



Auswertungs-Bericht

Laborvergleichsuntersuchung

DLA 08/2019

Allergene VIII:

Buchweizen, Mandel und Macadamia

in Frühstückscerealien

DLA - Proficiency Tests GmbH

Kalte Weide 21

24641 Sievershütten/Germany

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

Koordinator der LVU:

Dr. Matthias Besler-Scharf

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

<i>EP-Anbieter</i> <i>PT-Provider</i>	<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</i> <i>PT-Number</i>	DLA 08/2019
<i>EP-Koordinator</i> <i>PT-Coordinator</i>	Dr. Matthias Besler-Scharf
<i>Status des EP-Bericht</i> <i>Status of PT-Report</i>	<p>Abschlussbericht / Final report (20. März 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</i> <i>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: 20. März 2020</p>
<i>Unteraufträge</i> <i>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</i> <i>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.....	9
2.2 Probenversand und Informationen zur Untersuchung.....	9
2.3 Ergebnisübermittlung.....	9
3. Auswertung.....	10
3.1 Konsenswert der Teilnehmer (zugewiesener Wert).....	10
3.2 Robuste Standardabweichung.....	11
3.3 Ausschluss von Ergebnissen und Ausreißer.....	11
3.4 Zielstandardabweichung (für die Eignungsbeurteilung).....	12
3.4.1 Allgemeines Modell nach Horwitz.....	12
3.4.2 Auswertung eines Versuchs zur Präzision.....	12
3.4.3 Werte aus Erkenntnissen.....	15
3.5 z-Score.....	16
3.5.1 Warn- und Eingriffssignale.....	16
3.6 z'-Score.....	17
3.7 Quotient S^*/opt	17
3.8 Standardunsicherheit und Rückführbarkeit.....	17
3.9 Graphische Darstellung der Bezugswerte.....	18
3.10 Wiederfindungsraten: Dotierung.....	18
4. Ergebnisse.....	19
4.1 Vergleichsuntersuchung Buchweizen.....	21
4.1.1 ELISA-Ergebnisse: Buchweizen.....	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.....	48
4.4 z-Scores der Teilnehmer: Übersichtstabelle.....	49
5. Dokumentation.....	50
5.1 Angaben der Teilnehmer.....	50
5.1.1 ELISA: Buchweizen.....	50
5.1.2 ELISA: Macadamia.....	51
5.1.3 ELISA: Mandel.....	52
5.1.4 PCR: Buchweizen.....	53
5.1.5 PCR: Macadamia.....	53
5.1.6 PCR: Mandel.....	54
5.2 Homogenität.....	55
5.2.1 Mischungshomogenität vor der Abfüllung.....	55
5.3 Informationen zur Eignungsprüfung (EP).....	56
6. Verzeichnis der Teilnehmer in alphabetischer Reihenfolge.....	57
7. Verzeichnis relevanter Literatur.....	58

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 eine Mischung handelsüblicher Müslis 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 B** folgendermaßen hergestellt:

Die Dotierungsmaterialien, die die allergenen Zutaten Buchweizen, Mandel und Macadamia enthalten, wurden gesiebt (mesh 400 µm), dann zu einem Aliquot der Grundmatrix gegeben und die Mischung homogenisiert. Anschließend wurde portionsweise erneut Grundmatrix in 3 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, Brombee- ren), Salz Nährwertangaben pro 100 g: Fett 14 g, Kohlenhydrate 63 g, Eiweiß 10 g	62,1 g/100 g	62,0 g/100 g	-
Müsli Crunchy Zutaten: Haferflocken, Zucker, Palmöl, Weizen- mehl, Kokosnuss, Melasse, Salz, Gers- tenmalzextrakt, Zimt Nährwertangaben pro 100 g: Fett 22 g, Kohlenhydrate 60 g, Eiweiß 8 g	12,6 g/100 g	12,6 g/100 g	-
Haferflocken Zutaten: Haferflocken	25,2 g/100 g	25,2 g/100 g	-
Kartoffelpulver Zutaten: Kartoffeln, E471, E304, E223, E100	-	-	99,7 g/100 g
<i>Buchweizen:</i> - als Buchweizen* - davon 12,6% Gesamtprotein**	-	180 mg/kg 22,7 mg/kg	172 mg/kg 21,7 mg/kg
<i>Mandel:</i> - als Mandel* - davon 21,1% Gesamtprotein**	-	28,2 mg/kg 5,96 mg/kg	28,2 mg/kg 5,96 mg/kg
<i>Macadamia:</i> - als Macadamia* - davon 8,0% Gesamtprotein**	-	34,8 mg/kg 2,78 mg/kg	29,3 mg/kg 2,34 mg/kg
<i>weitere Zutaten:</i> Maltodextrin, Natriumsulfat und Siliciumdioxid	-	<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=5,18 für Mandel- und F=5,30 für Macadamiaprotein)

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 B und Dotierungsneueprobe hat eine Wahrscheinlichkeit von 77% bzw. 67% 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 1,1 bzw. 1,2 erhalten. Die Ergebnisse der Microtracer-Analyse sind in der Dokumentation angegeben.

Homogenität der abgefüllten dotierten Probe B

Durchführung der Homogenitätstests

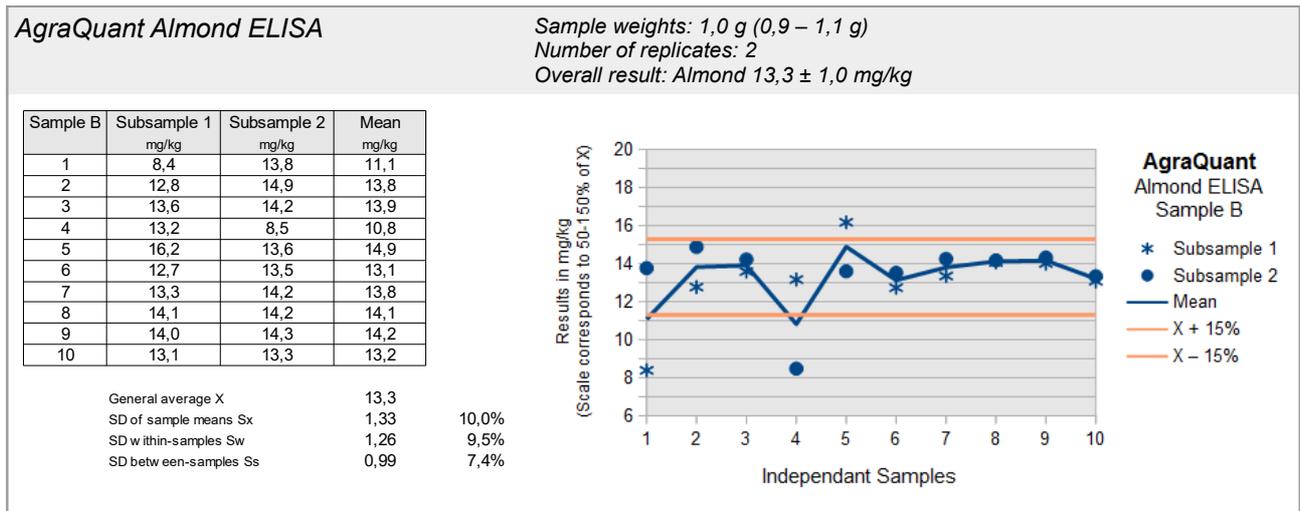
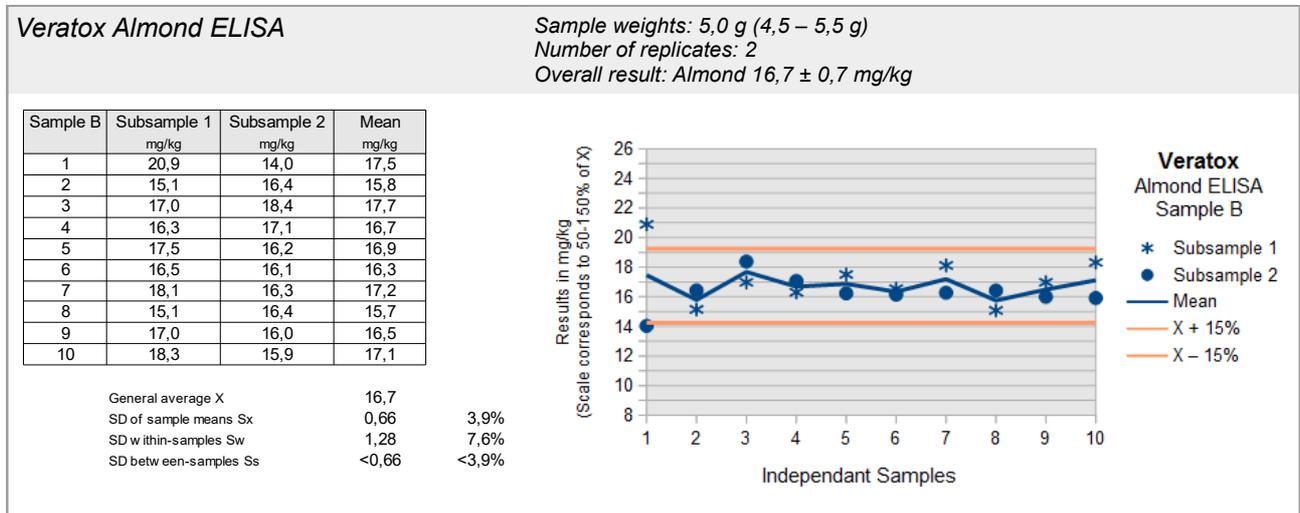
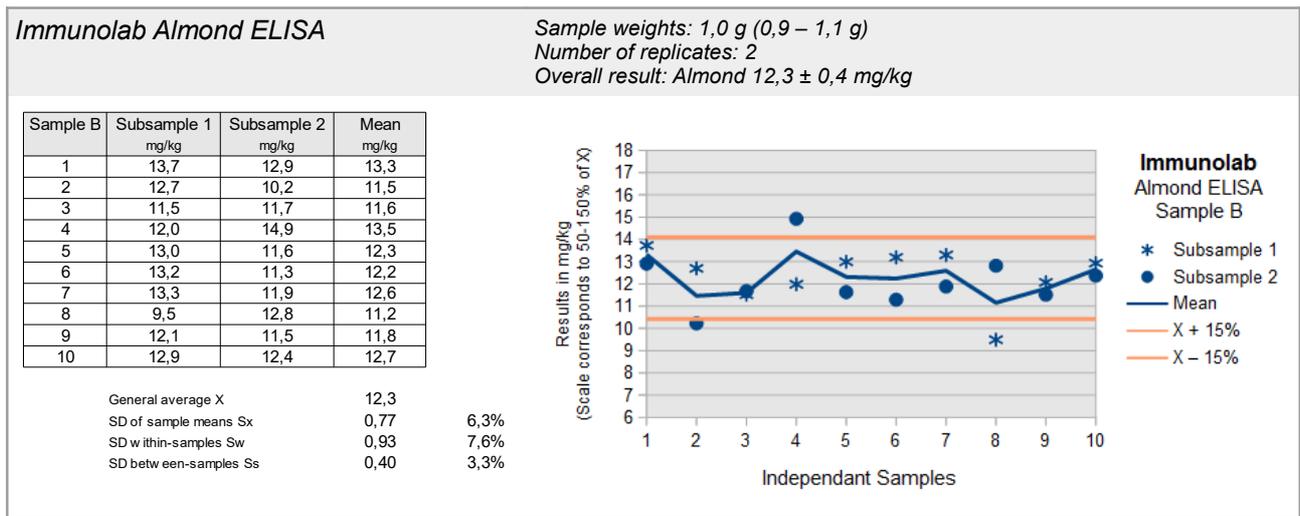
Die Homogenitätstests wurden in Kooperation mit den Labors der angegebenen Testkit-Anbieter durchgeführt. Von DLA wurden zufällig 10 Muster der abgefüllten dotierten Probe ausgewählt und davon jeweils 2 Teilproben in zuvor zufällig-codierte Extraktionsbehälter eingewogen und anschließend den Labors zur Analyse zugeschickt. 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

