



**Auswertungs-Bericht**

Laborvergleichsuntersuchung

**DLA 15/2019**

**Response PT Ei:**

**5 prozessierte Proben  
Flüssigei (pasteurisiert), Ei (gekocht),  
Volleipulver, Eiernudeln und Eigeback**

**in Kartoffelpulver-Matrix**

***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><b>DLA - Proficiency Tests GmbH</b>          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 15/2019
<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 (8. Februar 2020)</p> <p>Gültig ist die jeweils letzte Version/Korrektur des Berichts. Sie ersetzt alle vorangegangenen Versionen.          Only the latest version/correction of the report is valid. It replaces all preceding versions.</p>
<i>EP-Bericht Freigabe</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: 8. Februar 2020</p>
<i>Unteraufträge</i> <i>Subcontractors</i>	<p>Im Rahmen dieser Eignungsprüfung wurden nachstehende Leistungen im Unterauftrag vergeben: Keine          As part of the present proficiency test the following services were subcontracted: none</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.....	5
2.1 Untersuchungsmaterial.....	5
2.1.1 Homogenität.....	7
2.1.2 Stabilität.....	7
2.2 Probenversand und Informationen zur Untersuchung.....	8
2.3 Ergebnisübermittlung.....	8
3. Auswertung.....	9
3.1 Qualitativer Score.....	10
3.2 Wiederfindungs-Score (WFR-Score).....	10
3.2.1 Wiederfindungsraten eines Versuchs zur Präzision.....	11
3.2.2 Werte aus Erkenntnissen .....	13
4. Ergebnisse.....	14
4.1 Vergleichsuntersuchung prozessierte Eiprodukte.....	15
4.1.1 Qualitative Scores: ELISA-Methoden.....	15
4.1.2 Quantitativ: ELISA-Methoden Wiederfindungs-Scores (WFR-Scores).....	16
5. Dokumentation.....	19
5.1 Angaben der Teilnehmer.....	19
5.1.1 ELISA-Methoden.....	19
5.2 Homogenität.....	21
5.2.1 Mischungshomogenität vor der Abfüllung.....	21
5.3 Informationen zur Eignungsprüfung (EP).....	24
6. Verzeichnis der Teilnehmer in alphabetischer Reihenfolge.....	25
7. Verzeichnis relevanter Literatur.....	26

## 1. Einleitung

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

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

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

Das vorliegende Eignungsprüfungs-Format „**Response PT – Allergene**“ bietet die Möglichkeit anhand von jeweils 5 unterschiedlich prozessierten Produkten eines Allergens in einfacher Trägermatrix sowie einer „Nullprobe“ nachzuweisen, dass mit der analytischen Bestimmungsmethode des teilnehmenden Labors die betreffenden prozessierten Allergene qualitativ erfasst werden können und quantitative Response-Faktoren für die jeweiligen prozessierten Produkte zu ermitteln.

Um eine Vergleichbarkeit der prozessierten Produkte zu gewährleisten werden die Allergen-Konzentrationen der PT-Probenreihe als Volleipulver-Gehalt auf ein annähernd gleiches Niveau eingestellt. Die Auswertung der PT-Ergebnisse erfolgt qualitativ in Scores von 1-5 (Score 5 = alle Prozessierungen erfolgreich erfasst). Quantitative Ergebnisse werden unter Angabe der erzielten Wiederfindungsrate informativ mit einem Wiederfindungs-Score im Bericht angegeben.

## 2. Durchführung

### 2.1 Untersuchungsmaterial

Zur Untersuchung wurden sechs LVU-Proben für den qualitativen Nachweis und ggf. die quantitative Bestimmung von Ei in Flüssigei (pasteurisiert), Ei (gekocht), Volleipulver, Eiernudeln und Eigeback in Kartoffelpulver/Maltodextrin zur Verfügung gestellt.

Die jeweiligen Rohstoffe für die Probenreihe waren handelsübliche prozessierte Eiprodukte bzw. rohe Eier, die von DLA gekocht wurden (Wasser, 10 min). Pro PT-Probe wurden jeweils 4-8 Produkte unterschiedlicher Herkunft verarbeitet.

Es wurden Vormischungen mit Gehalten von ca. 3,5 - 10 % der betreffenden allergenen Zutaten hergestellt (s. Tab. 1). Hierzu wurden die Produkte ggf. gefriergetrocknet (Flüssigei, gekochtes Ei), mittels Messermühle bzw. Zentrifugalmühle zerkleinert, gravimetrisch gemischt und homogenisiert. Anschließend wurden die Rohstoffe, außer Eigeback und Eiernudeln, mit weiteren Zutaten versetzt und mittels Kugelmühle weiter zerkleinert und homogenisiert.

Die Allergen-Vormischungen wurden anschließend zur Trägermatrix Kartoffelpulver / Maltodextrin (mesh < 500 µm) gegeben und homogenisiert. Ein Aliquot der Trägermatrix wurde als „Null“-Probe abgenommen.

Die 6 PT-Proben wurden zu Portionen von ca. 20 g in metallisierte PET-Folienbeutel abgefüllt.

Die Ei-Gehalte der PT-Probenreihe lagen im Bereich von 52 bis 62 mg/kg als Volleipulver (s. Tabelle 1).

Jeder zugewiesene Wert, hier die dotierten Allergen-Gehalte, sind mit einer Standardunsicherheit behaftet. Als Unsicherheiten wurden u.a. folgende Faktoren berücksichtigt: Proteingehalt des Dotierungsmaterials, Mischungshomogenität, Homogenität und Stabilität von Eiprotein.

Alle Unsicherheitsbeiträge wurden in Form von Standardabweichungen ausgedrückt und als Varianzen addiert. Die Wurzel aus der Summe der Gesamtvarianzen ergibt die kombinierte Unsicherheit "Uc", die mit dem Erweiterungsfaktor k=2 multipliziert die erweiterte Unsicherheit der zugewiesenen Werte " $U(X_{pt})$ " ergibt [3, 13, 16 - 17].

Tabelle 1: Zusammensetzung der DLA-Proben

PT-Probenreihe	Probe 1	Probe 2	Probe 3	Probe 4	Probe 5	Probe 6
	Eigebäck	Ei, gekocht	Volleipulver	Eiernudeln	Flüssig-ei	„Null“
Zutaten	g/100 g	g/100g	g/100g	g/100g	g/100g	g/100g
Kartoffelpulver Zutaten: Kartoffeln, E471, E304, E223, E100 Nährwertangaben pro 100 g: Protein 8,3 g, Kohlenhydrate 76 g, Fett 0,6 g, Salz 0,15 g	75	75	75	74	75	75
Maltodextrin	25	25	25	24	25	25
Allergen-Vormischungen Zutaten: Maltodextrin (<90%), Siliciumdioxid (< 1,3%) und prozessierte Allergenprodukte (je 3,5% - 10% Ei)	0,95	0,62	0,54	1,5	0,55	-
<b>Allergen-Gehalte</b>	mg/kg	mg/kg	mg/kg	mg/kg	mg/kg	mg/kg
<i>Eigebäck Biskuits* (26% Vollei und Zucker, Weizenmehl, Invertzuckersirup, Backtriebmittel, Aroma, Glucose, Salz) Gesamtprotein 8,7 % *** (6 Produkte, Europa)</i>	953	-	-	-	-	-
<i>Ei, gekocht* (gefriergetrocknet) Protein 49,4 % ** (8 Produkte, Europa)</i>	-	61,5	-	-	-	-
<i>Volleipulver* Protein 46,9 % ** (6 Produkte, Europa)</i>	-	-	55,2	-	-	-
<i>Eiernudeln* (15% Vollei und Hartweizen, Weichweizen, Salz) Gesamtprotein 13,6 % *** (8 Produkte, Europa)</i>	-	-	-	1500	-	-
<i>Flüssig-ei, pasteurisiert* (gefriergetrocknet) Protein 50,0 % ** (4 Produkte, Europa)</i>	-	-	-	-	55,1	-
<i>- als Volleipulver</i>	59,9	61,5	55,2	51,7	55,1	-
<i>erweiterte kombinierte Unsicherheit (k=2) des Ei-Gehalts (= ± 11 %)</i>	± 6,59	± 6,77	± 6,07	± 5,69	± 6,06	-

