



Auswertungs-Bericht

Laborvergleichsuntersuchung

DLA ptAL08 (2021)

Allergene VIII:

Buchweizen, Mandel und Macadamia

in Frühstückscerealien

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</i> <i>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</i> <i>PT-Number</i></p> | <p>DLA ptAL08 (2021)</p> |
| <p><i>EP-Koordinator</i> <i>PT-Coordinator</i></p> | <p>Dr. Matthias Besler-Scharf</p> |
| <p><i>Status des EP-Bericht</i> <i>Status of PT-Report</i></p> | <p>Abschlussbericht / Final report (22. März 2022)</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</i> <i>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: 22. März 2022</p> |
| <p><i>Unteraufträge</i> <i>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</i> <i>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</i> <i>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> |



Deutsche
Akkreditierungsstelle
D-EP-21534-01-00

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 Ausreißern..... | 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 Buchweizen..... | 21 |
| 4.1.1 ELISA-Ergebnisse: Buchweizen (als Protein)..... | 21 |
| 4.1.2 PCR-Ergebnisse: Buchweizen..... | 24 |
| 4.2 Vergleichsuntersuchung Macadamia..... | 27 |
| 4.2.1 ELISA-Ergebnisse: Macadamia..... | 27 |
| 4.2.2 PCR-Ergebnisse: Macadamia..... | 35 |
| 4.3 Vergleichsuntersuchung Mandel..... | 38 |
| 4.3.1 ELISA-Ergebnisse: Mandel..... | 38 |
| 4.3.2 PCR-Ergebnisse: Mandel..... | 46 |
| 4.4 z-Scores der Teilnehmer: Übersichtstabelle..... | 49 |
| 5. Dokumentation..... | 51 |
| 5.1 Angaben der Teilnehmer..... | 51 |
| 5.1.1 ELISA: Buchweizen..... | 51 |
| 5.1.2 ELISA: Macadamia..... | 52 |
| 5.1.3 ELISA: Mandel..... | 53 |
| 5.1.4 PCR: Buchweizen..... | 54 |
| 5.1.5 PCR: Macadamia..... | 55 |
| 5.1.6 PCR: Mandel..... | 56 |
| 5.2 Homogenität..... | 57 |
| 5.2.1 Mischungshomogenität vor der Abfüllung..... | 57 |
| 5.3 Informationen zur Eignungsprüfung (EP)..... | 58 |
| 6. Verzeichnis der Teilnehmer in alphabetischer Reihenfolge..... | 59 |
| 7. Verzeichnis relevanter Literatur..... | 60 |

1. Einleitung

Die Teilnahme an Laborvergleichsuntersuchungen (LVU) bzw. Eignungsprüfungen (EP) 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 der Lebensmittelmatrixproben handelt es sich um eine Mischung handelsüblicher Frühstückscerealien mit Früchten und Haferflocken von europäischen Herstellern. 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 A** folgendermaßen hergestellt:

Die Dotierungsmaterialien, die die allergenen Zutaten Buchweizen, Mandel und Macadamia enthalten, wurden zerkleinert und gesiebt, dann zu einem Aliquot der Grundmatrix gegeben und die Mischung homogenisiert. Anschließend wurde portionsweise erneut Grundmatrix in weiteren Schritten zugegeben und jeweils homogenisiert bis die Gesamtmenge erreicht war.

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

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

Tabelle 1: Zusammensetzung der DLA-Proben

| Zutaten | Probe A | Probe B | Dotierungs-niveauprobe |
|--|--------------------------|--------------|--------------------------|
| Müsli Crunchy Früchte, Bio Zutaten: Haferflocken, Zucker, Sonnenblumenöl, Weizen gepufft, Schwarzes Johannisbeer-saft-Konzentrat, gefriergetrocknete Beeren (Himbeeren, Erdbeeren, Brombeeren), Salz Nährwertangaben pro 100 g: Fett 14 g, Kohlenhydrate 63 g, Eiweiß 10 g | 33,3 g/100 g | 33,3 g/100 g | - |
| Porridge Beere, Bio Zutaten: Hafervollkornflocken, Datteln getrocknet (Datteln, Reismehl), Cranberries getrocknet und gesüßt (Cranberries, Apfelsaftkonzentrat, Sonnenblumenöl), Himbeeren gefriergetrocknet, Rote-Bete-Saftkonzentrat, Himbeerpulver gefriergetrocknet Nährwertangaben pro 100 g: Fett 5,8 g, Kohlenhydrate 60 g, Eiweiß 13 g | 33,3 g/100 g | 33,3 g/100 g | - |
| Müsli Crunchy Hafer, Bio Zutaten: Hafervollkornflocken, Rohrzucker, Sonnenblumenöl, Reisextrudat (Reismehl, Gerstenmalzmehl, Meersalz), Reissirup, Kokosraspeln Nährwertangaben pro 100 g: Fett 14 g, Kohlenhydrate 64 g, Eiweiß 10 g | 33,3 g/100 g | 33,3 g/100 g | - |
| Kartoffelpulver Zutaten: Kartoffeln, E471, E304, E223, E100 | - | - | 99,9 g/100 g |
| <i>Buchweizen</i> - als Buchweizen* - davon 12,2% Gesamtprotein** | 20,2 mg/kg 2,46 mg/kg | - | 20,8 mg/kg 2,53 mg/kg |
| <i>Macadamia</i> - als Macadamia* - davon 8,0% Gesamtprotein** | 10,2 mg/kg 0,82 mg/kg | - | 9,22 mg/kg 0,74 mg/kg |
| <i>Mandel, geröstet</i> gemahlen, Mischung (23 Produkte aus USA, Europa, Australien, Vorderasien) - als Mandel* - davon 21,1% Gesamtprotein** | 13,9 mg/kg 2,94 mg/kg | - | 15,5 mg/kg 3,27 mg/kg |
| <i>weitere Zutaten:</i> <i>Maltodextrin, Natriumsulfat und Siliciumdioxid</i> | <0,3 g/100 g | - | <0,3 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 Buchweizen-, F=5,30 für Macadamia- und F=5,18 für Mandelprotein)

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

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-Probe A und der Dotierungsniveauprobe hat eine Wahrscheinlichkeit von 21% bzw. 97% 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 1,8 bzw. 0,59 erhalten. Der höhere HorRat-Wert wurde aufgrund der Ergebnisse der Wahrscheinlichkeit und der nachstehenden Homogenitätsprüfungen mittels ELISA akzeptiert. Die Ergebnisse der Microtracer-Analyse sind in der Dokumentation angegeben.

Homogenität der abgefüllten dotierten Probe A

Durchführung der Homogenitätstests

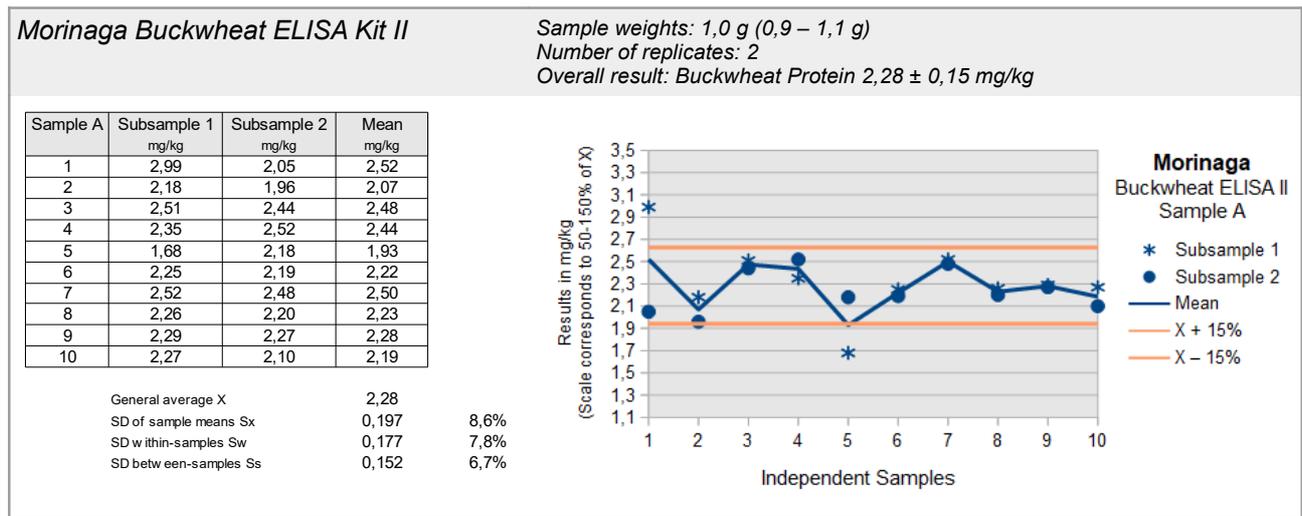
Die Homogenitätstests wurden in Kooperation mit den Laboren der angegebenen Testkit-Anbieter durchgeführt. Von DLA wurden zufällig 10 Muster der abgefüllten dotierten Probe ausgewählt und davon jeweils 2 Teilproben in zuvor zufällig-codierte Extraktionsbehälter eingewogen und anschließend den Laboren zur Analyse zugeschickt (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 Laboren nicht mitgeteilt. Nach Übersendung der Analysenergebnisse durch die Labore 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

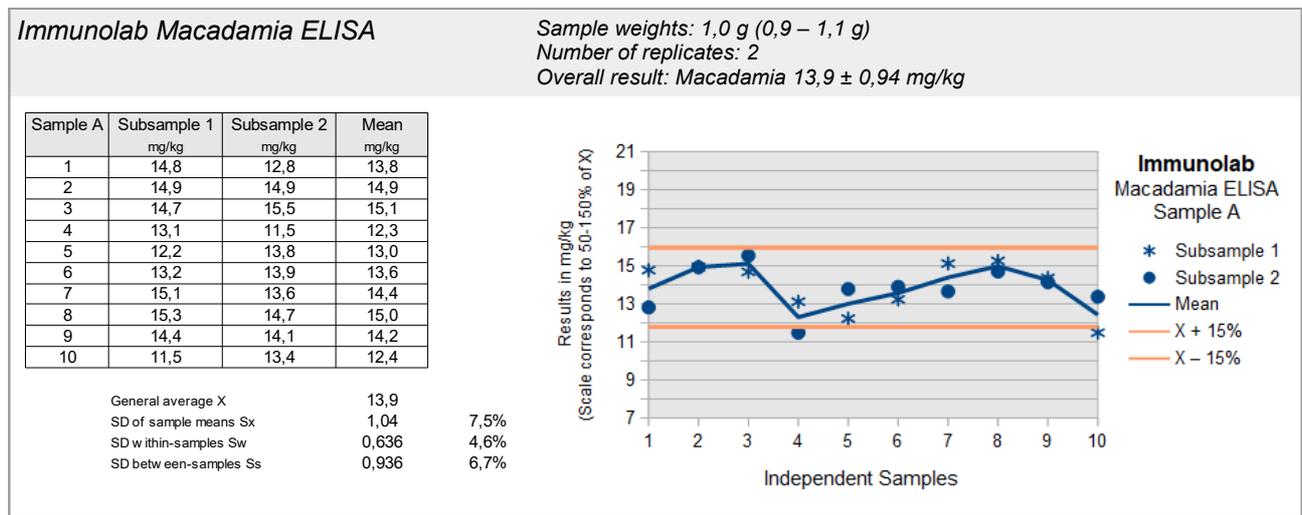
Die Homogenität wird mit einer Standardabweichung zwischen den Proben von $S_s \leq 15\%$ („Heterogenitätsstandardabweichung“) als hinreichend gesichert angesehen. Dieses Kriterium wird für die untersuchte Probe A in allen ELISA-Tests für Buchweizen, Macadamia und Mandel (Morinaga, Immunolab, AgraQuant, Veratox) 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 Buchweizen / Homogeneity Buckwheat



ELISA-Tests: Homogenität Macadamia / Homogeneity Macadamia



ELISA-Tests: Homogenität Mandel / Homogeneity Almond

Immunolab Almond ELISA

Sample weights: 1,0 g (0,9 – 1,1 g)
 Number of replicates: 2
 Overall result: Almond 7,79 ± 0,23 mg/kg

| Sample A | Subsample 1 mg/kg | Subsample 2 mg/kg | Mean mg/kg |
|----------|-------------------|-------------------|------------|
| 1 | 8,39 | 7,78 | 8,09 |
| 2 | 7,83 | 8,04 | 7,93 |
| 3 | 8,29 | 7,15 | 7,72 |
| 4 | 9,17 | 7,58 | 8,37 |
| 5 | 7,15 | 6,67 | 6,91 |
| 6 | 9,27 | 7,15 | 8,21 |
| 7 | 7,35 | 8,16 | 7,76 |
| 8 | 7,10 | 7,72 | 7,41 |
| 9 | 7,16 | 7,79 | 7,48 |
| 10 | 7,72 | 8,33 | 8,02 |

General average X: 7,79
 SD of sample means Sx: 0,434 (5,6%)
 SD within-samples Sw: 0,519 (6,7%)
 SD between-samples Ss: 0,232 (3,0%)

Veratox Almond ELISA

Sample weights: 5,0 g (4,5 – 5,5 g)
 Number of replicates: 2
 Overall result: Almond 9,34 ± 0,72 mg/kg

| Sample A | Subsample 1 mg/kg | Subsample 2 mg/kg | Mean mg/kg |
|----------|-------------------|-------------------|------------|
| 1 | 10,6 | 10,6 | 10,6 |
| 2 | 10,4 | 9,88 | 10,15 |
| 3 | 8,58 | 10,2 | 9,40 |
| 4 | 10,4 | 9,53 | 9,96 |
| 5 | 8,07 | 9,82 | 8,95 |
| 6 | 9,09 | 9,10 | 9,10 |
| 7 | 7,73 | 7,78 | 7,76 |
| 9 | 9,68 | 8,66 | 9,17 |
| 10 | 10,1 | 7,74 | 8,94 |

General average X: 9,34
 SD of sample means Sx: 0,837 (9,0%)
 SD within-samples Sw: 0,615 (6,6%)
 SD between-samples Ss: 0,715 (7,7%)

AgraQuant Almond ELISA

Sample weights: 1,0 g (0,9 – 1,1 g)
 Number of replicates: 2
 Overall result: Almond 5,78 ± 0,53 mg/kg

| Sample A | Subsample 1 mg/kg | Subsample 2 mg/kg | Mean mg/kg |
|----------|-------------------|-------------------|------------|
| 1 | 7,10 | 5,25 | 6,17 |
| 2 | 5,77 | 5,55 | 5,66 |
| 3 | 7,46 | 6,75 | 7,11 |
| 4 | 5,32 | 6,24 | 5,78 |
| 5 | 4,93 | 5,76 | 5,34 |
| 6 | 5,39 | 4,74 | 5,07 |
| 7 | 5,80 | 5,90 | 5,85 |
| 9 | 5,20 | 5,29 | 5,25 |
| 10 | 5,58 | 5,96 | 5,77 |

General average X: 5,78
 SD of sample means Sx: 0,604 (10,5%)
 SD within-samples Sw: 0,412 (7,1%)
 SD between-samples Ss: 0,529 (9,2%)

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 Degraderate 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. $0,40$ ($19,2^\circ\text{C}$) bzw. $0,36$ ($19,3^\circ\text{C}$). 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 49. Kalenderwoche 2021 je eine Portion der Untersuchungsmaterialien A und B sowie eine Dotierungsniveauprobe verschickt. Die Untersuchungsverfahren wurden freigestellt. Die Untersuchungen waren durchzuführen bis spätestens 04. Februar 2022.

