



Auswertungs-Bericht
Laborvergleichsuntersuchung

DLA 07/2019

Allergene VII:

Pistazien und Mollusken

in Suppenpulver (Champignon)

DLA - Proficiency Tests GmbH
Kalte Weide 21
24641 Sievershütten/Germany

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

Koordinator der LVU:
Dr. Matthias Besler-Scharf

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

<i>EP-Anbieter PT-Provider</i>	<p>DLA - Proficiency Tests GmbH Kalte Weide 21, 24641 Sievershütten, Germany</p> <p>Geschäftsführer/CEO: Dr. Matthias Besler-Scharf Stellv. Leitung/Deputy Lead: Alexandra Scharf MSc.</p> <p>Tel. ++49-(0)4532-9183358 Mob. ++49(0)171-1954375 Fax. ++49(0)4102-9944976 eMail. proficiency-testing@dla-lvu.de</p>
<i>EP-Nummer PT-Number</i>	DLA 07/2019
<i>EP-Koordinator PT-Coordinator</i>	Dr. Matthias Besler-Scharf
<i>Status des EP-Bericht Status of PT-Report</i>	<p>Abschlussbericht / Final report (28. Februar 2020)</p> <p>Gültig ist die jeweils letzte Version/Korrektur des Berichts. Sie ersetzt alle vorangegangenen Versionen. Only the latest version/correction of the report is valid. It replaces all preceding versions.</p>
<i>EP-Bericht Freigabe PT-Report Authorization</i>	<p>Dr. Matthias Besler-Scharf (Technischer Leiter / Technical Manager) - <i>gezeichnet / signed M. Besler-Scharf</i> Alexandra Scharf MSc. (QM-Beauftragte / Quality Manager) - <i>gezeichnet / signed A. Scharf</i> Datum / Date: 28. Februar 2020</p>
<i>Unteraufträge Subcontractors</i>	<p>Im Rahmen dieser Eignungsprüfung wurden nachstehende Leistungen im Unterauftrag vergeben: Homogenitätsprüfung der EP-Parameter, Proteinbestimmung As part of the present proficiency test the following services were subcontracted: Homogeneity tests of PT-parameter(s), protein determination</p>
<i>Vertraulichkeit Confidentiality</i>	<p>Die Teilnehmerergebnisse sind im EP-Bericht in anonymisierter Form mit Auswertenummern benannt. Daten einzelner Teilnehmer werden ausschließlich nach vorheriger Zustimmung des Teilnehmers an Dritte weitergegeben. Participant result are named anonymously with evaluation numbers in the PT report. Data of individual participants will be passed on to third parties only with prior consent of the participant.</p>

Inhalt

1. Einleitung.....	4
2. Durchführung.....	4
2.1 Untersuchungsmaterial.....	4
2.1.1 Homogenität.....	6
2.1.2 Stabilität.....	8
2.2 Probenversand und Informationen zur Untersuchung.....	8
2.3 Ergebnisübermittlung.....	8
3. Auswertung.....	9
3.1 Konsenswert der Teilnehmer (zugewiesener Wert).....	9
3.2 Robuste Standardabweichung.....	10
3.3 Ausschluss von Ergebnissen und Ausreißer.....	10
3.4 Zielstandardabweichung (für die Eignungsbeurteilung).....	11
3.4.1 Allgemeines Modell nach Horwitz.....	11
3.4.2 Auswertung eines Versuchs zur Präzision.....	11
3.4.3 Werte aus Erkenntnissen.....	14
3.5 z-Score.....	15
3.5.1 Warn- und Eingriffssignale.....	15
3.6 z'-Score.....	16
3.7 Quotient S*/opt.....	16
3.8 Standardunsicherheit und Rückführbarkeit.....	16
3.9 Graphische Darstellung der Bezugswerte.....	17
3.10 Wiederfindungsraten: Dotierung.....	17
4. Ergebnisse.....	18
4.1 Vergleichsuntersuchung Mollusken.....	20
4.1.1 ELISA-Ergebnisse: Mollusken (als Miesmuschel-Pulver).....	20
4.1.2 PCR-Ergebnisse: Mollusken (als Miesmuschel-Pulver).....	23
4.2 Vergleichsuntersuchung Pistazie.....	26
4.2.1 ELISA-Ergebnisse: Pistazie.....	26
4.2.2 PCR-Ergebnisse: Pistazie.....	34
4.3 z-Scores der Teilnehmer: Übersichtstabelle.....	37
5. Dokumentation.....	38
5.1 Angaben der Teilnehmer.....	38
5.1.1 ELISA: Mollusken (Miesmuschel).....	38
5.1.2 ELISA: Pistazie.....	39
5.1.3 PCR: Mollusken (Miesmuschel).....	40
5.1.4 PCR: Pistazie.....	41
5.2 Homogenität.....	42
5.2.1 Mischungshomogenität vor der Abfüllung.....	42
5.3 Informationen zur Eignungsprüfung (EP).....	43
6. Verzeichnis der Teilnehmer in alphabetischer Reihenfolge.....	44
7. Verzeichnis relevanter Literatur.....	45

1. Einleitung

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

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

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

2. Durchführung

2.1 Untersuchungsmaterial

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

Bei dem Untersuchungsmaterial der Lebensmittelmatrixproben handelt es sich um ein handelsübliches Istant-Suppenpulver (Champignon-Cremesuppe) mit Zusatz von Kartoffelmehl. Die Grundzusammensetzung war für beide Proben A und B gleich (s. Tabelle 1).

Nach Sieben (mesh 2,5 mm) wurde die Grundmischung homogenisiert.

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

Die Dotierungsmaterialien, die die allergenen Zutaten Pistazie und Miesmuschel enthalten, wurden gesiebt (mesh 250 µm), dann zu einem Aliquot der Grundmatrix gegeben und die Mischung homogenisiert. Anschließend wurde portionsweise erneut Grundmatrix in 4 weiteren Schritten zugegeben und jeweils maschinell 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
Champignon-Cremesuppe (Pulver) Zutaten: Modifizierte Stärke, Palmöl, Glukosesirup, Stärke, jodiertes Speisesalz, Kartoffeln, Zucker, Reismehl, Maltodextrin, Zwiebeln, Hefeextrakt, Champignonsaftkonzentrat, Speisesalz, Gewürze (Pfeffer, Muskatnuss, Curcuma), Knoblauch, Steinpilzpulver, Tomatenpulver, Aromen, Säuerungsmittel (Citronensäure) Nährwertangaben pro 100 g: Eiweiß <5,5 g, Kohlenhydrate 58 g, Fett 21 g	49,6 g/100g	49,7 g/100g	-
Kartoffelmehl Nährwertangaben pro 100 g: Eiweiß 0 g	50,2 g/100g	50,3 g/100g	-
Kartoffelpulver Zutaten: Kartoffeln, E471, E304, E223, E100	-	-	99,8 g/100 g
<i>Miesmuscheln (Mytilus edulis):</i> gekocht, getrocknet und gemahlen - als Miesmuschelpulver* - davon 74% Gesamtprotein***	243 mg/kg 180 mg/kg	-	173 mg/kg 128 mg/kg
<i>Pistazien:</i> unbehandelt, gemahlen - als Pistazien* - davon 22% Gesamtprotein**	28,9 mg/kg 6,27 mg/kg	-	22,8 mg/kg 4,95 mg/kg
<i>weitere Zutaten:</i> Maltodextrin, Natriumsulfat und Siliciumdioxid	<0,2 g/100 g	-	<0,2 g/100 g

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

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

*** Proteingehalt gemäß Deklaration

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

2.1.1 Homogenität

Die **Mischungshomogenität vor der Abfüllung** wurde in 8-fach Bestimmung mittels **Microtracer-Analyse** untersucht. Es handelt sich um eine normierte Methode, die Bestandteil des internationalen GMP-Zertifizierungssystems für Futtermittel ist [14]. Vor der Mischung werden mit Farbstoff beschichtete Eisenpartikel in μm -Größe zur Probe gegeben und die Partikelzahl wird nach der Homogenisierung in entnommenen Aliquoten bestimmt. Die Bewertung der Mischungshomogenität erfolgt auf Grundlage der Poissonverteilung anhand des chi-Quadrat-Tests. Eine Wahrscheinlichkeit von $\geq 5\%$ ist gleichzusetzen mit einer guten homogenen Mischung und von $\geq 25\%$ mit einer exzellenten Mischung [14, 15]. Die Microtracer-Analyse der vorliegenden LVU-Proben A und der Dotierungsniveauprobe hat eine Wahrscheinlichkeit von 94% bzw. 68% ergeben. Die Partikel-Ergebnisse wurden zusätzlich in Konzentrationen umgerechnet, statistisch als Normalverteilung ausgewertet und mit der Standardabweichung nach Horwitz verglichen. Für die Beurteilung sind HorRat-Werte zwischen 0,3 und 1,3 unter Wiederholbedingungen (Messungen innerhalb des Labors) zu akzeptieren [17]. Es wurden HorRat-Werte von 0,8 bzw. 1,0 erhalten. Die Ergebnisse der Microtracer-Analyse sind in der Dokumentation angegeben.