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

\*\* Proteingehalt gemäß Laboranalyse der Rohstoffmischungen bezogen (Gesamtstickstoff nach Kjeldahl mit F=6,25 für Eiweiß)

\*\*\* Proteingehalt berechnet gemäß Deklaration der Produkte (neben Ei sind weitere Proteinquellen enthalten)

**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  $\mu\text{m}$ -Größe zur Probe gegeben und die Partikelzahl wird nach der Homogenisierung in entnommenen Aliquoten bestimmt. Die Bewertung der Mischungshomogenität erfolgt auf Grundlage der Poissonverteilung anhand des chi-Quadrat-Tests. Eine Wahrscheinlichkeit von  $\geq 5\%$  ist gleichzusetzen mit einer guten homogenen Mischung und von  $\geq 25\%$  mit einer exzellenten Mischung [14, 15].

Die Microtracer-Analyse der vorliegenden LVU-Proben 1-5 hat eine Wahrscheinlichkeit von 77%, 87%, 98%, 78% bzw. 100% ergeben. Die Partikel-Ergebnisse wurden zusätzlich in Konzentrationen umgerechnet, statistisch als Normalverteilung ausgewertet und mit der Standardabweichung nach Horwitz verglichen. Für die Beurteilung sind HorRat-Werte zwischen 0,3 und 1,3 unter Wiederholbedingungen (Messungen innerhalb des Labors) zu akzeptieren [17]. Es wurden HorRat-Werte von 0,92, 0,77, 0,51, 0,91 bzw. 0,46 erhalten. Die Ergebnisse der Microtracer-Analyse sind in der Dokumentation angegeben.

### 2.1.2 Stabilität

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

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

Der  $a_w$ -Wert der EP-Proben lag bei ca. 0,28 (21,6°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 39. Kalenderwoche 2019 je eine Portion der Untersuchungsmaterialien Proben 1 bis 6 verschickt. Die Untersuchungsverfahren wurden freigestellt. Die Untersuchungen waren durchzuführen bis spätestens 08. November 2019.

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

*Es handelt sich um fünf unterschiedliche Proben mit ähnlichen Gehalten an dem unterschiedlich prozessierten allergenen Parameter Ei in einfacher Trägermatrix sowie eine „Null“-Probe (Trägermatrix).*

- *Die Proben 1-5 sind in zufälliger Reihenfolge nummeriert und enthalten Flüssigei (pasteurisiert), Ei (gekocht), Volleipulver, Eiernudeln und Egebäck.*
- *Bitte geben Sie alle quantitativen Ergebnisse als Volleipulver, soweit möglich unter Angabe des zugrundeliegenden Gehalts an Gesamt-Protein in Ei an.  
Mögliche Umrechnungsfaktoren auf die prozessierten Eiprodukte werden separat in der Ergebnisabgabedatei abgefragt.*

*Bitte beachten Sie die beiliegenden Informationen zur Eignungsprüfung. (siehe Dokumentation unter Punkt 5.3 EP-Informationen)*

## 2.3 Ergebnisübermittlung

Die Ergebnisabgabe erfolgte einheitlich auf, an die Teilnehmer versandten Übermittlungsbögen bzw. -dateien. 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.

Abgefragt und dokumentiert wurden die o.g. Ergebnisse sowie Angaben zu den Testmethoden wie Spezifitäten, 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 11 Teilnehmer haben fristgerecht Ergebnisse abgegeben.

### 3. Auswertung

Verschiedene ELISA-Methoden zur quantitativen Bestimmung von Allergenen in Lebensmitteln können verschiedene Antikörper-Spezifitäten aufweisen, mit unterschiedlichem Referenzmaterial kalibriert worden sein und sich unterschiedlicher Extraktionsverfahren bedienen. Die verschiedenen ELISA-Methoden können daher zu einer unterschiedlichen Bewertung des Gehalts eines Analyten führen [26-29, 40]. Darüber hinaus können Matrix- und/oder Prozessierung die Nachweisbarkeit von Allergenen sowohl mittels ELISA- als auch mittels PCR-Verfahren stark beeinflussen.

In der vorliegenden LVU wurden von dem Allergen Ei fünf verschiedenartig prozessierte Produkte, *Eigebäck, Ei (gekocht), Volleipulver, Eiernudeln und Flüssigei (pasteurisiert)* zur Verfügung gestellt, um die qualitative Nachweisbarkeit und die Response in der quantitativen Bestimmung der eingesetzten Methoden ermitteln zu können.

Die Teilnehmer-Ergebnisse werden *qualitativ* mit einem Score von 1-5 bewertet, der angibt wie viele prozessierte Produkte erfolgreich erfasst wurden.

Die quantitativen Teilnehmer-Ergebnisse werden mit einem Wiederfindungs-Score (*WFR-Score*) bewertet, der angibt wie viele Ergebnisse im Bereich einer Wiederfindungsrate von 50 - 150% des Dotierungs-Levels liegen.

### 3.1 Qualitativer Score

Die qualitative Bewertung der Ergebnisse jedes Teilnehmers erfolgt mit Scores von 1 - 5 anhand der Anzahl der Übereinstimmungen der Angaben „positiv“ oder „negativ“ mit den **Dotierungen der LVU-Probenreihe** (siehe Tab. 2). Ein Score von 5 bedeutet, dass alle prozessierten Produkte erfolgreich erfasst wurden.

Die Ergebnisse der Matrixprobe 6 („Null“-Probe) werden nicht bewertet, sofern das betreffende Teilnehmerergebnis in Übereinstimmung mit  $\geq 75\%$  positiver oder negativer Ergebnisse der Teilnehmer steht (Konsenswert) oder das Ergebnis unterhalb der Bestimmungsgrenze der eingesetzten Methode liegt.