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 Buchweizen, Mandel und Macadamia im mg/kg Bereich in der Matrix Frühstückscerealien. 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 5.3 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.

Alle 16 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 Ausreißern

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

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

Die Zielstandardabweichung nach Horwitz wird z.Z. in der Praxis von ELISA- und PCR-Verfahren mit Messwerten im 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 24 – 42% 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} [32-34]

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

3.4.3 Werte aus Erkenntnissen

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

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

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

Tabelle 3: ELISA-Validierungskriterien

| Literatur [18-24] | Wiederfindungsrate | Wiederholstandard- abweichung | Vergleichsstandard- abweichung |
|----------------------|--------------------|----------------------------------|-----------------------------------|
| MHLW 2006 | 50 - 150% | | ≤ 25% |
| CEN 2009 | | ≤ 20% | |
| AOAC 2010 | 50 - 150% | 6,9 - 34,4% ^(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 | Wiederholstandard- abweichung | Vergleichsstandard- abweichung |
|-------------------|----------------------|----------------------------------|-----------------------------------|
| CAC 2010 | ± 25% ^(a) | ≤ 25% | ≤ 35% |

(a) = Trueness / Richtigkeit

Aufgrund der derzeitigen Leistungsfähigkeiten von ELISA- bzw. PCR-Methoden zur quantitativen Bestimmung von Allergenen in Lebensmitteln, die sich aus den Präzisionsdaten von Versuchen und aus den o.g. Validierungsanforderungen ableiten lassen, legen wir für die relative Zielstandardabweichung σ_{pt} einen Wert von 25% 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]. Gleichermaßen 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, der Anzahl der Teilnehmer (P) einer LVU und anderen Faktoren 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 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 **Mandel-** und **Macadamiaprotein** angegeben wurden, sind mit dem experimentell bestimmten Proteingehalt der Rohstoffe auf das **Gesamtlebensmittel (Mandel, Macadamia)** umgerechnet worden (s. Seite 5). Die ELISA-Ergebnisse für **Buchweizen** wurden einheitlich als **Protein** angegeben und ohne Umrechnung 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 Buchweizen

4.1.1 ELISA-Ergebnisse: Buchweizen (als Protein)

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 | | |
| 14 | positiv | 3,18 | negativ | <2.5 | 2/2 (100%) | ES | |
| 4 | positiv | 2,58 | negativ | | 2/2 (100%) | MI-II | |
| 15 | positiv | 3,00 | negativ | <1 | 2/2 (100%) | MI-II | |

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

Methoden:
 ES = ELISA-Systems
 MI-II = Morinaga Institute ELISA Kit II

Anmerkung:

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

Quantitative Auswertung ELISA: Probe A

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

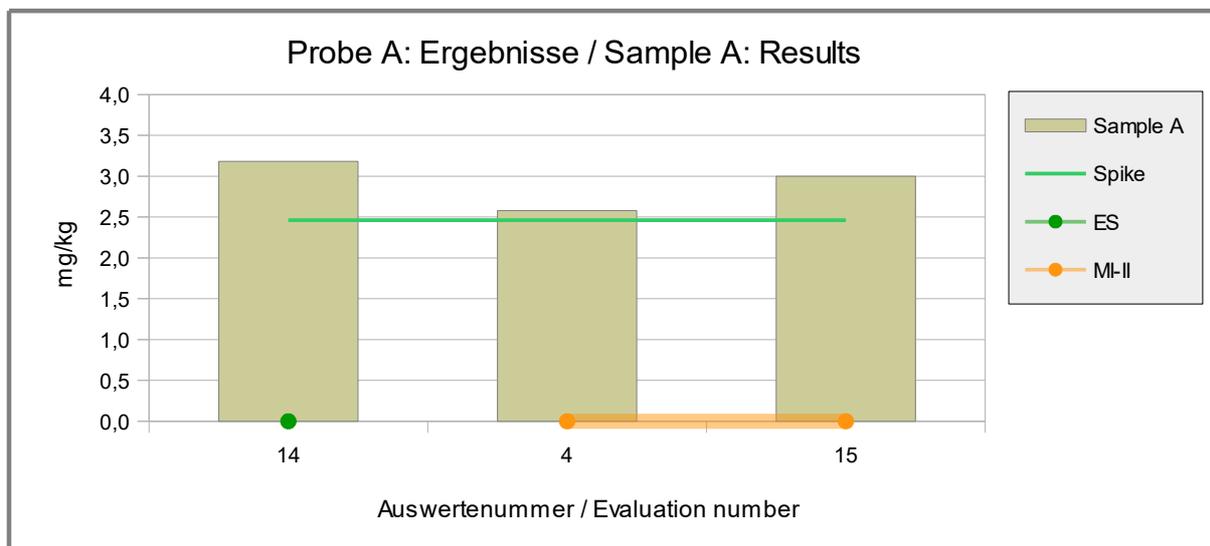


Abb./Fig. 1: ELISA-Ergebnisse Buchweizen (als Protein)
 grüne Linie = Zusatzniveau (Spike)
 runde Symbole = Zuordnung der Methoden (s. Legende)

Quantitative Auswertung ELISA: Dotierungsniveauprobe

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

| Auswertenummer | Buchweizen pos/neg | Buchweizen [mg/kg] | z-Score X _{p_tALL} | Methode | Hinweis |
|----------------|-----------------------|-----------------------|--|---------|---------|
| 14 | positiv | 7,49 | | ES | |
| 4 | positiv | 1,89 | | MI-II | |
| 15 | positiv | 2,50 | | MI-II | |

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

Methoden:

ES = ELISA-Systems

MI-II = Morinaga Institute ELISA Kit II

Anmerkung:

Für die Dotierungsniveauprobe wurden 100% positive Ergebnisse erhalten.

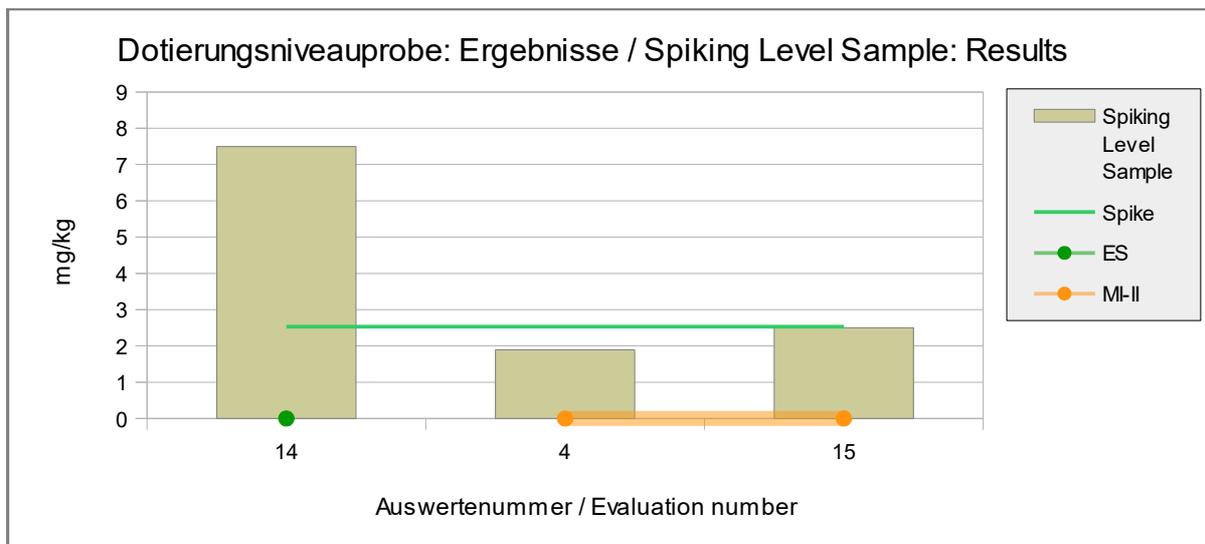


Abb./Fig. 2: ELISA-Ergebnisse Buchweizen (als Protein)
 grüne Linie = Zusatzniveau (Spike)
 runde Symbole = Zuordnung der Methoden (s. Legende)

**Wiederfindungsraten mit z-Scores ELISA für Buchweizen (Protein):
Dotierungsniveauprobe und Probe A**

| Auswertenummer | Dotierungsniveauprobe | Wiederfindungsrate* | | Probe A | Wiederfindungsrate* | | Methode | Hinweis |
|----------------|-----------------------|---------------------|--------------------|----------|---------------------|--------------------|---------|---------|
| | [m g/kg] | [%] | [Z _{RR}] | [m g/kg] | [%] | [Z _{RR}] | | |
| 14 | 7,49 | 296 | 7,8 | 3,18 | 129 | 1,2 | ES | |
| 4 | 1,89 | 74,7 | -1,0 | 2,58 | 105 | 0,20 | MI-II | |
| 15 | 2,50 | 98,8 | -0,05 | 3,00 | 122 | 0,88 | MI-II | |

| AB** | 50-150 % | AB** | 50-150 % |
|---------------|-----------|---------------|------------|
| Anzahl im AB | 2 | Anzahl im AB | 3 |
| Prozent im AB | 67 | Prozent im AB | 100 |

Methoden:

ES = ELISA-Systeme

MI-II = Morinaga Institute ELISA Kit II

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

** Akzeptanzbereich der AOAC für Allergen-ELISAs

Anmerkung:

Zwei von drei Teilnehmern haben mit der Dotierungsniveauprobe mittels ELISA eine Wiederfindungsrate im Bereich der AOAC-Anforderung von 50-150% erhalten. Für die dotierte Lebensmittelmatrix-Probe A lagen alle drei Wiederfindungsraten in diesem Akzeptanzbereich.

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

4.1.2 PCR-Ergebnisse: Buchweizen

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 | 14,6 | negativ | | 2/2 (100%) | SFA | |
| 10 | positiv | | negativ | | 2/2 (100%) | SFA-ID | |
| 14 | positiv | 17,4 | negativ | <1 | 2/2 (100%) | SFA-ID | |
| 15 | positiv | | negativ | | 2/2 (100%) | div | |

| | Probe A | Probe B |
|-----------------|---------|---------|
| Anzahl positiv | 4 | 0 |
| Anzahl negativ | 0 | 4 |
| Prozent positiv | 100 | 0 |
| Prozent negativ | 0 | 100 |
| Konsenswert | positiv | negativ |

Methoden:

SFA = Sure Food ALLERGEN, R-Biopharm / Congen
 SFA-ID = Sure Food Allergen ID, R-Biopharm / Congen
 div = keine genaue Angabe / andere Methode

Anmerkung:

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

Quantitative Auswertung PCR: Probe A

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

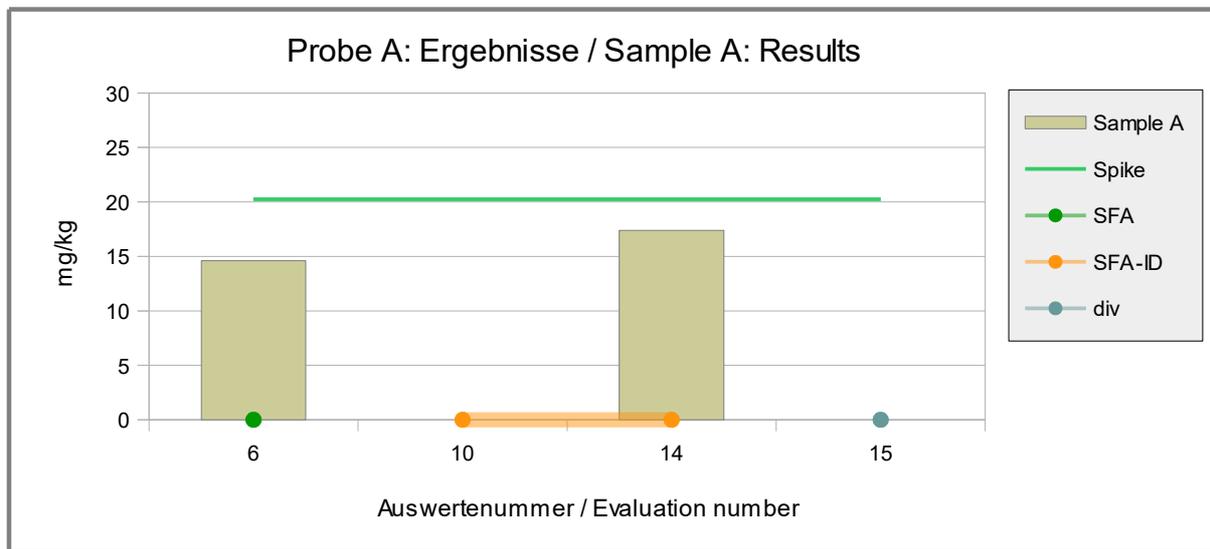


Abb./Fig. 3: PCR-Ergebnisse Buchweizen
 grüne Linie = Zusatzniveau (Spike)
 runde Symbole = Zuordnung der Methoden (s. Legende)

Quantitative Auswertung PCR: Dotierungsniveauprobe

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

| Auswertenummer | Buchweizen pos/neg | Buchweizen [mg/kg] | z-Score X _{pt} _{ALL} | Methode | Hinweis |
|----------------|-----------------------|-----------------------|---|---------|---------|
| 6 | positiv | 9,00 | | SFA | |
| 10 | positiv | | | SFA-ID | |
| 14 | positiv | 20,3 | | SFA-ID | |
| 15 | positiv | | | div | |

| | |
|-----------------|---------|
| Anzahl positiv | 4 |
| Anzahl negativ | 0 |
| Prozent positiv | 100 |
| Prozent negativ | 0 |
| Konsenswert | positiv |

Methoden:

SFA = Sure Food ALLERGEN, R-Biopharm / Congen
 SFA-ID = Sure Food Allergen ID, R-Biopharm / Congen
 div = keine genaue Angabe / andere Methode

Anmerkung:

Für die Dotierungsniveauprobe wurden 100% positive Ergebnisse erhalten.