Homogenität der abgefüllten dotierten Probe A

Durchführung der Homogenitätstests

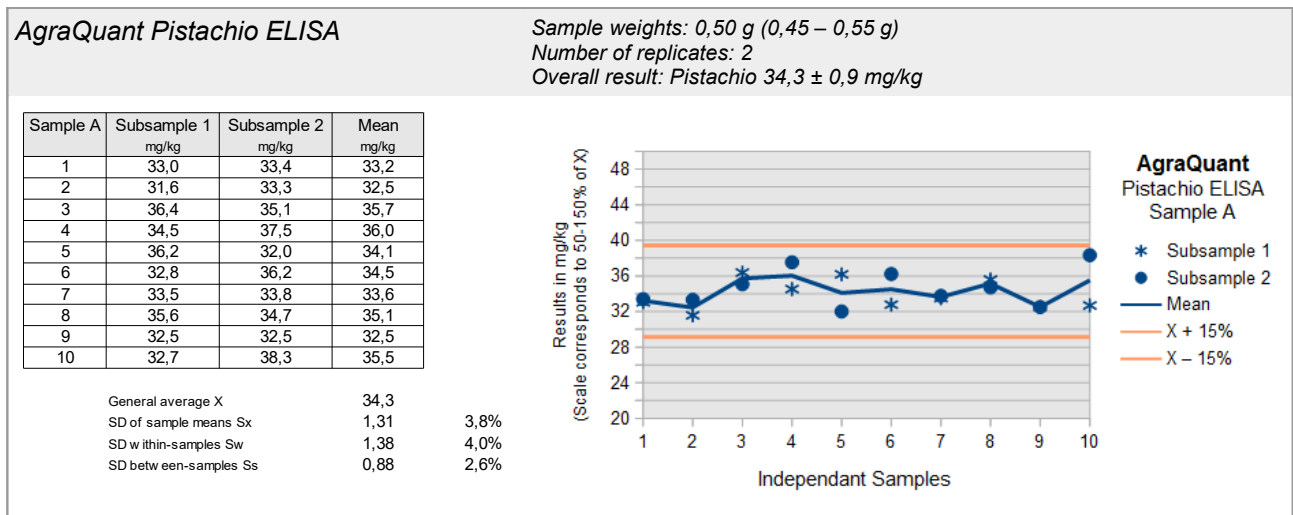
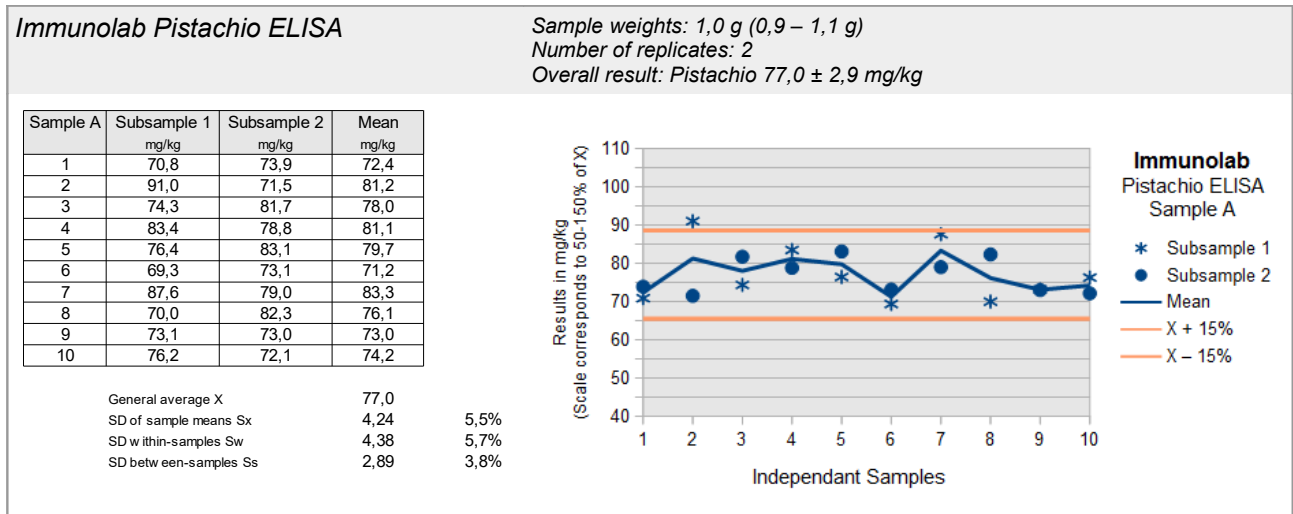
Die Homogenitätstests wurden in Kooperation mit den Labors der angegebenen Testkit-Anbieter durchgeführt. Von DLA wurden zufällig 10 Muster der abgefüllten dotierten Probe ausgewählt und davon jeweils 2 Teilproben in zuvor zufällig-codierte Extraktionsbehälter eingewogen und anschließend den Labors zur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

Bewertung der Homogenität

Die Homogenität wird mit einer Standardabweichung zwischen den Proben von $S_s \leq 15\%$ („Heterogenitätsstandardabweichung“) als hinreichend gesichert angesehen. Dieses Kriterium wird für die untersuchte Probe A in allen ELISA-Tests für Pistazie (Immunolab und AgraQuant) erfüllt (s. Seite 7). ELISA-Tests für Mollusken wurde nicht durchgeführt. 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 Pistazie / Homogeneity Pistachio



2.1.2 Stabilität

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

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

Der a_w -Wert der EP-Proben lag bei ca. $0,41$ ($18,8^\circ\text{C}$). 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 46. Kalenderwoche 2019 je eine Portion der Untersuchungsmaterialien A und B sowie eine Dotierungsmaterialprobe verschickt. Die Untersuchungsverfahren wurden freigestellt. Die Untersuchungen waren durchzuführen bis spätestens 06. Januar 2020.

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 **Pistazien** und/oder **Mollusken** im mg/kg Bereich in der Matrix **Champignon-Cremesuppe** (Pulver). 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 13 Teilnehmer haben fristgerecht Ergebnisse abgegeben.

3. Auswertung

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

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

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

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

3.1 Konsenswert der Teilnehmer (zugewiesener Wert)

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

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

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

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

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

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

3.2 Robuste Standardabweichung

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

Folgende robuste Standardabweichungen werden herangezogen:

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

3.3 Ausschluss von Ergebnissen und Ausreißer

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

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

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

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

3.4 Zielstandardabweichung (für die Eignungsbeurteilung)

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

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

3.4.1 Allgemeines Modell nach Horwitz

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

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

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

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

3.4.2 Auswertung eines Versuchs zur Präzision

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

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

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

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

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

Aus den Präzisionsdaten der ASU §64 Methoden ergeben sich abhängig von Matrix bzw. Prozessierung und Konzentrationsbereich relative Zielstandardabweichungen im Bereich von 12 – 33% für die ELISA-Methoden und 18 – 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} [32-36]

Parameter	Matrix	Mittelwerte [mg/kg]	Wiederfindung	rob RSD_r	RSD_r	RSD_R	σ_{pt}	Methode / Literatur
Paranuss	Reiskekse	89,1	89,1 %	-	34,1%	34,4%	24,5%	rt-PCR ASU 18.00-21
		17,3	86,5 %		36,2%	38,2%	28,4%	
		9,8	98 %		40,2%	41,8%	30,6%	
Paranuss	Weizenkekse Soßenpulver	80,8	65,7 %	-	25,6%	36,4%	31,6%	rt-PCR ASU 18.00-21
		42,6	42,6 %		27,5%	39,7%	34,6%	
Paranuss	Reiskekse	96,6	96,6 %	-	16,8%	31,8%	29,5%	rt-PCR <small>multiplex</small> ASU 18.00-22
		14,2	71 %		54,2%	56,5%	41,5%	
Paranuss	Weizenkekse Soßenpulver	76,5	62,2 %	-	15,6%	35,8%	34,1%	rt-PCR <small>multiplex</small> ASU 18.00-22
		48,4	48,4 %		34,4%	37,5%	28,5%	
Soja	Weizenmehl Maismehl	107	107 %	63 %	-	31 %	-	rt-PCR ASU 16.01-9
		145	145 %	34 %	-	24 %	-	
Sojamehl	Brühwurst (100°C, 60 min)	114,1	114 %	-	14,7%	22,2%	19,6%	rt-PCR ASU 08.00-65
		64,4	161 %		27,7%	41,4%	36,5%	
Sojamehl	Wurst, autoklaviert	33,1	33,1 %	-	21,5%	30,8	26,8%	rt-PCR ASU 08.00-65
Sojamehl	Brühwurst (100°C, 60 min)	82,0	82 %	-	17,3%	24,1%	20,8%	rt-PCR ASU 08.00-59
		39,6	99 %		22,9%	31,8%	27,4%	
		19,6	98 %		22,9%	24,0%	17,7%	
		9,3	93 %		31,1%	30,2%	-	

3.4.3 Werte aus Erkenntnissen

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

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

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

Tabelle 3: ELISA-Validierungskriterien

Literatur [18-24]	Wiederfindungsrate	Wiederholstandardabweichung	Vergleichsstandardabweichung
MHLW 2006	50 - 150%		≤ 25%
CEN 2009		≤ 20%	
AOAC 2010	50 - 150%	6,9 - 34,4% ^(a)	19,5 - 57,2% ^(a)
CAC 2010	70 - 120%	≤ 25%	≤ 35%

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

Tabelle 4: PCR-Validierungskriterien

Literatur [18]	Wiederfindungsrate	Wiederholstandardabweichung	Vergleichsstandardabweichung
CAC 2010	± 25% ^(a)	≤ 25%	≤ 35%

(a) = Trueness / Richtigkeit

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

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

3.5 z-Score

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

Die Berechnung erfolgt nach:

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

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

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

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

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

3.5.1 Warn- und Eingriffssignale

Gemäß der ISO 13528 für statistische Verfahren für Eignungsprüfungen wird empfohlen, dass ein Ergebnis, das einen z-Wert $> 3,0$ oder $< -3,0$ ergibt, als „Eingriffssignal“ zu werten ist [3]. 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 und der Anzahl der Teilnehmer (P) einer LVU beeinflusst wird. Die Standardunsicherheit des zugewiesenen Wertes ($U_{(x_{pt})}$) wird für die vorliegende LVU wie folgt berechnet [3]:

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

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

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

3.9 Graphische Darstellung der Bezugswerte

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

3.10 Wiederfindungsraten: Dotierung

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

4. Ergebnisse

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

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

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

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

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

Die ELISA-Ergebnisse, die als **Miesmuscheln-** oder **Pistazienprotein** angegeben wurden, sind mit dem experimentell bestimmten bzw. deklarierten Proteingehalt der Rohstoffe auf das **Gesamtlebensmittel (Miesmuschel-Pulver, Pistazien)** umgerechnet worden.

Nassgewichte von Mollusken/Miesmuscheln wurden in Trockengewicht/Miesmuschel-Pulver unter Berücksichtigung eines Wassergehalts von 80,6 % umgerechnet (USDA Nutrient Database).