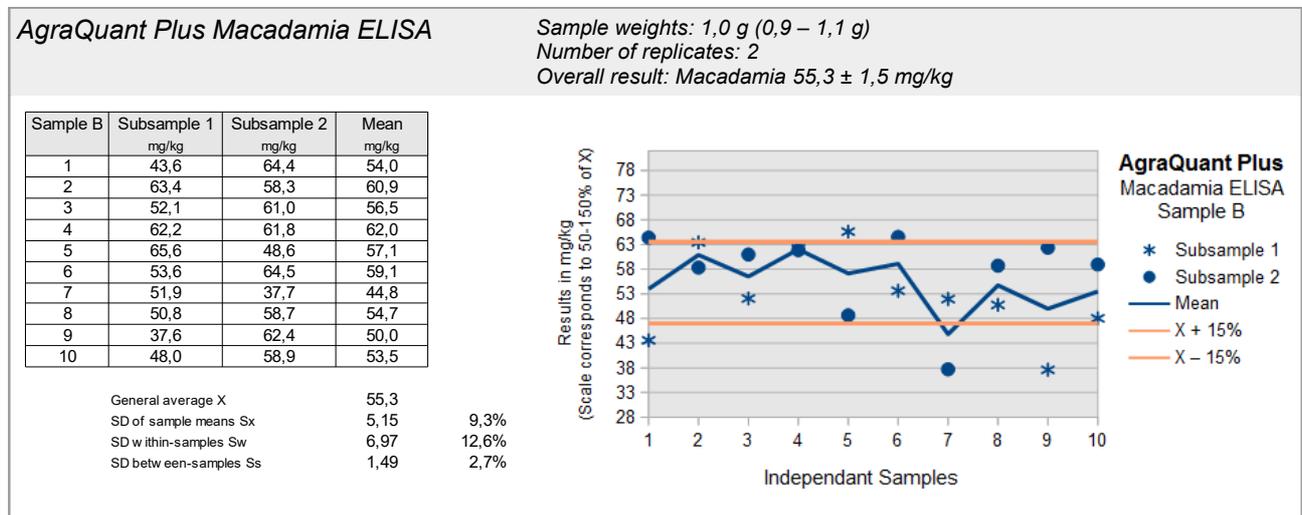
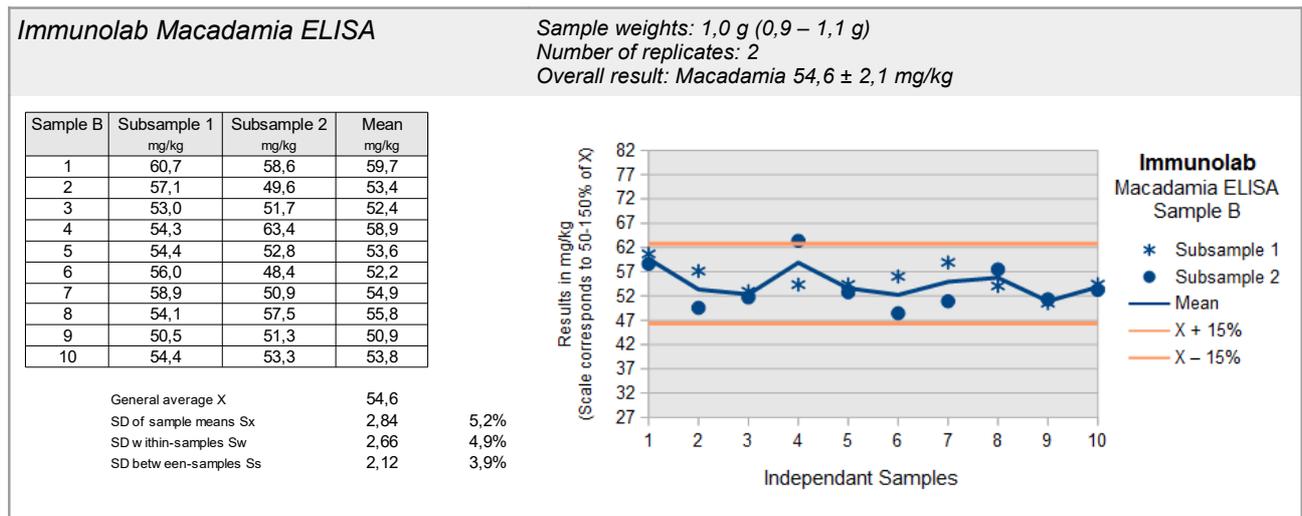
Die Homogenität wird mit einer Standardabweichung zwischen den Proben von $S_s \leq 15\%$ („Heterogenitätsstandardabweichung“) als hinreichend gesichert angesehen. Dieses Kriterium wird für die untersuchte Probe B in allen ELISA-Tests für PiMandel (Immunolab, Veratox und AgraQuant) sowie Macadamia (Immunolab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



ELISA-Tests: Homogenität Macadamia / Homogeneity Macadamia



2.1.2 Stabilität

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

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

Der a_w -Wert der EP-Proben lag bei ca. $0,32$ ($19,4^\circ\text{C}$). 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 50. Kalenderwoche 2019 je eine Portion der Untersuchungsmaterialien A und B sowie eine Dotierungsmaterialprobe verschickt. Die Untersuchungsverfahren wurden freigestellt. Die Untersuchungen waren durchzuführen bis spätestens 31. 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 Buchweizen, Mandel und Macadamia im mg/kg Bereich in der Matrix Müsli mit Früchten. 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 15 Teilnehmer haben Ergebnisse abgegeben.

3. Auswertung

Verschiedene ELISA-Methoden zur quantitativen Bestimmung von Allergenen in Lebensmitteln können verschiedene Antikörper-Spezifitäten aufweisen, mit unterschiedlichem Referenzmaterial kalibriert worden sein und sich unterschiedlicher Extraktionsverfahren bedienen. Die verschiedenen ELISA-Methoden können daher zu einer unterschiedlichen Bewertung des Gehalts eines Analyten führen [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	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_r	RSD_r	RSD_R	σ_{pt}	Methode / Literatur
Mandel	Reiskekse	105,2 18,0 10,5	105 % 90 % 105 %	-	19,3% 44,0% 32,0%	27,5% 49,1% 38,8%	23,9% 38,0% 31,5%	rt-PCR ASU 18.00-20
Mandel	Weizenkekse Soßenpulver	114,3 88,1	94,6 % 88,1 %	-	22,1% 43,9%	41,8% 43,1%	38,8% - %	rt-PCR ASU 18.00-20
Mandel	Reiskekse	109 21,3 12,3	109 % 107 % 121 %	-	17,6% 35,8% 32,0%	32,8% 45,0% 47,8%	30,3% 37,2% 42,1%	rt-PCR multiplex ASU 18.00-22
Mandel	Weizenkekse Soßenpulver	120,7 112	98,2 % 94,1 %	-	15,7% 36,2%	32,5% 42,8%	30,5% 34,3%	rt-PCR multiplex ASU 18.00-22
Paranuss	Reiskekse	89,1 17,3 9,8	89,1 % 86,5 % 98 %	-	34,1% 36,2% 40,2%	34,4% 38,2% 41,8%	24,5% 28,4% 30,6%	rt-PCR ASU 18.00-21
Paranuss	Weizenkekse Soßenpulver	80,8 42,6	65,7 % 42,6 %	-	25,6% 27,5%	36,4% 39,7%	31,6% 34,6%	rt-PCR ASU 18.00-21
Paranuss	Reiskekse	96,6 14,2	96,6 % 71 %	-	16,8% 54,2%	31,8% 56,5%	29,5% 41,5%	rt-PCR multiplex ASU 18.00-22
Paranuss	Weizenkekse Soßenpulver	76,5 48,4	62,2 % 48,4 %	-	15,6% 34,4%	35,8% 37,5%	34,1% 28,5%	rt-PCR multiplex ASU 18.00-22

3.4.3 Werte aus Erkenntnissen

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

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

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

Tabelle 3: ELISA-Validierungskriterien

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

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

Tabelle 4: PCR-Validierungskriterien

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

(a) = Trueness / Richtigkeit

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

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

3.5 z-Score

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

Die Berechnung erfolgt nach:

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

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

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

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

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

3.5.1 Warn- und Eingriffssignale

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

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

3.6 z'-Score

Der z'-Score kann u.a. zur Beurteilung der Ergebnisse der teilnehmenden Labore herangezogen werden, wenn die Standardunsicherheit des zugewiesenen Wertes berücksichtigt werden muss (s. 3.8). Der z'-Score drückt das Verhältnis der Abweichung des Ergebnisses (x_i) des betreffenden Teilnehmers vom zugewiesenen Wert zur Wurzel aus der Quadratsumme von Zielstandardabweichung (σ_{pt}) und Standardunsicherheit ($U_{(x_{pt})}$) aus [3].

Die Berechnung erfolgt nach:

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

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

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

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

Zu Warn- und Eingriffssignalen siehe 3.5.1.

3.7 Quotient S*/ σ_{pt}

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

3.8 Standardunsicherheit und Rückführbarkeit

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

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

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

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

3.9 Graphische Darstellung der Bezugswerte

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

3.10 Wiederfindungsraten: Dotierung

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

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 **Buchweizen-, Mandel-, und Macadamiaprotein** angegeben wurden, sind mit dem experimentell bestimmten Proteingehalt der Rohstoffe auf das **Gesamtlebensmittel (Buchweizen, Mandel, Macadamia)** umgerechnet worden (s. S.5).

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°:		
Zielstandardabweichung σ_{pt} bzw. σ_{pt}'		
untere Grenze des Zielbereichs ($X_{pt} - 2\sigma_{pt}$) bzw. ($X_{pt} - 2\sigma_{pt}'$)°		
obere Grenze des Zielbereichs ($X_{pt} + 2\sigma_{pt}$) bzw. ($X_{pt} + 2\sigma_{pt}'$)°		
Quotient S^*/σ_{pt} bzw. S^*/σ_{pt}'		
Standardunsicherheit $U_{(X_{pt})}$		
Ergebnisse im Zielbereich		
Prozent im Zielbereich		

° 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

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		
15	negativ	0	positiv	97,7	2/2 (100%)	BF	
12	negativ	<20	positiv	417	2/2 (100%)	ES	Ergebnis umgerechnet °
14	negativ	<2,5	positiv	183	2/2 (100%)	MI-II	Ergebnis umgerechnet °

° Umrechnung S. 19

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

Methoden:

BF = MonoTrace ELISA, BioFront Technologies
 ES = ELISA-Systems
 MI-II = Morinaga Institute ELISA Kit II

Anmerkung:

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

Quantitative Auswertung ELISA: Probe B

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

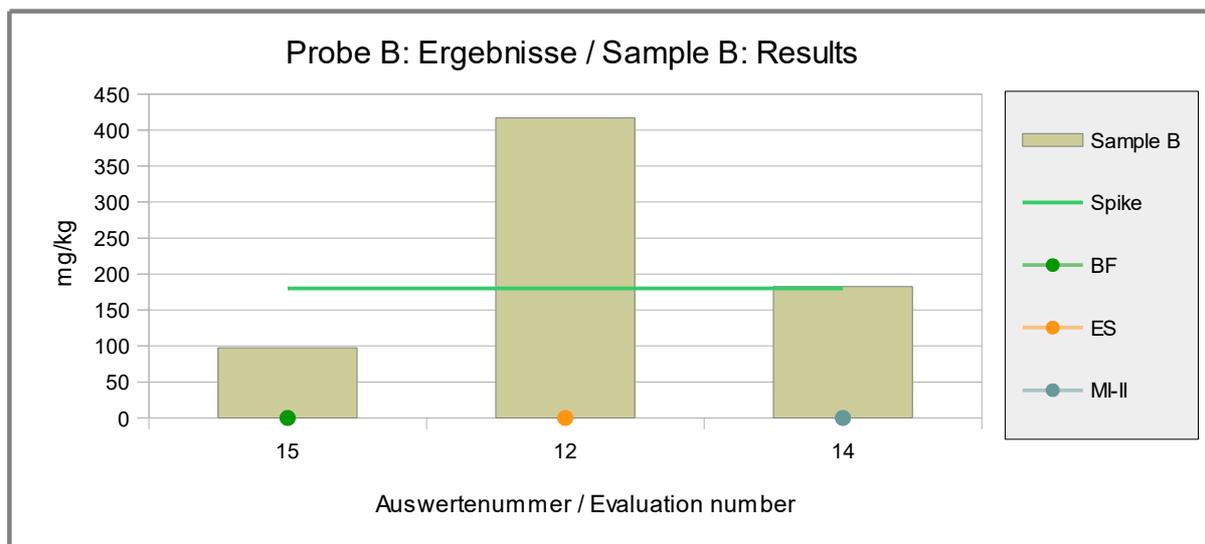


Abb./Fig. 1: ELISA-Ergebnisse Buchweizen
 grüne Linie = Zusatzniveau (Spike)
 runde Symbole = Zuordnung der Methoden (s. Legende)

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 _{pt} ^{ALL}	Methode	Hinweis
15	positiv	175		BF	
12	positiv	417		ES	Ergebnis umgerechnet °
14	positiv	198		MI-II	Ergebnis umgerechnet °

° Umrechnung S. 19

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

Methoden:

BF = MonoTrace ELISA, BioFront Technologies

ES = ELISA-Systems

MI-II = Morinaga Institute ELISA Kit II

Anmerkung:

Es wurden ausschließlich positive Ergebnisse für die Dotierungsniveauprobe erhalten.