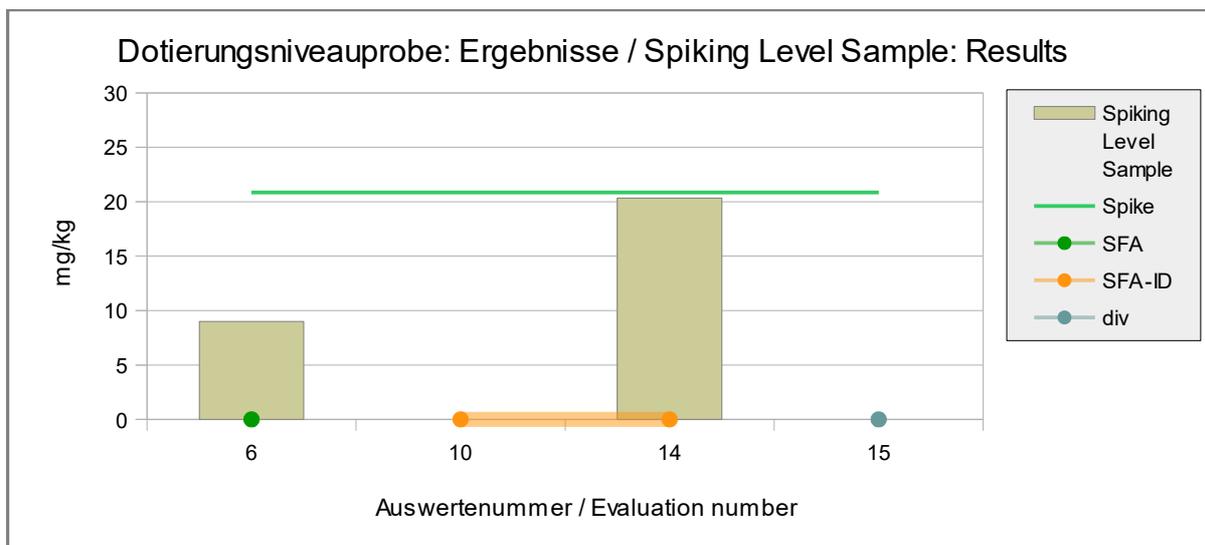


Abb./Fig. 4: PCR-Ergebnisse Buchweizen
 grüne Linie = Zusatzniveau (Spike)
 runde Symbole = Zuordnung der Methoden (s. Legende)

**Wiederfindungsraten mit z-Scores PCR für Buchweizen:
Dotierungsniveauprobe und Probe A**

| Auswertenummer | Dotierungsniveauprobe | Wiederfindungsrate* | | Probe A | Wiederfindungsrate* | | Methode | Hinweis |
|----------------|-----------------------|---------------------|--------------------|---------|---------------------|--------------------|---------|------------------------|
| | [mg/kg] | [%] | [Z _{RR}] | [mg/kg] | [%] | [Z _{RR}] | | |
| 6 | 9,00 | 43,2 | -2,3 | 14,6 | 72,1 | -1,1 | SFA | |
| 10 | | | | | | | SFA-ID | |
| 14 | 20,3 | 97,6 | -0,10 | 17,4 | 86,0 | -0,56 | SFA-ID | Ergebnisangabe als DNA |
| 15 | | | | | | | div | |

| AB** | 50-150 % | AB** | 50-150 % |
|---------------|-----------|---------------|------------|
| Anzahl im AB | 1 | Anzahl im AB | 2 |
| Prozent im AB | 50 | Prozent im AB | 100 |

Methoden:

SFA = Sure Food ALLERGEN, R-Biopharm / Congen

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

div = keine genaue Angabe / andere Methode

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

** Akzeptanzbereich der AOAC für Allergen-ELISAs

Anmerkung:

Einer von zwei Teilnehmern hat mit der Dotierungsniveauprobe mittels PCR eine Wiederfindungsrate im Bereich der AOAC-Anforderung von 50-150% erhalten. Für die dotierte Lebensmittelmatrix-Probe A lagen beide Wiederfindungsraten in diesem Akzeptanzbereich.

Da die Ergebnisse von Teilnehmer 14 als DNA angegeben wurden, erfolgte die Berechnung der Wiederfindungsrate bezogen auf Buchweizen unter Vorbehalt rein informativ.

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

4.2 Vergleichsuntersuchung Macadamia

4.2.1 ELISA-Ergebnisse: Macadamia

Qualitative Auswertung der Ergebnisse: Proben A und B

| Auswertenummer | Probe A | Probe A | Probe B | Probe B | Qualitative Bewertung | Methode | Hinweis |
|----------------|---------|---------|---------|---------|-------------------------------------|---------|------------------------|
| | pos/neg | [mg/kg] | pos/neg | [mg/kg] | Übereinstimmungen mit Konsenswerten | | |
| 7 | positiv | 15,6 | negativ | <4,16 | 2/2 (100%) | 3M | Ergebnis umgerechnet ° |
| 12a | positiv | 25,0 | negativ | 0 | 2/2 (100%) | AQ-P | |
| 15 | positiv | 35,0 | negativ | <1 | 2/2 (100%) | AQ-P | |
| 5 | positiv | 18,6 | negativ | <2 | 2/2 (100%) | BF | |
| 11 | positiv | 13,0 | positiv | 3,10 | 1/2 (50%) | BF | |
| 13 | positiv | 16,1 | negativ | <4,0 | 2/2 (100%) | BF | |
| 1 | positiv | 23,9 | negativ | <1 | 2/2 (100%) | IL | |
| 14 | positiv | 15,7 | negativ | <1 | 2/2 (100%) | IL | |
| 2 | positiv | 16,0 | - | | 1/1 (100%) | SP | |
| 16 | positiv | 13,3 | * | 1,00 | 1/1 (100%) | SP | * Probe B: grenzwertig |
| 12b | positiv | | negativ | | 2/2 (100%) | div | Lateral Flow |

° Umrechnung S. 19

| | Probe A | Probe B |
|-----------------|---------|---------|
| Anzahl positiv | 11 | 1 |
| Anzahl negativ | 0 | 8 |
| Prozent positiv | 100 | 11 |
| Prozent negativ | 0 | 89 |
| Konsenswert | positiv | negativ |

Methoden:

3M = 3M Protein ELISA Kit

AQ-P = AgraQuant Plus, RomerLabs

BF = MonoTrace ELISA, BioFront Technologies

IL = Immunolab

SP = SensiSpec ELISA Kit, Eurofins

div = keine genaue Angabe / andere Methode

Anmerkung:

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

Quantitative Auswertung ELISA: Probe A

| Auswertenummer | Macadamia | z-Score X _{pt} ^{ALL} | Methode | Hinweis |
|----------------|-----------|---|---------|------------------------|
| | [mg/kg] | | | |
| 7 | 15,6 | -0,61 | 3M | Ergebnis umgerechnet ° |
| 12a | 25,0 | 1,4 | AQ-P | |
| 15 | 35,0 | 3,6 | AQ-P | |
| 5 | 18,6 | 0,04 | BF | |
| 11 | 13,0 | -1,2 | BF | |
| 13 | 16,1 | -0,50 | BF | |
| 1 | 23,9 | 1,2 | IL | |
| 14 | 15,7 | -0,59 | IL | |
| 2 | 16,0 | -0,53 | SP | |
| 16 | 13,3 | -1,1 | SP | |
| 12b | | | div | Lateral Flow |

° Umrechnung S. 19

Methoden:

- 3M = 3M Protein ELISA Kit
- AQ-P = AgraQuant Plus, RomerLabs
- BF = MonoTrace ELISA, BioFront Technologies
- IL = Immunolab
- SP = SensiSpec ELISA Kit, Eurofins
- div = keine genaue Angabe / andere Methode

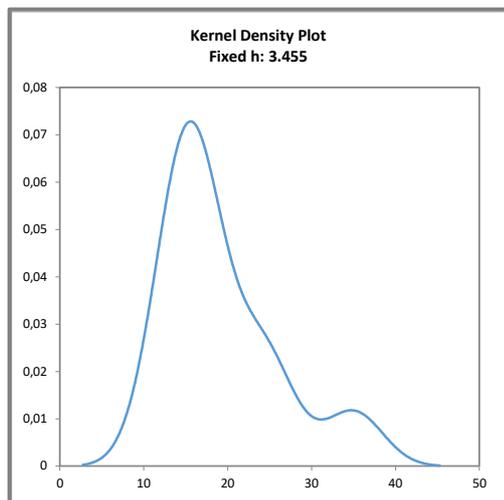


Abb. / Fig. 5:

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 einer leichten Schulter bei etwa > 22 mg/kg (2 höhere Einzelwerte, Methoden AQ-P und IL) und einem Nebenpeak bei ca. 35 mg/kg, der auf ein Teilnehmerergebnis außerhalb des Zielbereichs zurückzuführen ist (Methode AQ-P).

Kenndaten: Quantitative Auswertung ELISA Macadamia**Probe A**

| Kenndaten | Alle Ergebnisse [mg/kg] |
|--|-----------------------------------|
| Zugewiesener Wert (X_{pt}) | X_{pt}^{ALL} |
| Anzahl der Messergebnisse | 10 |
| Anzahl der Ausreißer | 0 |
| Mittelwert | 19,2 |
| Median | 16,1 |
| Robuster Mittelwert (X_{pt}) | 18,4 |
| Robuste Standardabweichung (S^*) | 5,72 |
| <i>Zielkenndaten:</i> | |
| Zielstandardabweichung σ_{pt} | 4,61 |
| Untere Grenze des Zielbereichs | 9,21 |
| Obere Grenze des Zielbereichs | 27,6 |
| Quotient S^*/σ_{pt} | 1,2 |
| Standardunsicherheit $U(X_{pt})$ | 2,26 |
| Ergebnisse im Zielbereich | 9 |
| Prozent im Zielbereich | 90 |

Anmerkungen zu den Kenndaten und Vergleich der Bezugswerte:

Die Kerndichte-Schätzung zeigte annähernd eine symmetrische Verteilung und keine eindeutigen methodenabhängigen Unterschiede.

Die Auswertung der Ergebnisse aller Methoden zeigte eine normale Variabilität der Ergebnisse. Der Quotient S^*/σ_{pt} lag 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 180% vom Zusatzniveau von Macadamia zu Probe A oberhalb der relevanten Anforderungen für die eingesetzten Methoden (s. 3.4.3 und S.34 "Wiederfindungsraten mit z-Scores ELISA für Macadamia").

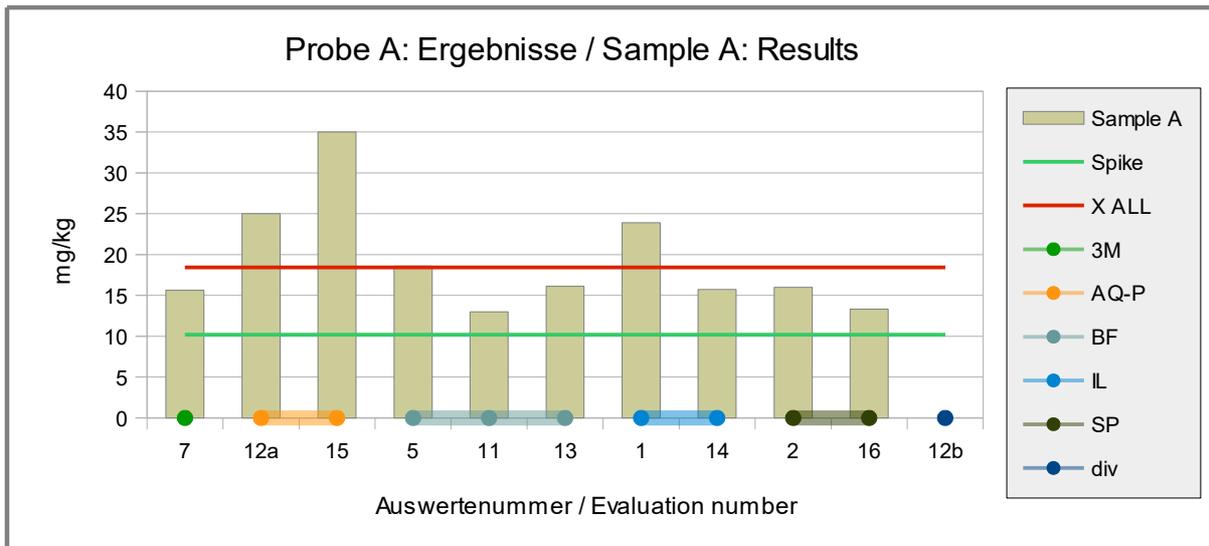


Abb./Fig. 6: ELISA-Ergebnisse Macadamia
 grüne Linie = Zusatzniveau (Spike)
 rote Linie = robuster Mittelwert aller Ergebnisse
 runde Symbole = Zuordnung der Methoden (s. Legende)

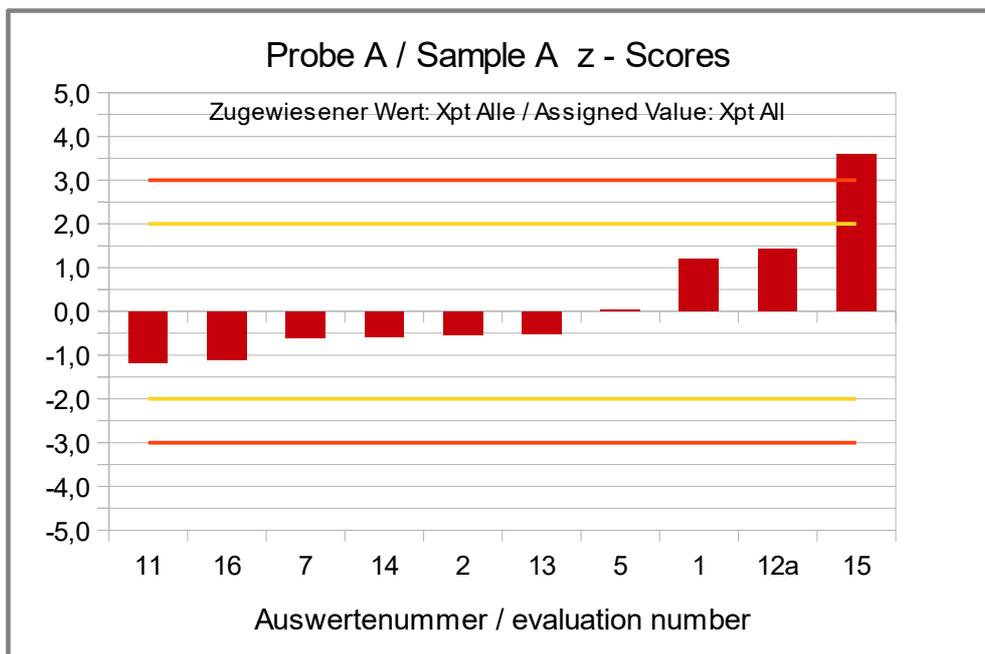


Abb./Fig. 7:
 z-Scores (ELISA-Ergebnisse als Macadamia)
 Zugewiesener Wert: robuster Mittelwert aller Ergebnisse

Quantitative Auswertung ELISA: Dotierungsniveauprobe

| Auswertenummer | Macadamia [mg/kg] | z-Score X_{ptALL} | Methode | Hinweis |
|----------------|----------------------|------------------------|---------|------------------------|
| 7 | 19,5 | -0,19 | 3M | Ergebnis umgerechnet ° |
| 12a | 23,0 | 0,49 | AQ-P | |
| 15 | 34,0 | 2,6 | AQ-P | |
| 5 | | | BF | |
| 11 | 3,10 | -3,4 | BF | |
| 13 | | | BF | |
| 1 | 21,0 | 0,10 | IL | |
| 14 | 18,7 | -0,35 | IL | |
| 2 | 23,0 | 0,49 | SP | |
| 16 | 17,7 | -0,54 | SP | |
| 12b | | | div | Lateral Flow |

° Umrechnung S. 19

Methoden:

3M = 3M Protein ELISA Kit

AQ-P = AgraQuant Plus, RomerLabs

BF = MonoTrace ELISA, BioFront Technologies

IL = Immunolab

SP = SensiSpec ELISA Kit, Eurofins

div = keine genaue Angabe / andere Methode

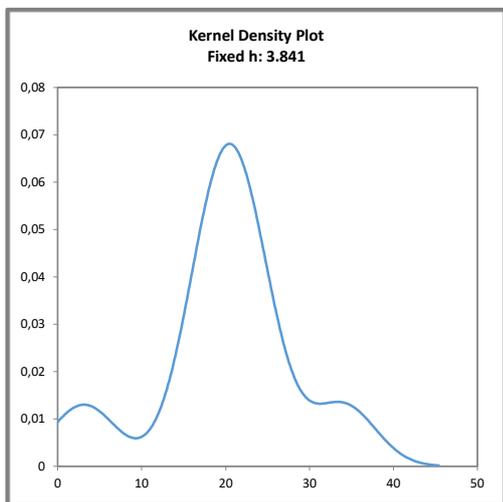


Abb. / Fig. 8:

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

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

Anmerkung:

Die Kerndichte-Schätzung zeigt annähernd eine symmetrische Verteilung der Ergebnisse mit 2 Nebenpeaks außerhalb des Zielbereichs bei ca. 3 mg/kg (Methode BF) und bei 34 mg/kg (Methode AQ-P).

