



**Auswertungs-Bericht**

Laborvergleichsuntersuchung

**DLA 17/2019**

**ALM Verification:**

**Ei in Keks-Matrix**

**5 Proben mit Volleipulver gebacken  
(Gehalte: 0,1 / 0,5 / 1,0 / 5,0 / 15 mg/kg)**

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

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

*Koordinator der LVU:*  
*Dr. Matthias Besler-Scharf*

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

<i>EP-Anbieter PT-Provider</i>	<b>DLA - Proficiency Tests GmbH</b> Kalte Weide 21, 24641 Sievershütten, Germany  Geschäftsführer/CEO: Dr. Matthias Besler-Scharf Stellv. Leitung/Deputy Lead: Alexandra Scharf MSc.  Tel. ++49-(0)4532-9183358 Mob. ++49(0)171-1954375 Fax. ++49(0)4102-9944976 eMail. proficiency-testing@dla-lvu.de
<i>EP-Nummer PT-Number</i>	DLA 17/2019
<i>EP-Koordinator PT-Coordinator</i>	Dr. Matthias Besler-Scharf
<i>Status des EP-Bericht Status of PT-Report</i>	Abschlussbericht / Final report (11. März 2020)  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.
<i>EP-Bericht Freigabe PT-Report Authorization</i>	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: 11. März 2020
<i>Unteraufträge Subcontractors</i>	Im Rahmen dieser Eignungsprüfung wurden nachstehende Leistungen im Unterauftrag vergeben: Proteinbestimmung As part of the present proficiency test the following services were subcontracted: protein determination
<i>Vertraulichkeit Confidentiality</i>	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.

## Inhalt

1. Einleitung.....	4
2. Durchführung.....	5
2.1 Untersuchungsmaterial.....	5
2.1.1 Charakterisierung der PT-Probenreihe.....	7
2.1.2 Homogenität.....	8
2.1.3 Stabilität.....	8
2.2 Probenversand und Informationen zur Untersuchung.....	9
2.3 Ergebnisübermittlung.....	9
3. Auswertung.....	10
3.1 Action Level Matrix Score (ALM-Score).....	11
3.2 Wiederfindungs-Score (WFR-Score).....	11
3.2.1 Wiederfindungsraten eines Versuchs zur Präzision.....	12
3.2.2 Werte aus Erkenntnissen.....	14
4. Ergebnisse.....	15
4.1 Vergleichsuntersuchung Ei.....	16
4.1.1 Qualitativ: Action Level Matrix-Scores.....	16
4.1.1.1 ELISA-Methoden.....	16
4.1.1.2 Quantitativ: Wiederfindungs-Scores.....	17
4.1.1.2.1 ELISA-Ergebnisse (als Volleipulver).....	17
4.1.1.3 Informative Angaben: Statistische Kenndaten Ei.....	19
4.1.1.3.1 ELISA-Methoden (als Volleipulver).....	19
5. Dokumentation.....	21
5.1 Angaben der Teilnehmer.....	21
5.1.1 ELISA-Methoden.....	21
5.2 Homogenität.....	23
5.2.1 Mischungshomogenität vor der Abfüllung.....	23
5.3 Informationen zur Eignungsprüfung (EP).....	26
6. Verzeichnis der Teilnehmer in alphabetischer Reihenfolge.....	27
7. Verzeichnis relevanter Literatur.....	28

## 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 PT-Format „**Action Level Matrix – ALM Verification**“ bietet die Möglichkeit anhand einer Art Kalibrierreihe von 5 Proben eines Allergens in einer spezifischen Lebensmittelmatrix sowie einer „Nullprobe“ nachzuweisen, dass mit der analytischen Bestimmungsmethode des teilnehmenden Labors der für die Kennzeichnung des betreffenden Allergens relevante Gehalt sicher erfasst werden kann.

Dabei reichen die Allergen-Konzentrationen der PT-Probenreihe von 1/10 bis mindestens das 5-fache des Action Levels, der i.d.R. auf die Schwellenwertdosis (VITAL Konzept 2.0) bzw. Beurteilungswerte des ALTS/ALS zurückgeht (vgl. Tabelle 3). Die Auswertung der PT-Ergebnisse erfolgt qualitativ in Scores von 1-5 (Score 3 = Action Level erfolgreich erfasst). Quantitative Ergebnisse werden unter Angabe der erzielten Wiederfindungsrate informativ im Bericht angegeben.