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 $X_{pt_{M_i}}$	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 Mollusken

4.1.1 ELISA-Ergebnisse: Mollusken (als Miesmuschel-Pulver)

Qualitative Auswertung der Ergebnisse: Proben A und B

Auswertenummer	Probe A	Probe A	Probe B	Probe B	Qualitative Bewertung	Methode	Hinweis
	pos/neg	[mg/kg]	pos/neg	[mg/kg]	Übereinstimmungen mit Konsenswerten		
5	positiv	1,76	negativ	<1,4	2/2 (100%)	3M	Ergebnis umgerechnet °
7	positiv	11,6	negativ	<3,9	2/2 (100%)	IL	Ergebnis umgerechnet °

° Umrechnung S. 18

	Probe A	Probe B
Anzahl positiv	2	0
Anzahl negativ	0	2
Prozent positiv	100	0
Prozent negativ	0	100
Konsenswert	positiv	negativ

Methoden:

3M = 3M Protein ELISA Kit
 IL = Immunolab

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.

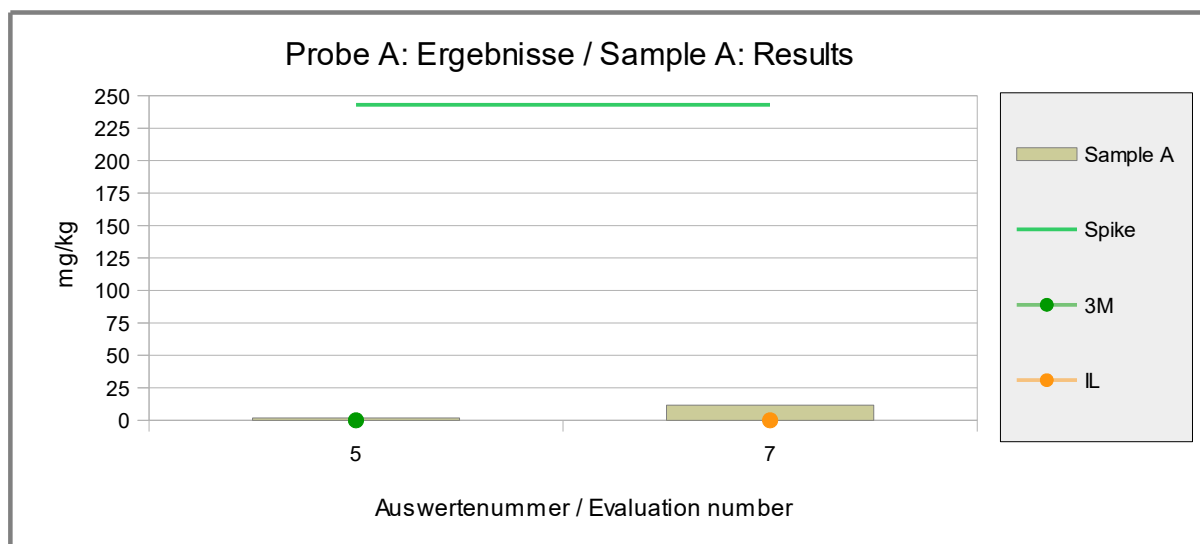


Abb./Fig. 1: ELISA-Ergebnisse Mollusken (als Miesmuschel-Pulver)
 grüne Linie = Zusatzniveau (Spike)
 runde Symbole = Zuordnung der Methoden (s. Legende)

Quantitative Auswertung ELISA: Dotierungsniveauprobe

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

Auswertenummer	Miesmuschel pos/neg	Miesmuschel [mg/kg]	z-Score X _{pt,ALL}	Methode	Hinweis
5	positiv	2,57		3M	Ergebnis umgerechnet °
7	positiv	7,76		IL	Ergebnis umgerechnet °

° Umrechnung S. 18

Anzahl positiv	2
Anzahl negativ	0
Prozent positiv	100
Prozent negativ	0
Konsenswert	positiv

Methoden:

3M = 3M Protein ELISA Kit

IL = Immunolab

Anmerkung:

Es wurden ausschließlich positive Ergebnisse für die Dotierungsniveauprobe erhalten.

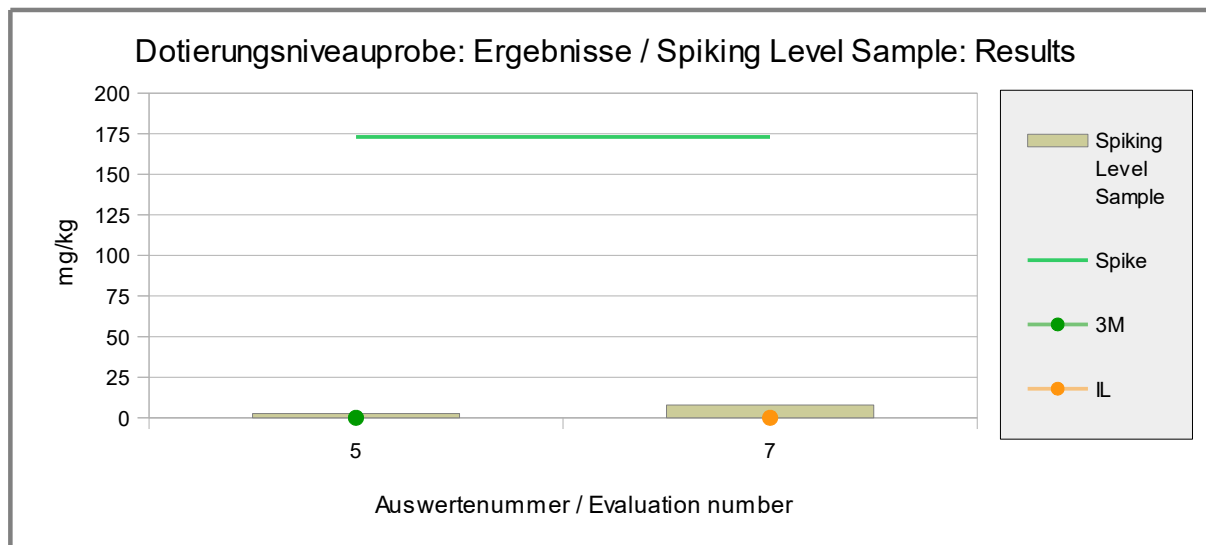


Abb./Fig. 2: ELISA-Ergebnisse Mollusken (als Miesmuschel-Pulver)
 grüne Linie = Zusatzniveau (Spike)
 runde Symbole = Zuordnung der Methoden (s. Legende)

**Wiederfindungsraten ELISA für Mollusken (Miesmuschel-Pulver):
Dotierungsniveauprobe und Probe A**

Auswertenummer	Dotierungsniveauprobe	Wiederfindungsrate*	Probe A	Wiederfindungsrate*	Methode	Hinweis
	[mg/kg]	[%]	[mg/kg]	[%]		
5	2,57	1,5	1,76	0,7	3M	Ergebnis umgerechnet °
7	7,76	4,5	11,6	4,8	IL	Ergebnis umgerechnet °

° Umrechnung S. 18

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

Methoden:

3M = 3M Protein ELISA Kit
IL = Immunolab

* Wiederfindungsrate 100% Bezugsgröße: Miesmuschel (Pulver), s. Seite 5

** Akzeptanzbereich der AOAC für Allergen-ELISAs

Anmerkung:

Die Wiederfindungsraten der beiden Teilnehmer lagen sowohl für die Dotierungsniveauprobe als auch für die dotierte Lebensmittelmatrix-Probe A mittels ELISA-Methoden deutlich unterhalb des Bereichs der AOAC-Anforderung von 50-150%.

4.1.2 PCR-Ergebnisse: Mollusken (als Miesmuschel-Pulver)

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		
8	positiv		negativ		2/2 (100%)	SFA	
11	positiv	>1	negativ	<0,4	2/2 (100%)	SFA	
12	positiv	245	negativ	<0,2	2/2 (100%)	SFA	Ergebnis umgerechnet °
13	positiv		negativ		2/2 (100%)	SFA	

° Umrechnung S. 18

	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

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.

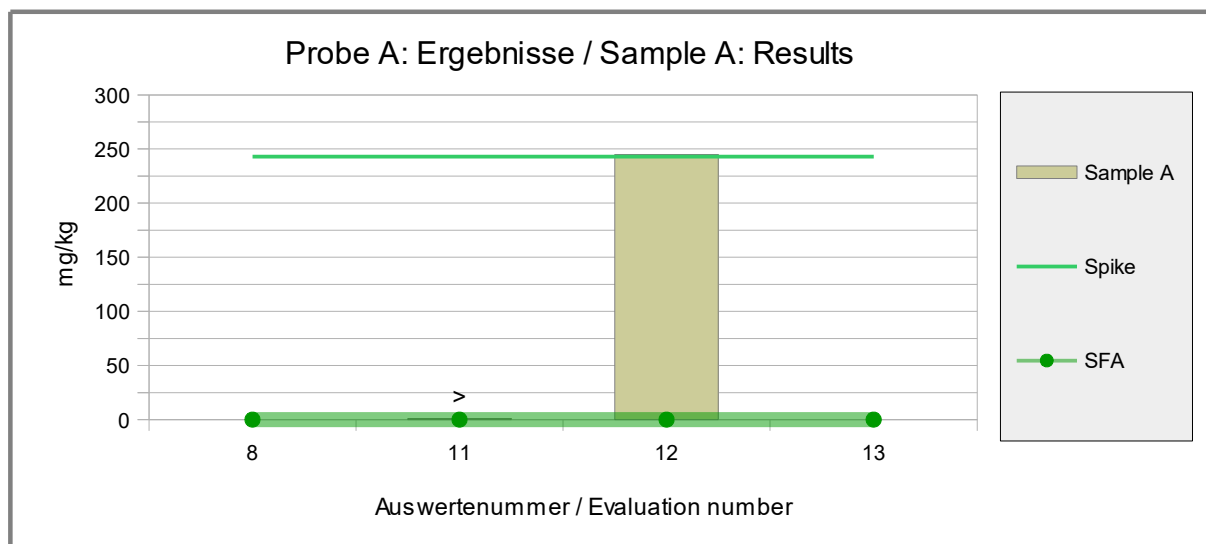


Abb./Fig. 3: PCR-Ergebnisse Mollusken (als Miesmuschel-Pulver)

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	Miesmuschel pos/neg	Miesmuschel [mg/kg]	z-Score Xpt _{ALL}	Methode	Hinweis
8	positiv			SFA	
11	positiv	>1		SFA	
12	positiv	149		SFA	Ergebnis umgerechnet °
13	positiv			SFA	

° Umrechnung S. 18

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

Methoden:

SFA = Sure Food ALLERGEN, R-Biopharm / Congen

Anmerkung:

Es wurden ausschließlich positive Ergebnisse für die Dotierungsniveauprobe erhalten.