Kenndaten: Quantitative Auswertung ELISA Macadamia**Dotierungsniveauprobe**

| Kenndaten | Alle Ergebnisse [mg/kg] |
|--|-----------------------------------|
| Zugewiesener Wert (X_{pt}) | X_{pt_ALL} |
| Anzahl der Messergebnisse | 8 |
| Anzahl der Ausreißer | - |
| Mittelwert | 20,0 |
| Median | 20,3 |
| Robuster Mittelwert (X_{pt}) | 20,5 |
| Robuste Standardabweichung (S^*) | 5,10 |
| Zielkenndaten: | |
| Zielstandardabweichung σ_{pt} | 5,12 |
| Untere Grenze des Zielbereichs | 10,2 |
| Obere Grenze des Zielbereichs | 30,7 |
| Quotient S^*/σ_{pt} | 1,0 |
| Standardunsicherheit $U(X_{pt})$ | 2,26 |
| Ergebnisse im Zielbereich | 6 |
| Prozent im Zielbereich | 75 |

Anmerkungen zu den Kenndaten und Vergleich der Bezugswerte:

Die Kerndichte-Schätzung zeigte annähernd eine symmetrische Verteilung und keine eindeutigen methodenabhängigen Unterschiede.

Die Verteilung der Ergebnisse aller Methoden zeigte eine geringe Variabilität. Der Quotient S^*/σ_{pt} lag bei 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 222% vom Zusatzniveau von Macadamia zur Dotierungsniveauprobe oberhalb der relevanten Anforderungen für die eingesetzten Methoden (s. 3.4.3 und S.34 "Wiederfindungsraten mit z-Scores ELISA für Macadamia").

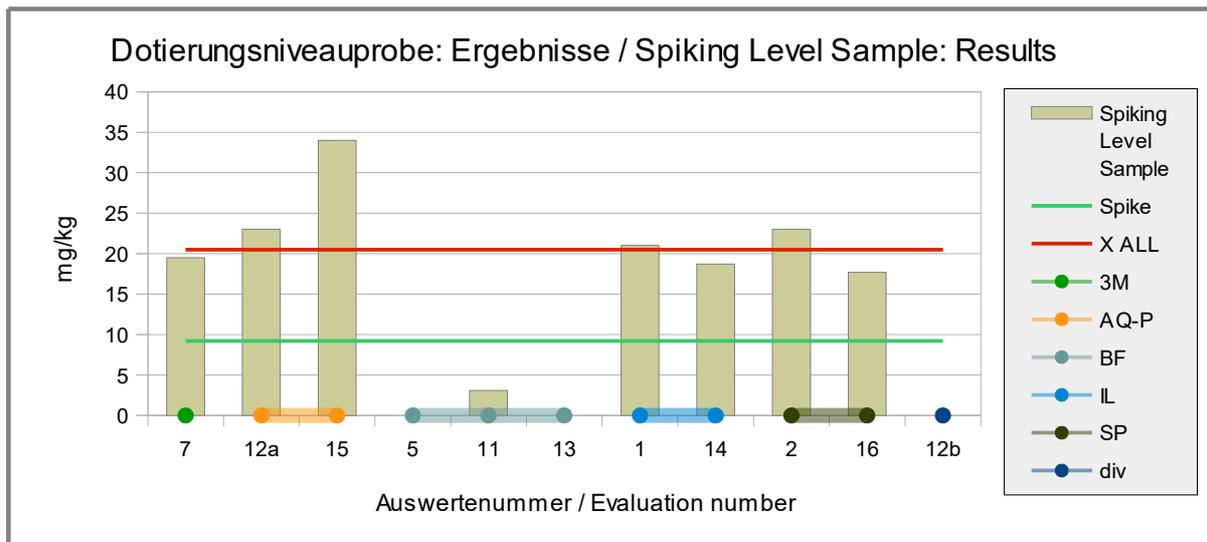


Abb./Fig. 9: ELISA-Ergebnisse Macadamia
 grüne Linie = Zusatzniveau (Spike)
 rote Linie = robuster Mittelwert aller Ergebnisse
 runde Symbole = Zuordnung der Methoden (s. Legende)

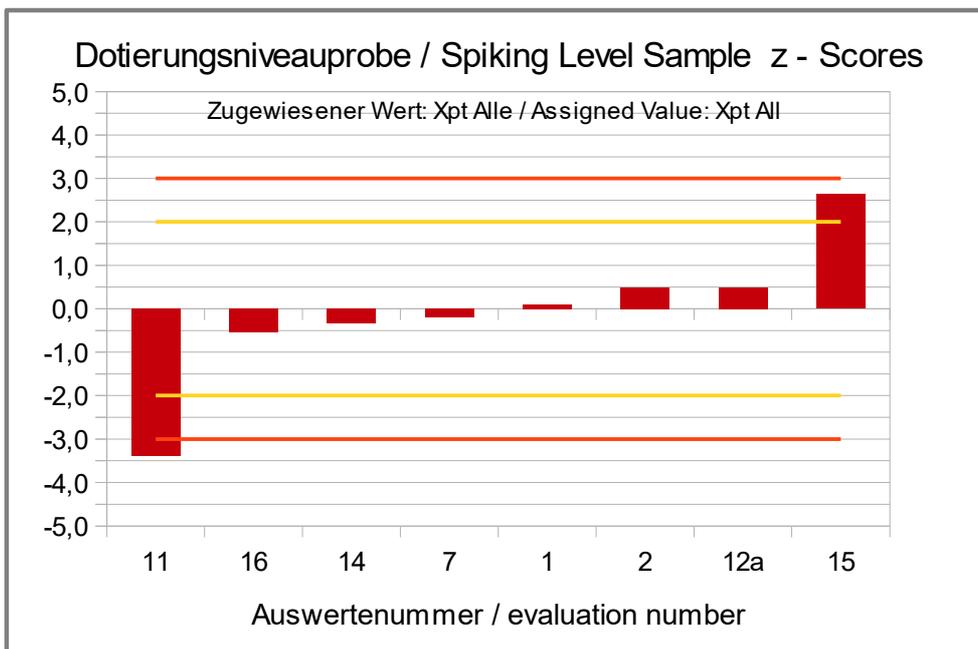


Abb./Fig. 10:
 z-Scores (ELISA-Ergebnisse als Macadamia)
 Zugewiesener Wert: robuster Mittelwert aller Ergebnisse

**Wiederfindungsraten mit z-Scores ELISA für Macadamia:
Dotierungsniveauprobe und Probe A**

| Auswertenummer | Dotierungsniveauprobe | Wiederfindungsrate* | | Probe A | Wiederfindungsrate* | | Methode | Hinweis |
|----------------|-----------------------|---------------------|------------------------|---------|---------------------|------------------------|---------|------------------------|
| | | [mg/kg] | [%] [Z _{RR}] | | [mg/kg] | [%] [Z _{RR}] | | |
| 7 | 19,5 | 211 | 4,5 | 15,6 | 153 | 2,1 | 3M | Ergebnis umgerechnet ° |
| 12a | 23,0 | 249 | 6,0 | 25,0 | 245 | 5,8 | AQ-P | |
| 15 | 34,0 | 369 | 11 | 35,0 | 343 | 9,7 | AQ-P | |
| 5 | | | | 18,6 | 182 | 3,3 | BF | |
| 11 | 3,10 | 33,6 | -2,7 | 13,0 | 127 | 1,1 | BF | |
| 13 | | | | 16,1 | 158 | 2,3 | BF | |
| 1 | 21,0 | 228 | 5,1 | 23,9 | 234 | 5,4 | IL | |
| 14 | 18,7 | 203 | 4,1 | 15,7 | 154 | 2,2 | IL | |
| 2 | 23,0 | 249 | 6,0 | 16,0 | 157 | 2,3 | SP | |
| 16 | 17,7 | 192 | 3,7 | 13,3 | 130 | 1,2 | SP | |
| 12b | | | | | | | div | Lateral Flow |

° Umrechnung S. 19

| AB** | 50-150 % | AB** | 50-150 % |
|---------------|----------|---------------|-----------|
| Anzahl im AB | 0 | Anzahl im AB | 2 |
| Prozent im AB | 0 | Prozent im AB | 20 |

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

** Akzeptanzbereich der AOAC für Allergen-ELISAs

Methoden:

3M = 3M Protein ELISA Kit

AQ-P = AgraQuant Plus, RomerLabs

BF = MonoTrace ELISA, BioFront Technologies

IL = Immunolab

SP = SensiSpec ELISA Kit, Eurofins

div = keine genaue Angabe / andere Methode

Anmerkung:

Keiner der Teilnehmer hat mit der Dotierungsniveauprobe mittels ELISA eine Wiederfindungsrate im Bereich der AOAC-Anforderung von 50-150% erhalten. Mit einer Ausnahme lagen alle Wiederfindungsraten deutlich über 150%. Für die dotierte Lebensmittelmatrix-Probe A lagen 20% (2) der Wiederfindungsraten in diesem Akzeptanzbereich.

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

4.2.2 PCR-Ergebnisse: Macadamia

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 | 4,40 | negativ | | 2/2 (100%) | SFA | |
| 9 | positiv | | negativ | | 2/2 (100%) | SFA | |
| 8 | positiv | | negativ | | 2/2 (100%) | SFA-4p | |
| 3 | positiv | | negativ | | 2/2 (100%) | SFA-ID | |
| 10 | positiv | | negativ | | 2/2 (100%) | SFA-ID | |
| 14 | positiv | 17,0 | negativ | <1 | 2/2 (100%) | SFA-ID | |
| 2 | positiv | | negativ | | 2/2 (100%) | div | |
| 15 | positiv | | negativ | | 2/2 (100%) | div | |

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

Methoden:

SFA = Sure Food ALLERGEN, R-Biopharm / Congen
 SFA-4p = Sure Food Allergen 4plex, R-Biopharm / Congen
 SFA-ID = Sure Food Allergen ID, R-Biopharm / Congen
 div = keine genaue Angabe / andere Methode

Anmerkung:

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

Quantitative Auswertung PCR: Probe A

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

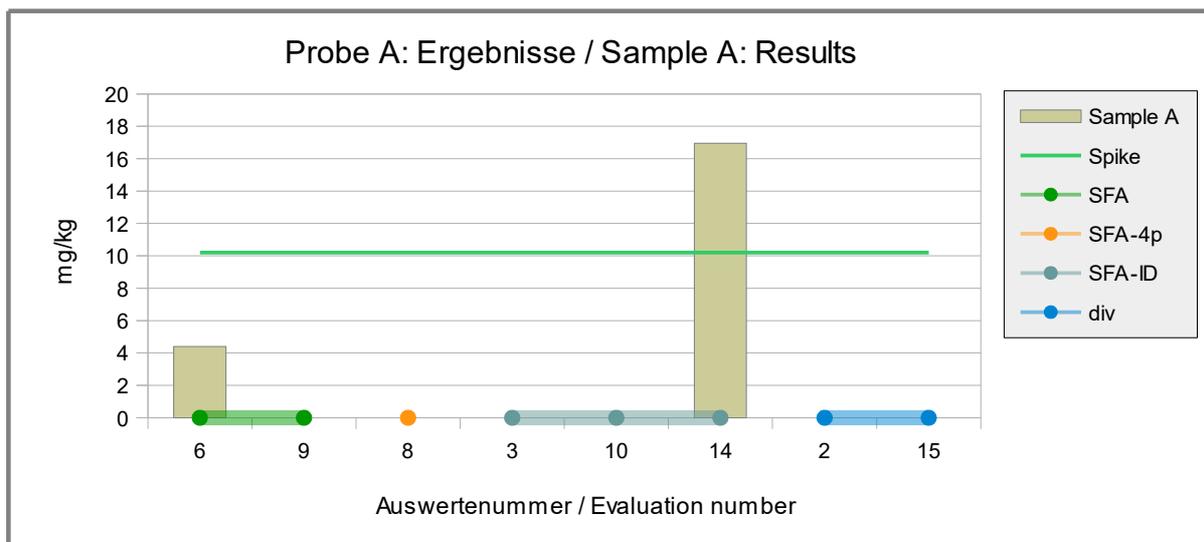


Abb./Fig. 11: PCR-Ergebnisse Macadamia
 grüne Linie = Zusatzniveau (Spike)
 runde Symbole = Zuordnung der Methoden (s. Legende)

Quantitative Auswertung PCR: Dotierungsniveauprobe

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

| Auswertenummer | Macadamia pos/neg | Macadamia [mg/kg] | z-Score Xpt _{ALL} | Methode | Hinweis |
|----------------|----------------------|----------------------|-------------------------------|---------|---------|
| 6 | positiv | 1,40 | | SFA | |
| 9 | positiv | | | SFA | |
| 8 | positiv | | | SFA-4p | |
| 3 | positiv | | | SFA-ID | |
| 10 | positiv | | | SFA-ID | |
| 14 | positiv | 6,52 | | SFA-ID | |
| 2 | positiv | | | div | |
| 15 | positiv | | | div | |

| | |
|-----------------|---------|
| Anzahl positiv | 8 |
| Anzahl negativ | 0 |
| Prozent positiv | 100 |
| Prozent negativ | 0 |
| Konsenswert | positiv |

Methoden:

SFA = Sure Food ALLERGEN, R-Biopharm / Congen
 SFA-4p = Sure Food Allergen 4plex, R-Biopharm / Congen
 SFA-ID = Sure Food Allergen ID, R-Biopharm / Congen
 div = keine genaue Angabe / andere Methode

Anmerkung:

Für die Dotierungsniveauprobe wurden 100% positive Ergebnisse erhalten.