Tabelle 2: Bewertung der Ergebnisse anhand von qualitativen Scores

Probe 1 Eigebäck	Probe 2 Ei, Gekocht	Probe 3 Vollei- Pulver	Probe 4 Eier- Nudeln	Probe 5 Flüssigei	Probe 6 „Null“	Score qualitativ	Eignung qualitativ
pos/neg	pos/neg	pos/neg	pos/neg	pos/neg	pos/neg	Anzahl erfasster Proben 1 - 5	
negativ	negativ	negativ	negativ	negativ	negativ	0 (0%)	nicht erfolgreich
negativ	negativ	negativ	negativ	positiv	negativ	1 (20%)	1 Produktgruppe
negativ	negativ	negativ	positiv	positiv	negativ	2 (40%)	2 Produktgruppen
negativ	negativ	positiv	positiv	positiv	negativ	3 (60%)	3 Produktgruppen
negativ	positiv	positiv	positiv	positiv	negativ	4 (80%)	4 Produktgruppen
positiv	positiv	positiv	positiv	positiv	negativ	5 (100%)	5 Produktgruppen

### 3.2 Wiederfindungs-Score (WFR-Score)

Die Bewertung der quantitativen Ergebnisse jedes Teilnehmers für die **dotierten LVU-Proben** erfolgt anhand der Anzahl von Wiederfindungsraten im Akzeptanzbereich und anhand von Wiederfindungs-Scores (*WFR-Scores*). Die Angabe der WFR-Scores wird als Anzahl von Ergebnissen im Akzeptanzbereich (s.u.) pro Anzahl quantitativ bestimmter Proben vorgenommen. Dahinter wird in Klammern der entsprechende Prozentsatz angegeben.

Die Wiederfindungsraten werden in Bezug auf das jeweilige zugesetzte prozessierte Allergen (Zusatzniveau) berechnet. Die Bezugswerte ergeben sich aus den unter 2.1 Untersuchungsmaterial in Tabelle 1 angegebenen Gehalten der Proben 1 bis 5. Als Akzeptanzbereich AB für die Bewertung der Teilnehmerergebnisse wird der von der AOAC vorgeschlagene Bereich von 50 - 150% für die Wiederfindungsraten von Allergen-ELISAs herangezogen [21]. Für quantitative PCR-Bestimmungen sowie LC/MS wird ebenfalls dieser Akzeptanzbereich herangezogen.

Es werden nur exakte quantitative Angaben berücksichtigt. Einzelergebnisse die außerhalb des angegebenen Messbereiches liegen (z.B. mit der Angabe  $> 25$  mg/kg oder  $< 2,5$  mg/kg) oder die Angabe „0“ werden nicht berücksichtigt.

Die angegebenen Wiederfindungsraten dienen u.a. einer Einschätzung von Prozessierungseinflüssen.

3.2.1 Wiederfindungsraten eines Versuchs zur Präzision

In Ringversuchen der ASU §64 Methoden wurden für verschiedene Parameter abhängig von Matrix bzw. Prozessierung und Konzentrationsbereich Wiederfindungsraten im Bereich von 57 – 119% für die ELISA-Methoden und 33 – 145% für die PCR-Methoden erhalten (s. Tab. 3a und 3b). Die angegebenen Zielstandardabweichungen  $\sigma_{pt}$  wurden für eine Anzahl von  $m = 2$  Wiederholmessungen berechnet.

Tabelle 3a: ELISA-Methoden – Wiederfindungsraten und Präzisionsdaten ausgewählter Auswertungen von Versuchen zur Präzision [33-34]

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

Die Working Group on Prolamin Analysis and Toxicity (WGPAT) hat Ringversuche zur Validierung von zwei kommerziellen ELISA-Test-Kits zur Gluten-Bestimmung mittels monoklonalem R5 Antikörper durchgeführt [30]. 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 [30].

Das IRMM (Institute for Reference Materials and Measurements) hat in einem Ringversuch die Eignung fünf verschiedener ELISA-Test-Kits zur Bestimmung von Erdnuss getestet [33]. 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 3b:** PCR-Methoden – Relative Wiederholstandardabweichungen ( $RSD_r$ ) und relative Vergleichsstandardabweichungen ( $RSD_R$ ) gemäß ausgewählter Auswertungen von Versuchen zur Präzision und die resultierende Zielstandardabweichung  $\sigma_{pt}$  [35-39]

Parameter	Matrix	Mittelwerte [mg/kg]	Wiederfindung	rob $RSD_r$	$RSD_r$	$RSD_R$	$\sigma_{pt}$	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 <small>multiplex</small> 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 <small>multiplex</small> ASU 18.00-22
Soja	Weizenmehl Maismehl	107 145	107 % 145 %	63 % 34 %	- -	31 % 24 %	- -	rt-PCR ASU 16.01-9
Sojamehl	Brühwurst (100°C, 60 min)	114,1 64,4	114 % 161 %	-	14,7% 27,7%	22,2% 41,4%	19,6% 36,5%	rt-PCR ASU 08.00-65
Sojamehl	Wurst, autoklaviert	33,1	33,1 %	-	21,5%	30,8	26,8%	rt-PCR ASU 08.00-65
Sojamehl	Brühwurst (100°C, 60 min)	82,0 39,6 19,6 9,3	82 % 99 % 98 % 93 %	-	17,3% 22,9% 22,9% 31,1%	24,1% 31,8% 24,0% 30,2%	20,8% 27,4% 17,7% -	rt-PCR ASU 08.00-59

3.2.2 Werte aus Erkenntnissen

Anforderungen an die Leistungsfähigkeit der Analysemethoden zur quantitativen Bestimmung von Allergenen in Lebensmitteln sind u.a. vom Ministry of Health and Welfare (MHLW) in Japan [25], von der Arbeitsgruppe 12 „Lebensmittelallergene“ des Technischen Komitees CEN/TC 275 [22-24], von einer internationalen "Food Allergen Working Group" unter der Leitung der AOAC Presidential Task Force on Food Allergens [26] und vom Codex Alimentarius Committee (CAC/GL 74-2010) [21] erarbeitet worden.

Die hier relevanten ELISA- bzw. PCR-Validierungskriterien der Gremien sind in den Tabellen 4 und 5 angegeben.

Tabelle 4: ELISA-Validierungskriterien

Literatur [21-26]	Wiederfindungsrate	Wiederholstandardabweichung	Vergleichsstandardabweichung
MHLW 2006	50 - 150%		≤ 25%
CEN 2009		≤ 20%	
AOAC 2010	50 - 150%	6,9 - 34,4% <sup>(a)</sup>	19,5 - 57,2% <sup>(a)</sup>
CAC 2010	70 - 120%	≤ 25%	≤ 35%

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

Tabelle 5: PCR-Validierungskriterien

Literatur [20]	Wiederfindungsrate	Wiederholstandardabweichung	Vergleichsstandardabweichung
CAC 2010	± 25% <sup>(a)</sup>	≤ 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 i.d.R. eine relative Zielstandardabweichung  $\sigma_{pt}$  Wert von 25% und für die Wiederfindungsrate entsprechend 50-150% fest.

### 4. Ergebnisse

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

Es erfolgte eine getrennte Auswertung von ELISA- (und Lateral Flow), PCR- und LC/MS-Methoden.

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.

ELISA-Ergebnisse, die als **Eiklarproteine** oder **Eiprotein (Eiklar- und Eigelbproteine)** angegeben wurden, sind in **Volleipulver** umgerechnet worden. Sofern angegeben wurden die Vorgaben des betreffenden Testkit-Herstellers berücksichtigt. Es wurde ein Anteil von 26% Eiklarprotein bzw. 48% Eiprotein in *Volleipulver* zugrunde gelegt.