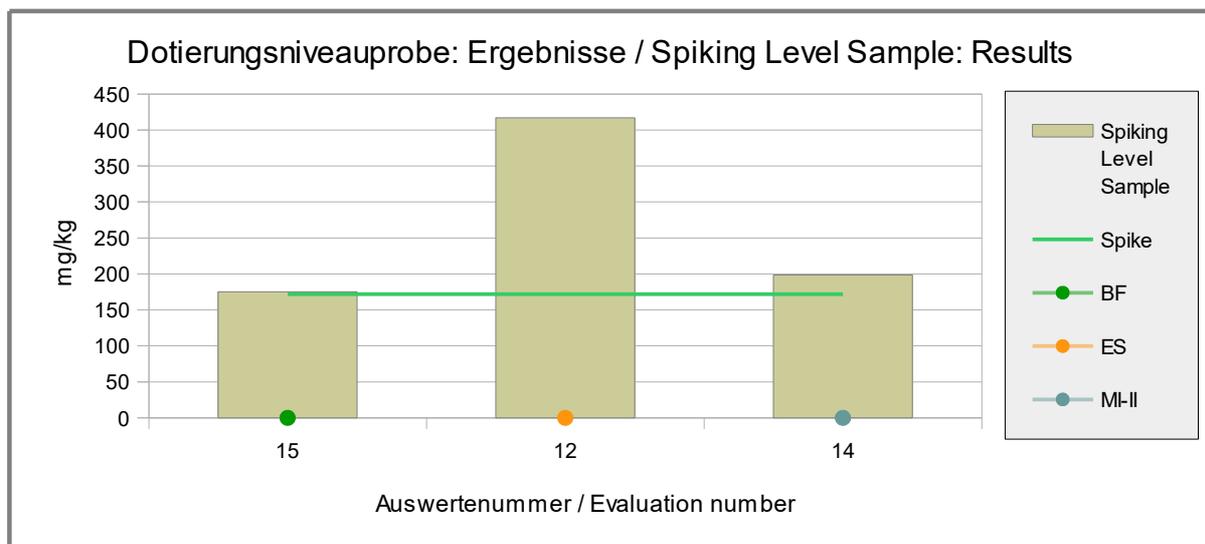


Abb./Fig. 2: ELISA-Ergebnisse Buchweizen
 grüne Linie = Zusatzniveau (Spike)
 runde Symbole = Zuordnung der Methoden (s. Legende)

**Wiederfindungsraten ELISA für Buchweizen:
Dotierungsniveauprobe und Probe B**

Auswertenummer	Dotierungsniveauprobe	Wiederfindungsrate*	Probe B	Wiederfindungsrate*	Methode	Hinweis
	[mg/kg]	[%]	[mg/kg]	[%]		
15	175	102	97,7	54	BF	
12	417	242	417	232	ES	Ergebnis umgerechnet °
14	198	115	183	101	MI-II	Ergebnis umgerechnet °

° Umrechnung S. 19

AB**	50-150 %	AB**	50-150 %
Anzahl im AB	2	Anzahl im AB	2
Prozent im AB	67	Prozent im AB	67

Methoden:

BF = MonoTrace ELISA, BioFront Technologies

ES = ELISA-Systeme

MI-II = Morinaga Institute ELISA Kit II

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

** Akzeptanzbereich der AOAC für Allergen-ELISAs

Anmerkung:

Zwei von drei Teilnehmern haben sowohl mit der Dotierungsniveauprobe als auch mit der dotierten Lebensmittelmatrix-Probe B mittels ELISA eine Wiederfindungsrate im Bereich der AOAC-Anforderung von 50-150% erhalten.

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		
4	negativ		positiv		2/2 (100%)	SFA	
12	negativ	<1	positiv	333	2/2 (100%)	SFA	
14	negativ	<1	positiv		2/2 (100%)	div	

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

Methoden:

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 B.

Quantitative Auswertung PCR: Probe B

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

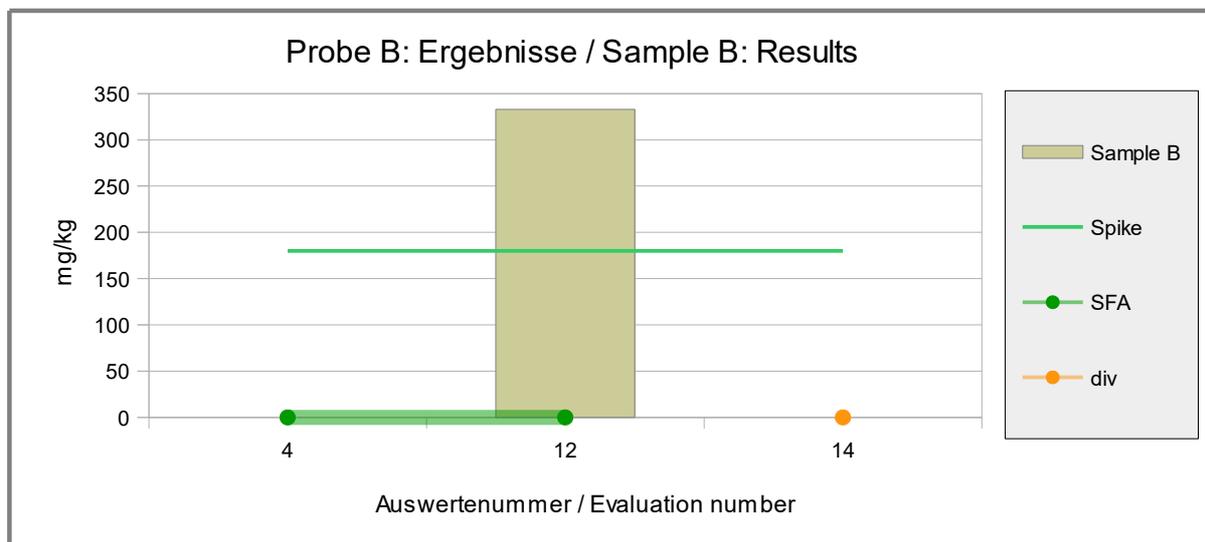


Abb./Fig. 3: PCR-Ergebnisse Buchweizen
 grüne Linie = Zusatzniveau (Spike)
 runde Symbole = Zuordnung der Methoden (s. Legende)

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 Xpt _{ALL}	Methode	Hinweis
4	positiv			SFA	
12	positiv	256		SFA	
14	positiv			div	

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

Methoden:

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.

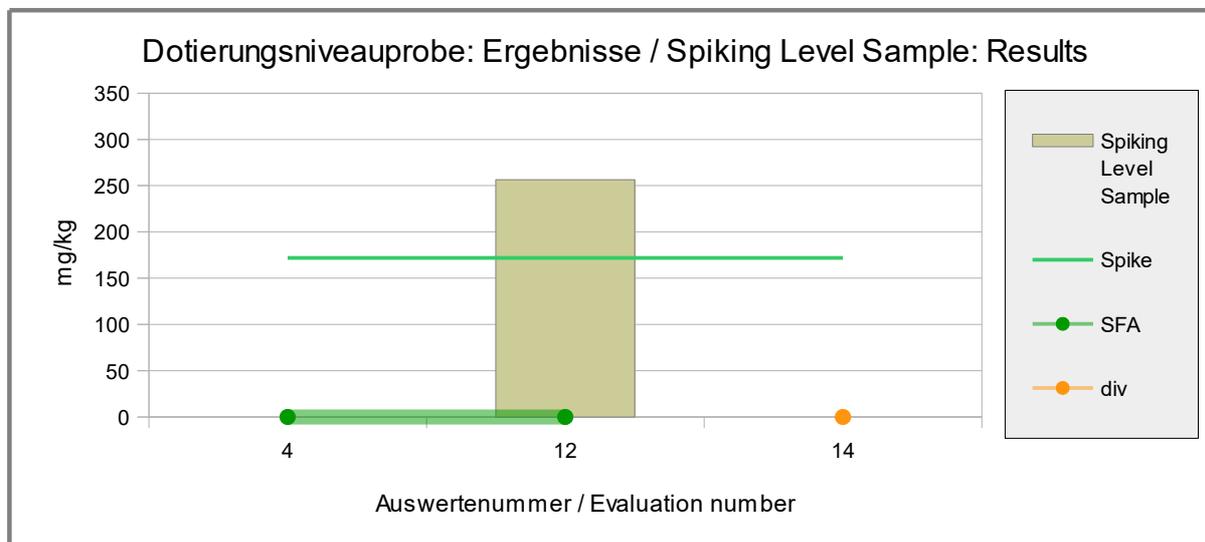


Abb./Fig. 4: PCR-Ergebnisse Buchweizen
 grüne Linie = Zusatzniveau (Spike)
 runde Symbole = Zuordnung der Methoden (s. Legende)

**Wiederfindungsraten PCR für Buchweizen:
Dotierungsniveauprobe und Probe B**

Auswertenummer	Dotierungsniveauprobe	Wiederfindungsrate*	Probe B	Wiederfindungsrate*	Methode	Hinweis
	[mg/kg]	[%]	[mg/kg]	[%]		
4					SFA	
12	256	149	333	185	SFA	
14					div	

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

Methoden:

SFA = Sure Food ALLERGEN, R-Biopharm / Congen

div = keine genaue Angabe / andere Methode

div = not indicated / other method

* Wiederfindungsrate 100% Bezugsgröße: Buchweizen, 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. Für die dotierte Lebensmittelmatrix-Probe B lag die Wiederfindungsrate oberhalb dieses Akzeptanzbereiches.

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		
9	negativ	<1	positiv	52,9	2/2 (100%)	AQ	
14	negativ	<1	positiv	90,0	2/2 (100%)	AQ	
1	negativ	<2,0	positiv	22,2	2/2 (100%)	BF	
2	negativ	< 2	positiv	21,8	2/2 (100%)	BF	
10	negativ	<2	positiv	69,0	2/2 (100%)	BF	
15	negativ	0	positiv	15,8	2/2 (100%)	BF	
7	negativ	<1	positiv	63,0	2/2 (100%)	EF	
8	negativ	<0,1	positiv	58,0	2/2 (100%)	EF	
11	negativ	<4,1	positiv	73,8	2/2 (100%)	ET	Ergebnis umgerechnet °
12	negativ	<1	positiv	60,9	2/2 (100%)	IL	

° Umrechnung S. 19

	Probe A	Probe B
Anzahl positiv	0	10
Anzahl negativ	10	0
Prozent positiv	0	100
Prozent negativ	100	0
Konsenswert	negativ	positiv

Methoden:

AQ = AgraQuant, RomerLabs
 BF = MonoTrace ELISA, BioFront Technologies
 EF = SensiSpec ELISA Kit, Eurofins
 ET = Elution Technologies ELISA Kit
 IL = Immunolab

Anmerkung:

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

Quantitative Auswertung ELISA: Probe B

Auswertenummer	Macadamia [mg/kg]	z'-Score X _{pt} ^{ALL}	Methode	Hinweis
9	52,9	-0,35	AQ	
14	90,0	1,6	AQ	
1	22,2	-2,0	BF	
2	21,8	-2,0	BF	
10	69,0	0,52	BF	
15	15,8	-2,3	BF	
7	63,0	0,19	EF	
8	58,0	-0,08	EF	
11	73,8	0,77	ET	Ergebnis umgerechnet °
12	60,9	0,08	IL	

° Umrechnung S. 19

Methoden:

- AQ = AgraQuant, RomerLabs
- BF = MonoTrace ELISA, BioFront Technologies
- EF = SensiSpec ELISA Kit, Eurofins
- ET = Elution Technologies ELISA Kit
- IL = Immunolab

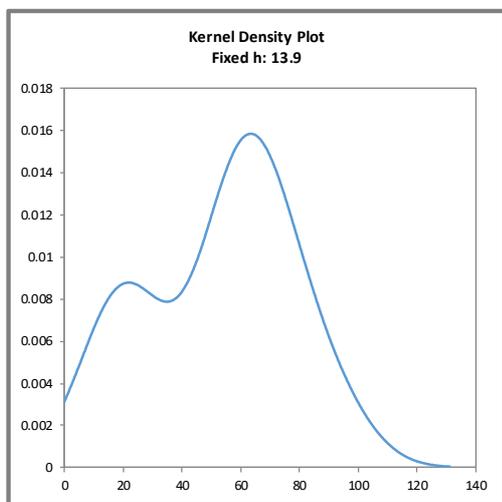


Abb. / Fig. 5:

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 eine breite annähernd symmetrische Verteilung der Ergebnisse mit einem Nebenpeak bei < 40 mg/kg, der auf drei von vier Ergebnissen der Methode BF zurückgeht.

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

Kenndaten	Alle Ergebnisse [mg/kg]
Zugewiesener Wert (X_{pt})	X_{pt_ALL}
Anzahl der Messergebnisse	10
Anzahl der Ausreißer	0
Mittelwert	52,7
Robuster Mittelwert	52,7
Median (X_{pt})	59,4
Robuste Standardabweichung (S^*)	28,2
<i>Zielkenndaten:</i>	
Zielstandardabweichung σ_{pt}'	18,6
Untere Grenze des Zielbereichs	22,3
Obere Grenze des Zielbereichs	96,6
Quotient S^*/σ_{pt}'	1,5
Standardunsicherheit $U_{(X_{pt})}$	11,1
Ergebnisse im Zielbereich	9
Prozent im Zielbereich	90

Anmerkungen zu den Kenndaten und Vergleich der Bezugswerte:

Die Kerndichte-Schätzung zeigte eine breite Verteilung, aufgrund der geringen Anzahl von Ergebnissen jedoch keine eindeutigen methodenabhängigen Unterschiede (drei niedrige Werte der Methode BF). Für eine getrennte Auswertung einzelner ELISA-Methoden lagen zu wenige Ergebnisse vor.