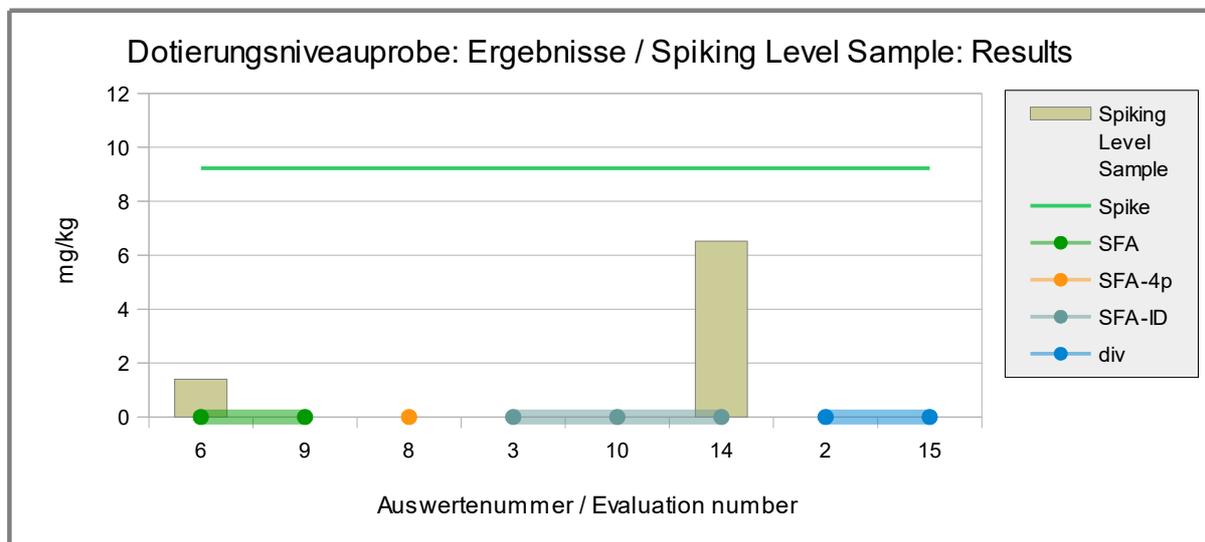


Abb./Fig. 12: PCR-Ergebnisse Macadamia
 grüne Linie = Zusatzniveau (Spike)
 runde Symbole = Zuordnung der Methoden (s. Legende)

**Wiederfindungsraten mit z-Scores PCR für Macadamia:
Dotierungsniveauprobe und Probe A**

| Auswertenummer | Dotierungsniveauprobe | Wiederfindungsrate* | | Probe A | Wiederfindungsrate* | | Methode | Hinweis |
|----------------|-----------------------|---------------------|--------------------|---------|---------------------|--------------------|---------|------------------------|
| | [mg/kg] | [%] | [Z _{RR}] | [mg/kg] | [%] | [Z _{RR}] | | |
| 6 | 1,40 | 15,2 | -3,4 | 4,40 | 43,1 | -2,3 | SFA | |
| 9 | | | | | | | SFA | |
| 8 | | | | | | | SFA-4p | |
| 3 | | | | | | | SFA-ID | |
| 10 | | | | | | | SFA-ID | |
| 14 | 6,52 | 70,7 | -1,2 | 17,0 | 166 | 2,6 | SFA-ID | Ergebnisangabe als DNA |
| 2 | | | | | | | div | |
| 15 | | | | | | | div | |

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

Methoden:

SFA = Sure Food ALLERGEN, R-Biopharm / Congen
SFA-4p = Sure Food Allergen 4plex, R-Biopharm / Congen
SFA-ID = Sure Food Allergen ID, R-Biopharm / Congen
div = keine genaue Angabe / andere Methode

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

** Akzeptanzbereich der AOAC für Allergen-ELISAs

Anmerkung:

Ein (50%) Teilnehmer hat mit der Dotierungsniveauprobe mittels PCR eine Wiederfindungsrate im Bereich der AOAC-Anforderung von 50-150% erhalten. Für die dotierte Lebensmittelmatrix-Probe A lag keine der Wiederfindungsraten in diesem Akzeptanzbereich.

Da die Ergebnisse von Teilnehmer 14 als DNA angegeben wurden, erfolgte die Berechnung der Wiederfindungsrate bezogen auf Macadamia unter Vorbehalt rein informativ.

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

4.3 Vergleichsuntersuchung Mandel

4.3.1 ELISA-Ergebnisse: Mandel

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 | | |
| 12a | positiv | 13,0 | negativ | 0 | 2/2 (100%) | AQ-P | |
| 14a | positiv | 5,48 | negativ | <0.5 | 2/2 (100%) | BC | |
| 5 | positiv | 10,3 | negativ | <1 | 2/2 (100%) | BF | |
| 11 | positiv | 9,00 | negativ | <2,37 | 2/2 (100%) | ES | Ergebnis umgerechnet ° |
| 1 | positiv | 5,90 | negativ | <0,4 | 2/2 (100%) | IL | |
| 4 | positiv | 9,69 | negativ | | 2/2 (100%) | RS-F | |
| 9 | positiv | 17,6 | negativ | < BG | 2/2 (100%) | RS-F | |
| 14b | positiv | 14,4 | negativ | <2.5 | 2/2 (100%) | RS-F | |
| 15a | positiv | 7,00 | negativ | <2.5 | 2/2 (100%) | RS-F | |
| 2 | positiv | 6,50 | negativ | <0,4 | 2/2 (100%) | SP | |
| 16 | positiv | 9,50 | negativ | < 0.2 | 2/2 (100%) | SP | |
| 7 | positiv | 6,59 | negativ | <2,5 | 2/2 (100%) | VT | |
| 13 | positiv | 11,4 | negativ | <2.5 | 2/2 (100%) | VT | |
| 15b | positiv | 8,00 | negativ | <2.5 | 2/2 (100%) | VT | |
| 12b | positiv | | negativ | | 2/2 (100%) | div | Lateral Flow |

° Umrechnung S. 19

| | Probe A | Probe B |
|-----------------|---------|---------|
| Anzahl positiv | 15 | 0 |
| Anzahl negativ | 0 | 15 |
| Prozent positiv | 100 | 0 |
| Prozent negativ | 0 | 100 |
| Konsenswert | positiv | negativ |

Methoden:

- AQ-P = AgraQuant Plus, RomerLabs
- BC = BioCheck ELISA
- BF = MonoTrace ELISA, BioFront Technologies
- ES = ELISA-Systems
- IL = Immunolab
- RS-F= Ridascreen® Fast, R-Biopharm
- SP = SensiSpec ELISA Kit, Eurofins
- VT = Veratox, Neogen
- div = keine genaue Angabe / andere Methode

Anmerkung:

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

Quantitative Auswertung ELISA: Probe A

| Auswertenummer | Mandel [mg/kg] | z-Score X_{ptALL} | Methode | Hinweis |
|----------------|-------------------|------------------------|---------|------------------------|
| 12a | 13,0 | 1,5 | AQ-P | |
| 14a | 5,48 | -1,7 | BC | |
| 5 | 10,3 | 0,39 | BF | |
| 11 | 9,00 | -0,16 | ES | Ergebnis umgerechnet ° |
| 1 | 5,90 | -1,5 | IL | |
| 4 | 9,69 | 0,13 | RS-F | |
| 9 | 17,6 | 3,5 | RS-F | |
| 14b | 14,4 | 2,1 | RS-F | |
| 15a | 7,00 | -1,0 | RS-F | |
| 2 | 6,50 | -1,2 | SP | |
| 16 | 9,50 | 0,05 | SP | |
| 7 | 6,59 | -1,2 | VT | |
| 13 | 11,4 | 0,86 | VT | |
| 15b | 8,00 | -0,59 | VT | |
| 12b | | | div | Lateral Flow |

° Umrechnung S. 19

Methoden:

- AQ-P = AgraQuant Plus, RomerLabs
- BC = BioCheck ELISA
- BF = MonoTrace ELISA, BioFront Technologies
- ES = ELISA-Systems
- IL = Immunolab
- RS-F = Ridascreen® Fast, R-Biopharm
- SP = SensiSpec ELISA Kit, Eurofins
- VT = Veratox, Neogen
- div = keine genaue Angabe / andere Methode

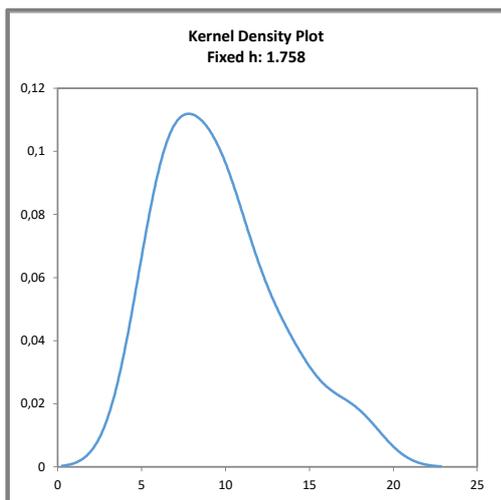


Abb. / Fig. 13:

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

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

Anmerkung:

Die Kerndichte-Schätzung zeigt annähernd eine symmetrische Verteilung der Ergebnisse mit einer leichten Schulter bei ca. > 15 mg/kg, die auf 2 Ergebnisse außerhalb des Zielbereichs zurückzuführen ist (Methode RS-F).

Kenndaten: Quantitative Auswertung ELISA Mandel**Probe A**

| Kenndaten | Alle Ergebnisse [mg/kg] |
|--|-----------------------------------|
| Zugewiesener Wert (X_{pt}) | X_{pt_ALL} |
| Anzahl der Messergebnisse | 14 |
| Anzahl der Ausreißer | 0 |
| Mittelwert | 9,59 |
| Median | 9,25 |
| Robuster Mittelwert (X_{pt}) | 9,38 |
| Robuste Standardabweichung (S^*) | 3,46 |
| <i>Zielkenndaten:</i> | |
| Zielstandardabweichung σ_{pt} | 2,34 |
| Untere Grenze des Zielbereichs | 4,69 |
| Obere Grenze des Zielbereichs | 14,1 |
| Quotient S^*/σ_{pt} | 1,5 |
| Standardunsicherheit $U_{(X_{pt})}$ | 1,15 |
| Ergebnisse im Zielbereich | 12 |
| Prozent im Zielbereich | 86 |

Anmerkungen zu den Kenndaten und Vergleich der Bezugswerte:

Die Kerndichte-Schätzung zeigte annähernd eine symmetrische Verteilung und keine eindeutigen methodenabhängigen Unterschiede.

Die Auswertung der Ergebnisse aller Methoden zeigte eine normale Variabilität der Ergebnisse. Der Quotient S^*/σ_{pt} lag 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 vorliegen.

Der robuste Mittelwert der Auswertung lag mit 67% vom Zusatzniveau von Mandel zu Probe A innerhalb der relevanten Anforderungen für die eingesetzten Methoden (s. 3.4.3 und S.45 "Wiederfindungsraten mit z-Scores ELISA für Mandel").

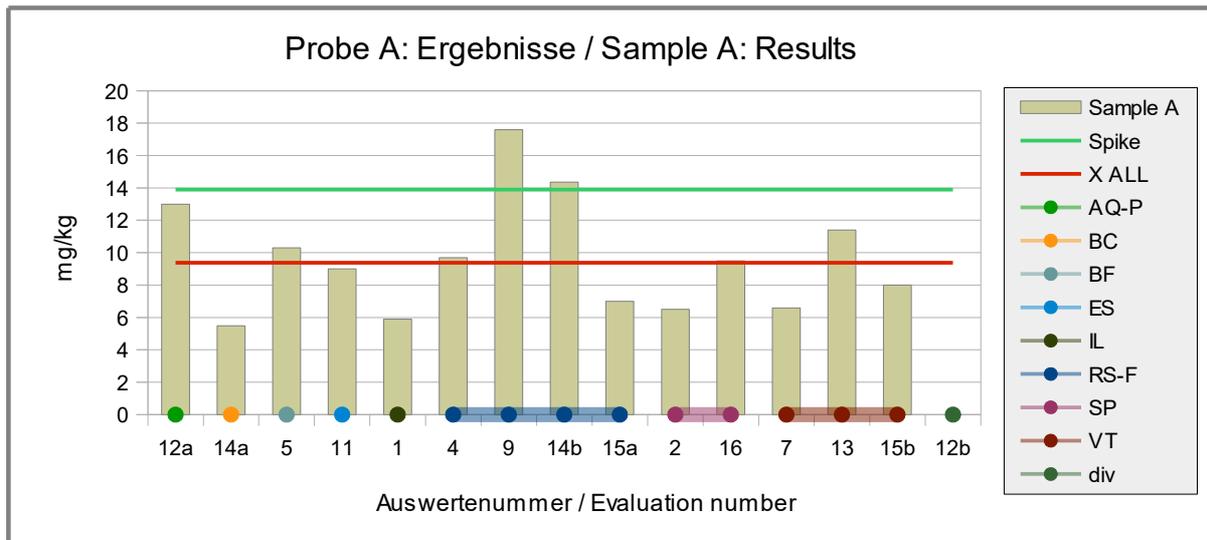


Abb./Fig. 14: ELISA-Ergebnisse Mandel
 grüne Linie = Zusatzniveau (Spike)
 rote Linie = robuster Mittelwert aller Ergebnisse
 runde Symbole = Zuordnung der Methoden (s. Legende)

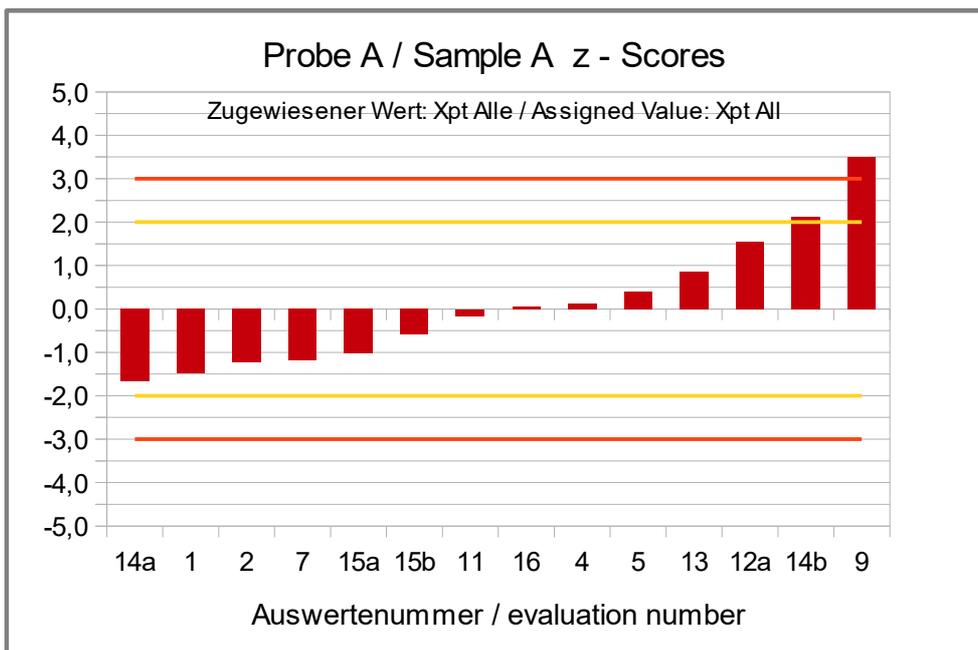


Abb./Fig. 15:
 z-Scores (ELISA-Ergebnisse als Mandel)
 Zugewiesener Wert: robuster Mittelwert aller Ergebnisse

Quantitative Auswertung ELISA: Dotierungsniveauprobe

| Auswertenummer | Mandel | z-Score X_{ptALL} | Methode | Hinweis |
|----------------|---------|------------------------|---------|------------------------|
| | [mg/kg] | | | |
| 12a | 13,0 | 0,32 | AQ-P | |
| 14a | 10,9 | -0,39 | BC | |
| 5 | 16,0 | 1,3 | BF | |
| 11 | 7,58 | -1,5 | ES | Ergebnis umgerechnet ° |
| 1 | 9,20 | -0,94 | IL | |
| 4 | 11,2 | -0,28 | RS-F | |
| 9 | 17,8 | 1,9 | RS-F | |
| 14b | 17,4 | 1,8 | RS-F | |
| 15a | 14,0 | 0,65 | RS-F | |
| 2 | 9,60 | -0,81 | SP | |
| 16 | 11,5 | -0,18 | SP | |
| 7 | 11,0 | -0,36 | VT | |
| 13 | 9,20 | -0,94 | VT | |
| 15b | 11,0 | -0,35 | VT | |
| 12b | | | div | Lateral Flow |

° Umrechnung S. 19

Methoden:

- AQ-P = AgraQuant Plus, RomerLabs
- BC = BioCheck ELISA
- BF = MonoTrace ELISA, BioFront Technologies
- ES = ELISA-Systems
- IL = Immunolab
- RS-F= Ridascreen® Fast, R-Biopharm
- SP = SensiSpec ELISA Kit, Eurofins
- VT = Veratox, Neogen
- div = keine genaue Angabe / andere Methode

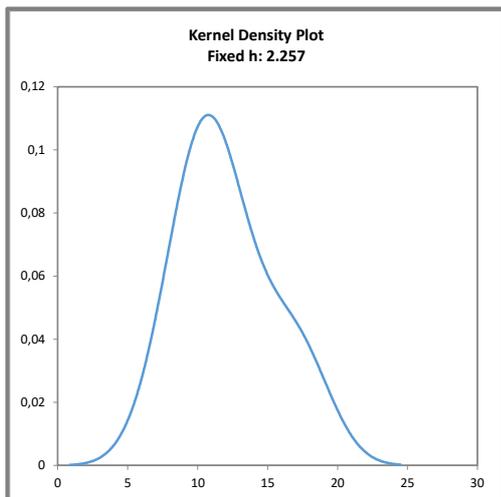


Abb. / Fig. 16:

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

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

Anmerkung:

Die Kerndichte-Schätzung zeigt annähernd eine symmetrische Verteilung der Ergebnisse mit einer leichten Schulter bei ca. > 15 mg/kg, die auf 2 höhere Einzelwerte mit der Methode RS-F zurückzuführen ist.