Die qualitativen Ergebnisse und deren Bewertung werden in tabellarischer Form folgendermaßen aufgeführt:

Auswertenummer	Probe 1	Probe 2	Probe 3	Probe 4	Probe 5	Probe 6 „Null“	Score qualitativ	Methode	Hinweis
	pos/neg	pos/neg	pos/neg	pos/neg	pos/neg	pos/neg	Anzahl erfasster Proben 1 - 5		

Die quantitativen Ergebnisse und deren Bewertung werden in tabellarischer Form folgendermaßen aufgeführt:

Auswertenummer	Probe 1		Probe 2		Probe 3		Probe 4		Probe 5		WFR-Score	Methode	Hinweis
	Ergebnis	WFR *											
	[mg/kg]	[%]	Anzahl im AB**										

\* Wiederfindungsrate

## 4.1 Vergleichsuntersuchung prozessierte Eiprodukte

### 4.1.1 Qualitative Scores: ELISA-Methoden

Auswertenummer	Probe 1 Eigebäck	Probe 2 Ei, Gekocht	Probe 3 Vollei- Pulver	Probe 4 Eier- Nudeln	Probe 5 Flüssigei	Probe 6 „Null“	Score qualitativ	Methode	Hinweis
	pos/neg	pos/neg	pos/neg	pos/neg	pos/neg	pos/neg	Anzahl erfasster Proben 1-5		
4	positiv	positiv	positiv	positiv	positiv	negativ	5 (100%)	AQ	
2	negativ	positiv	positiv	positiv	positiv	negativ	4 (80%)	BF	
11	negativ	positiv	positiv	positiv	positiv	negativ	4 (80%)	BK	
5a	positiv	positiv	positiv	positiv	positiv	negativ	5 (100%)	BK	
8	positiv	positiv	positiv	positiv	positiv	negativ	5 (100%)	IL	
3	positiv	positiv	positiv	positiv	positiv	negativ	5 (100%)	MI-II	
7	positiv	positiv	positiv	positiv	positiv	negativ	5 (100%)	MI-II	
10a	positiv	positiv	positiv	positiv	positiv	negativ	5 (100%)	MI-II	
1	positiv	positiv	positiv	positiv	positiv	negativ	5 (100%)	RS-F	
6	positiv	positiv	positiv	positiv	positiv	negativ	5 (100%)	RS-F	
9	positiv	positiv	positiv	positiv	positiv	negativ	5 (100%)	RS-F	
10b	positiv	positiv	positiv	positiv	positiv	negativ	5 (100%)	RS-F	
5b	positiv	positiv	positiv	positiv	positiv	negativ	5 (100%)	RS-F	

	Probe 1	Probe 2	Probe 3	Probe 4	Probe 5	Probe 6
Anzahl positiv	11	13	13	13	13	0
Anzahl negativ	2	0	0	0	0	13
Prozent positiv	85	100	100	100	100	0
Prozent negativ	15	0	0	0	0	100
Konsenswert	positiv	positiv	positiv	positiv	positiv	negativ
Dotierung	positiv	positiv	positiv	positiv	positiv	negativ

**Methoden:**

AQ = AgraQuant, RomerLabs  
 BF = MonoTrace ELISA, BioFront Technologies  
 BK = BioKits, Neogen  
 IL = Immunolab  
 MI-II = Morinaga Institute ELISA Kit II  
 RS-F= Ridascreeen® Fast, R-Biopharm

Anmerkung:

Für die Proben 2-5 wurden mittels ELISA-Methoden Konsenswerte von 100% positiven Ergebnissen erhalten. Für die prozessierte Probe 1 (Eigebäck) wurden zwei negative Ergebnisse erhalten, sodass ein Konsenswert von 85% positiven Ergebnissen resultiert.

#### 4.1.2 Quantitativ: ELISA-Methoden Wiederfindungs-Scores (WFR-Scores)

Auswertenummer	Probe 1 Eigebäck		Probe 2 Ei, gekocht		Probe 3 Volleipulver		Probe 4 Eiernudeln		Probe 5 Flüssigei		WFR-Score	Methode	Hinweis
	Ergebnis	WFR *	Ergebnis	WFR *	Ergebnis	WFR *	Ergebnis	WFR *	Ergebnis	WFR *	WFR *		
	[mg/kg]	[%]	[mg/kg]	[%]	[mg/kg]	[%]	[mg/kg]	[%]	[mg/kg]	[%]	Anzahl in AB**		
4	< 1,54		7,31	12	68,5	124	9,62	19	103	186	1/4 (25%)	AQ	Ergebnis umgerechnet °
2	0,200	0,3	15,1	25	53,4	97	14,0	27	114	207	1/5 (20%)	BF	
11	< BG		21,0	34	56,1	102	9,00	17	74,0	134	2/4 (50%)	BK	
5a	2,70	4,5	23,2	38	56,0	101	13,9	27	74,1	134	2/5 (40%)	BK	
8	1,00	1,7	40,0	65	60,0	109	12,6	24	130	236	2/5 (40%)	IL	
3	39,2	65	24,2	39	42,7	77	46,0	89	50,8	92	4/5 (80%)	MI-II	Ergebnis umgerechnet °
7	36,0	60	14,0	23	42,0	76	44,0	85	44,0	80	4/5 (80%)	MI-II	
10a	31,3	52	12,5	20	33,3	60	31,3	60	41,7	76	4/5 (80%)	MI-II	Ergebnis umgerechnet °
1	2,60	4,3	6,60	11	56,5	102	11,1	21	83,8	152	1/5 (20%)	RS-F	
6	2,10	3,5	4,60	7	58,3	106	15,1	29	50,7	92	2/5 (40%)	RS-F	
9	2,29	3,8	12,6	20	71,1	129	18,2	35	99,9	181	1/5 (20%)	RS-F	
10b	2,00	3,3	15,0	24	58,0	105	19,0	37	80,0	145	2/5 (40%)	RS-F	
5b	3,04	5,1	7,80	13	66,6	121	16,7	32	92,2	167	1/5 (20%)	RS-F	

° Umrechnung S. 14

	AB**	50-150 %								
Anzahl in AB	3		1		13		3		7	
Prozent in AB	27		8		100		23		54	