Als zugewiesener Wert wurde der Median verwendet (vgl. 3.1, S. 11). 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 ist erhöht im Vergleich zu 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 eingeschränkt, da für einige Methoden nur wenige Ergebnisse vorlagen.

Der Median der Auswertung aller Methoden lag mit 171% vom Zusatzniveau von Macadamia zu Probe B, oberhalb der relevanten Anforderungen für die eingesetzten Methoden (s. 3.4.3 und S.34 "Wiederfindungsraten ELISA für Macadamia").

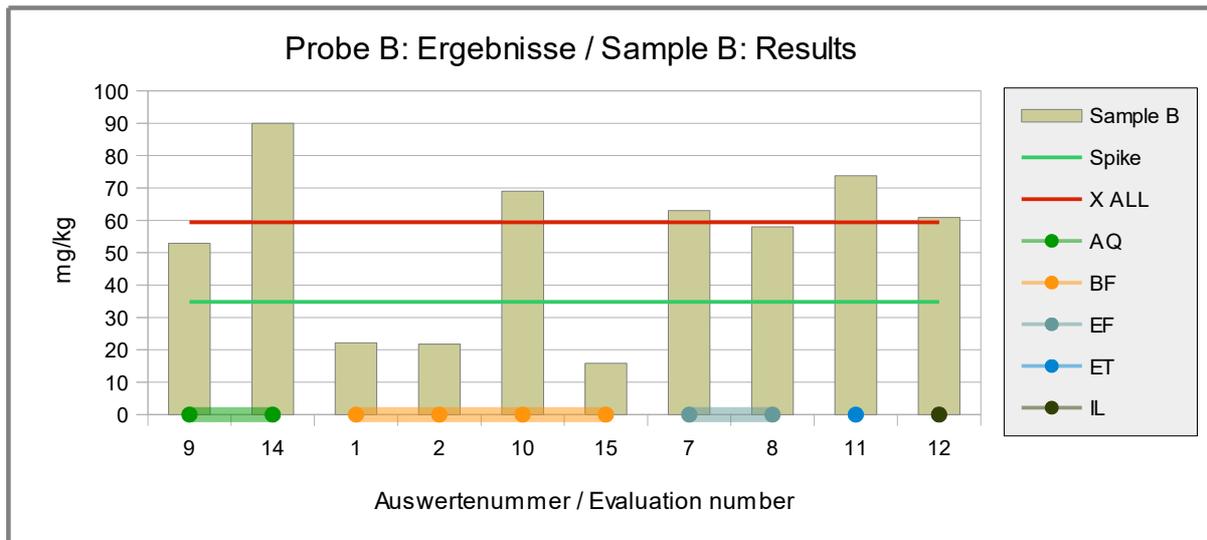


Abb./Fig. 6: ELISA-Ergebnisse Macadamia
 grüne Linie = Zusatzniveau (Spike)
 rote Linie = robuster Mittelwert aller Ergebnisse
 runde Symbole = Zuordnung der Methoden (s. Legende)

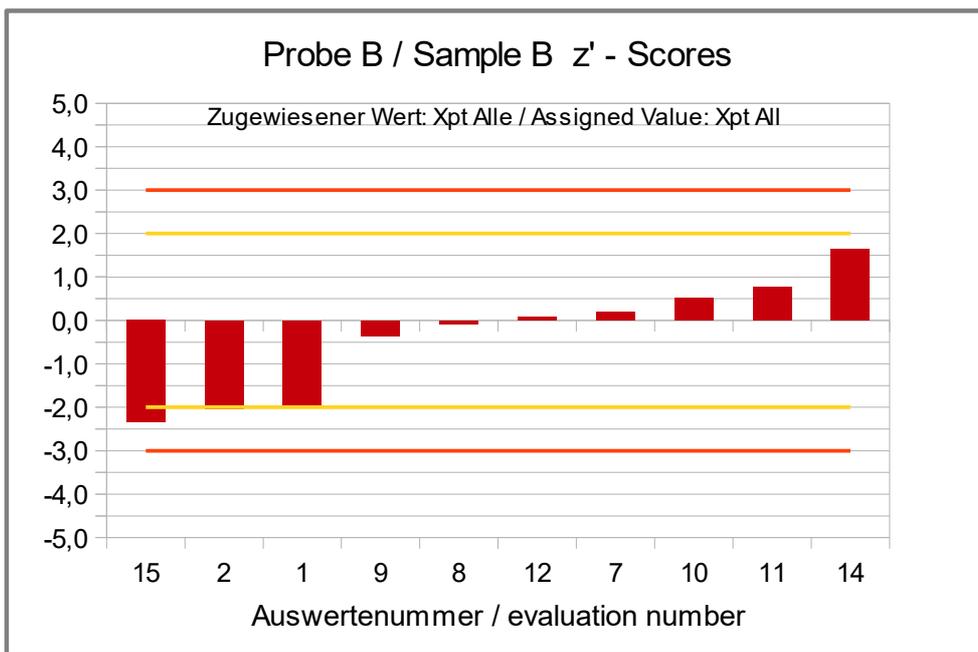


Abb./Fig. 7:
 z'-Scores (ELISA-Ergebnisse Macadamia)
 Zugewiesener Wert: Median aller Ergebnisse

Quantitative Auswertung ELISA: Dotierungsniveauprobe

Auswertenummer	Dotierungsniveauprobe [mg/kg]	z'-Score X _{pt} ^{ALL}	Methode	Hinweis
9	53,2	-0,23	AQ	
14	85,0	1,4	AQ	
1	10,9	-2,5	BF	
2	20,6	-2,0	BF	
10	36,0	-1,1	BF	
15	10,7	-2,5	BF	
7	63,0	0,28	EF	
8	62,0	0,23	EF	
11	76,3	0,98	ET	Ergebnis umgerechnet °
12	72,7	0,79	IL	

° Umrechnung S. 19

Methoden:

- AQ = AgraQuant, RomerLabs
- BF = MonoTrace ELISA, BioFront Technologies
- EF = SensiSpec ELISA Kit, Eurofins
- ET = Elution Technologies ELISA Kit
- IL = Immunolab

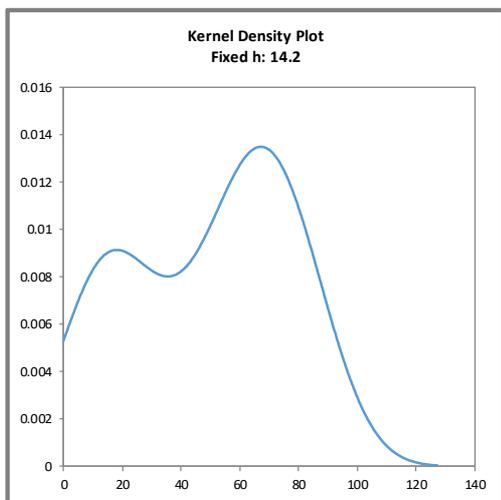


Abb. / Fig. 8:

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 eine breite annähernd symmetrische Verteilung der Ergebnisse mit einem Nebenpeak bei < 40 mg/kg, der auf drei von vier Ergebnissen der Methode BF zurückgeht.

Kenndaten: Quantitative Auswertung ELISA Macadamia**Dotierungsniveauprobe**

Kenndaten	Alle Ergebnisse [mg/kg]
Zugewiesener Wert (X_{pt})	X_{pt_ALL}
Anzahl der Messergebnisse	10
Anzahl der Ausreißer	0
Mittelwert	49,0
Robuster Mittelwert	49,0
Median (X_{pt})	57,6
Robuste Standardabweichung (S^*)	31,4
<i>Zielkenndaten:</i>	
Zielstandardabweichung σ_{pt}'	19,0
Untere Grenze des Zielbereichs	19,6
Obere Grenze des Zielbereichs	95,6
Quotient S^*/σ_{pt}'	1,7
Standardunsicherheit $U_{(X_{pt})}$	12,4
Ergebnisse im Zielbereich	8
Prozent im Zielbereich	80

Anmerkungen zu den Kenndaten und Vergleich der Bezugswerte:

Die Kerndichte-Schätzung zeigte eine breite Verteilung, aufgrund der geringen Anzahl von Ergebnissen jedoch keine eindeutigen methodenabhängigen Unterschiede (niedrige Werte der Methode BF). Für eine getrennte Auswertung einzelner ELISA-Methoden lagen zu wenige Ergebnisse vor.

Als zugewiesener Wert wurde der Median verwendet (vgl. 3.1, S. 11). 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 ist erhöht im Vergleich zu 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 eingeschränkt, da für einige Methoden nur wenige Ergebnisse vorlagen.

Der Median der Auswertung lag mit 197% vom Zusatzniveau von Macadamia zu Probe B, oberhalb der relevanten Anforderungen für die eingesetzten Methoden (s. 3.4.3 und S.34 "Wiederfindungsraten ELISA für Macadamia").

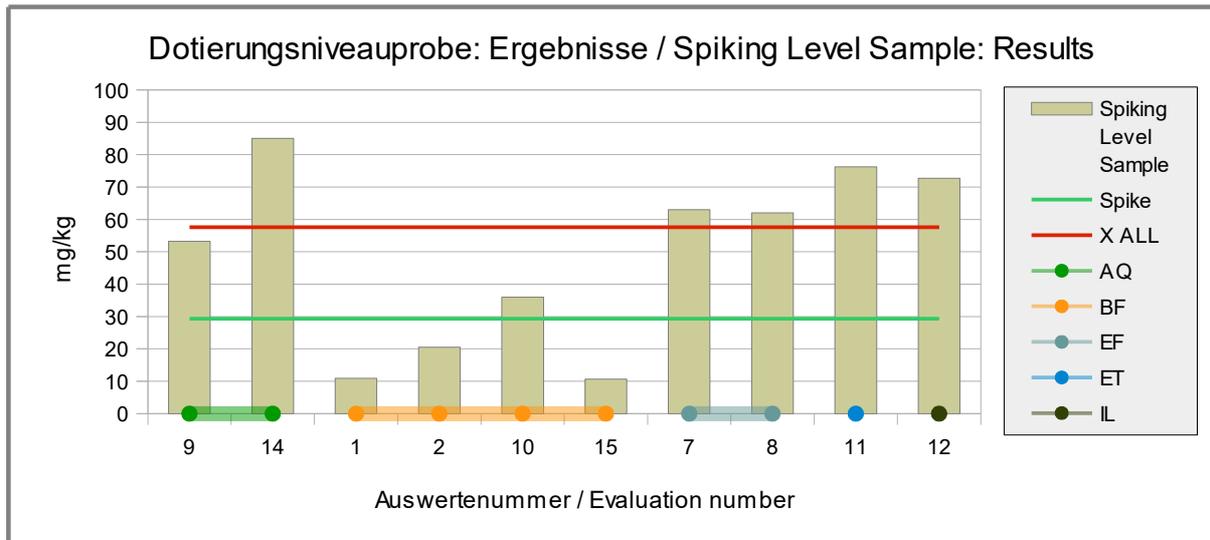


Abb./Fig. 9: ELISA-Ergebnisse Macadamia
 grüne Linie = Zusatzniveau (Spike)
 rote Linie = robuster Mittelwert aller Ergebnisse
 runde Symbole = Zuordnung der Methoden (s. Legende)

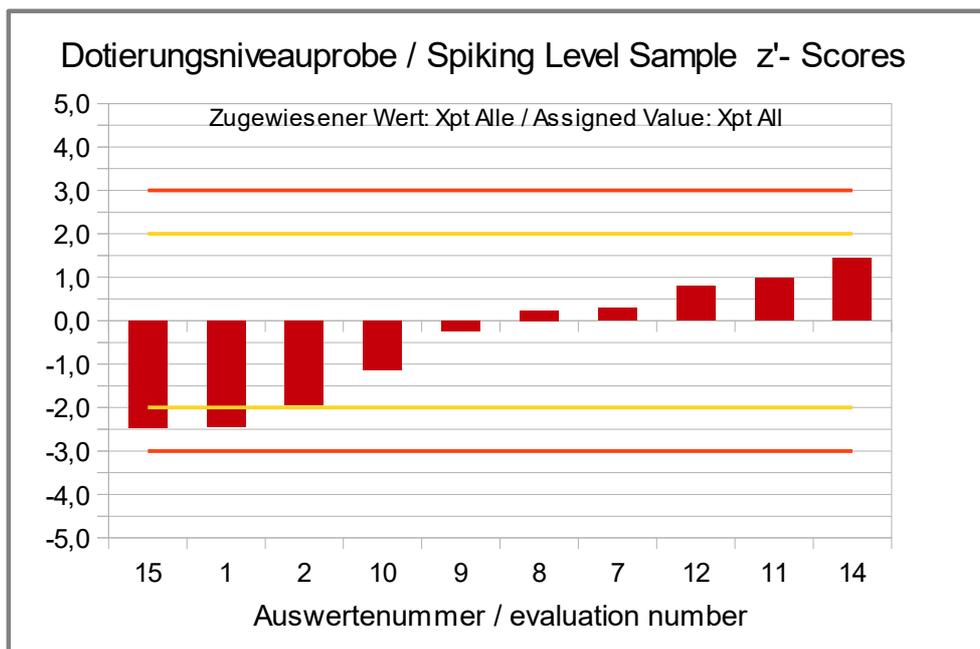


Abb./Fig. 10:
 z'-Scores (ELISA-Ergebnisse Macadamia)
 Zugewiesener Wert: Median aller Ergebnisse