Kenndaten: Quantitative Auswertung ELISA Mandel**Dotierungsniveauprobe**

| Kenndaten | Alle Ergebnisse [mg/kg] |
|--|-----------------------------------|
| Zugewiesener Wert (X_{pt}) | X_{pt_ALL} |
| Anzahl der Messergebnisse | 14 |
| Anzahl der Ausreißer | 0 |
| Mittelwert | 12,1 |
| Median | 11,1 |
| Robuster Mittelwert (X_{pt}) | 12,0 |
| Robuste Standardabweichung (S^*) | 3,45 |
| Zielkenndaten: | |
| Zielstandardabweichung σ_{pt} | 3,01 |
| Untere Grenze des Zielbereichs | 6,02 |
| Obere Grenze des Zielbereichs | 18,1 |
| Quotient S^*/σ_{pt} | 1,1 |
| Standardunsicherheit $U(X_{pt})$ | 1,15 |
| Ergebnisse im Zielbereich | 14 |
| Prozent im Zielbereich | 100 |

Anmerkungen zu den Kenndaten und Vergleich der Bezugswerte:

Die Kerndichte-Schätzung zeigte annähernd eine symmetrische Verteilung und keine eindeutigen methodenabhängigen Unterschiede.

Die Verteilung der Ergebnisse aller Methoden zeigte eine normale Variabilität. Der Quotient S^*/σ_{pt} lag 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 77% vom Zusatzniveau von Mandel zur Dotierungsniveauprobe innerhalb der relevanten Anforderungen für die eingesetzten Methoden (s. 3.4.3 und S.45 "Wiederfindungsraten mit z-Scores ELISA für Mandel").

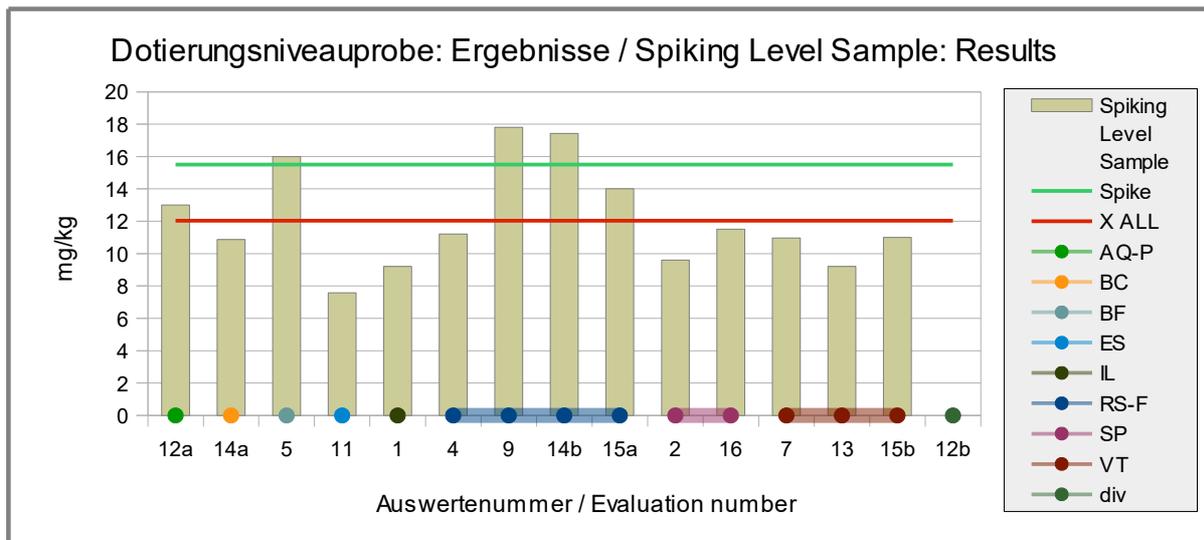


Abb./Fig. 17: ELISA-Ergebnisse Mandel
 grüne Linie = Zusatzniveau (Spike)
 rote Linie = robuster Mittelwert aller Ergebnisse
 runde Symbole = Zuordnung der Methoden (s. Legende)

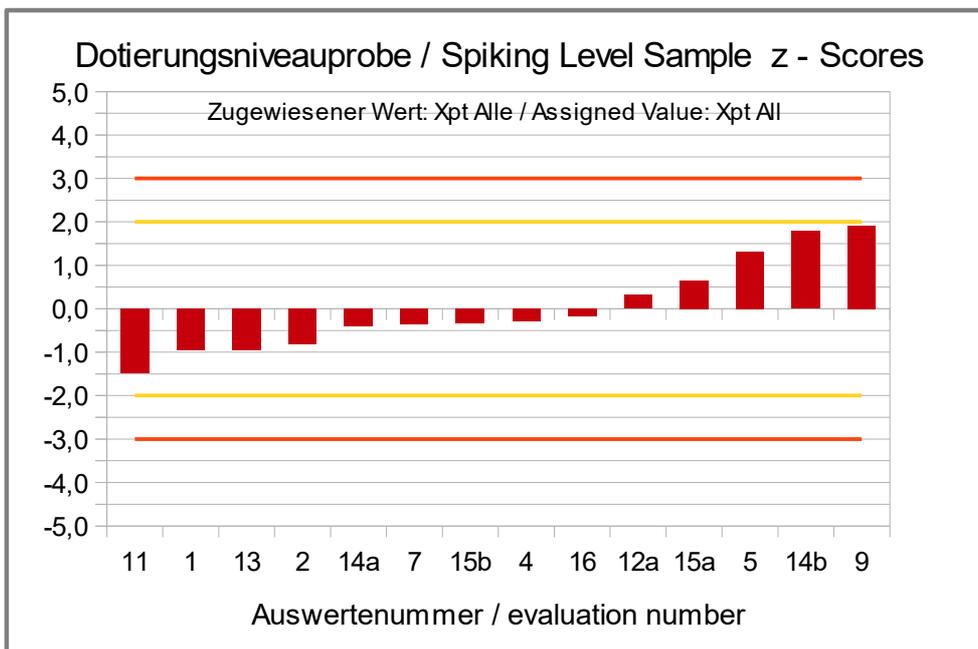


Abb./Fig. 18:
 z-Scores (ELISA-Ergebnisse als Mandel)
 Zugewiesener Wert: robuster Mittelwert aller Ergebnisse

**Wiederfindungsraten mit z-Scores ELISA für Mandel:
Dotierungsniveauprobe und Probe A**

| Auswertenummer | Dotierungsniveauprobe | Wiederfindungsrate* | | Probe A | Wiederfindungsrate* | | Methode | Hinweis |
|----------------|-----------------------|---------------------|--------------------|---------|---------------------|--------------------|---------|------------------------|
| | [mg/kg] | [%] | [Z _{RR}] | [mg/kg] | [%] | [Z _{RR}] | | |
| 12a | 13,0 | 83,9 | -0,65 | 13,0 | 93,5 | -0,26 | AQ-P | |
| 14a | 10,9 | 70,1 | -1,2 | 5,48 | 39,4 | -2,4 | BC | |
| 5 | 16,0 | 103 | 0,13 | 10,3 | 74,1 | -1,0 | BF | |
| 11 | 7,58 | 48,9 | -2,0 | 9,00 | 64,7 | -1,4 | ES | Ergebnis umgerechnet ° |
| 1 | 9,20 | 59,4 | -1,6 | 5,90 | 42,4 | -2,3 | IL | |
| 4 | 11,2 | 72,3 | -1,1 | 9,69 | 69,7 | -1,2 | RS-F | |
| 9 | 17,8 | 115 | 0,59 | 17,6 | 127 | 1,1 | RS-F | |
| 14b | 17,4 | 112 | 0,50 | 14,4 | 103 | 0,13 | RS-F | |
| 15a | 14,0 | 90,3 | -0,39 | 7,00 | 50,4 | -2,0 | RS-F | |
| 2 | 9,60 | 61,9 | -1,5 | 6,50 | 46,8 | -2,1 | SP | |
| 16 | 11,5 | 74,2 | -1,0 | 9,50 | 68,3 | -1,3 | SP | |
| 7 | 11,0 | 70,7 | -1,2 | 6,59 | 47,4 | -2,1 | VT | |
| 13 | 9,20 | 59,4 | -1,6 | 11,4 | 82,0 | -0,72 | VT | |
| 15b | 11,0 | 71,0 | -1,2 | 8,00 | 57,6 | -1,7 | VT | |
| 12b | | | | | | | div | Lateral Flow |

° Umrechnung S. 19

| AB** | 50-150 % | AB** | 50-150 % |
|---------------|-----------|---------------|-----------|
| Anzahl im AB | 13 | Anzahl im AB | 10 |
| Prozent im AB | 93 | Prozent im AB | 71 |

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

** Akzeptanzbereich der AOAC für Allergen-ELISAs

Methoden:

AQ-P = AgraQuant Plus, RomerLabs

BC = BioCheck ELISA

BF = MonoTrace ELISA, BioFront Technologies

ES = ELISA-Systems

IL = Immunolab

RS-F = RidascreeN® Fast, R-Biopharm

SP = SensiSpec ELISA Kit, Eurofins

VT = Veratox, Neogen

div = keine genaue Angabe / andere Methode

Anmerkung:

93% (13) der Teilnehmer haben mit der Dotierungsniveauprobe mittels ELISA eine Wiederfindungsrate im Bereich der AOAC-Anforderung von 50-150% erhalten. Für die dotierte Lebensmittelmatrix-Probe A lagen 71% (10) der Wiederfindungsraten in diesem Akzeptanzbereich.

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

4.3.2 PCR-Ergebnisse: Mandel

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 | 1,00 | negativ | | 2/2 (100%) | SFA | |
| 9 | positiv | | negativ | | 2/2 (100%) | SFA | |
| 3 | positiv | | negativ | | 2/2 (100%) | SFA-ID | |
| 5 | positiv | >0,4 | negativ | <0,4 | 2/2 (100%) | SFA-ID | |
| 10 | positiv | | negativ | | 2/2 (100%) | SFA-ID | |
| 14 | positiv | 1,57 | negativ | <1 | 2/2 (100%) | SFA-ID | |
| 8 | negativ | | negativ | | 1/2 (50%) | div | keine Positivprobe identifiziert |
| 15 | negativ | | negativ | | 1/2 (50%) | div | keine Positivprobe identifiziert |

| | Probe A | Probe B |
|-----------------|---------|---------|
| Anzahl positiv | 6 | 0 |
| Anzahl negativ | 2 | 8 |
| Prozent positiv | 75 | 0 |
| Prozent negativ | 25 | 100 |
| Konsenswert | positiv | negativ |

Methoden:

SFA = Sure Food ALLERGEN, R-Biopharm / Congen
 SFA-ID = Sure Food Allergen ID, R-Biopharm / Congen
 div = keine genaue Angabe / andere Methode

Anmerkung:

Die Konsenswerte stehen in qualitativer Übereinstimmung mit der Dotierung von Probe A. Es wurden 2 negative Ergebnisse für Probe A erhalten.

Quantitative Auswertung PCR: Probe A

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

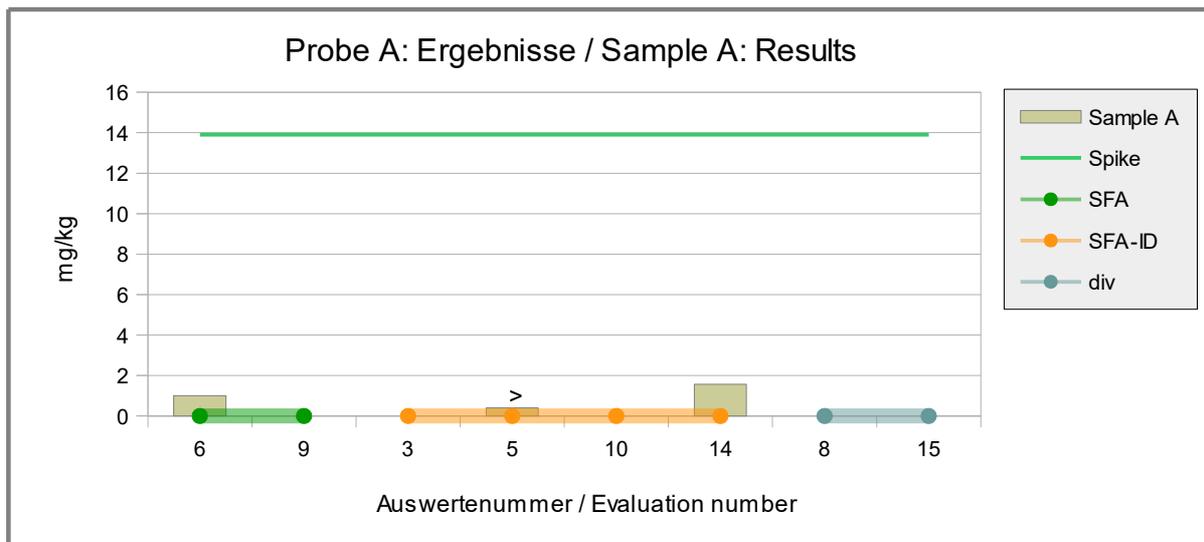


Abb./Fig. 19: PCR-Ergebnisse Mandel
 grüne Linie = Zusatzniveau (Spike)
 runde Symbole = Zuordnung der Methoden (s. Legende)

Quantitative Auswertung PCR: Dotierungsniveauprobe

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

| Auswertenummer | Mandel pos/neg | Mandel [mg/kg] | z-Score Xpt _{ALL} | Methode | Hinweis |
|----------------|-------------------|-------------------|-------------------------------|---------|----------------------------------|
| 6 | positiv | 1,00 | | SFA | |
| 9 | positiv | | | SFA | |
| 3 | positiv | | | SFA-ID | |
| 5 | positiv | >0,4 | | SFA-ID | |
| 10 | positiv | | | SFA-ID | |
| 14 | positiv | 1,31 | | SFA-ID | |
| 8 | negativ | | | div | keine Positivprobe identifiziert |
| 15 | negativ | | | div | keine Positivprobe identifiziert |

| | |
|-----------------|---------|
| Anzahl positiv | 6 |
| Anzahl negativ | 2 |
| Prozent positiv | 75 |
| Prozent negativ | 25 |
| Konsenswert | positiv |

Methoden:

SFA = Sure Food ALLERGEN, R-Biopharm / Congen
 SFA-ID = Sure Food Allergen ID, R-Biopharm / Congen
 div = keine genaue Angabe / andere Methode

Anmerkung:

Für die Dotierungsniveauprobe wurden 75% positive Ergebnisse erhalten.