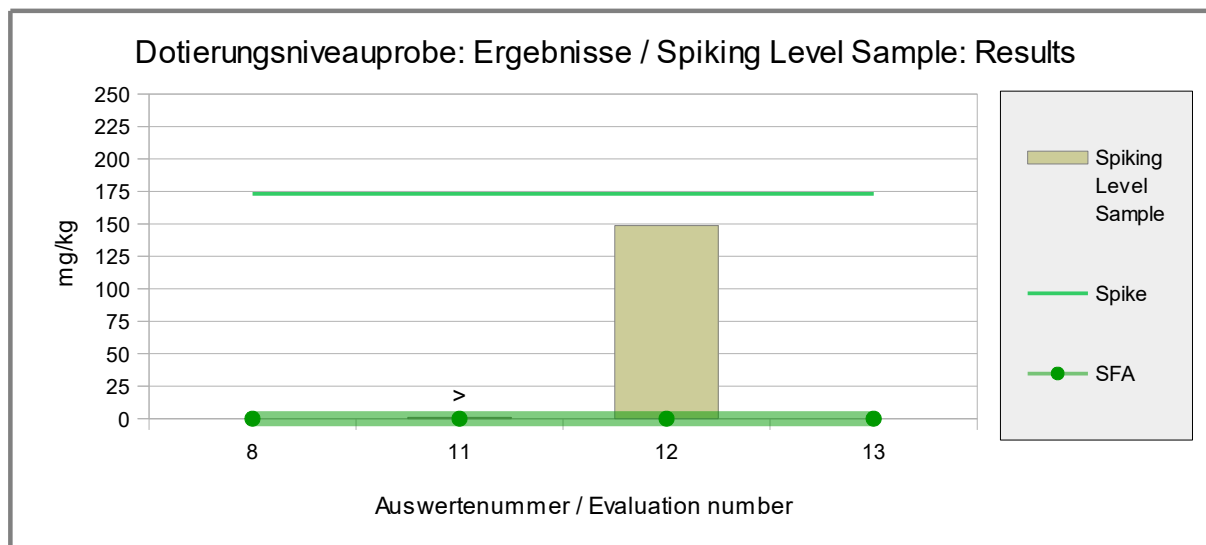


Abb./Fig. 4: PCR-Ergebnisse Mollusken (Miesmuschel-Pulver)
 grüne Linie = Zusatzniveau (Spike)
 runde Symbole = Zuordnung der Methoden (s. Legende)

**Wiederfindungsraten PCR für Mollusken (Miesmuschel-Pulver):
Dotierungsniveauprobe und Probe A**

Auswertenummer	Dotierungsniveauprobe	Wiederfindungsrate*	Probe A	Wiederfindungsrate*	Methode	Hinweis
	[mg/kg]	[%]	[mg/kg]	[%]		
8					SFA	
11	>1		>1		SFA	
12	149	86	245	101	SFA	Ergebnis umgerechnet °
13					SFA	

° Umrechnung S. 18

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

Methoden:

SFA = Sure Food ALLERGEN, R-Biopharm / Congen

* Wiederfindungsrate 100% Bezugsgröße: Miesmuscheln (Pulver), s. Seite 5

** Akzeptanzbereich der AOAC für Allergen-ELISAs

Anmerkung:

Ein Teilnehmer hat sowohl mit der Dotierungsniveauprobe als auch mit der dotierten Lebensmittelmatrix-Probe A mittels PCR eine Wiederfindungsrate im Bereich der AOAC-Anforderung von 50-150% erhalten.

4.2 Vergleichsuntersuchung Pistazie

4.2.1 ELISA-Ergebnisse: Pistazie

Qualitative Auswertung der Ergebnisse: Proben A und B

Auswertenummer	Probe A	Probe A	Probe B	Probe B	Qualitative Bewertung	Methode	Hinweis
	pos/neg	[mg/kg]	pos/neg	[mg/kg]	Übereinstimmungen mit Konsenswerten		
5	positiv	21,2	negativ	<4,6	2/2 (100%)	3M	Ergebnis umgerechnet °
3	positiv	48,1	negativ	<1	2/2 (100%)	AQ	
10	positiv	68,1	negativ	<1	2/2 (100%)	AQ	
11	positiv	87,1	negativ	<0,6	2/2 (100%)	AQ	Ergebnis umgerechnet °
13	positiv	180	negativ	<2,5	2/2 (100%)	AQ	
12	positiv	82,7	negativ	<1	2/2 (100%)	BC	
2	positiv	96,1	negativ	<2,0	2/2 (100%)	BF	
8	positiv	>20	negativ	< 1	2/2 (100%)	BF	
6	positiv	131	negativ	<LOQ	2/2 (100%)	IL	
7	positiv	87,4	negativ	<1	2/2 (100%)	IL	
9	positiv	646	negativ	<4,6	2/2 (100%)	OS	Ergebnis umgerechnet °

° Umrechnung S. 18

	Probe A	Probe B
Anzahl positiv	11	0
Anzahl negativ	0	11
Prozent positiv	100	0
Prozent negativ	0	100
Konsenswert	positiv	negativ

Methoden:

3M = 3M Protein ELISA Kit
 AQ = AgraQuant, RomerLabs
 BC = BioCheck ELISA
 BF = MonoTrace ELISA, BioFront Technologies
 IL = Immunolab
 OS = Orsell

Anmerkung:

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

Quantitative Auswertung ELISA: Probe A

Auswertenummer	Pistazie [mg/kg]	z'-Score X _{pt} ^{ALL}	Methode	Hinweis
5	21,2	-2,3	3M	Ergebnis umgerechnet °
3	48,1	-1,3	AQ	
10	68,1	-0,63	AQ	
11	87,1	0,04	AQ	Ergebnis umgerechnet °
13	180	3,3	AQ	
12	82,7	-0,12	BC	
2	96,1	0,35	BF	
8	>20		BF	
6	131	1,6	IL	
7	87,4	0,05	IL	
9	646		OS	Ergebnis umgerechnet °, Ergebnis ausgeschlossen

° Umrechnung S. 20

Methoden:

- 3M = 3M Protein ELISA Kit
- AQ = AgraQuant, RomerLabs
- BC = BioCheck ELISA
- BF = MonoTrace ELISA, BioFront Technologies
- IL = Immunolab
- OS = Orsell

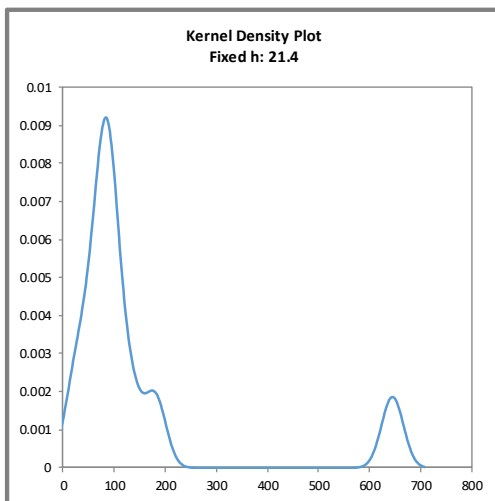


Abb. / Fig. 5:

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 zwei Nebenpeaks bei ca. 180 mg/kg (Methode AQ) und 646 mg/kg (Methode OS), die auf Einzelergebnisse oberhalb des Zielbereiches zurückgehen.

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

Kenndaten	Alle Ergebnisse [mg/kg]
Zugewiesener Wert (X_{pt})	X_{pt_ALL}
Anzahl der Messergebnisse [°]	9
Anzahl der Ausreißer	0
Mittelwert	89,0
Median	87,1
Robuster Mittelwert (X_{pt})	86,1
Robuste Standardabweichung (S^*)	45,1
Zielkenndaten:	
Zielstandardabweichung σ_{pt}'	28,6
Untere Grenze des Zielbereichs	29,0
Obere Grenze des Zielbereichs	143
Quotient S^*/σ_{pt}'	1,6
Standardunsicherheit $U_{(X_{pt})}$	18,8
Ergebnisse im Zielbereich	7
Prozent im Zielbereich	78

[°] ohne Ergebnisse Nr. 9 (vorab ausgeschlossen)

Anmerkungen zu den Kenndaten und Vergleich der Bezugswerte:

Die Kerndichte-Schätzung zeigte keine eindeutigen methodenabhängigen Unterschiede (ein hoher Einzelwert).

Die Verteilung der Ergebnisse aller Methoden wies eine leicht erhöhte Variabilität mit einem Quotienten S^*/σ_{pt}' von $> 2,0$ auf. Daher wurde unter Berücksichtigung der Standardunsicherheit mittels z'-Score ausgewertet. Der Quotient S^*/σ_{pt}' lag dann unter $2,0$.

Die robuste Standardabweichung liegt im oberen 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 298% vom Zusatzniveau von Pistazie zu Probe A, deutlich oberhalb der relevanten Anforderungen für die eingesetzten Methoden (s. 3.4.3 und S.33 "Wiederfindungsraten ELISA für Pistazie").