\* Wiederfindungsrate 100% Bezugsgröße: Volleipulver, s. Seite 6

\*\* Akzeptanzbereich der AOAC für Allergen-ELISAs

**Methoden:**

AQ = AgraQuant, RomerLabs

BF = MonoTrace ELISA, BioFront Technologies

BK = BioKits, Neogen

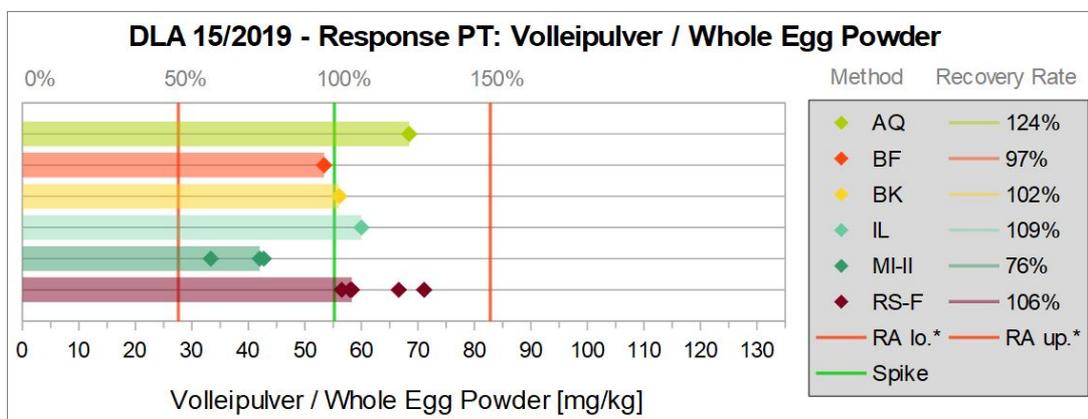
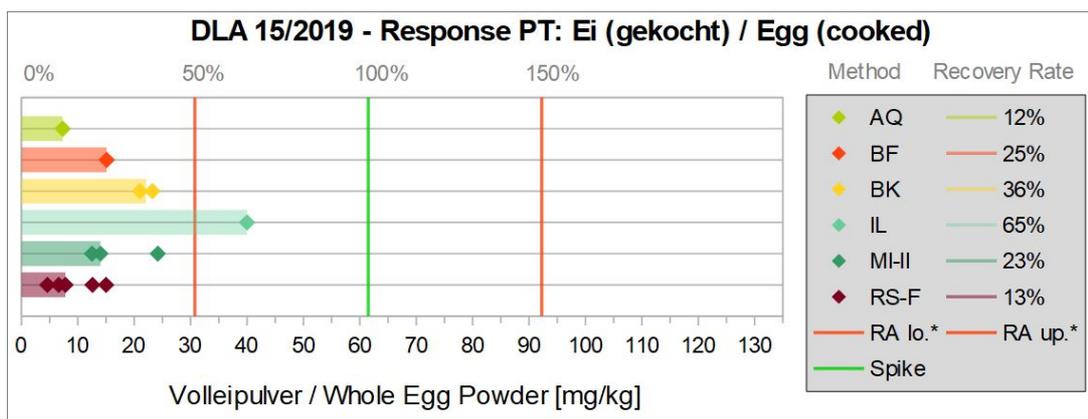
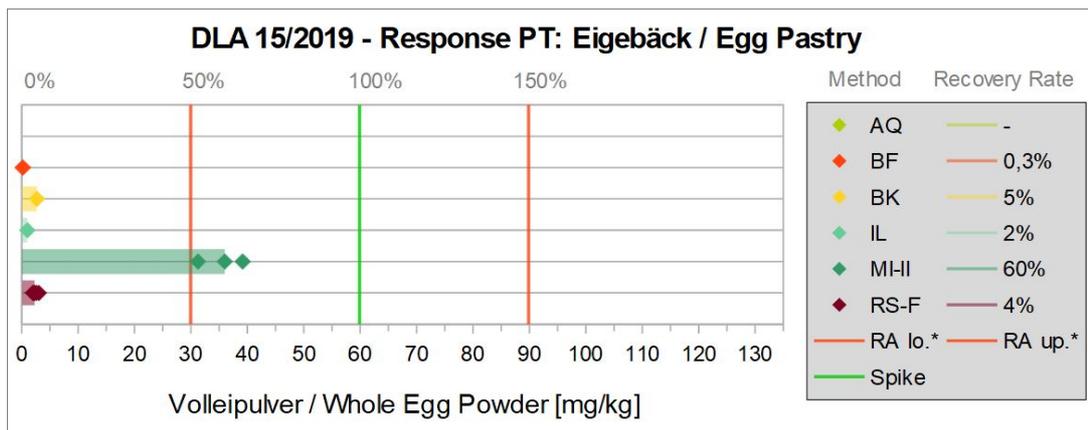
IL = Immunolab

MI-II = Morinaga Institute ELISA Kit II

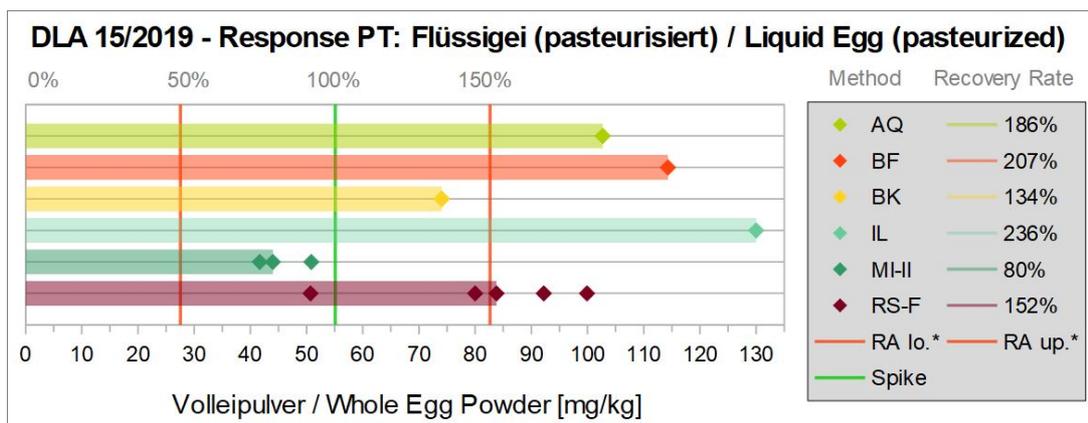
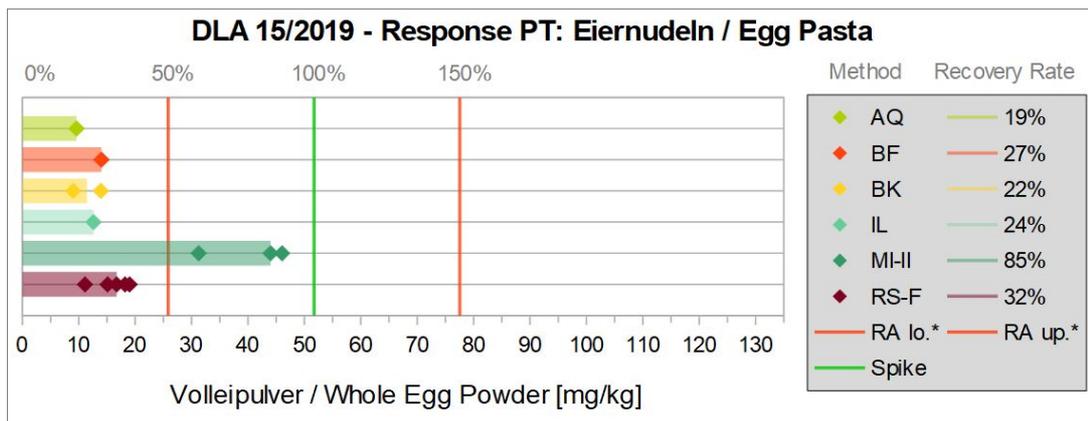
RS-F= Ridascreen® Fast, R-Biopharm

Anmerkung:

Für Probe 3 (Volleipulver) lagen 100% der Wiederfindungsraten der ELISA-Methoden im Akzeptanzbereich von 50-150%. Für Flüssigei (pasteurisiert) (Probe 5) lagen 54% der Wiederfindungsraten der Teilnehmerergebnisse im Akzeptanzbereich und die übrigen Ergebnisse darüber. Bei Probe 1 (Eigebäck), Probe 2 (gekochtes Ei) und Probe 4 (Eiernudeln) wurde dagegen mit 27% (3), 8% (1) und 23% (3) jeweils eine niedrigere Response beobachtet. Die übrigen Ergebnisse lagen unterhalb des Akzeptanzbereichs.