Zusätzlich wurde zur Information eine quantitative Bewertung der ELISA-Ergebnisse für den Action Level sowie den Level 5 mittels z-Score vorgenommen.

## 2. Durchführung

### 2.1 Untersuchungsmaterial

Zur Untersuchung wurden 6 LVU-Proben mit gleicher Lebensmittelmatrix für den qualitativen Nachweis und ggf. die quantitative Bestimmung von Ei in der Lebensmittelmatrix Kekse für Kinder zur Verfügung gestellt. Die Ei-Level der PT-Probenreihe lagen im Bereich von 0,1 mg/kg bis 15 mg/kg (als Volleipulver), der mittlere Wert stellt den „Action Level“ dar (s. Tabelle 1).

Bei der Lebensmittelmatrix des Untersuchungsmaterials handelt es sich um eine Mischung handelsüblicher Kekse. Die Grundzusammensetzung war für alle 6 Proben gleich (s. Tabelle 1).

Nach Zerkleinern und Sieben mittels Schlagmühle (mesh 1,5 mm) wurde die Grundmischung homogenisiert und ein Aliquot als Level „Null“-Probe abgenommen.

Zur Herstellung der eihaltigen Proben wurden zunächst Kekse unter Zusatz einer Mischung von Volleipulver (weitere Angaben s.u.) gebacken (150°C, 40 min) und anschließend getrocknet (40°C). Danach wurden die eihaltigen Kekse mittels Messermühle zerkleinert und anschließend homogenisiert.

Anschließend wurde die **Reihe der dotierten Proben** folgendermaßen hergestellt: Nach Zerkleinerung und Homogenisierung wurden die eihaltigen Kekse zu einem Aliquot der Grundmatrix gegeben und die Mischung homogenisiert. Anschließend wurde portionsweise erneut Grundmatrix in 2-3 weiteren Schritten zugegeben und jeweils homogenisiert bis die Gesamtmenge erreicht war.

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

Zur Dotierung wurde eine Mischung von Volleipulvern aus insgesamt 6 Einzelprodukte aus 2 Ländern (Europa) verwendet. Diese Mischung der Volleipulver hat in den Proben (Matrix Kartoffelpulver/Maltodextrin) der Eigenschaftsprüfung DLA 15/2019 für Ei mit diversen ELISA-Methoden eine mittlere Wiederfindungsrate von 101 % ± 20 % (n=13) ergeben.

Tabelle 1: Zusammensetzung der DLA-Proben

PT-Probenreihe	Level 0 „Null“	Level 1 0,1 mg/kg	Level 2 0,5 mg/kg	Level 3 1,0 mg/kg	Level 4 5,0 mg/kg	Level 5 15 mg/kg
Zutaten	g/100 g	g/100g	g/100g	g/100g	g/100g	g/100g
Butterkekse Zutaten: Weizenmehl, Zucker, Butter, Gerstenmalzextrakt, Magermilchpulver, Glucose, Glucosesirup, Backtriebmit- tel Ammoniumcarbonat, Salz, Emulgator Lecithine Nährwertangaben pro 100 g: Fett 12 g, Kohlenhydrate 76 g, Eiweiß 7,1 g	100	>99,9	>99,9	>99,9	>99,9	99,8
Kekse (gebacken 150°C, 40 min) Zutaten: Weizenmehl, Zu- cker, Butter, Wasser, Mi- schung von Volleipulvern, Salz	-	0,002	0,008	0,017	0,083	0,25
Allergen-Gehalte	mg/kg	mg/kg	mg/kg	mg/kg	mg/kg	mg/kg
davon Ei:	-					
- als Volleipulver*		<b>0,101</b>	<b>0,506</b>	<b>1,01</b>	<b>5,04</b>	<b>15,1</b>
- mit 46,9% Gesamtprotein**		0,047	0,237	0,474	2,36	7,08
erweiterte kombinierte Unsicherheit (k=2) des Ei-Ge- halts (= ± 11 %)		± 0,011	± 0,056	± 0,11	± 0,55	± 1,7

\*Allergen-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 Eiprotein)

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

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, 18-20].