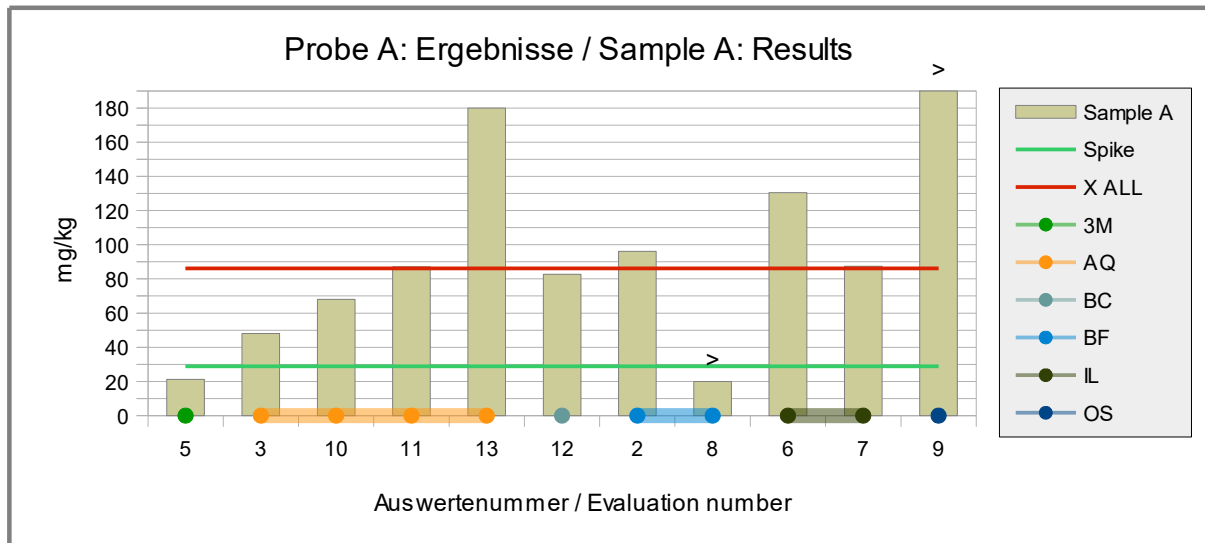


Abb./Fig. 6: ELISA-Ergebnisse Pistazie
 grüne Linie = Zusatzniveau (Spike)
 rote Linie = robuster Mittelwert aller Ergebnisse
 runde Symbole = Zuordnung der Methoden (s. Legende)

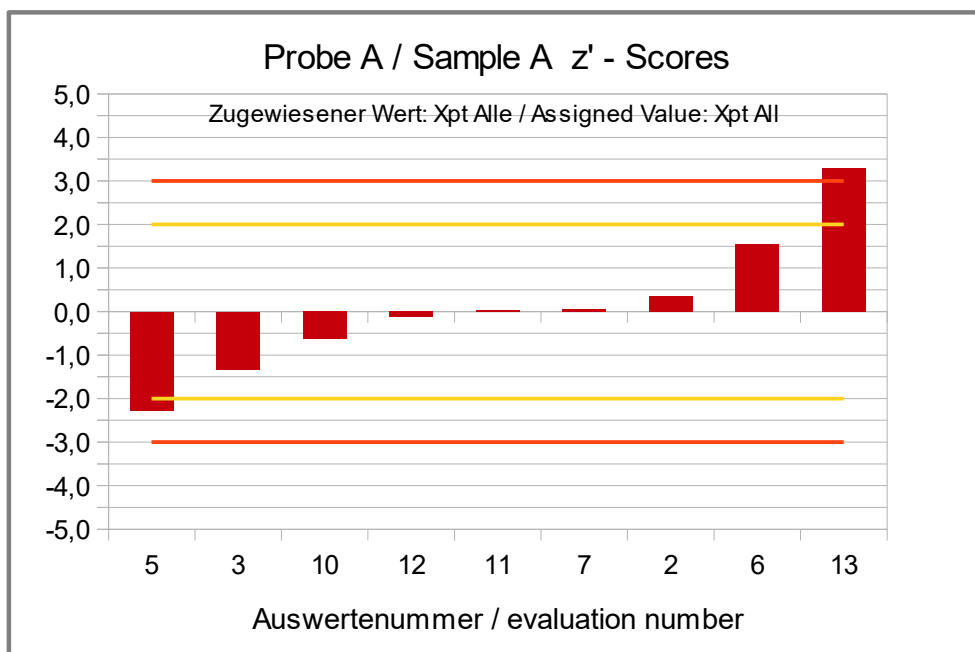


Abb./Fig. 7: z'-Scores (ELISA-Ergebnisse Pistazie) Zugewiesener Wert: robuster Mittelwert aller Ergebnisse

Quantitative Auswertung ELISA: Dotierungsniveauprobe

Auswertenummer	Dotierungsniveauprobe [mg/kg]	z'-Score $X_{pt,ALL}$	Methode	Hinweis
5	16,6	-2,4	3M	Ergebnis umgerechnet °
3	50,7	-1,3	AQ	
10	77,6	-0,33	AQ	
11	79,8	-0,26	AQ	Ergebnis umgerechnet °
13	130	1,5	AQ	
12	88,0	0,03	BC	
2	106	0,64	BF	
8	>40		BF	
6	168	2,8	IL	
7	78,8	-0,29	IL	
9	439		OS	Ergebnis umgerechnet °, Ergebnis ausgeschlossen

° Umrechnung S. 18

Methoden:

- 3M = 3M Protein ELISA Kit
- AQ = AgraQuant, RomerLabs
- BC = BioCheck ELISA
- BF = MonoTrace ELISA, BioFront Technologies
- IL = Immunolab
- OS = Orsell

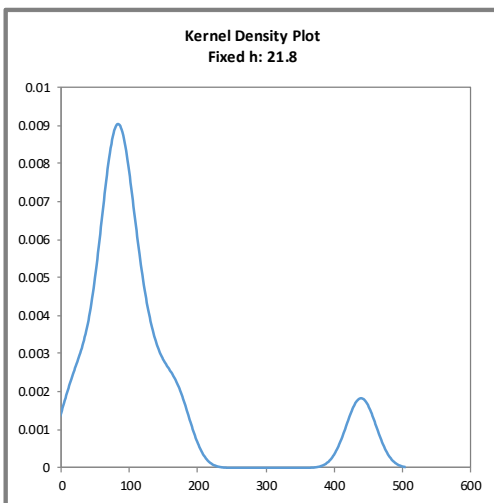


Abb. / Fig. 8:

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

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

Anmerkung:

Die Kerndichte-Schätzung zeigt annähernd eine symmetrische Verteilung mit einer Schulter bei ca. 170 mg/kg und einem Nebenpeak bei ca. 440 mg/kg, der auf einen Einzelwert außerhalb des Zielbereiches zurückgeht (Methode OS).

Kenndaten: Quantitative Auswertung ELISA Pistazie**Dotierungsniveauprobe**

Kenndaten	Alle Ergebnisse [mg/kg]
Zugewiesener Wert (X_{pt})	X_{pt_ALL}
Anzahl der Messergebnisse [°]	9
Anzahl der Ausreißer	0
Mittelwert	88,4
Median	79,8
Robuster Mittelwert (X_{pt})	87,3
Robuste Standardabweichung (S^*)	46,2
Zielkenndaten:	
Zielstandardabweichung σ_{pt}'	29,1
Untere Grenze des Zielbereichs	29,1
Obere Grenze des Zielbereichs	145
Quotient S^*/σ_{pt}'	1,6
Standardunsicherheit $U(X_{pt})$	19,2
Ergebnisse im Zielbereich	7
Prozent im Zielbereich	78

[°] ohne Ergebnisse Nr. 9 (vorab ausgeschlossen)

Anmerkungen zu den Kenndaten und Vergleich der Bezugswerte:

Die Kerndichte-Schätzung zeigte keine eindeutigen methodenabhängigen Unterschiede (ein hoher Einzelwert).

Die Verteilung der Ergebnisse aller Methoden wies eine erhöhte Variabilität mit einem Quotienten S^*/σ_{pt}' von $> 2,0$ auf. Daher wurde unter Berücksichtigung der Standardunsicherheit mittels z'-Score ausgewertet. Der Quotient S^*/σ_{pt}' lag dann unter $2,0$.

Die robuste Standardabweichung liegt im oberen 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 Mittelwerte der Auswertung lag mit 383% vom Zusatzniveau von Pistazie zur Dotierungsniveauprobe deutlich oberhalb der relevanten Anforderungen für die eingesetzten Methoden (s. 3.4.3 und S. 33 "Wiederfindungsraten ELISA für Pistazie").

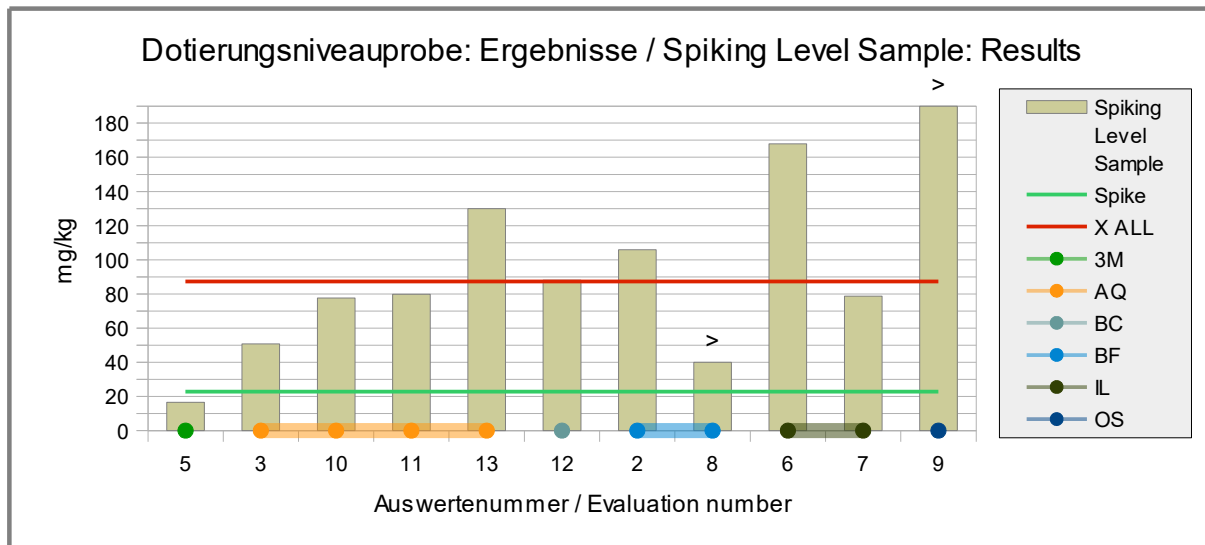


Abb./Fig. 9: ELISA-Ergebnisse Pistazie
 grüne Linie = Zusatzniveau (Spike)
 rote Linie = robuster Mittelwert aller Ergebnisse
 runde Symbole = Zuordnung der Methoden (s. Legende)