**Wiederfindungsraten ELISA für Macadamia:
Dotierungsniveauprobe und Probe B**

Auswertenummer	Dotierungsniveauprobe	Wiederfindungsrate*	Probe B	Wiederfindungsrate*	Methode	Hinweis
	[mg/kg]	[%]	[mg/kg]	[%]		
9	53,2	182	52,9	152	AQ	
14	85,0	290	90,0	259	AQ	
1	10,9	37	22,2	64	BF	
2	20,6	70	21,8	63	BF	
10	36,0	123	69,0	198	BF	
15	10,7	37	15,8	45	BF	
7	63,0	215	63,0	181	EF	
8	62,0	212	58,0	167	EF	
11	76,3	260	73,8	212	ET	Ergebnis umgerechnet °
12	72,7	248	60,9	175	IL	

° Umrechnung S. 19

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

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

** Akzeptanzbereich der AOAC für Allergen-ELISAs

Methoden:

AQ = AgraQuant, RomerLabs
 BF = MonoTrace ELISA, BioFront Technologies
 EF = SensiSpec ELISA Kit, Eurofins
 ET = Elution Technologies ELISA Kit
 IL = Immunolab

Anmerkung:

Zwei Teilnehmer (Methode BF) haben mit der Dotierungsniveauprobe und mit der dotierten Lebensmittelmatrix-Probe B mittels ELISA eine Wiederfindungsrate im Bereich der AOAC-Anforderung von 50-150% erhalten. Die Wiederfindungsraten der Ergebnisse der anderen Methoden lagen jeweils über 150%.

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		
4	negativ		positiv	9,80	2/2 (100%)	SFA	
12	negativ	<1	positiv	74,6	2/2 (100%)	SFA	
14	negativ		positiv		2/2 (100%)	div	

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

Methoden:

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 B.

Quantitative Auswertung PCR: Probe B

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

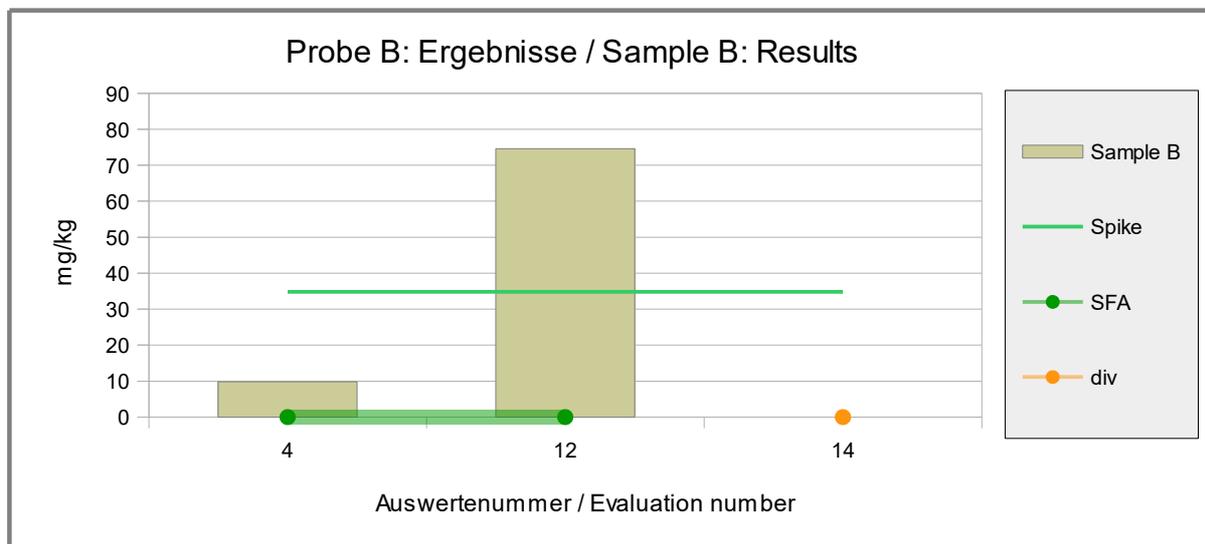


Abb./Fig. 11: PCR-Ergebnisse Macadamia
 grüne Linie = Zusatzniveau (Spike)
 runde Symbole = Zuordnung der Methoden (s. Legende)

Quantitative Auswertung PCR: Dotierungsniveauprobe

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

Auswertenummer	Macadamia	Macadamia	z-Score Xpt _{ALL}	Methode	Hinweis
	pos/neg	[mg/kg]			
4	positiv	7,40		SFA	
12	positiv	33,9		SFA	
14	positiv			div	

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

Methoden:

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.

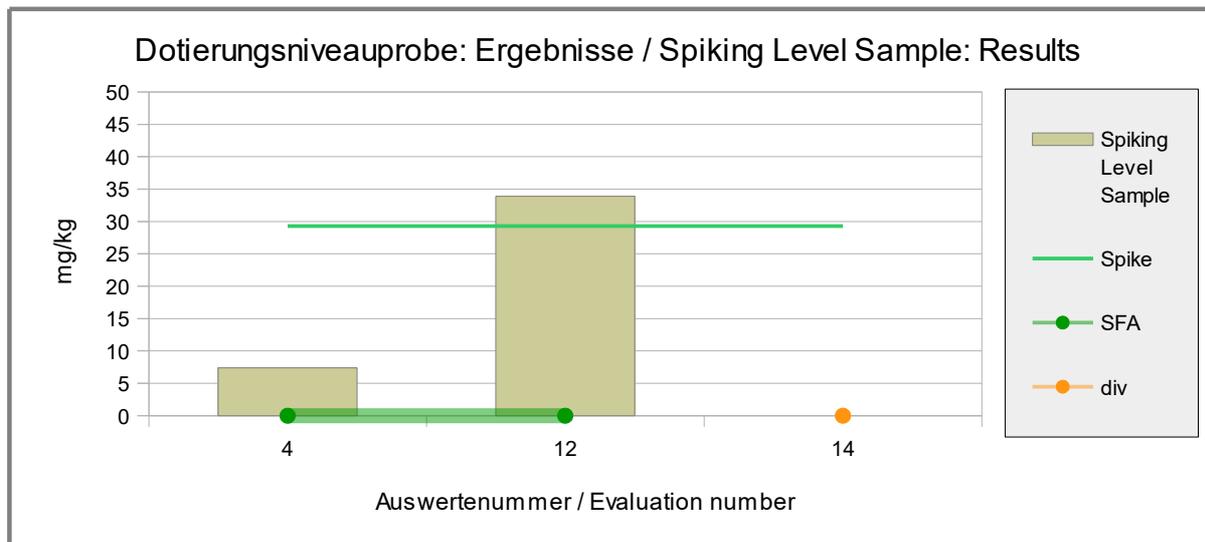


Abb./Fig. 12: PCR-Ergebnisse Macadamia
 grüne Linie = Zusatzniveau (Spike)
 runde Symbole = Zuordnung der Methoden (s. Legende)

**Wiederfindungsraten PCR für Macadamia:
Dotierungsniveauprobe und Probe B**

Auswertenummer	Dotierungsniveauprobe	Wiederfindungsrate*	Probe B	Wiederfindungsrate*	Methode	Hinweis
	[mg/kg]	[%]	[mg/kg]	[%]		
4	7,40	25	9,80	28	SFA	
12	33,9	116	74,6	214	SFA	
14					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

div = keine genaue Angabe / andere Methode

div = not indicated / other method

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

** Akzeptanzbereich der AOAC für Allergen-ELISAs

Anmerkung:

Einer der Teilnehmer hat mit der Dotierungsniveauprobe mittels PCR eine Wiederfindungsrate im Bereich der AOAC-Anforderung von 50-150% erhalten. Für die dotierte Lebensmittelmatrix-Probe B lagen keine der beiden der Wiederfindungsraten im Akzeptanzbereich.

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]			
13	negativ	<LOD	positiv	14,3	2/2 (100%)	AQ	
2	negativ	< 1	positiv	14,4	2/2 (100%)	BF	
15	negativ	0	positiv	14,3	2/2 (100%)	BF	
8	negativ	<0,2	positiv	13,1	2/2 (100%)	EF	
10a	negativ	<2,4	positiv	14,2	2/2 (100%)	ES	Ergebnis umgerechnet °
5	negativ	<BG	positiv	25,4	2/2 (100%)	RS-F	
6	negativ	<2,5	positiv	20,6	2/2 (100%)	RS-F	
7	negativ	<2,5	positiv	29,0	2/2 (100%)	RS-F	
9	negativ	<2,5	positiv	23,4	2/2 (100%)	RS-F	
12	negativ	<2,5	positiv	26,6	2/2 (100%)	RS-F	
10b	negativ	<2,5	positiv	>20,0	2/2 (100%)	RS-F	
14a	negativ	<2,5	positiv	18,0	2/2 (100%)	RS-F	
1	negativ	<2,5	positiv	21,6	2/2 (100%)	VT	
3	negativ	<1	positiv	17,1	2/2 (100%)	VT	
11	negativ	<2,5	positiv	20,1	2/2 (100%)	VT	
14b	negativ	<2,5	positiv	16,0	2/2 (100%)	VT	

° Umrechnung S. 19

	Probe A	Probe B
Anzahl positiv	0	16
Anzahl negativ	16	0
Prozent positiv	0	100
Prozent negativ	100	0
Konsenswert	negativ	positiv

Methoden:

- AQ = AgraQuant, RomerLabs
- BF = MonoTrace ELISA, BioFront Technologies
- EF = SensiSpec ELISA Kit, Eurofins
- ES = ELISA-Systems
- RS-F= Ridascreeen® Fast, R-Biopharm
- VT = Veratox, Neogen

Anmerkung:

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

Quantitative Auswertung ELISA: Probe B

Auswertenummer	Mandel	z-Score $X_{pt_{ALL}}$	z-Score $X_{pt_{RS-F}}$	Methode	Hinweis
	[mg/kg]				
13	14,3	-1,0		AQ	
2	14,4	-0,99		BF	
15	14,3	-1,0		BF	
8	13,1	-1,3		EF	
10a	14,2	-1,0		ES	Ergebnis umgerechnet °
5	25,4	1,3	0,26	RS-F	
6	20,6	0,31	-0,54	RS-F	
7	29,0	2,1	0,87	RS-F	
9	23,4	0,90	-0,07	RS-F	
12	26,6	1,6	0,47	RS-F	
10b	>20			RS-F	
14a	18,0	-0,23	-0,98	RS-F	
1	21,6	0,52		VT	
3	17,1	-0,42		VT	Ergebnis umgerechnet °
11	20,1	0,21		VT	
14b	16,0	-0,65		VT	

° Umrechnung S. 19

Methoden:

- AQ = AgraQuant, RomerLabs
- BF = MonoTrace ELISA, BioFront Technologies
- EF = SensiSpec ELISA Kit, Eurofins
- ES = ELISA-Systems
- RS-F= Ridascreeen® Fast, R-Biopharm
- VT = Veratox, Neogen

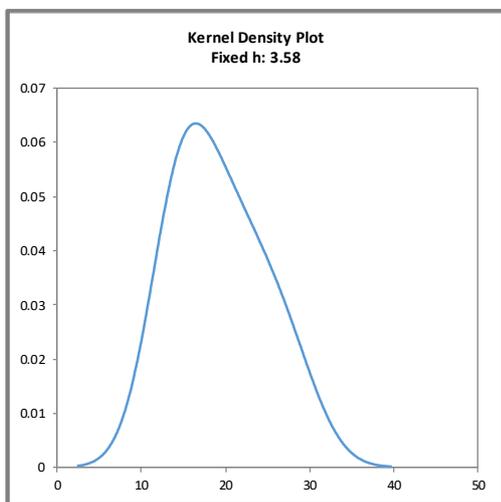


Abb. / Fig. 13:

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

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

Anmerkung:

Die Kerndichte-Schätzung zeigt annähernd eine symmetrische Verteilung der Ergebnisse mit einer leichten Schulter bei > 25 mg/kg (Methode RS-F).