**Abb./Fig. 1:** Darstellung der Einzelergebnisse (Proben 1-3) getrennt nach Methoden mit Angabe der durchschnittlichen Wiederfindungsrate (Recovery Rate), untere Skala Volleipulver in mg/kg, obere Skala Wiederfindungsrate in %, mit \* Akzeptanzbereich von 50% - 150% (\* range of acceptance: RA lower limit bis RA upper limit)



**Abb./Fig. 2:** Darstellung der Einzelergebnisse (Proben 4 und 5) getrennt nach Methoden mit Angabe der durchschnittlichen Wiederfindungsrate (Recovery Rate), untere Skala Volleipulver in mg/kg, obere Skala Wiederfindungsrate in %, mit \* Akzeptanzbereich von 50% - 150% (\* range of acceptance: RA lower limit bis RA upper limit)

## 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-Methoden

Meth. Abk.	Auswertenummer	Datum der Analyse	Ergebnis Probe 1		Ergebnis Probe 2		Ergebnis Probe 3		Ergebnis Probe 4		Ergebnis Probe 5		Ergebnis Probe 6		NWG / LOD *	BG / LOQ *	MU*	Angabe quantitatives Ergebnis als
			qualitativ	mg/kg	qualitativ	mg/kg	qualitativ	mg/kg	qualitativ	mg/kg	qualitativ	mg/kg	qualitativ	mg/kg				
		Tag/Monat	qualitativ	mg/kg	qualitativ	mg/kg	qualitativ	mg/kg	qualitativ	mg/kg	qualitativ	mg/kg	qualitativ	mg/kg	mg/kg	mg/kg	mg/kg	bevorzugt als Volleipulver
AQ	4	18.10.19	positiv	<0,4 mg/kg	positiv	1,9	positiv	17,8	positiv	2,5	positiv	26,7	negativ		0,05	0,4		Eiklarproteine, gesamt
BF	2	08.11.19	negativ	0,2	positiv	15,1	positiv	53,4	positiv	14	positiv	114,3	negativ	0,3	0,3	1		Volleipulver
BK	11	08.10.19	-	< BG	-	21,0	-	56,1	-	9,0	-	74,0	-	< BG		1,5		Volleipulver
BK	5a	31.10.19	positiv	2,7	positiv	23,2	positiv	56	positiv	13,9	positiv	74,1	negativ		0,5	0,5		Volleipulver
IL	8	07.10.19	positiv	1	positiv	40	positiv	60	positiv	12,6	positiv	130	negativ	0	0,05	0,4		Volleipulver
MI-II	3	29.10/06.11	positiv	18,8	positiv	11,6	positiv	20,5	positiv	22,1	positiv	24,4	negativ	< 0,31	0,31	0,31		Eiprotein
MI-II	7	15.10.19	positiv	36	positiv	14	positiv	42	positiv	44	positiv	44	negativ	<0,65	0,65	0,65		Volleipulver
MI-II	10a	11.10.19	positiv	15	positiv	6	positiv	16	positiv	15	positiv	20	negativ		1,25	3,5	1,025	Volleiprotein
RS-F	1	29./30.10.19	positiv	2,6	positiv	6,6	positiv	56,5	positiv	11,1	positiv	83,8	negativ		0,5	0,5		Volleipulver
RS-F	6	23.10.19	-	2,1	-	4,6	-	58,3	-	15,1	-	50,7	-	< 0,5	0,1	0,5		Volleipulver
RS-F	9	08.10.	positiv	2,29	positiv	12,6	positiv	71,1	positiv	18,2	positiv	99,9	negativ	< 0,5	0,1	0,5		Volleipulver
RS-F	10b	18.10.19	positiv	2	positiv	15	positiv	58	positiv	19	positiv	80	negativ		0,5	0,5	0,28	Volleipulver
RS-F	5b	31.10.19	positiv	3,04	positiv	7,8	positiv	66,6	positiv	16,7	positiv	92,2	negativ		0,5	0,5		Volleipulver

\* NWG Nachweisgrenze / BG Bestimmungsgrenze

\* LOD limit of detection / LOQ limit of quantitation

\* MU Messunsicherheit / MU measurement uncertainty

## Weitere Angaben zu den Methoden

Meth. Abk.	Auswertenummer	Methode	Spezifität	Gehalt Gesamt-Protein in Ei (gemäß Methodenvorschrift)	Umrechnung für prozessierte Eiprodukte (gemäß Methodenvorschrift) Umrechnung von X in Y (Faktor oder %)	Hinweise zur Methode (Extraktion und Bestimmung)	Methode akkreditiert nach ISO/IEC 17025	Sonstige Hinweise
		Test-Kit + Anbieter	Antikörper	%		z.B. Extraktionslösung / Zeit / Temperatur	ja/nein	
AQ	4	AgraQuant ELISA Egg White COKAL0848, RomerLabs	Polyklonal (Eiklarproteine)			laut Kitanleitung	ja	keine Umrechnungsfaktoren vom Hersteller angegeben
BF	2	MonoTrace Egg ELISA kit, BioFront Technologies	Monoklonaler Antikörper-basierter Assay	1:20 Extraktionsverhältnis bei 62°C für 10 Minuten	N/A	Produkt # EOM-EK		
BK	11	BioKits Egg Assay Kit, Neogen	polyklonaler AK gegen Gal d1	10		nach Testanleitung	ja	
BK	5a	BioKits Egg Assay Kit, Neogen	Ovomucoid		1 g Ovomucoid entspricht 10 g Eiklarprotein bzw. 30 g Volleipulver	nach Testanleitung	ja	
IL	8	Immunolab Egg white ELISA	Ovomucoid					
MI-II	3	Morinaga Egg (Ovalbumin) ELISA Kit II (M2111)		48,05 % Gesamt-Protein	Umrechnungsfaktor von Eiprotein in Epulver ist 2,06	Short Time Extraction Method	ja	
MI-II	7	Morinaga Egg (Ovalbumin) ELISA Kit II (M2111)	erkennt das Eiklarprotein Ovalbumin	Hühnerei als Volleipulver enthält 47,6% Gesamtprotein; Faktor 2,1	nicht vorhanden	lt. Herstellerangaben	ja	für unsere Kunden geben wir die Ergebnisse als mg/kg Volleiprotein an
MI-II	10a	Morinaga Egg (Ovalbumin) ELISA Kit II (M2111)					ja	
RS-F	1	Ridascreen® FAST Egg Protein R6402, R-Biopharm					ja	MU = 31,5%
RS-F	6	Ridascreen® FAST Egg Protein R6402, R-Biopharm		49 +/- 1		laut Kit	nein	
RS-F	9	Ridascreen® FAST Egg Protein R6402, R-Biopharm				nach Herstelleranleitung	ja	
RS-F	10b	Ridascreen® FAST Egg Protein R6402, R-Biopharm					ja	
RS-F	5b	Ridascreen® FAST Egg Protein R6402, R-Biopharm	Eiklarproteine			nach Testanleitung	ja	

**5.2 Homogenität**

**5.2.1 Mischungshomogenität vor der Abfüllung**

**Microtracer Homogenitätstest**

**DLA 15-2019 Probe 1**

Gewicht Gesamtprobe	1,00	kg
Microtracer	FSS-rot lake	
Teilchengröße	75 – 300	µm
Gewicht pro Partikel	2,0	µg
Tracerzugabe	23,0	mg/kg

**Analysenergebnisse:**

Probe	Einwaage [g]	Partikel Anzahl	Partikel [mg/kg]
1	5,16	72	27,9
2	5,09	77	30,3
3	5,02	80	31,9
4	5,06	63	24,9
5	5,04	69	27,4
6	5,10	72	28,2
7	5,04	72	28,6
8	5,16	85	32,9