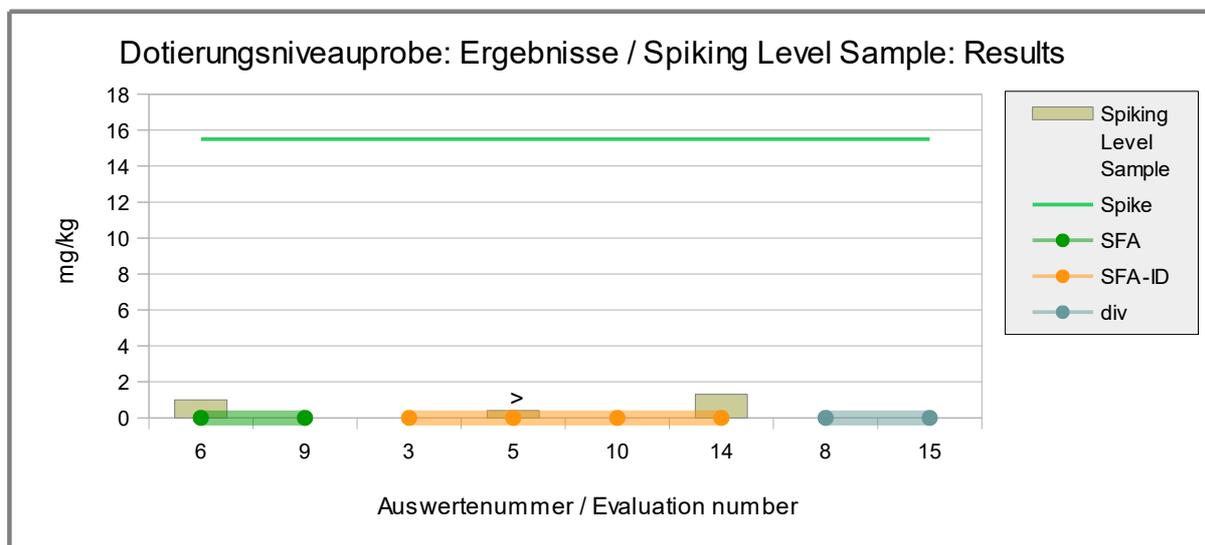


Abb./Fig. 20:

PCR-Ergebnisse Mandel
 grüne Linie = Zusatzniveau (Spike)
 runde Symbole = Zuordnung der Methoden (s. Legende)

**Wiederfindungsraten mit z-Scores PCR für Mandel:
Dotierungsniveauprobe und Probe A**

| Auswertenummer | Dotierungsniveauprobe | Wiederfindungsrate* | | Probe A | Wiederfindungsrate* | | Methode | Hinweis |
|----------------|-----------------------|---------------------|--------------------|---------|---------------------|--------------------|---------|------------------------|
| | [mg/kg] | [%] | [Z _{RR}] | [mg/kg] | [%] | [Z _{RR}] | | |
| 6 | 1,00 | 6,45 | -3,7 | 1,00 | 7,19 | -3,7 | SFA | |
| 9 | | | | | | | SFA | |
| 3 | | | | | | | SFA-ID | |
| 5 | >0,4 | | | >0,4 | | | SFA-ID | |
| 10 | | | | | | | SFA-ID | |
| 14 | 1,31 | 8,45 | -3,7 | 1,57 | 11,3 | -3,5 | SFA-ID | Ergebnisangabe als DNA |
| 8 | | | | | | | div | |
| 15 | | | | | | | div | |

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

Methoden:

SFA = Sure Food ALLERGEN, R-Biopharm / Congen
 SFA-ID = Sure Food Allergen ID, R-Biopharm / Congen
 div = keine genaue Angabe / andere Methode

* Wiederfindungsrate 100% Bezugsgröße: Mandel, s. Seite 5
 ** Akzeptanzbereich der AOAC für Allergen-ELISAs

Anmerkung:

Keiner der Teilnehmer hat mit der Dotierungsniveauprobe oder der dotierten Lebensmittelmatrix-Probe A mittels PCR eine Wiederfindungsrate im Bereich der AOAC-Anforderung von 50-150% erhalten. Da die Ergebnisse von Teilnehmer 14 als DNA angegeben wurden, erfolgte die Berechnung der Wiederfindungsrate bezogen auf Mandel unter Vorbehalt rein informativ. Die zugehörigen z-Scores basieren auf der Zielstandardabweichung von 25%.

4.4 z-Scores der Teilnehmer: Übersichtstabelle

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

| Auswertenummer | ELISA Macadamia: Xpt (div. Methoden) | | ELISA Mandel: Xpt (div. Methoden) | |
|----------------|---|------------|--------------------------------------|------------|
| | Probe A | Dot. Probe | Probe A | Dot. Probe |
| 1 | 1,2 | 0,10 | -1,5 | -0,94 |
| 2 | -0,53 | 0,49 | -1,2 | -0,81 |
| 3 | | | | |
| 4 | | | 0,13 | -0,28 |
| 5 | 0,04 | | 0,39 | 1,3 |
| 6 | | | | |
| 7 | -0,61 | -0,19 | -1,2 | -0,36 |
| 8 | | | | |
| 9 | | | 3,5 | 1,9 |
| 10 | | | | |
| 11 | -1,2 | -3,4 | -0,16 | -1,5 |
| 12 / 12a | 1,4 | 0,49 | 1,5 | 0,32 |
| 12b | | | | |
| 13 | -0,50 | | 0,86 | -0,94 |
| 14 / 14a | -0,59 | -0,35 | -1,7 | -0,39 |
| 14b | | | 2,1 | 1,8 |
| 15 / 15a | 3,6 | 2,6 | -1,0 | 0,65 |
| 15b | | | -0,59 | -0,35 |
| 16 | -1,1 | -0,54 | 0,05 | -0,18 |

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 Buchweizen (als Protein): Xpt (Zusatz) | | ELISA Macadamia: Xpt (Zusatz) | | ELISA Mandel: Xpt (Zusatz) | | PCR Buchweizen: Xpt (Zusatz) | | PCR Macadamia: Xpt (Zusatz) | | PCR Mandel: Xpt (Zusatz) | |
|----------------|--|------------|----------------------------------|------------|-------------------------------|------------|---------------------------------|------------|--------------------------------|------------|-----------------------------|------------|
| | Probe A | Dot. Probe | Probe A | Dot. Probe | Probe A | Dot. Probe | Probe A | Dot. Probe | Probe A | Dot. Probe | Probe A | Dot. Probe |
| 1 | | | 5,4 | 5,1 | -2,3 | -1,6 | | | | | | |
| 2 | | | 2,3 | 6,0 | -2,1 | -1,5 | | | | | | |
| 3 | | | | | | | | | | | | |
| 4 | 0,20 | -1,0 | | | -1,2 | -1,1 | | | | | | |
| 5 | | | 3,3 | | -1,0 | 0,13 | | | | | | |
| 6 | | | | | | | -1,1 | -2,3 | -2,3 | -3,4 | -3,7 | -3,7 |
| 7 | | | 2,1 | 4,5 | -2,1 | -1,2 | | | | | | |
| 8 | | | | | | | | | | | | |
| 9 | | | | | 1,1 | 0,59 | | | | | | |
| 10 | | | | | | | | | | | | |
| 11 | | | 1,1 | -2,7 | -1,4 | -2,0 | | | | | | |
| 12 / 12a | | | 5,8 | 6,0 | -0,26 | -0,65 | | | | | | |
| 12b | | | | | | | | | | | | |
| 13 | | | 2,3 | | -0,72 | -1,6 | | | | | | |
| 14 / 14a | 1,2 | 7,8 | 2,2 | 4,1 | -2,4 | -1,2 | -0,56 | -0,10 | 2,6 | -1,2 | -3,5 | -3,7 |
| 14b | | | | | 0,13 | 0,50 | | | | | | |
| 15 / 15a | 0,88 | -0,05 | 9,7 | 11 | -2,0 | -0,39 | | | | | | |
| 15b | | | | | -1,7 | -1,2 | | | | | | |
| 16 | | | 1,2 | 3,7 | -1,3 | -1,0 | | | | | | |

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: Buchweizen

| 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 |
| ES | 14 | 13.01.2022 | positiv | 3,18 | negativ | <2.5 | positiv | 7,49 | 2,5 | 2,5 | | Buchweizenprotein | ELISA Systems Buckwheat ESBWPRD-48 |
| MI-II | 4 | 18. Jan | positiv | 2,58 | negativ | | positiv | 1,89 | 0,31 | 0,31 | 32 | Buchweizenprotein | Buckwheat ELISA Kit-II, Morinaga |
| MI-II | 15 | 12.1./3.2.22 | positiv | 3 | negativ | <1 | positiv | 2,5 | 1 | 1 | | Buchweizenprotein | Buckwheat ELISA Kit-II, Morinaga |

* 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 | |
| ES | 14 | Gemäß Kit-Anweisungen | Gemäß Kit-Anweisungen | ja | |
| MI-II | 4 | | Extraktionspuffer/ 10 Min./ 100 °C | ja | |
| MI-II | 15 | | | | |

5.1.2 ELISA: Macadamia

| 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 | | | | | |
| | | Tag/Monat | | | | | | | | | % | | Test-Kit + Anbieter |
| 3M | 7 | 28.01.2022 | positiv | 1,25 | negativ | <0,333 | positiv | 1,56 | NA | 0,333 | | Macadamia protein | 3M Macadamia nut Protein ELISA Kit E96MAC |
| AQ-P | 12a | 20.01.22 | positiv | 25 | negativ | 0 | positiv | 23 | 1 | 1 | 24 | Macadamia | AgraQuant Plus ELISA Macadamia COKAL 1648F, RomerLabs |
| AQ-P | 15 | 14.01.22 | positiv | 35 | negativ | <1 | positiv | 34 | 1 | 1 | | Macadamia | AgraQuant Plus ELISA Macadamia COKAL 1648F, RomerLabs |
| BF | 5 | | positiv | 18,6 | negativ | <2 | - | | | | | Macadamia | MonoTrace Almond ELISA kit, BioFront Technologies |
| BF | 11 | 16. Dez | positiv | 13 | positiv | 3,1 | positiv | 3,1 | | | | Macadamia | MonoTrace Macadamia ELISA kit, BioFront Technologies |
| BF | 13 | 03. Feb | nachgewiesen | 16,1 | nicht nachgewiesen | <4.0 | nachgewiesen | | | | 4 | Lebensmittel | MonoTrace -BioFront |
| IL | 1 | | positiv | 23,9 | negativ | <1 | positiv | 21 | | | | Macadamia | Immunolab Macadamia ELISA |
| IL | 14 | 15.12.2022 | positiv | 15,72 | negativ | <1 | positiv | 18,72 | 1 | 1 | 12,4 | Macadamia | Immunolab Macadamia ELISA |
| SP | 2 | 27.12.21 | positiv | 16 | - | | positiv | 23 | 1 | 1 | | Macadamia | Eurofins SensiSpec Macadamia nut ELISA Kit |
| SP | 16 | 22.01.22 | positiv | 13,3 | grenzwertig | 1.0 | positiv | 17,7 | 0,1 | 1 | | Macadamia | Eurofins SensiSpec Macadamia nut ELISA Kit |
| div ° | 12b | 27.01.22 | positiv | | negativ | | positiv | | | | 2 | Macadamia | Lateral Flow |

* 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 | |
| 3M | 7 | | wie in der Kit-Beilage angegeben | ja | |
| AQ-P | 12a | Macadamia protein, polyclonal | nach TKB | ja | |
| AQ-P | 15 | | | | |
| BF | 5 | | | ja | |
| BF | 11 | | | | Dieses Kit ist kreuzreaktiv MN1-EK-96 |
| BF | 13 | | | ja | |
| IL | 1 | | | | |
| IL | 14 | Gemäß Kit-Anweisungen | Gemäß Kit-Anweisungen | ja | |
| SP | 2 | erkennt Macadamianussprotein | lt. Herstellerangaben | ja | Probe B: nicht analysierbar aufgrund von geringer Kreuzreaktivität mit Kokosnuss |
| SP | 16 | | | Probe B auf BG-Ebene | |
| div ° | 12b | | | | |

° Lateral Flow

5.1.3 ELISA: Mandel

| 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-P | 12a | 14.12.21 | positiv | 13 | negativ | 0 | positiv | 13 | 1 | 1 | 21 | Mandel | AgraQuant Plus ELISA Almond COKAL0748F, RomerLabs |
| BC | 14a | 15.12.2022 | positiv | 5,48 | negativ | <0.5 | positiv | 10,86 | 0,5 | 0,5 | | Mandel | BioCheck ELISA Almond-Check |
| BF | 5 | | positiv | 10,3 | negativ | <1 | positiv | 16 | | 1 | | Mandel | MonoTrace Almond ELISA kit, BioFront Technologies |
| ES | 11 | 22. Dez | positiv | 1,9 | negativ | <0,5 | positiv | 1,6 | | | | Mandelprotein | ELISA Systems Almonds ESARD-48 |
| IL | 1 | | positiv | 5,9 | negativ | <0,4 | positiv | 9,2 | | | | Mandel | Immunolab Almond ELISA |
| RS-F | 4 | 12. Jan | positiv | 9,69 | negativ | | positiv | 11,21 | 0,1 | 2,5 | 30 | Mandel | Ridascreen® FAST Almond R6901, R-Biopharm |
| RS-F | 9 | 31/01 | - | 17,6 | - | < BG | - | 17,8 | | 2,5 | | Mandel | Ridascreen® FAST Almond R6901, R-Biopharm |
| RS-F | 14b | 15.12.2022 | positiv | 14,35 | negativ | <2.5 | positiv | 17,43 | 2,5 | 2,5 | 29,32 | Mandel | Ridascreen® FAST Almond R6901, R-Biopharm |
| RS-F | 15a | 05.01.22 | positiv | 7 | negativ | <2.5 | positiv | 14 | 2,5 | 2,5 | | Bitte auswählen! | Ridascreen® FAST Almond R6901, R-Biopharm |
| SP | 2 | 22.12.21 | positiv | 6,5 | negativ | <0,4 | positiv | 9,6 | 0,4 | 0,4 | | Mandel | Eurofins SensiSpec Almond ELISA Kit |
| SP | 16 | 22.01.22 | positiv | 9,5 | negativ | < 0.2 | positiv | 11,5 | 0.06 | 0,4 | | Mandel | Eurofins SensiSpec Almond ELISA Kit |
| VT | 7 | 11.01.2022 | positiv | 6,59 | negativ | <2,5 | positiv | 10,96 | NA | 2,5 | | Mandel | Veratox Almond, Neogen |
| VT | 13 | 18/1 | nachgewiesen | 11,4 | nicht nachgewiesen | <2.5 | nachgewiesen | 9,2 | | 2,5 | | Lebensmittel | Veratox 8440 - Neogen |
| VT | 15b | 04.01.22 | positiv | 8 | negativ | <2.5 | positiv | 11 | 2,5 | 2,5 | | Mandel | Veratox Almond, Neogen |
| div ° | 12b | 27.01.22 | positiv | | negativ | | positiv | | | 2 | | Mandel | Lateral Flow |