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

Kenndaten	Alle Ergebnisse [mg/kg]	Methode RS-F [mg/kg]
Zugewiesener Wert (X_{pt})	X_{pt}_{ALL}	$X_{pt}_{METHOD\ RS-F}$
Anzahl der Messergebnisse	15	6
Anzahl der Ausreißer	0	0
Mittelwert	19,2	23,8
Median	18,0	24,4
Robuster Mittelwert (X_{pt})	19,1	23,8
Robuste Standardabweichung (S^*)	5,56	4,58
<i>Zielkenndaten:</i>		
Zielstandardabweichung σ_{pt}	4,78	5,96
Untere Grenze des Zielbereichs	9,55	11,9
Obere Grenze des Zielbereichs	28,7	35,8
Quotient S^*/σ_{pt}	1,2	0,77
Standardunsicherheit $U_{(X_{pt})}$	1,80	2,34
Ergebnisse im Zielbereich	14	6
Prozent im Zielbereich	93	100

Methoden:

RS-F = R-Biopharm, Ridascreen® Fast

Anmerkungen zu den Kenndaten und Vergleich der Bezugswerte:

Die Kerndichte-Schätzung zeigte annähernd eine symmetrische Verteilung.

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

Die robusten Mittelwerte der Auswertungen lagen mit 68% bzw. 85% vom Zusatzniveau von Mandel zu Probe B, innerhalb der relevanten Anforderungen für die eingesetzten Methoden (s. 3.4.3 und S.47 "Wiederfindungsraten ELISA für Mandel").

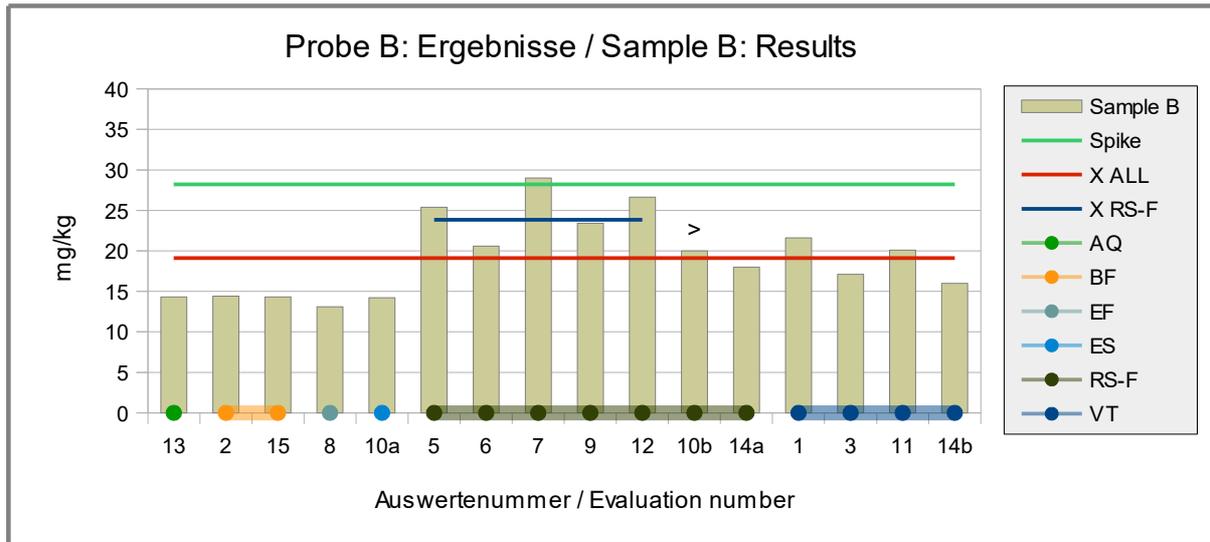


Abb./Fig. 14: ELISA-Ergebnisse Mandel
 grüne Linie = Zusatzniveau (Spike)
 rote Linie = robuster Mittelwert aller Ergebnisse
 blaue Linie = robuster Mittelwert Ergebnisse Methode RS-F
 runde Symbole = Zuordnung der Methoden (s. Legende)

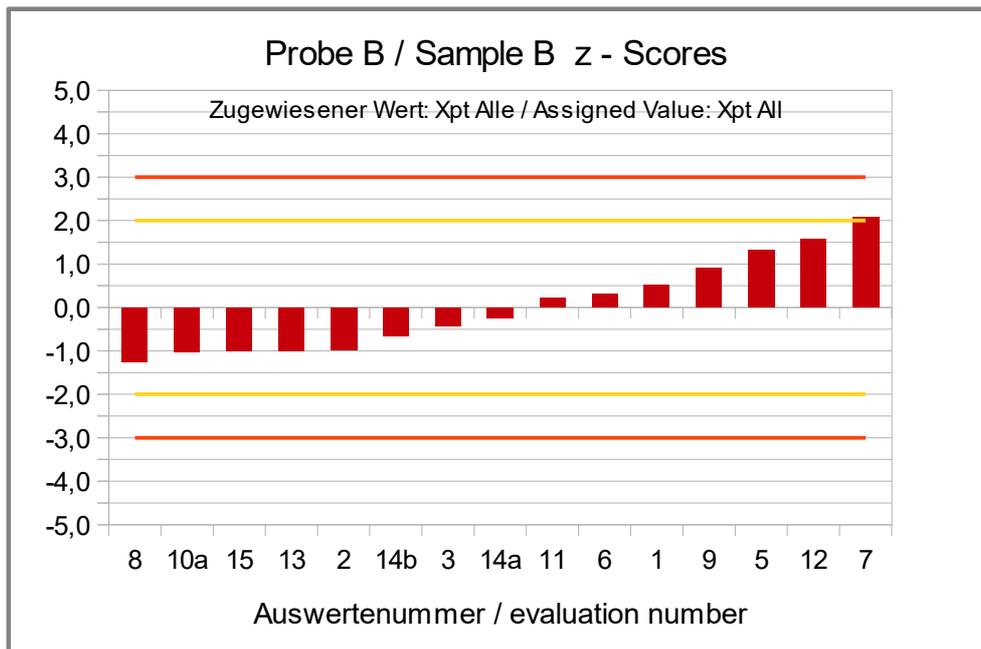


Abb./Fig. 15:
 z-Scores (ELISA-Ergebnisse Mandel)
 Zugewiesener Wert: robuster Mittelwert aller Ergebnisse

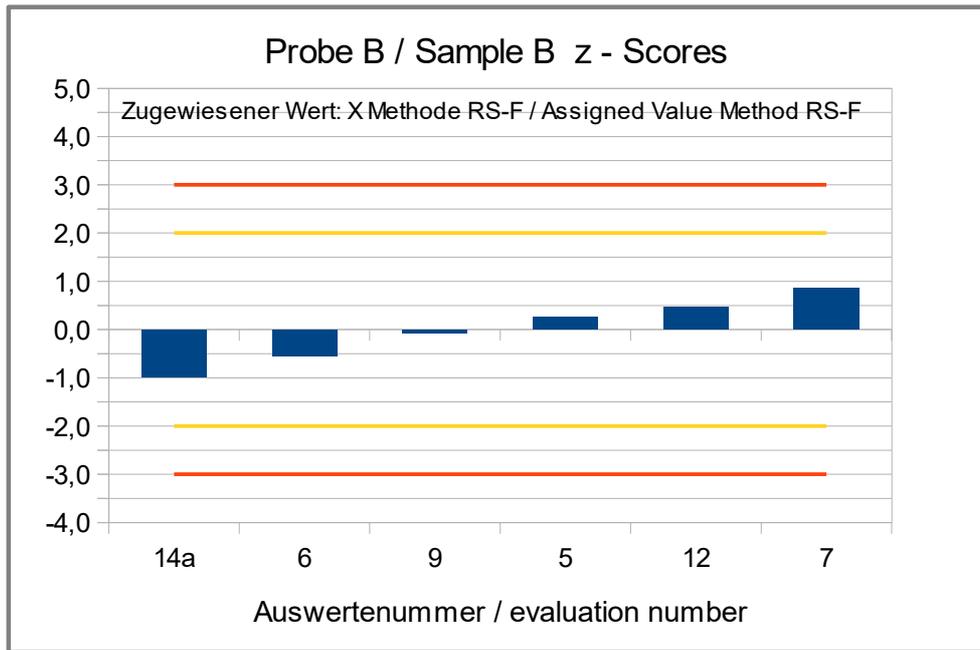


Abb./Fig. 16:

z-Scores (ELISA-Ergebnisse Mandel) Bezugswert robuster Mittelwert
 Ergebnisse Methode RS-F (R-Biopharm, Ridascreen Fast)

Quantitative Auswertung ELISA: Dotierungsniveauprobe

Auswertenummer	Mandel	z-Score Xpt _{ALL}	z-Score Xpt _{RS-F}	Methode	Hinweis
	[mg/kg]				
13	17,0	-1,4		AQ	
2	18,7	-1,1		BF	
15	36,1	1,6		BF	
8	17,5	-1,3		EF	
10a	13,7	-1,9		ES	Ergebnis umgerechnet °
5	28,0	0,33	-0,24	RS-F	
6	>20			RS-F	
7	37,0	1,7	0,96	RS-F	
9	28,4	0,39	-0,19	RS-F	
12	42,5	2,6	1,7	RS-F	
10b	19,0	-1,1	-1,5	RS-F	
14a	24,0	-0,29	-0,78	RS-F	
1	25,8	-0,01		VT	
3	28,1	0,34		VT	
11	27,9	0,31		VT	
14b	28,0	0,33		VT	

° Umrechnung S. 19

Methoden:

- AQ = AgraQuant, RomerLabs
- BF = MonoTrace ELISA, BioFront Technologies
- EF = SensiSpec ELISA Kit, Eurofins
- ES = ELISA-Systems
- RS-F= Ridascreen® Fast, R-Biopharm
- VT = Veratox, Neogen

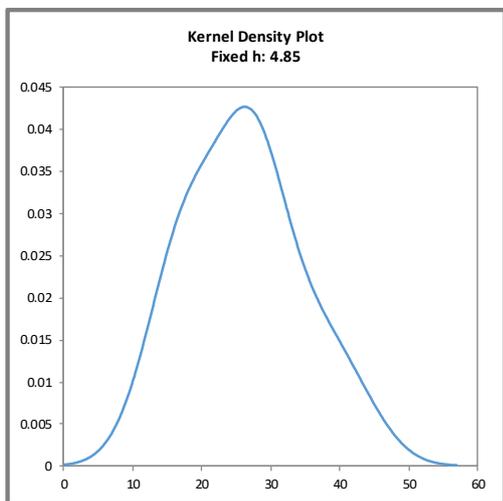


Abb. / Fig. 17:

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

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

Anmerkung:

Die Kerndichte-Schätzung zeigt annähernd eine symmetrische Verteilung mit einer leichten Schulter bei >35 mg/kg (verschiedene Methoden).

Kenndaten: Quantitative Auswertung ELISA Mandel**Dotierungsniveauprobe**

Kenndaten	Alle Ergebnisse [mg/kg]	Methode RS-F [mg/kg]
Zugewiesener Wert (X_{pt})	X_{pt_ALL}	$X_{pt_METHOD\ RS-F}$
Anzahl der Messergebnisse	15	6
Anzahl der Ausreißer	0	0
Mittelwert	26,1	29,8
Median	27,9	28,2
Robuster Mittelwert (X_{pt})	25,9	29,8
Robuste Standardabweichung (S^*)	8,69	9,72
<i>Zielkenndaten:</i>		
Zielstandardabweichung σ_{pt}	6,47	7,45
Untere Grenze des Zielbereichs	12,9	14,9
Obere Grenze des Zielbereichs	38,8	44,7
Quotient S^*/σ_{pt}	1,3	1,3
Standardunsicherheit $U(X_{pt})$	2,80	4,96
Ergebnisse im Zielbereich	14	6
Prozent im Zielbereich	93	100

Methoden:

RS-F = R-Biopharm, Ridascreen® Fast

Anmerkungen zu den Kenndaten und Vergleich der Bezugswerte:

Die Kerndichte-Schätzung zeigte annähernd eine symmetrische Verteilung.

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

Die robusten Mittelwerte der Auswertungen lagen mit 92% bzw. 106% vom Zusatzniveau von Mandel zur Dotierungsniveauprobe innerhalb der relevanten Anforderungen für die eingesetzten Methoden (s. 3.4.3 und S.47 "Wiederfindungsraten ELISA für Mandel").

