR (2014) [Foodstuffs, simultaneous detection and determination of lupin, almond, brazil nut and sesame in rice and wheat cookies and sauce powders by PCR]
 33. ASU §64 LFGB L 08.00-66 Untersuchung von Lebensmitteln - Nachweis und Bestimmung von Weizen (*Triticum* L.) und Roggen (*Secale cereale*) in Brühwurst mittels real-time PCR (2016) [Foodstuffs, detection and determination of wheat (*Triticum* L.) and rye (*Secale cereale*) in boiled sausages by real-time PCR]
 34. Durchführungsverordnung der Kommission/ Commission Implementing Regulation EU 828/2014; über die Anforderungen an die Bereitstellung von Informationen für Verbraucher über das Nichtvorhandensein oder das reduzierte Vorhandensein von Gluten in Lebensmitteln / on the requirements for the provision of information to consumers on the absence or reduced presence of gluten in food
 35. Bruins-Slot et al. (2015) Evaluating the performance of gluten ELISA test kits: The numbers do not tell the tale, Cereal Chem 92(5):513-521
 36. Köhler & Andersen (2014) Analyse von Glutengehalten in Getreide und getreidehaltigen Produkten, Tabellenwerk zum Nährstoffgehalt von Lebensmitteln 3.1.5.1, Deutsche Forschungsanstalt für Lebensmittelchemie Leibniz Institut Jahresbericht 2014 [Analysis of gluten contents in cereals and cereal products, nutrient tables of foods]

DLA ptAL02 (2021) - Allergene II

14 Teilnehmer haben mindestens ein Ergebnis eingereicht. Die Auswertung erfolgte hinsichtlich der Parameter Lupine und Gluten für ELISA- (qualitativ und quantitativ) und PCR-Methoden (qualitativ). Zusätzlich wurden für jedes quantitative Ergebnis Wiederfindungsraten für die Dotierungs-niveauprobe und die dotierte Probe ermittelt. Details zu den einzelnen Parametern inklusive separater Auswertung nach Testkit-Herstellern sind dem Auswertebereicht zu entnehmen.

9 Teilnehmer hatten ihren Sitz im Europäischen Ausland (Frankreich, Großbritannien, Italien, Österreich, Schweiz).