2.1.1 Charakterisierung der PT-Probenreihe

Die PT-Probenreihe wurde mittels ELISA-Bestimmung charakterisiert (Morinaga ELISA Kit II, n=5). Die dotierten Gehalte waren ab Level 2 nachweisbar und korrelierten mit den aufsteigenden Mittelwerten der Ergebnisse (Mean) (s. Abb. 1). Die relativen Standardabweichungen (RSD) lagen im Bereich von 7,6% bis 36% und die Wiederfindungsraten (Recovery) bei 24% bis 32% (Level 3: abgeschätzte Werte <LOQ des Test-Kits).

Tabelle 2: Charakterisierung der PT-Probenreihe als Volleipulver in Keksen mittels ELISA-Bestimmung (Morinaga ELISA II, n=5).

PT-Sample	Level 0	Level 1	Level 2	Level 3*	Level 4	Level 5
	[mg/kg]	[mg/kg]	[mg/kg]	[mg/kg]	[mg/kg]	[mg/kg]
Spiking	0,0	0,10	0,51	1,01	5,0	15,1
Result 1	0,0	<0,2	<0,2	0,30	1,66	3,31
Result 2	0,0	<0,2	<0,2	0,32	1,12	3,86
Result 3	0,0	<0,2	<0,2	0,52	1,33	3,82
Result 4	0,0	<0,2	<0,2	0,24	1,05	3,29
Result 5	0,0	<0,2	<0,2	0,23	1,70	3,65
Mean	0,0	<0,2	<0,2	0,32	1,37	3,59
SD	-	-	-	0,12	0,30	0,27
RSD [%]	-	-	-	36,4	21,9	7,6
Recovery [%]	-	-	-	31,9	27,2	23,7

\* Level 3: Werte unterhalb ELISA-Kit LOQ

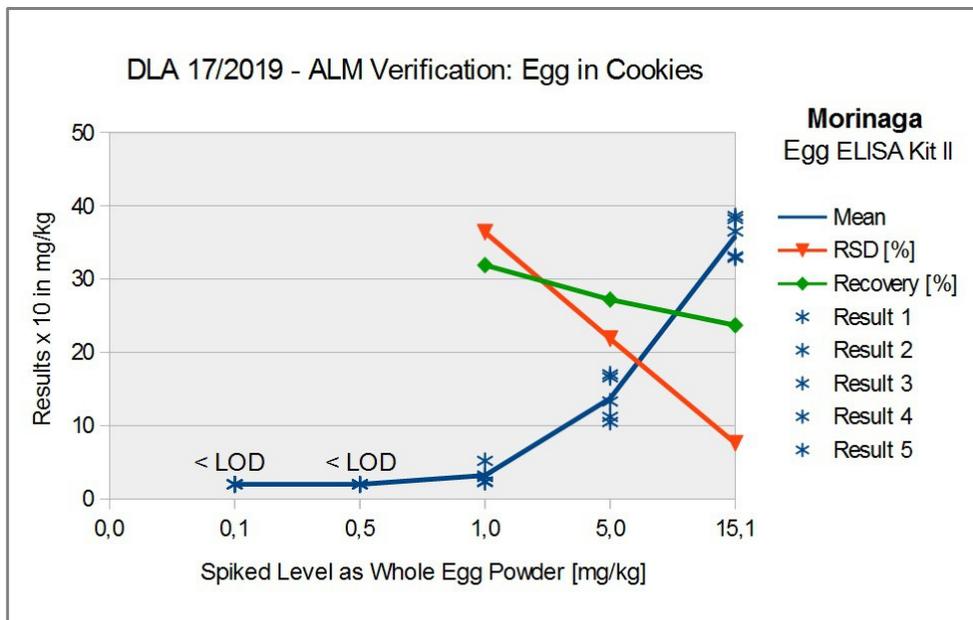


Abb./Fig. 1: Darstellung der ELISA-Ergebnisse der PT-Probenreihe als Volleipulver in Keksen (Morinaga ELISA Kit II, n=5), Anmerkung: Messergebnisse x 10, die x-Achse ist zur besseren Erkennbarkeit der niedrigen Gehalte nicht linear dargestellt.