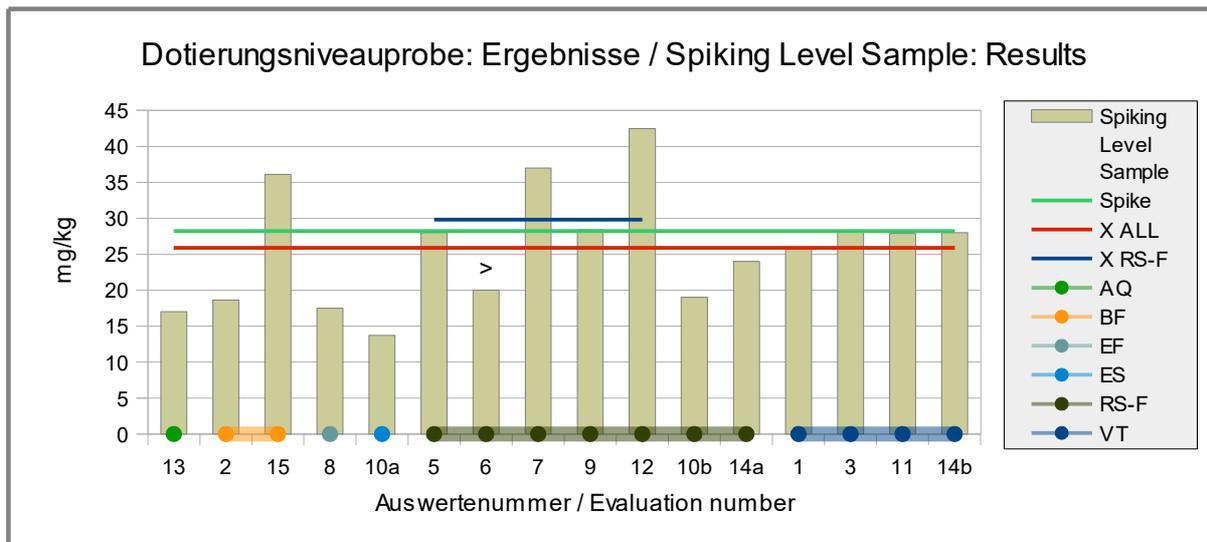


Abb./Fig. 18: ELISA-Ergebnisse Mandel
 grüne Linie = Zusatzniveau (Spike)
 rote Linie = robuster Mittelwert aller Ergebnisse
 blaue Linie = robuster Mittelwert Ergebnisse Methode RS-F
 runde Symbole = Zuordnung der Methoden (s. Legende)

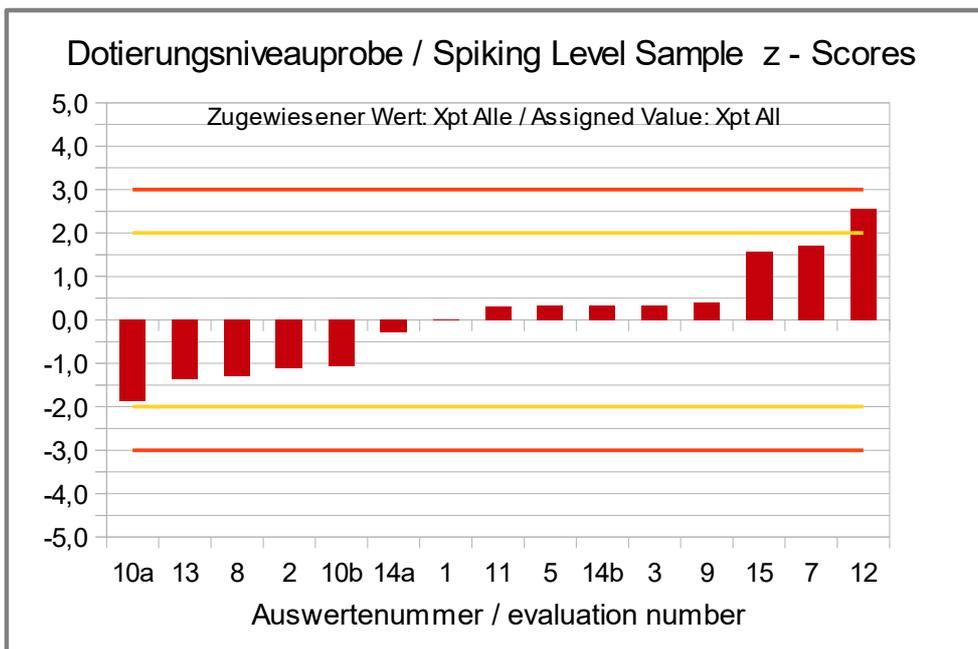


Abb./Fig. 19:
 z-Scores (ELISA-Ergebnisse Mandel)
 Zugewiesener Wert: robuster Mittelwert aller Ergebnisse

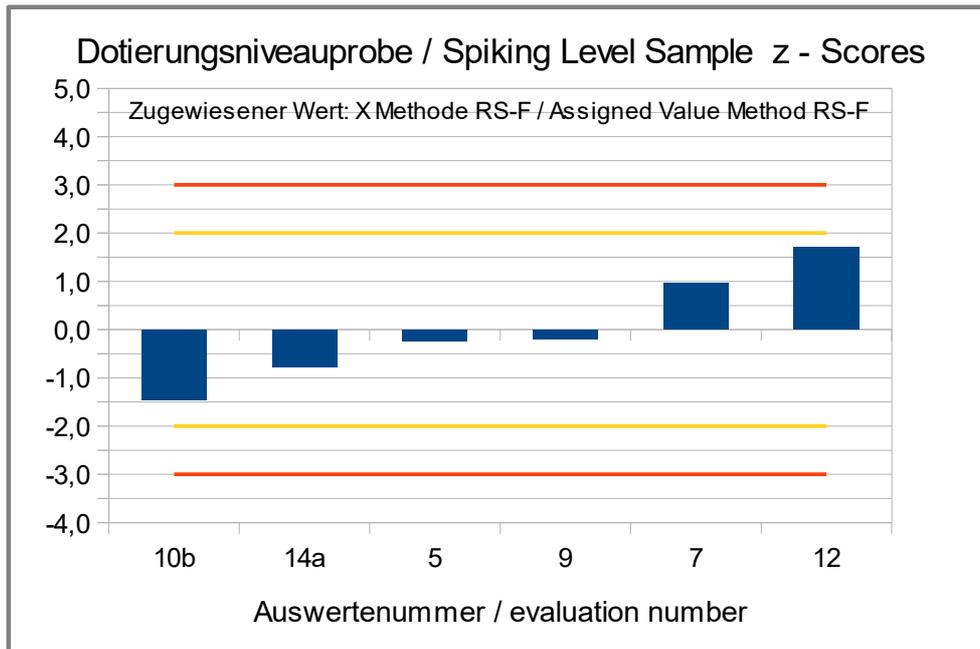


Abb./Fig. 20:

z-Scores (ELISA-Ergebnisse Mandel) Bezugswert robuster Mittelwert
 Ergebnisse Methode RS-F (R-Biopharm, Ridascreen Fast)

Wiederfindungsraten ELISA für Mandel: Dotierungsniveauprobe und Probe B

Auswertenummer	Dotierungsniveauprobe	Wiederfindungsrate*	Probe B	Wiederfindungsrate*	Methode	Hinweis
	[mg/kg]	[%]	[mg/kg]	[%]		
13	17,0	60	14,3	51	AQ	
2	18,7	66	14,4	51	BF	
15	36,1	128	14,3	51	BF	
8	17,5	62	13,1	46	EF	
10a	13,7	49	14,2	50	ES	Ergebnis umgerechnet °
5	28,0	99	25,4	90	RS-F	
6	>20		20,6	73	RS-F	
7	37,0	131	29,0	103	RS-F	
9	28,4	101	23,4	83	RS-F	
12	42,5	151	26,6	94	RS-F	
10b	19,0	67	>20		RS-F	
14a	24,0	85	18,0	64	RS-F	
1	25,8	91	21,6	77	VT	
3	28,1	100	17,1	61	VT	
11	27,9	99	20,1	71	VT	
14b	28,0	99	16,0	57	VT	

° Umrechnung S. 19

AB**	50-150 %	AB**	50-150 %
Anzahl im AB	13	Anzahl im AB	14
Prozent im AB	87	Prozent im AB	93

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

** Akzeptanzbereich der AOAC für Allergen-ELISAs

Methoden:

AQ = AgraQuant, RomerLabs

BF = MonoTrace ELISA, BioFront Technologies

EF = SensiSpec ELISA Kit, Eurofins

ES = ELISA-Systeme

RS-F= Ridascreen® Fast, R-Biopharm

VT = Veratox, Neogen

Anmerkung:

87% (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 B lagen 93% (14) der Wiederfindungsraten in diesem Akzeptanzbereich.

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		
4	negativ		positiv		1/1 (100%)	SFA	
5	negativ		positiv		1/1 (100%)	SFA	
14	negativ		negativ		1/1 (100%)	div	Positivprobe nicht detektiert

	Probe A	Probe B
Anzahl positiv	0	2
Anzahl negativ	3	1
Prozent positiv	0	67
Prozent negativ	100	33
Konsenswert	negativ	keiner

Methoden:

SFA = Sure Food ALLERGEN, R-Biopharm / Congen
 div = keine genaue Angabe / andere Methode
 div = not indicated / other method

Anmerkung:

Der negative Konsenswert für Probe A steht in qualitativer Übereinstimmung mit der Dotierung von Probe B.
 Ein negatives Ergebnis für Probe B wurde mit einer internen Methode erhalten, sodass kein Konsenswert erhalten wurde.

Qualitative Auswertung PCR: Dotierungsniveauprobe

Auswertenummer	Mandel	Mandel	z-Score Xpt _{ALL}	Methode	Hinweis
	pos/neg	[mg/kg]			
4	positiv			SFA	
5	positiv			SFA	
14	positiv			div	

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

Methoden:

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.

Quantitative Auswertung PCR: Probe B und Dotierungsniveauprobe

Eine quantitative Auswertung erfolgte nicht, weil keine quantitativen Einzelergebnisse vorlagen.

4.4 z-Scores der Teilnehmer: Übersichtstabelle

Auswertenummer	ELISA Macadamia: Xpt (div. Methoden)		ELISA Mandel: Xpt (div. Methoden)		ELISA Mandel: Xpt (Methode: RS-F)	
	Probe B°	Dot.-Probe°	Probe B	Dot.-Probe	Probe B	Dot.-Probe
1	-2,0	-2,5	0,52	-0,01	-	-
2	-2,0	-2,0	-0,99	-1,12	-	-
3	-	-	-0,42	0,34	-	-
4	-	-	-	-	-	-
5	-	-	1,3	0,33	0,26	-0,24
6	-	-	0,31	-	-0,54	-
7	0,19	0,28	2,1	1,7	0,87	0,96
8	-0,08	0,23	-1,3	-1,3	-	-
9	-0,35	-0,23	0,90	0,39	-0,07	-0,19
10 / 10a	0,52	-1,14	-1,0	-1,9	-	-
10b	-	-	-	-1,1	-	-1,5
11	0,77	0,98	0,21	0,31	-	-
12	0,08	0,79	1,6	2,6	0,47	1,7
13	-	-	-1,0	-1,4	-	-
14 / 14a	1,7	1,4	-0,23	-0,29	-0,98	-0,78
14b	-	-	-0,65	0,33	-	-
15	-2,4	-2,5	-1,0	1,6	-	-

°z'-Score

Methoden: RS-F = R-Biopharm, Ridascreen® Fast

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*	Angabe quantitatives Ergebnis als	Methode
			qualitativ	mg/kg	qualitativ	mg/kg	qualitativ	mg/kg	mg/kg	mg/kg			
		Tag/Monat										z.B. Lebensmittel / Protein	ELISA Test-Kit + Anbieter
BF	15	31/1	negativ	0	positiv	97,7	positiv	175,1	0,08	1		Buchweizen	MonoTrace Buckwheat ELISA kit, BioFront Technologies
ES	12	09.01.20	negativ	<2.5	positiv	52,53	positiv	52,53	2,5	2,5	30	Buchweizenprotein	ELISA Systems Buckwheat ESBWPRD-48
MI-II	14	17.01.2020, 29.01.2020	negativ	<0.31	positiv	23	positiv	25	0,31	0,31		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 nach ISO/IEC 17025	Sonstige Hinweise
		Antikörper	z.B. Extraktionslösung / Zeit / Temperatur	ja/nein	
BF	15	Monoklonal	1:10 für 10 Minuten bei 60°C		
ES	12	gemäß Kit-Anleitung	gemäß Kit-Anleitung	ja	
MI-II	14		gemäss Kitanleitung		