* 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-P | 12a | Mandelprotein, polyclonal | nach TKB | ja | |
| BC | 14a | Gemäß Kit-Anweisungen | Gemäß Kit-Anweisungen | ja | |
| BF | 5 | | | ja | |
| ES | 11 | | | | |
| IL | 1 | | | | |
| RS-F | 4 | | Extraktionspuffer/ 10 Min./ 60 °C | nein | |
| RS-F | 9 | AK reagieren spezifisch mit Mandelproteinen | nach Testanleitung | ja | |
| RS-F | 14b | Gemäß Kit-Anweisungen | Gemäß Kit-Anweisungen | ja | |
| RS-F | 15a | | | | |
| SP | 2 | erkennt Mandelproteine | lt. Herstellerangaben | ja | |
| SP | 16 | | | | |
| VT | 7 | | wie in der Kit-Beilage angegeben | ja | |
| VT | 13 | | | ja | |
| VT | 15b | | | | |
| div ° | 12b | | | | |

° Lateral Flow

5.1.4 PCR: Buchweizen

| 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 | | | | | |
| | | Tag/Monat | | | | | | | | | % | | Test-Kit + Anbieter |
| SFA | 6 | 19.01.22 | positiv | 14,6 | negativ | | positiv | 9 | 0,4 | 1 | 30 | Buchweizen | Sure Food ALLERGEN, R-Biopharm / Congen |
| SFA-ID | 10 | | positiv | | negativ | | positiv | | 0,4 | | | Buchweizen-DNA | Sure Food Allergen ID, R-Biopharm / Congen |
| SFA-ID | 14 | 01.02.2022 | positiv | 17,4 | negativ | <1 | positiv | 20,33 | 1 | 1 | | Buchweizen-DNA | Sure Food Allergen ID, R-Biopharm / Congen |
| div | 15 | 31.12.21 | positiv | | negativ | | positiv | | 1 | | | Buchweizen-DNA | Auswahl PCR-Methoden |

* 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 | 6 | Fagopyrum esculentum | Sure Food Prep Advanced Protokoll 1 | nein | Artikelnr. S3620, K03 |
| SFA-ID | 10 | | real time PCR | nein | |
| SFA-ID | 14 | Gemäß Kit-Anweisungen | Gemäß Kit-Anweisungen | nein | |
| div | 15 | ITS | Macherey-Nagel NucleoSpin Food Mini Kit | | |

5.1.5 PCR: Macadamia

| 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 | 6 | 28.12.22 | positiv | 4,4 | negativ | | positiv | 1,4 | 0,4 | 1 | 30 | Macadamia | Sure Food ALLERGEN, R-Biopharm / Congen |
| SFA | 9 | 28.12.21 | positiv | | negativ | | positiv | | | | | Macadamia-DNA | Sure Food ALLERGEN, R-Biopharm / Congen |
| SFA-4p | 8 | 12.01.22 | positiv | | negativ | | positiv | | 0,4 | | | Bitte auswählen! | Sure Food Allergen 4plex, R-Biopharm / Congen |
| SFA-ID | 3 | | positiv | | negativ | | positiv | | 0,4 | | | Bitte auswählen! | Sure Food Allergen ID, R-Biopharm / Congen |
| SFA-ID | 10 | | positiv | | negativ | | positiv | | 0,4 | | | Macadamia-DNA | Sure Food Allergen ID, R-Biopharm / Congen |
| SFA-ID | 14 | 03.01.2022 | positiv | 16,95 | negativ | <1 | positiv | 6,52 | 1 | 1 | | Macadamia-DNA | Sure Food Allergen ID, R-Biopharm / Congen |
| div | 2 | 27.12.21 | positiv | | negativ | | positiv | | 4 | | | Macadamia-DNA | interne Methode |
| div | 15 | 07.01.22 | positiv | | negativ | | positiv | | 20 | | | Macadamia-DNA | Auswahl PCR-Methoden |

* 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 | 6 | Macadamia ternifolia | Sure Food Prep Advanced Protokoll 1 | nein | Artikelnr. S3616, K02 |
| SFA | 9 | charakteristischer Sequenzabschnitt der Macadamia-DNA | Dotierungsprobe: SureFood Prep Advanced r-biopharm/ Proteinase K/ Real Time PCR/ 45 Zyklen Probe A+B: Dneasy Mericon Food-Kit Qiagen/ Proteinase K/ Real Time PCR/ 45 Zyklen | ja | |
| SFA-4p | 8 | | | | |
| SFA-ID | 3 | | | | |
| SFA-ID | 10 | | real time PCR | nein | |
| SFA-ID | 14 | Gemäß Kit-Anweisungen | Gemäß Kit-Anweisungen | nein | |
| div | 2 | | CTAB / Proteinase K / Rnase A / Promega Maxwell / realtime PCR / 45 Zyklen | ja | |
| div | 15 | integrifolia vicilin precursor (AMP2) integrifolia vicilin precursor (AMP2) | Wizard Genomic DNA isolation | | |

5.1.6 PCR: Mandel

| 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 | 6 | 28.12.22 | positiv | 1 | negativ | | positiv | 1 | 0,4 | 1 | 30 | Mandel | Sure Food ALLERGEN, R-Biopharm / Congen |
| SFA | 9 | 27.12.21 | positiv | | negativ | | positiv | | | | | Mandel-DNA | Sure Food ALLERGEN, R-Biopharm / Congen |
| SFA-ID | 3 | | positiv | | negativ | | positiv | | 0,4 | | | Bitte auswählen! | Sure Food Allergen ID, R-Biopharm / Congen |
| SFA-ID | 5 | | positiv | > 0,4 | negativ | <0,4 | positiv | > 0,4 | 0,4 | | | Mandel-DNA | Sure Food Allergen ID, R-Biopharm / Congen |
| SFA-ID | 10 | | positiv | | negativ | | positiv | | 0,4 | | | Mandel-DNA | Sure Food Allergen ID, R-Biopharm / Congen |
| SFA-ID | 14 | 03.01.2022 | positiv | 1,57 | negativ | <1 | positiv | 1,31 | 1 | 1 | | Mandel-DNA | Sure Food Allergen ID, R-Biopharm / Congen |
| div | 8 | 12.01.22 | negativ | | negativ | | negativ | | 10 | | | Bitte auswählen! | |
| div | 15 | 07.01.22 | negativ | | negativ | | negativ | | 50 | | | Mandel-DNA | Auswahl PCR-Methoden |

* 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 | 6 | Prunus dulcis | Sure Food Prep Advanced Protokoll 1 | nein | Artikelnr. S3604, K02 |
| SFA | 9 | charakteristischer Sequenzabschnitt der Mandel-DNA | Dotierungsprobe: SureFood Prep Advanced r-biopharm/ Proteinase K/ Real Time PCR/ 45 Zyklen Probe A+B: Dneasy Mericon Food-Kit Qiagen/ Proteinase K/ Real Time PCR/ 45 Zyklen | ja | |
| SFA-ID | 3 | | | | |
| SFA-ID | 5 | | | ja | |
| SFA-ID | 10 | | real time PCR | nein | |
| SFA-ID | 14 | Gemäß Kit-Anweisungen | Gemäß Kit-Anweisungen | nein | |
| div | 8 | | | | |
| div | 15 | nsLTP | Wizard Genomic DNA isolation | | |

5.2 Homogenität

5.2.1 Mischungshomogenität vor der Abfüllung

Microtracer Homogenitätstest

DLA ptAL08 (201) Probe A

| | | |
|----------------------|--------------|-------|
| Gewicht Gesamtprobe | 2,50 | kg |
| Microtracer | FSS-rot lake | |
| Teilchengröße | 75 – 300 | µm |
| Gewicht pro Partikel | 2,0 | µg |
| Tracerzugabe | 20,7 | mg/kg |

Analysenergebnisse:

| Probe | Einwaage [g] | Partikel Anzahl | Partikel [mg/kg] |
|-------|--------------|-----------------|------------------|
| 1 | 5,05 | 29 | 11,5 |
| 2 | 4,98 | 30 | 12,0 |
| 3 | 5,01 | 31 | 12,4 |
| 4 | 5,02 | 37 | 14,7 |
| 5 | 4,96 | 44 | 17,7 |
| 6 | 4,99 | 45 | 18,0 |
| 7 | 5,05 | 45 | 17,8 |
| 8 | 5,00 | 32 | 12,8 |

| Poisson-Verteilung | | |
|---------------------------|-----------|----------|
| Probenanzahl | 8 | |
| Freiheitsgrad | 7 | |
| Mittelwert | 36,6 | Partikel |
| Standardabweichung | 7,11 | Partikel |
| χ^2 (CHI-Quadrat) | 9,66 | |
| Wahrscheinlichkeit | 21 | % |
| Wiederfindungsrate | 71 | % |

| Normalverteilung | | |
|----------------------------|------------|-------|
| Probenanzahl | 8 | |
| Mittelwert | 14,6 | mg/kg |
| Standardabweichung | 2,84 | mg/kg |
| rel. Standardabweichung | 19,4 | % |
| Horwitz Standardabweichung | 10,7 | % |
| HorRat-Wert | 1,8 | |
| Wiederfindungsrate | 71 | % |

Microtracer Homogenitätstest

DLA ptAL08 (2021) Dotierungsniveauprobe

| | | |
|----------------------|--------------|-------|
| Gewicht Gesamtprobe | 1,20 | kg |
| Microtracer | FSS-rot lake | |
| Teilchengröße | 75 – 300 | µm |
| Gewicht pro Partikel | 2,0 | µg |
| Tracerzugabe | 31,8 | mg/kg |

Analysenergebnisse:

| Probe | Einwaage [g] | Partikel Anzahl | Partikel [mg/kg] |
|-------|--------------|-----------------|------------------|
| 1 | 4,97 | 77 | 31,0 |
| 2 | 5,00 | 87 | 34,8 |
| 3 | 5,01 | 88 | 35,1 |
| 4 | 4,97 | 82 | 33,0 |
| 5 | 5,05 | 80 | 31,7 |
| 6 | 4,96 | 86 | 34,7 |
| 7 | 5,02 | 81 | 32,3 |
| 8 | 4,98 | 90 | 36,1 |

| Poisson-Verteilung | | |
|---------------------------|-----------|----------|
| Probenanzahl | 8 | |
| Freiheitsgrad | 7 | |
| Mittelwert | 83,9 | Partikel |
| Standardabweichung | 4,63 | Partikel |
| χ^2 (CHI-Quadrat) | 1,79 | |
| Wahrscheinlichkeit | 97 | % |
| Wiederfindungsrate | 106 | % |

| Normalverteilung | | |
|----------------------------|-------------|-------|
| Probenanzahl | 8 | |
| Mittelwert | 33,6 | mg/kg |
| Standardabweichung | 1,85 | mg/kg |
| rel. Standardabweichung | 5,5 | % |
| Horwitz Standardabweichung | 9,4 | % |
| HorRat-Wert | 0,59 | |
| Wiederfindungsrate | 106 | % |

5.3 Informationen zur Eignungsprüfung (EP)

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

| | |
|--|---|
| EP-Nummer | ptAL08 - 2021 |
| EP-Name | Allergene VIII: Buchweizen, Mandel und Macadamia in Frühstückscerealien mit „Dotierungsniveauprobe“ |
| Probenmatrix (Prozessierung) | Proben A + B: Müsli mit Früchten / Zutaten: Hafervollkornflocken, Zucker, Sonnenblumenöl, Reisextrudat (Reismehl, Gerstenmalzmehl), Weizen gepufft, Schwarzes Johannisbeersaft-Konzentrat, gefriergetrocknete Beeren (Himbeeren, Erdbeeren, Brombeeren), Datteln, Cranberries, Reisirup, Kokosnuss, Salz, Apfelsaft-Konzentrat, Rote Beete Saft-Konzentrat, 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: Buchweizen (Buchweizenprotein, DNA), Mandel (Mandelprotein, DNA) und Macadamia (Macadamia protein, 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 04. Februar 2022 |
| Auswertebericht | Der Auswertebericht wird voraussichtlich 6 Wochen nach Abgabetermin der Ergebnisse fertiggestellt und per eMail als PDF-Datei zugesandt. |
| Koordinator und Ansprechpartner der EP | Dr. Matthias Besler-Scharf |

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

6. Verzeichnis der Teilnehmer in alphabetischer Reihenfolge

| Teilnehmer / Participant | Ort / Town | Land / Country |
|--------------------------|------------|-----------------|
| | | Deutschland |
| | | SCHWEIZ |
| | | KANADA |
| | | ITALIEN |
| | | Deutschland |
| | | Deutschland |
| | | FRANKREICH |
| | | Deutschland |
| | | KANADA |
| | | GROSSBRITANNIEN |
| | | SPANIEN |
| | | TSCHECHIEN |
| | | ITALIEN |

[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 18.00-20 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]
 33. ASU §64 LFGB L 18.00-21 Untersuchung von Lebensmitteln - Nachweis und Bestimmung von Paranuss (Bertholletia excelsa) in Reis- und Weizenkeksen sowie in Soßenpulver mittels real-time PCR (2014) [Foodstuffs, detection and determination of brazil nut (Bertholletia excelsa) in rice and wheat cookies and sauce powders by PCR]
 34. ASU §64 LFGB L 18.00-22 Untersuchung von Lebensmitteln - Simultaner Nachweis und Bestimmung von Lupine, Mandel, Paranuss und Sesam in Reis- und Weizenkeksen sowie Soßenpulver mittels real-time PCR (2014) [Foodstuffs, simultaneous detection and determination of lupin, almond, brazil nut and sesame in rice and wheat cookies and sauce powders by PCR]

DLA ptAL08 (2021) - Allergene VIII

Alle 16 Teilnehmer haben mindestens ein Ergebnis eingereicht. Die Auswertung erfolgte für ELISA-Methoden hinsichtlich der Parameter Macadamia und Mandel qualitativ und quantitativ und für Buchweizen aufgrund der wenigen Ergebnisse nur qualitativ. Die PCR-Methoden wurden für alle 3 Parameter ebenfalls qualitativ bewertet. Zusätzlich wurden für jeden Teilnehmer Wiederfindungsraten für die Dotierungsniveauprobe und die dotierte Probe A ermittelt. Details zu den einzelnen Parametern sind dem Auswertebereicht zu entnehmen.

7 Teilnehmer hatten ihren Sitz im Europäischen Ausland (Frankreich, Großbritannien, Italien, Schweiz, Spanien, Tschechien) und 2 Teilnehmer in Kanada.