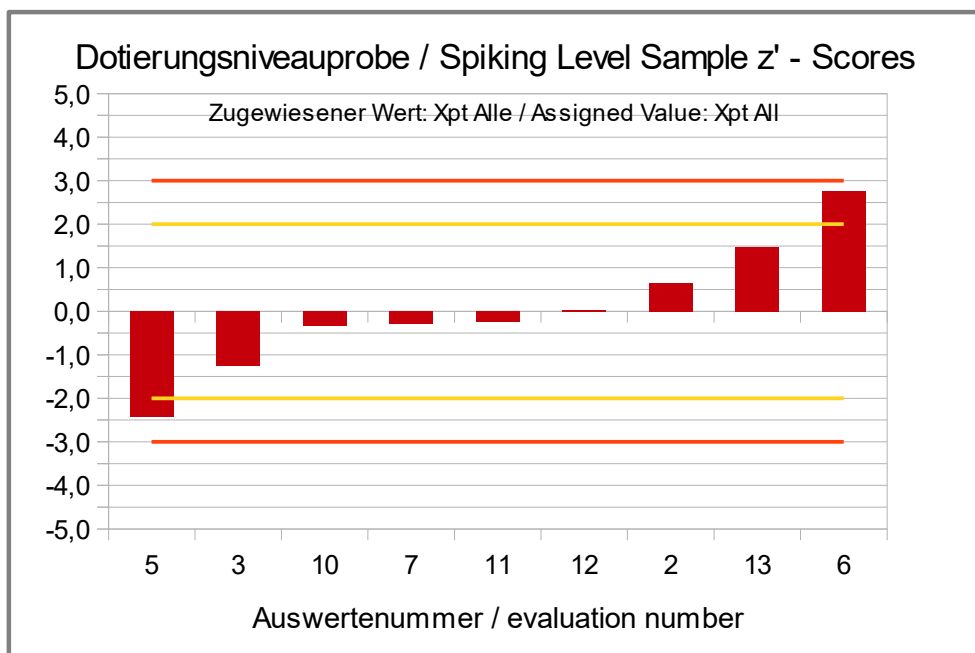


Abb./Fig. 10: z'-Scores (ELISA-Ergebnisse Pistazie) Zugewiesener Wert: robuster Mittelwert aller Ergebnisse

**Wiederfindungsraten ELISA für Pistazie:
Dotierungsniveauprobe und Probe A**

Auswertenummer	Dotierungsniveauprobe	Wiederfindungsrate*	Probe A	Wiederfindungsrate*	Methode	Hinweis
	[mg/kg]	[%]	[mg/kg]	[%]		
5	16,6	73	21,2	73	3M	Ergebnis umgerechnet °
3	50,7	222	48,1	166	AQ	
10	77,6	340	68,1	236	AQ	
11	79,8	350	87,1	302	AQ	Ergebnis umgerechnet °
13	130	570	180	623	AQ	
12	88,0	386	82,7	286	BC	
2	106	464	96,1	333	BF	
8	>40		>20		BF	
6	168	736	131	452	IL	
7	78,8	345	87,4	303	IL	
9	439	1924	646	2238	OS	Ergebnis umgerechnet °

° Umrechnung S. 18

AB**	50-150 %	AB**	50-150 %
Anzahl im AB	1	Anzahl im AB	1
Prozent im AB	10	Prozent im AB	10

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

** Akzeptanzbereich der AOAC für Allergen-ELISAs

Methoden:

- 3M = 3M Protein ELISA Kit
- AQ = AgraQuant, RomerLabs
- BC = BioCheck ELISA
- BF = MonoTrace ELISA, BioFront Technologies
- IL = Immunolab
- OS = Orsell

Anmerkung:

Ein Teilnehmer hat mit der Dotierungsniveauprobe und mit der dotierten Lebensmittelmatrix-Probe A mittels ELISA eine Wiederfindungsrate im Bereich der AOAC-Anforderung von 50-150% erhalten. Alle anderen Wiederfindungsraten lagen deutlich oberhalb von 150%.

4.2.2 PCR-Ergebnisse: Pistazie

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		
1	positiv		negativ		2/2 (100%)	GR	
8	positiv		negativ		2/2 (100%)	SFA	
12	positiv	77,6	negativ	<1	2/2 (100%)	SFA	
4	positiv		negativ		2/2 (100%)	div	
13	positiv		negativ		2/2 (100%)	div	

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

Methoden:

GR = SPECIALfinder Assay, real time PCR, Generon
 SFA = Sure Food ALLERGEN, R-Biopharm / Congen
 div = keine genaue Angabe / andere Methode
 div = not indicated / other method

Anmerkung:

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

Quantitative Auswertung PCR: Probe A

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

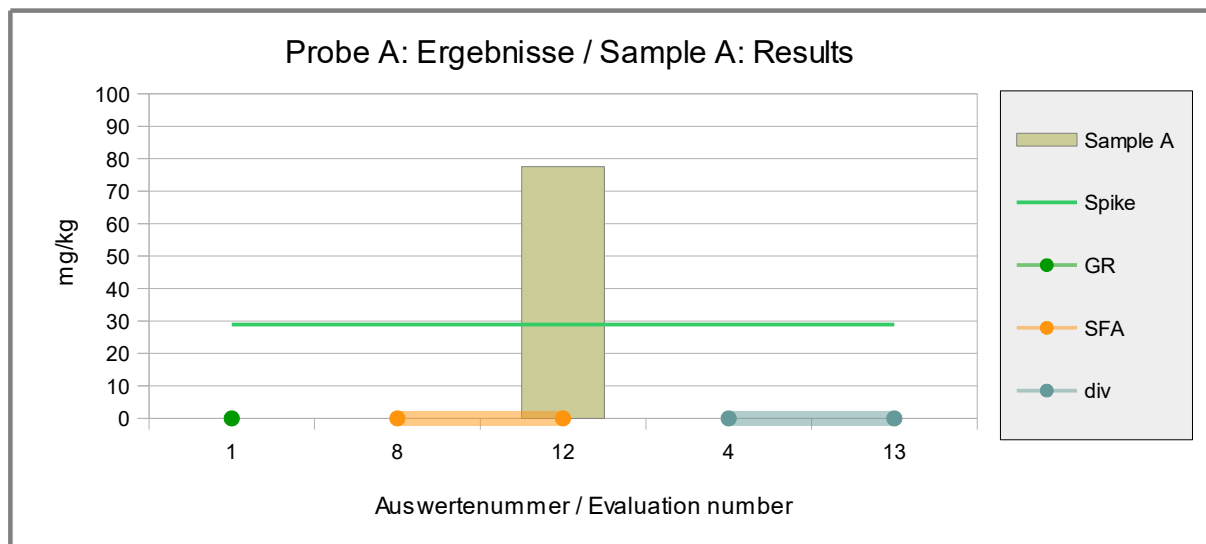


Abb./Fig. 11: PCR-Ergebnisse Pistazie
 grüne Linie = Zusatzniveau (Spike)
 runde Symbole = Zuordnung der Methoden (s. Legende)

Quantitative Auswertung PCR: Dotierungsniveauprobe

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

Auswertenummer	Pistazie	Dotierungsniveauprobe	z-Score Xpt _{ALL}	Methode	Hinweis
	pos/neg	[mg/kg]			
1	positiv			GR	
8	positiv			SFA	
12	positiv	27,0		SFA	
4	positiv			div	
13	positiv			div	

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

Methoden:

GR = SPECIALfinder Assay, real time PCR, Generon
 SFA = Sure Food ALLERGEN, R-Biopharm / Congen
 div = keine genaue Angabe / andere Methode
 div = not indicated / other method

Anmerkung:

Es wurden ausschließlich positive Ergebnisse für die Dotierungsniveauprobe erhalten.

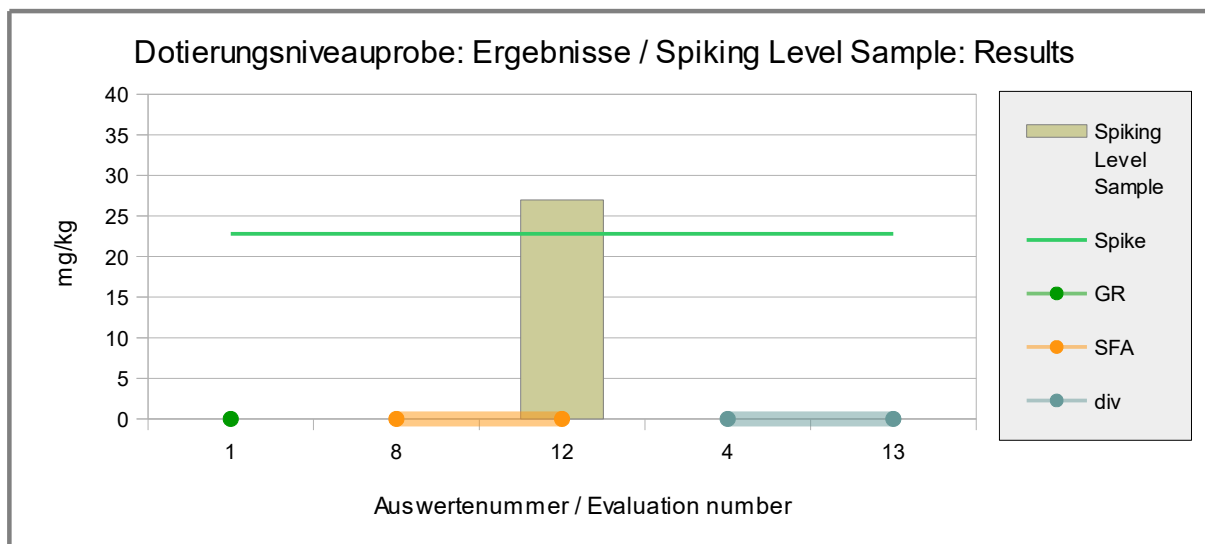


Abb./Fig. 12: PCR-Ergebnisse Pistazie
 grüne Linie = Zusatzniveau (Spike)
 runde Symbole = Zuordnung der Methoden (s. Legende)