**Poisson-Verteilung**

Probenanzahl	8	
Freiheitsgrad	7	
Mittelwert	73,7	Partikel
Standardabweichung	6,57	Partikel
$\chi^2$ (CHI-Quadrat)	4,10	
<b>Wahrscheinlichkeit</b>	<b>77</b>	%
Wiederfindungsrate	126	%

**Normalverteilung**

Probenanzahl	8	
Mittelwert	29,0	mg/kg
Standardabweichung	2,59	mg/kg
rel. Standardabweichung	8,91	%
Horwitz Standardabweichung	9,64	%
<b>HorRat-Wert</b>	<b>0,92</b>	
Wiederfindungsrate	126	%

**Microtracer Homogenitätstest**

**DLA 15-2019 Probe 2**

Gewicht Gesamtprobe	1,00	kg
Microtracer	FSS-rot lake	
Teilchengröße	75 – 300	µm
Gewicht pro Partikel	2,0	µg
Tracerzugabe	31,4	mg/kg

**Analysenergebnisse:**

Probe	Einwaage [g]	Partikel Anzahl	Partikel [mg/kg]
1	5,03	96	38,2
2	5,06	80	31,6
3	4,96	82	33,1
4	5,06	76	30,0
5	5,13	87	33,9
6	5,06	83	32,8
7	5,02	89	35,5
8	5,05	84	33,3

**Poisson-Verteilung**

Probenanzahl	8	
Freiheitsgrad	7	
Mittelwert	84,6	Partikel
Standardabweichung	6,18	Partikel
$\chi^2$ (CHI-Quadrat)	3,16	
<b>Wahrscheinlichkeit</b>	<b>87</b>	%
Wiederfindungsrate	107	%

**Normalverteilung**

Probenanzahl	8	
Mittelwert	33,5	mg/kg
Standardabweichung	2,45	mg/kg
rel. Standardabweichung	7,31	%
Horwitz Standardabweichung	9,43	%
<b>HorRat-Wert</b>	<b>0,77</b>	
Wiederfindungsrate	107	%

**Microtracer Homogenitätstest**

**DLA 15-2019 Probe 3**

Gewicht Gesamtprobe	1,00	kg
Microtracer	FSS-rot lake	
Teilchengröße	75 – 300	µm
Gewicht pro Partikel	2,0	µg
Tracerzugabe	31,2	mg/kg

**Analysenergebnisse:**

Probe	Einwaage [g]	Partikel Anzahl	Partikel [mg/kg]
1	5,18	92	35,5
2	5,02	99	39,4
3	5,01	95	37,9
4	5,16	92	35,7
5	5,12	90	35,2
6	5,05	99	39,2
7	5,07	93	36,7
8	5,14	100	38,9

Poisson-Verteilung		
Probenanzahl	8	
Freiheitsgrad	7	
Mittelwert	95,0	Partikel
Standardabweichung	4,52	Partikel
χ <sup>2</sup> (CHI-Quadrat)	1,50	
<b>Wahrscheinlichkeit</b>	<b>98</b>	%
Wiederfindungsrate	120	%

Normalverteilung		
Probenanzahl	8	
Mittelwert	37,3	mg/kg
Standardabweichung	1,77	mg/kg
rel. Standardabweichung	4,76	%
Horwitz Standardabweichung	9,28	%
<b>HorRat-Wert</b>	<b>0,51</b>	
Wiederfindungsrate	120	%

**Microtracer Homogenitätstest**

**DLA 15-2019 Probe 4**

Gewicht Gesamtprobe	1,00	kg
Microtracer	FSS-rot lake	
Teilchengröße	75 – 300	µm
Gewicht pro Partikel	2,0	µg
Tracerzugabe	26,5	mg/kg

**Analysenergebnisse:**

Probe	Einwaage [g]	Partikel Anzahl	Partikel [mg/kg]
1	5,18	74	28,6
2	5,16	73	28,3
3	5,05	68	26,9
4	5,10	80	31,4
5	5,13	86	33,5
6	5,11	68	26,6
7	5,06	75	29,6
8	5,02	82	32,7

Poisson-Verteilung		
Probenanzahl	8	
Freiheitsgrad	7	
Mittelwert	75,8	Partikel
Standardabweichung	6,59	Partikel
χ <sup>2</sup> (CHI-Quadrat)	4,01	
<b>Wahrscheinlichkeit</b>	<b>78</b>	%
Wiederfindungsrate	112	%

Normalverteilung		
Probenanzahl	8	
Mittelwert	29,7	mg/kg
Standardabweichung	2,58	mg/kg
rel. Standardabweichung	8,70	%
Horwitz Standardabweichung	9,60	%
<b>HorRat-Wert</b>	<b>0,91</b>	
Wiederfindungsrate	112	%

**Microtracer Homogenitätstest**

**DLA 15-2019 Probe 5**

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

**Analysenergebnisse:**

Probe	Einwaage [g]	Partikel Anzahl	Partikel [mg/kg]
2	5,05	61	24,2
4	5,12	60	23,4
5	5,02	58	23,1
6	5,27	66	25,0
7	5,06	63	24,9
8	5,15	64	24,9
9	5,03	59	23,5
10	5,07	67	26,4

**Poisson-Verteilung**

Probenanzahl	8	
Freiheitsgrad	7	
Mittelwert	62,2	Partikel
Standardabweichung	2,81	Partikel
$\chi^2$ (CHI-Quadrat)	0,89	
<b>Wahrscheinlichkeit</b>	<b>100</b>	%
Wiederfindungsrate	116	%

**Normalverteilung**

Probenanzahl	8	
Mittelwert	24,4	mg/kg
Standardabweichung	1,10	mg/kg
rel. Standardabweichung	4,52	%
Horwitz Standardabweichung	9,89	%
<b>HorRat-Wert</b>	<b>0,46</b>	
Wiederfindungsrate	116	%

**5.3 Informationen zur Eignungsprüfung (EP)**

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

EP-Nummer	<b>DLA 15-2019</b>
EP-Name	<b>Response PT Ei: Prozessierte Proben Flüssigei (pasteurisiert), Ei (gekocht), Volleipulver, Eiernudeln und Egebäck in Kartoffelpulver-Matrix</b>
Probenmatrix (Prozessierung)	<b>Proben 1-6:</b> Zutaten: Kartoffelpulver (ca. 75%), Maltodextrin (ca. 25%) sowie weitere Zusatzstoffe und Allergene Lebensmittel (nur in Proben 1-5)
Probenzahl und Probenmenge	5 unterschiedliche Proben je 20 g + 1 „Null-Probe“ 20 g
Lagerungsinformation	Proben 1-6: Raumtemperatur (Langzeit gekühlt 2 - 10 °C)
Verwendungszweck	Ausschließlich für Laboruntersuchungen (Qualitätskontrollproben)
Parameter	qualitativ + quantitativ: Ei / Eiprotein / DNA aus Flüssigei (pasteurisiert), Ei (gekocht), Volleipulver, Eiernudeln und Egebäck Proben 1-5: ca. 25 - 150 mg/kg (als Volleipulver)
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 Analyseneinwaagen, eine repräsentative Probenmenge entsprechend guter Laborpraxis zu homogenisieren. Am besten wird jeweils die gesamte Probenmenge homogenisiert.
Ergebnisangabe	Es werden für jede Probe 1 - 6 je ein Ergebnis ermittelt. Die Einzelergebnisse sind in die Ergebnisabgabe-Datei einzutragen, bei Mehrfachbestimmungen der Mittelwert.
Einheiten	mg/kg
Anzahl von Stellen	mindestens 2 signifikante Stellen
Ergebnisabgabe	Die Ergebnisabgabe-Datei wird per eMail übermittelt an: <b>pt@dla-lvu.de</b>
Abgabetermin	<b>Spätestens 08. November 2019</b>
Auswertebericht	Der Auswertebericht wird voraussichtlich 6 Wochen nach Abgabetermin der Ergebnisse fertiggestellt und per eMail als PDF-Datei zugesandt.
Koordinator und Ansprechpartner der EP	Dr. Matthias Besler-Scharf