5.1.2 ELISA: Macadamia

Meth. Abk.	Auswertenummer	Datum der Analyse	Ergebnis Probe A		Ergebnis Probe B		Ergebnis Dotierungsprobe		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
AQ	9	16.01.20	negativ	<1	positiv	52,9	positiv	53,2	1	1	50	Macadamia	AgraQuant Plus ELISA Macadamia COKAL1648F, RomerLabs
AQ	14	30.01.20	negativ	<1	positiv	90	positiv	85	1	1		Macadamia	AgraQuant Plus ELISA Macadamia COKAL1648F, RomerLabs
BF	1	03. Jan	negativ	<2.0	positiv	22,2	positiv	10,9		2		Macadamia	MonoTrace Macadamia ELISA kit, BioFront Technologies
BF	2		negativ	< 2	positiv	21,75	positiv	20,55		2		Macadamia	MonoTrace Macadamia ELISA kit, BioFront Technologies
BF	10		negativ	<2	positiv	69	positiv	36		2		Macadamia	MonoTrace Macadamia ELISA kit, BioFront Technologies
BF	15	31/1	negativ	0	positiv	15,8	positiv	10,7	0,13	2		Macadamia	MonoTrace Macadamia ELISA kit, BioFront Technologies
EF	7	06.01.20	negativ	<1	positiv	63	positiv	63	1	1		Macadamia	Eurofins SensiSpec Macadamia nut ELISA Kit
EF	8	30.12.19	negativ	<0,1	positiv	58	positiv	62	0.1	1		Macadamia, gesamt	Eurofins SensiSpec Macadamia ELISA Kit
ET	11	28.01.20	negativ	<0,33	positiv	5,9	positiv	6,1		0,33		Macadamia protein	Elution Technologies ELISA Kit Macadamia Protein E-75MCD
IL	12	04.01.20	negativ	<1	positiv	60,85	positiv	72,68	1	1	30,03	Macadamia	Immunolab Macadamia 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	
AQ	9	-	nach Manual	nein	-
AQ	14		gemäss Kitanleitung		
BF	1	monoklonal			
BF	2				
BF	10			nein	
BF	15	Monoklonal	1:10 für 10 Minuten bei 60°C		
EF	7	erkennt Macadamianussprotein	lt. Herstellerangaben	ja	
EF	8				
ET	11		wie festgelegt in Kit Beilage 3M Macadamia nut Protein ELISA KIT E96MAC	ja	gute Wiederfindungsrate in Probe A (110%), gute Wiederfindungsrate in Probe B (78%)
IL	12	gemäß Kit-Anleitung	gemäß Kit-Anleitung	ja	

5.1.3 ELISA: Mandel

Meth. Abk.	Auswertenummer	Datum der Analyse	Ergebnis Probe A		Ergebnis Probe B		Ergebnis Dotierungsprobe		NWG / LOD *	BG / LOQ *	MU*	Angabe quantitatives Ergebnis als z. B. Lebensmittel/ Protein	Methode
			qualitativ	mg/kg	qualitativ	mg/kg	qualitativ	mg/kg					
		Tag/Monat										ELISA Test-Kit + Anbieter	
AQ	13	31/01/20	-	<LOD	-	14,3	-	17	0,2	0,5		Mandel	AgraQuant ELISA Almond COKAL0748, RomerLabs
BF	2		negativ	< 1	positiv	14,4	positiv	18,65		1		Mandel	MonoTrace Almond ELISA kit, BioFront Technologies
BF	15	31/1	negativ	0	positiv	14,3	positiv	36,1	0,15	1		Mandel	MonoTrace Almond ELISA kit, BioFront Technologies
EF	8	30.12.19	negativ	<0,2	positiv	13,1	positiv	17,5	0.2	0.4		Mandel, gesamt	Eurofins SensiSpec Almond ELISA Kit
ES	10a		negativ	<0,5	positiv	3	positiv	2,9		0,5		Mandelprotein	ELISA Systems Almonds ESARD-48
RS-F	5	08.01.20	-	< BG	-	25,4	-	28		2,5		Lebensmittel Mandel	Ridascreen® FAST Almond R6901, R-Biopharm
RS-F	6	17.01.20	-	<2,5	-	20,6	-	>20,0	2,5	2,5	27	Mandel	Ridascreen® FAST Almond R6901, R-Biopharm
RS-F	7	06.01.20	negativ	<2,5	positiv	29	positiv	37	1,7	2,5		Mandel	Ridascreen® FAST Almond R6901, R-Biopharm
RS-F	9	16.01.20	negativ	<2,5	positiv	23,4	positiv	28,4	2,5	2,5	50	Mandel	Ridascreen® FAST Almond R6901, R-Biopharm
RS-F	12	17.12.19	negativ	<2,5	positiv	26,63	positiv	42,46	2,5	2,5	26,48	Mandel	Ridascreen® FAST Almond R6901, R-Biopharm
RS-F	10b		negativ	<2,5	positiv	>20	positiv	19		2,5		Mandel	Ridascreen® FAST Almond R6901, R-Biopharm
RS-F	14a	15.01.2020, 16.01.2020	negativ	<2,5	positiv	18	positiv	24	2,5	2,5		Mandel	Ridascreen® FAST Almond R6901, R-Biopharm
VT	1	03. Jan	negativ	<2,5	positiv	21,6	positiv	25,8		2,5		Mandel	Veratox Almond, Neogen
VT	3	20.12.19	negativ	< 1	positiv	17,11	positiv	28,07		1		Mandel	Veratox Almond, Neogen
VT	11	28.01.20	negativ	<2,5	positiv	20,1	positiv	27,9		2,5		Mandel	Veratox Almond, Neogen
VT	14b	16.01.20	negativ	<2,5	positiv	16	positiv	28	2,5	2,5		Mandel	Veratox Almond, Neogen

* 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	
AQ	13		60°C, 15 min	ja	
BF	2				
BF	15	Monoklonal	1:20 für 10 Minuten bei 60°C		
EF	8				
ES	10a			ja	
RS-F	5	Mandelprotein	nach Testanleitung	ja	
RS-F	6	Proteine von Mandeln	TED/10/60°C	ja	
RS-F	7	erkennt Mandelproteine	lt. Herstellerangaben	ja	
RS-F	9	-	nach Manual	ja	-
RS-F	12	gemäß Kit-Anleitung	gemäß Kit-Anleitung	ja	
RS-F	10b			ja	
RS-F	14a		gemäss Kitanleitung, mit Magermilchpulver Zusatz		
VT	1				
VT	3		2g in 50 mL of Pufferlösung; Inkubationszeit 15 Minuten bei 60°C	ja	
VT	11		wie in Kit-Beilage festgelegt	ja	Gute Wiederfindung in Probe A (54%) Gute Wiederfindung in Probe B (73%)
VT	14b		gemäss Kitanleitung		

5.1.4 PCR: Buchweizen

Meth. Abk.	Auswertenummer	Datum der Analyse	Ergebnis Probe A		Ergebnis Probe B		Ergebnis Dotierungsprobe		NWG / LOD *	BG / LOQ *	MU*	Angabe quantitatives Ergebnis als	Methode
			positiv / negativ	mg/kg	positiv / negativ	mg/kg	positiv / negativ	mg/kg					
			positiv / negativ	mg/kg	positiv / negativ	mg/kg	positiv / negativ	mg/kg	mg/kg	mg/kg	%	z.B. Lebensmittel / Protein	PCR Test-Kit + Anbieter
SFA	4	30.12.19	negativ		positiv		positiv		0,4		30	Buchweizen	Sure Food ALLERGEN, R-Biopharm / Congen
SFA-ID	12	05.01.20	negativ	<1	positiv	333	positiv	256,34	1	1	40	Bitte auswählen!	Sure Food Allergen ID, R-Biopharm / Congen
div	14	29.01.20	negativ	<1	positiv		positiv		1			Buchweizen	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	
SFA	4	Fagopyrum esculentum	SureFood Prep Advanced Protokoll 1	ja	Artikelnr. S7005 (K02)
SFA-ID	12	gemäß Kit-Anleitung	gemäß Kit-Anleitung	nein	
div	14	ITS	Wizard Genomic DNA isolation		

5.1.5 PCR: Macadamia

Meth. Abk.	Auswertenummer	Datum der Analyse	Ergebnis Probe A		Ergebnis Probe B		Ergebnis Dotierungsprobe		NWG / LOD *	BG / LOQ *	MU*	Angabe quantitatives Ergebnis als	Methode
			positiv / negativ	mg/kg	positiv / negativ	mg/kg	positiv / negativ	mg/kg					
			positiv / negativ	mg/kg	positiv / negativ	mg/kg	positiv / negativ	mg/kg	mg/kg	mg/kg	%	z.B. Lebensmittel / Protein	PCR Test-Kit + Anbieter
SFA	4	30.12.19	negativ		positiv	9,8	positiv	7,4	0,4		30	Macadamia	Sure Food ALLERGEN, R-Biopharm / Congen
SFA-ID	12	05.01.20	negativ	<1	positiv	74,63	positiv	33,89	1	1	40	Bitte auswählen!	Sure Food Allergen ID, R-Biopharm / Congen
div	14	29.01.20	negativ		positiv		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	
SFA	4	Macadamia ternifolia	SureFood Prep Advanced Protokoll 1	ja	Artikelnr. S3616 (K01)
SFA-ID	12	gemäß Kit-Anleitung	gemäß Kit-Anleitung	nein	
div	14	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*	Angabe quantitatives Ergebnis als	Methode
			positiv / negativ	mg/kg	positiv / negativ	mg/kg	positiv / negativ	mg/kg	mg/kg	mg/kg	%	z.B. Lebensmittel / Protein	
			negativ		positiv		positiv		0,4		30	Mandel	Sure Food ALLERGEN, R-Biopharm / Congen
SFA	4	02.01.20	negativ		positiv		positiv					Mandel	SureFood ALLERGEN, r-biopharm/Congen
SFA	5	08.01.20	negativ		positiv		positiv					Mandel	SureFood ALLERGEN, r-biopharm/Congen
div	14	30.01.20	negativ		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	
SFA	4	Prunus dulcis	SureFood Prep Advanced Protokoll 1	ja	Artikelnr. S3604 (K01)
SFA	5	charakteristischer Sequenzabschnitt der Mandel-DNA	Dneasy Mericon Food-Kit /Proteinase K/ Real Time PCR/ 45 Zyklen	ja	
div	14	nsLTP	Wizard Genomic DNA isolation		Mandel-DNA in Spuren nachweisbar

5.2 Homogenität

5.2.1 Mischungshomogenität vor der Abfüllung

Microtracer Homogenitätstest

DLA 08-2019 Probe B

Gewicht Gesamtprobe	2,52	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	5,04	50	19,8
2	5,05	51	20,2
3	5,11	58	22,7
4	4,96	43	17,3
5	4,99	59	23,6
6	5,00	46	18,4
7	5,02	52	20,7
8	5,07	47	18,5

Poisson-Verteilung

Probenanzahl	8	
Freiheitsgrad	7	
Mittelwert	50,7	Partikel
Standardabweichung	5,44	Partikel
χ^2 (CHI-Quadrat)	4,08	
Wahrscheinlichkeit	77	%
Wiederfindungsrate	97	%

Normalverteilung

Probenanzahl	8	
Mittelwert	20,2	mg/kg
Standardabweichung	2,16	mg/kg
rel. Standardabweichung	10,7	%
Horwitz Standardabweichung	10,2	%
HorRat-Wert	1,1	
Wiederfindungsrate	97	%

Microtracer Homogenitätstest

DLA 08-2019 Dotierungsniveauprobe

Gewicht Gesamtprobe	1,50	kg
Microtracer	FSS-rot lake	
Teilchengröße	75 – 300	µm
Gewicht pro Partikel	2,0	µg
Tracerzugabe	18,7	mg/kg

Analysenergebnisse:

Probe	Einwaage [g]	Partikel Anzahl	Partikel [mg/kg]
1	5,04	47	18,7
2	5,02	50	19,9
3	5,04	46	18,3
4	4,88	58	23,8
5	4,98	51	20,5
6	4,88	54	22,1
7	5,08	60	23,6
8	4,91	43	17,5

Poisson-Verteilung

Probenanzahl	8	
Freiheitsgrad	7	
Mittelwert	51,1	Partikel
Standardabweichung	6,01	Partikel
χ^2 (CHI-Quadrat)	4,94	
Wahrscheinlichkeit	67	%
Wiederfindungsrate	110	%

Normalverteilung

Probenanzahl	8	
Mittelwert	20,5	mg/kg
Standardabweichung	2,41	mg/kg
rel. Standardabweichung	11,8	%
Horwitz Standardabweichung	10,2	%
HorRat-Wert	1,2	
Wiederfindungsrate	110	%

5.3 Informationen zur Eignungsprüfung (EP)

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

EP-Nummer	DLA 08-2019
EP-Name	Allergene VIII: Buchweizen, Mandel und Macadamia in Frühstückscerealien
Probenmatrix (Prozessierung)	Proben A + B: Müsli mit Früchten / Zutaten: Haferflocken, Zucker, Sonnenblumenöl, Palmöl, Weizen gepufft, Weizenmehl, Schwarzes Johannisbeersaft-Konzentrat, gefriergetrocknete Beeren (Himbeeren, Erdbeeren, Brombeeren), Kokosnuss, Melasse, Salz, Gerstenmalzextrakt, Zimt, 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 (Macadamiaprotein, 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 31. Januar 2020
Auswertebereich	Der Auswertebereich 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
		SPANIEN
		Deutschland
		USA
		SCHWEIZ
		KANADA
		ITALIEN
		Deutschland
		Deutschland
		Deutschland
		KANADA
		ITALIEN
		GROSSBRITANNIEN
		GRIECHENLAND
		SPANIEN

[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 08/2019 - Allergene VIII

Alle 15 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 Dotierungsneueprobe und die dotierte Probe ermittelt. Details zu den einzelnen Parametern inklusive separater Auswertung nach Testkit-Herstellern sind dem Auswertebereicht zu entnehmen.

7 Teilnehmer hatten ihren Sitz im Europäischen Ausland (Griechenland, Großbritannien, Italien, Schweiz, Spanien), ein Teilnehmer in den USA und zwei Teilnehmer in Kanada.