**Wiederfindungsraten PCR für Pistazie:
Dotierungsniveauprobe und Probe A**

Auswertenummer	Dotierungsniveauprobe	Wiederfindungsrate*	Probe A	Wiederfindungsrate*	Methode	Hinweis
	[mg/kg]	[%]	[mg/kg]	[%]		
1					GR	
8					SFA	
12	27,0	118	77,6	268	SFA	
4					div	
13					div	

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

Methoden:

GR = SPECIALfinder Assay, real time PCR, Generon
 SFA = Sure Food ALLERGEN, R-Biopharm / Congen
 div = keine genaue Angabe / andere Methode
 div = not indicated / other method

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

** Akzeptanzbereich der AOAC für Allergen-ELISAs

Anmerkung:

Ein Teilnehmer hat mit der Dotierungsniveauprobe mittels PCR eine Wiederfindungsrate im Bereich der AOAC-Anforderung von 50-150% erhalten, während die Wiederfindungsrate für die Lebensmittelmatrix-Probe A deutlich über 150% lag.

4.3 z-Scores der Teilnehmer: Übersichtstabelle

Auswertenummer	ELISA Pistazie	
	Probe A	Dotierungsniveauprobe
1	-	-
2	0,35	0,64
3	-1,3	-1,3
4	-	-
5	-2,3	-2,4
6	1,6	2,8
7	0,05	-0,29
8	-	-
9	-	-
10	-0,63	-0,33
11	0,04	-0,26
12	-0,12	0,03
13	3,3	1,5

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: Mollusken (Miesmuschel)

Meth. Abk.	Auswertenummer	Datum der Analyse	Ergebnis Probe A		Ergebnis Probe B		Ergebnis Dotierungsniveauprobe		NWG / LOD *	BG / LOQ *	MU*	Angabe quantitatives Ergebnis als	Methode
			qualitativ	mg/kg	qualitativ	mg/kg	qualitativ	mg/kg					
		Tag/Monat											ELISA Test-Kit + Anbieter
3M	5	22.11.2019	positiv	1,3	negativ	<1	positiv	1,9		1		Molluskenprotein	3M Mollusk Protein ELISA kit E96MOL
IL	7	03.12.19	positiv	60	negativ	<20	positiv	40				Miesmuschel	Immunolab Molluscs (Tropomyosin) ELISA

* 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 nach ISO/IEC 17025	Sonstige Hinweise
		Antikörper	z.B. Extraktionslösung / Zeit / Temperatur	ja/nein	
3M	5		wie in Kit-Anleitung angegeben	ja	hohe Wiederfindung in Probe A (194%) Hohe Wiederfindung in Probe B (176%)
IL	7		quantitative Abschätzung zwischen LOD und LOQ als Miesmuschel (Faktor gemäß Manual)		

5.1.2 ELISA: Pistazie

Meth. Abk.	Auswertenummer	Datum der Analyse	Ergebnis Probe A		Ergebnis Probe B		Ergebnis Dotierungsneveauprobe		NWG / LOD *	BG / LOQ *	MU*	Angabe quantitatives Ergebnis als	Methode
			qualitativ	mg/kg	qualitativ	mg/kg	qualitativ	mg/kg					
3M	5	16.12.2019	positiv	4,6	negativ	<1	positiv	3,6		1		Pistazienprotein	ELISA Test-Kit + Anbieter
AQ	3	09.12.19	positiv	48,06	negativ	<1	positiv	50,71	1	1	40	Pistazien, gesamt	AgraQuant Plus ELISA Pistachio COKAL2748F, RomerLabs
AQ	10	25.11.19	-	68,1	-	<1	-	77,6	0,13	1		Pistazien, gesamt	AgraQuant ELISA Pistachio COKAL2748, RomerLabs
AQ	11	Dez 19	positiv	18,91	negativ	<0,13	positiv	17,32	0,13	1		Pistazienprotein	AgraQuant ELISA Pistachio COKAL2748, RomerLabs
AQ	13	19.12.19	positiv	180	negativ	<2.5	positiv	130	2,5	2,5		Bitte auswählen!	AgraQuant ELISA Pistachio COKAL2748, RomerLabs
BC	12	27.12.2019	positiv	82,66	negativ	<1	positiv	88,03	1	1	30,21	Pistachio, total	BioCheck ELISA Pistachio-Check
BF	2	20/12	positiv	96,1	negativ	<2.0	positiv	105,9		2		Pistazien, gesamt	MonoTrace Pistachio ELISA kit, BioFront Technologies
BF	8	04. Dez	positiv	>20	negativ	< 1	positiv	>40		1		Pistazien, gesamt	MonoTrace Pistachio ELISA kit, BioFront Technologies
IL	6	21.11.2019	positiv	130,5	negativ	<LOQ	positiv	167,8	0,2	1		Pistazien, gesamt	Immunolab Pistachio ELISA
IL	7	03.12.19	positiv	87,4	negativ	<1	positiv	78,8				Pistazien, gesamt	Immunolab Pistachio ELISA
OS	9		positiv	140,28	negativ	< 1	positiv	95,22		1		Pistazienprotein	EZ-PLATE PISTACHIO 1-40 ppm ORSELL

* 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 nach ISO/IEC 17025	Sonstige Hinweise
		Antikörper	z.B. Extraktionslösung / Zeit / Temperatur	ja/nein	
3M	5		wie in Kit-Anleitung angegeben	ja	Gute Wiederfindung in Probe A (108%) Gute Wiederfindung in Probe B (122%)
AQ	3	-	nach Kitanleitung	nein	
AQ	10	unbekannt	gemäss Kit		Die neue Artikelnummer dieses Kits ist: 10002086
AQ	11	Pistazie	laut Anleitung	nein	
AQ	13				
BC	12	Gemäss Kit-Anleitung	Gemäss Kit-Anleitung	ja	
BF	2	monoklonal			
BF	8			ja	
IL	6			nein	mit Proben Verdünnung 1:10
IL	7				
OS	9		1 g Probe in 20 mL des verdünnten Extraktionspuffera (1:10); 15 minutes, 60°C	ja	

5.1.3 PCR: Mollusken (Miesmuschel)

Meth. Abk.	Auswertenummer	Datum der Analyse	Ergebnis Probe A		Ergebnis Probe B		Ergebnis Dotierungsniveauprobe		NWG / LOD *	BG / LOQ *	MU*	Angabe quantitatives Ergebnis als z.B. Lebensmittel/ Protein	Methode
			positiv / negativ	mg/kg	positiv / negativ	mg/kg	positiv / negativ	mg/kg					
SFA	8	28. Nov	positiv		negativ		positiv		0,4			DNA-Mollusken	Sure Food ALLERGEN, R-Biopharm / Congen
SFA	11	Dez 19	positiv	>1	negativ	<0,4	positiv	>1	0,4	1		DNA-Mollusken	Sure Food ALLERGEN, R-Biopharm / Congen
SFA	12	30.12.2019	positiv	1262,3	negativ	<1	positiv	765,9	1	1	25,56	Mollusken, frisch	Sure Food ALLERGEN, R-Biopharm / Congen
SFA	13	08.01.20	positiv		negativ		positiv					Bitte auswählen!	Sure Food ALLERGEN, R-Biopharm / Congen

* 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 nach ISO/IEC 17025	Sonstige Hinweise
		Target-Sequenz / -DNA	z.B. Extraktion / Enzyme / Clean-Up / Real Time PCR / Gelelektrophorese / Cyclen	ja/nein	
SFA	8			ja	
SFA	11	Mollusken	Real time PCR	nein	
SFA	12	gemäß Kit-Anleitung	gemäß Kit-Anleitung	ja	
SFA	13				

5.1.4 PCR: Pistazie

Meth. Abk.	Auswertenummer	Datum der Analyse	Ergebnis Probe A		Ergebnis Probe B		Ergebnis Dotierungsniveauprobe		NWG / LOD *	BG / LOQ *	MU*	Angabe quantitatives Ergebnis als z.B. Lebensmittel/ Protein	Methode
			positiv / negativ	mg/kg	positiv / negativ	mg/kg	positiv / negativ	mg/kg					
GR	1	31.12.2019	pos		neg		-		0,01%			Bitte auswählen!	PCR Test-Kit + Anbieter GENERON
SFA	8	28. Nov	positiv		negativ		positiv		0,4			DNA-Pistazie	Sure Food ALLERGEN, R-Biopharm / Congen
SFA	12	26.11.2019	positiv	77,56	negativ	<1	positiv	26,97	1	1	32,12	Pistazie, gesamt	Sure Food ALLERGEN, R-Biopharm / Congen
div	4	22.11.	positiv		negativ		positiv		1			DNA-Pistazien	interne Methode
div	13	07.01.20	positiv		negativ		positiv					Bitte auswählen!	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 nach ISO/IEC 17025	Sonstige Hinweise
		Target-Sequenz / -DNA	z.B. Extraktion / Enzyme / Clean-Up / Real Time PCR / Gelelektrophorese / Cyclen	ja/nein	
GR	1			ja	
SFA	8			ja	
SFA	12	gemäß Kit-Anleitung	gemäß Kit-Anleitung	nein	
div	4		CTAB / Proteinase K + Amylase / Promega Wizard DNA Clean Up / Realtime PCR / 45 Zyklen	ja	
div	13	Dehydrin			