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

**6. Verzeichnis der Teilnehmer in alphabetischer Reihenfolge**

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

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

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

## 7. Verzeichnis relevanter Literatur

1. DIN EN ISO/IEC 17025:2005; Allgemeine Anforderungen an die Kompetenz von Prüf- und Kalibrierlaboratorien / General requirements for the competence of testing and calibration laboratories
2. DIN EN ISO/IEC 17043:2010; Konformitätsbewertung – Allgemeine Anforderungen an Eignungsprüfungen / Conformity assessment – General requirements for proficiency testing
3. ISO 13528:2015 & DIN ISO 13528:2009; Statistische Verfahren für Eignungsprüfungen durch Ringversuche / Statistical methods for use in proficiency testing by interlaboratory comparisons
4. ASU §64 LFGB: Planung und statistische Auswertung von Ringversuchen zur Methodenvalidierung / DIN ISO 5725 series part 1, 2 and 6 Accuracy (trueness and precision) of measurement methods and results
5. Verordnung / Regulation 882/2004/EU; Verordnung über amtliche Kontrollen zur Überprüfung der Einhaltung des Lebensmittel- und Futtermittelrechts sowie der Bestimmungen über Tiergesundheit und Tierschutz / Regulation on official controls performed to ensure the verification of compliance with feed and food law, animal health and animal welfare rules
6. Evaluation of analytical methods used for regulation of food and drugs; W. Horwitz; Analytical Chemistry, 54, 67-76 (1982)
7. The International Harmonised Protocol for the Proficiency Testing of Analytical Laboratories ; J.AOAC Int., 76(4), 926 – 940 (1993)
8. A Horwitz-like funktion describes precision in proficiency test; M. Thompson, P.J. Lowthian; Analyst, 120, 271-272 (1995)
9. Protocol for the design, conduct and interpretation of method performance studies; W. Horwitz; Pure & Applied Chemistry, 67, 331-343 (1995)
10. Recent trends in inter-laboratory precision at ppb and sub-ppb concentrations in relation to fitness for purpose criteria in proficiency testing; M. Thompson; Analyst, 125, 385-386 (2000)
11. The International Harmonised Protocol for the Proficiency Testing of Analytical Chemistry Laboratories; Pure Appl Chem, 78, 145 – 196 (2006)
12. AMC Kernel Density – Representing data distributions with kernel density estimates, amc technical brief, Editor M Thompson, Analytical Methods Committee, AMCTB No 4, Revised March 2006 and Excel Add-in Kernel.xla 1.0e by Royal Society of Chemistry
13. EURACHEM/CITAC Leitfaden, Ermittlung der Messunsicherheit bei analytischen Messungen (2003); Quantifying Uncertainty in Analytical Measurement (1999)
14. GMP+ Feed Certification scheme, Module: Feed Safety Assurance, chapter 5.7 Checking procedure for the process accuracy of compound feed with micro tracers in GMP+ BA2 Control of residues, Version: 1st of January 2015 GMP+ International B.V.
15. MTSE SOP No. 010.01 (2014): Quantitative measurement of mixing uniformity and carry-over in powder mixtures with the rotary detector technique, MTSE Micro Tracers Services Europe GmbH
16. Homogeneity and stability of reference materials; Linsinger et al.; Accred Qual Assur, 6, 20-25 (2001)
17. AOAC Official Methods of Analysis: Guidelines for Standard Method Performance Requirements, Appendix F, p. 2, AOAC Int (2016)
18. EN ISO/IEC 17034:2016; Konformitätsbewertung – Allgemeine Anforderungen an die Kompetenz von Referenzmaterialherstellern / General requirements for the competence of reference material producers
19. ISO Guide 34:2000; General requirements for the competence of reference material producers
20. DAkkS 71 SD 1/4 016; Ermittlung und Angabe der Messunsicherheit nach Forderungen der DIN EN ISO/IEC 17025 (2011) [Estimation and indication of the measurement uncertainty]
21. 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
22. 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

23. 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
24. 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
25. Ministry of Health and Welfare, JSM, Japan 2006
26. 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)
27. 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)
28. 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)
29. EFSA (2014) Scientific Opinion on the evaluation of allergenic foods and food ingredients for labelling purposes<sup>1</sup>, EFSA Panel on Dietetic Products, Nutrition and Allergies (NDA), European Food Safety Authority (EFSA), Parma, Italy, EFSA Journal 2014;12(11):3894
30. 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
31. 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
32. 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]
33. 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]
34. 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]
35. 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]
36. 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]
37. ASU §64 LFGB L 16.01-9 Untersuchung von Lebensmitteln – Bestimmung von Soja (Glycine max) in Getreidemehl mittels real-time PCR (2016) [Foodstuffs, determination of soya (Glycine max) in cereal flour by real-time PCR]
38. ASU §64 LFGB L 08.00-59 Untersuchung von Lebensmitteln – Nachweis und Bestimmung von Senf (Sinapis alba) sowie Soja (Glycine max) in Brühwürsten mittels real-time PCR (2013) [Foodstuffs, detection and determination of mustard (Sinapis alba) and soya (Glycine max) in boiled sausages by real-time PCR]
39. ASU §64 LFGB L 08.00-65 Untersuchung von Lebensmitteln – Simultaner Nachweis und Bestimmung von schwarzem Senf (Brassica nigra L.), braunem Senf (Brassica juncea L.), weißem Senf (Sinapis alba), Sellerie (Apium graveolens) und Soja (Glycine max) in Brühwurst mittels real-time PCR (2017) [Foodstuffs, simultaneous detection and determination of black mustard (Brassica nigra L.), brown mustard (Brassica juncea L.), white mustard (Sinapis alba), celery (Apium graveolens) and soya (Glycine max) in boiled sausages by real-time PCR]

**DLA 15/2019 - Response PT Ei**

Alle 11 Teilnehmer haben Ergebnisse eingereicht. Es wurden 6 LVU-Proben für den qualitativen Nachweis und die quantitative Bestimmung von Ei in Egebäck, gekochtem Ei, Volleipulver, Eiernudeln und Flüssigei (pasteurisiert) in einer Trägermatrix sowie eine „Null“-Probe zur Verfügung gestellt. Die Teilnehmer-Ergebnisse wurden *qualitativ* mit einem Score von 1-5 bewertet, der angibt wie viele prozessierte Produkte erfolgreich erfasst wurden. Die quantitativen Ergebnisse wurden mit einem Wiederfindungs-Score (*WFR-Score*) bewertet, der angibt wie viele Ergebnisse im Bereich einer Wiederfindungsrate von 50 - 150% des Dotierungs-Levels liegen. Details sind dem Auswertebereich zu entnehmen.

2 Teilnehmer hatten ihren Sitz im Europäischen Ausland (Österreich) und ein Teilnehmer in den USA.