5.2 Homogenität

5.2.1 Mischungshomogenität vor der Abfüllung

Microtracer Homogenitätstest

DLA 07-2019 Probe A

Gewicht Gesamtprobe	2,28	kg
Microtracer	FSS-rot lake	
Teilchengröße	75 – 300	µm
Gewicht pro Partikel	2,0	µg
Tracerzugabe	22,9	mg/kg

Analysenergebnisse:

Probe	Einwaage [g]	Partikel Anzahl	Partikel [mg/kg]
1	5,00	53	21,2
2	5,08	59	23,2
3	5,17	51	19,7
4	5,05	53	21,0
5	5,13	59	23,0
6	5,02	52	20,7
7	5,18	48	18,5
8	5,10	50	19,6

Poisson-Verteilung

Probenanzahl	8	
Freiheitsgrad	7	
Mittelwert	53,1	Partikel
Standardabweichung	4,15	Partikel
χ^2 (CHI-Quadrat)	2,27	
Wahrscheinlichkeit	94	%
Wiederfindungsrate	91	%

Normalverteilung

Probenanzahl	8	
Mittelwert	20,9	mg/kg
Standardabweichung	1,63	mg/kg
rel. Standardabweichung	7,81	%
Horwitz Standardabweichung	10,1	%
HorRat-Wert	0,77	
Wiederfindungsrate	91	%

Microtracer Homogenitätstest

DLA 07-2019 Dotierungsniveauprobe

Gewicht Gesamtprobe	1,50	kg
Microtracer	FSS-rot lake	
Teilchengröße	75 – 300	µm
Gewicht pro Partikel	2,0	µg
Tracerzugabe	20,9	mg/kg

Analysenergebnisse:

Probe	Einwaage [g]	Partikel Anzahl	Partikel [mg/kg]
1	5,06	63	24,9
2	5,12	79	30,9
3	5,05	81	32,1
4	5,14	84	32,7
5	5,20	81	31,2
6	5,04	88	34,9
7	5,06	82	32,4
8	5,11	84	32,9

Poisson-Verteilung

Probenanzahl	8	
Freiheitsgrad	7	
Mittelwert	80,2	Partikel
Standardabweichung	7,48	Partikel
χ^2 (CHI-Quadrat)	4,88	
Wahrscheinlichkeit	68	%
Wiederfindungsrate	151	%

Normalverteilung

Probenanzahl	8	
Mittelwert	31,5	mg/kg
Standardabweichung	2,93	mg/kg
rel. Standardabweichung	9,32	%
Horwitz Standardabweichung	9,52	%
HorRat-Wert	0,98	
Wiederfindungsrate	151	%

5.3 Informationen zur Eignungsprüfung (EP)

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

EP-Nummer	DLA 07-2019
EP-Name	Allergene VII - Pistazien und Mollusken in Suppenpulver mit „Dotierungsniveauprobe“
Probenmatrix (Prozessierung)	Proben A + B: Champignon-Cremesuppe (Pulver)/ Zutaten: Modifizierte Stärke, Kartoffelmehl, Palmöl, Glukosesirup, Stärke, jodiertes Speisesalz, Kartoffeln, Zucker, Reismehl, Maltodextrin, Zwiebeln, Hefeextrakt, Champignonsaftkonzentrat, Speisesalz, Gewürze (Pfeffer, Muskatnuss, Curcuma), Knoblauch, Steinpilzpulver, Tomatenpulver, Aromen, Säuerungsmittel (Citronensäure) 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: Raumtemperatur (Langzeit gekühlt 2 - 10 °C) Dotierungsniveauprobe: Raumtemperatur
Verwendungszweck	Ausschließlich für Laboruntersuchungen (Qualitätskontrollproben)
Parameter	qualitativ + quantitativ: Pistazien (Pistazienprotein, DNA), Mollusken (Miesmuschel) (Molluskenprotein, 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
Abgabetermin	spätestens 06. Januar 2020
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. Ggf. werden die Prüfung der Gehalte, Homogenität und Stabilität von EP-Parametern von DLA im Unterauftrag vergeben.

6. Verzeichnis der Teilnehmer in alphabetischer Reihenfolge

Teilnehmer / Participant	Ort / Town	Land / Country
		Deutschland
		SCHWEIZ
		KANADA
		ITALIEN
		ZYPERN
		ITALIEN
		Deutschland
		Deutschland
		SCHWEIZ
		KANADA
		ITALIEN
		GROSSBRITANNIEN
		GRIECHENLAND

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

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

7. Verzeichnis relevanter Literatur

1. DIN EN ISO/IEC 17025:2005; Allgemeine Anforderungen an die Kompetenz von Prüf- und Kalibrierlaboratorien / General requirements for the competence of testing and calibration laboratories
2. DIN EN ISO/IEC 17043:2010; Konformitätsbewertung - Allgemeine Anforderungen an Eignungsprüfungen / Conformity assessment - General requirements for proficiency testing
3. ISO 13528:2015 & DIN ISO 13528:2009; Statistische Verfahren für Eignungsprüfungen durch Ringversuche / Statistical methods for use in proficiency testing by interlaboratory comparisons
4. ASU §64 LFGB: Planung und statistische Auswertung von Ringversuchen zur Methodenvalidierung / DIN ISO 5725 series part 1, 2 and 6 Accuracy (trueness and precision) of measurement methods and results
5. Verordnung / Regulation 882/2004/EU; Verordnung über über amtliche Kontrollen zur Überprüfung der Einhaltung des Lebensmittel- und Futtermittelrechts sowie der Bestimmungen über Tiergesundheit und Tierschutz / Regulation on official controls performed to ensure the verification of compliance with feed and food law, animal health and animal welfare rules
6. Evaluation of analytical methods used for regulation of food and drugs; W. Horwitz; Analytical Chemistry, 54, 67-76 (1982)
7. The International Harmonised Protocol for the Proficiency Testing of Analytical Laboratories ; J.AOAC Int., 76(4), 926 - 940 (1993)
8. A Horwitz-like funktion describes precision in proficiency test; M. Thompson, P.J. Lowthian; Analyst, 120, 271-272 (1995)
9. Protocol for the design, conduct and interpretation of method performance studies; W. Horwitz; Pure & Applied Chemistry, 67, 331-343 (1995)
10. Recent trends in inter-laboratory precision at ppb and sub-ppb concentrations in relation to fitness for purpose criteria in proficiency testing; M. Thompson; Analyst, 125, 385-386 (2000)
11. The International Harmonised Protocol for the Proficiency Testing of Analytical Chemistry Laboratories; Pure Appl Chem, 78, 145 - 196 (2006)
12. AMC Kernel Density - Representing data distributions with kernel density estimates, amc technical brief, Editor M Thompson, Analytical Methods Committee, AMCTB No 4, Revised March 2006 and Excel Add-in Kernel.xla 1.0e by Royal Society of Chemistry
13. EURACHEM/CITAC Leitfaden, Ermittlung der Messunsicherheit bei analytischen Messungen (2003); Quantifying Uncertainty in Analytical Measurement (1999)
14. GMP+ Feed Certification scheme, Module: Feed Safety Assurance, chapter 5.7 Checking procedure for the process accuracy of compound feed with micro tracers in GMP+ BA2 Control of residues, Version: 1st of January 2015 GMP+ International B.V.
15. MTSE SOP No. 010.01 (2014): Quantitative measurement of mixing uniformity and carry-over in powder mixtures with the rotary detector technique, MTSE Micro Tracers Services Europe GmbH
16. Homogeneity and stability of reference materials; Linsinger et al.; Accred Qual Assur, 6, 20-25 (2001)
17. AOAC Official Methods of Analysis: Guidelines for Standard Method Performance Requirements, Appendix F, p. 2, AOAC Int (2016)
18. 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 16.01-9 Untersuchung von Lebensmitteln - Bestimmung von Soja (Glycine max) in Getreidemehl mittels real-time PCR (2016) [Foodstuffs, determination of soya (Glycine max) in cereal flour by real-time PCR]
 33. ASU §64 LFGB L 18.00-21 Untersuchung von Lebensmitteln - Nachweis und Bestimmung von Paranuss (Bertholletia exceisa) in Reis- und Weizenkeksen sowie in Soßenpulver mittels real-time PCR (2014) [Foodstuffs, detection and determination of brazil nut (Bertholletia exceisa) in rice and wheat cookies and sauce powders by PCR]
 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]
 35. ASU §64 LFGB L 08.00-59 Untersuchung von Lebensmitteln - Nachweis und Bestimmung von Senf (Sinapis alba) sowie Soja (Glycine max) in Brühwürsten mittels real-time PCR (2013) [Foodstuffs, detection and determination of mustard (Sinapis alba) and soya (Glycine max) in boiled sausages by real-time PCR]
 36. ASU §64 LFGB L 08.00-65 Untersuchung von Lebensmitteln - Simultaner Nachweis und Bestimmung von schwarzem Senf (Brassica nigra L.), braunem Senf (Brassica juncea L.), weißem Senf (Sinapis alba), Sellerie (Apium graveolens) und Soja (Glycine max) in Brühwurst mittels real-time PCR (2017) [Foodstuffs, simultaneous detection and determination of black mustard (Brassica nigra L.), brown mustard (Brassica juncea L.), white mustard (Sinapis alba), celery (Apium graveolens) and soya (Glycine max) in boiled sausages by real-time PCR]

DLA 07/2019 - Allergene VII

Alle 13 Teilnehmer haben mindestens ein Ergebnis eingereicht. Die Auswertung erfolgte für ELISA-Methoden hinsichtlich des Parameters Pistazie qualitativ und quantitativ und für Mollusken (Miesmuschel) aufgrund der wenigen Ergebnisse nur qualitativ. Die PCR-Methoden wurden für alle Parameter ebenfalls qualitativ bewertet. Zusätzlich wurden für jeden Teilnehmer Wiederfindungsraten für die Dotierungsneuprobe und die dotierte Probe ermittelt. Details zu den einzelnen Parametern inklusive separater Auswertung nach Testkit-Herstellern sind dem Auswertebereich zu entnehmen.

8 Teilnehmer hatten ihren Sitz im Europäischen Ausland (Griechenland, Großbritannien, Italien, Schweiz, Zypern) und zwei Teilnehmer in Kanada.