### 2.1.2 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 82%, 92%, 99%, 98% bzw. 78% 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 0,88, 0,64, 0,54, 0,61 bzw. 0,94 erhalten. Die Ergebnisse der Microtracer-Analyse sind in der Dokumentation angegeben.

### 2.1.3 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. 0,19 (19,0°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 48. Kalenderwoche 2019 je eine Portion der Proben 1 bis 6 verschickt. Die Untersuchungsverfahren wurden freigestellt. Die Untersuchungen waren durchzuführen bis spätestens 10. Januar 2020.

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

*Die Eignungsprüfung Action Level Matrix (ALM) – Verification umfasst fünf unterschiedliche Proben mit definierten Gehalten an Ei sowie eine „Nullprobe“ in der Matrix Kekse.*

- *Die 6 Proben sind in zufälliger Reihenfolge nummeriert.*
- *Es soll qualitativ mit einer geeigneten Methode nachgewiesen werden, dass der sogenannte „Action Level“ von 1,0 mg/kg Ei als Volleipulver erfasst werden kann (= Action Level 1 (VITAL Konzept 2.0) bzw. Beurteilungswert des ALTS/ALS).*
- *Soweit möglich ist die Angabe quantitativer Ergebnisse erwünscht, um einen Vergleich zu den Zusatzniveaus darstellen zu können.*

*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.

Von 13 Teilnehmern haben 11 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 [31-34]. 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 wurde die allergene Zutat in einer speziellen Lebensmatrix in einer Art Kalibrierreihe mit Konzentrationen um den sogenannten Action Level herum zur Analyse zur Verfügung gestellt. Der hier als „Action Level“ bezeichnete Allergengehalt ist in Tabelle 3 farbig unterlegt.

Die Teilnehmer-Ergebnisse werden *qualitativ* mit einem Action Level Matrix Score (ALM-Score) bewertet, der angibt wie viele Konzentrations-Level 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.

**Tabelle 3:** Schwellenwerte, Beurteilungswerte und gesetzliche Höchstwerte (farbig unterlegt: Action Level in der vorliegenden LVU) [21-23, 32]

Allergen	Schwellenwert-dosis * (Vital Konzept 2.0)	Beurteilungswert ALTS/ALS	Gesetzliche Höchstwerte zur Kennzeichnung
	mg/kg	mg/kg	mg/kg
Gluten	100	> 80	20 **
<b>Ei (als Volleipulver)</b>	<b>0,66</b>	<b>&gt; 1</b>	
Erdnuss	8	> 5	
Soja (als Sojamehl)	25	> 20	
Milch (als ent fettetes Milchpulver)	2,8	> 2,5	
Haselnuss	6,4	> 5	
Cashew	106	> 50	
Mandel, Walnuss, Pekannuss, Paranuss, Pistazie, Macadamia	-	> 20	
Sesam, ungeschält	11,8	> 10	
Lupine	100	> 50	
Selleriesaat	-	> 20	
Senfsaat	1,9	> 5	

\* berechnet aus Schwellenwert bei Verzehr von 100 g Lebensmittel [22, 23]

\*\* Höchstwert zur Kennzeichnung als „glutenfrei“ gemäß EU-VO 828/2014 [21]

### 3.1 Action Level Matrix Score (ALM-Score)

Die qualitative Bewertung der Ergebnisse jedes Teilnehmers erfolgt mit sogenannten ALM-Scores von 1-5 anhand der Anzahl der Übereinstimmungen der Angaben „positiv“ oder „negativ“ mit den Dotierungen der LVU-Probenreihe (siehe Tab. 4). Ein ALM-Score von  $\geq 3$  bedeutet, dass der Action Level erfolgreich erfasst wurde.

Die Ergebnisse der Matrixprobe Level 0 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 4: Bewertung der Ergebnisse anhand von ALM-Scores

Level 0 „Null“	Level 1 0,1 mg/kg	Level 2 0,5 mg/kg	Level 3 (Action Level) 1,0 mg/kg	Level 4 5,0 mg/kg	Level 5 15 mg/kg	ALM-Score qualitativ	Bestimmung Action Level
pos/neg	pos/neg	pos/neg	pos/neg	pos/neg	pos/neg	Anzahl erfasster Level 1 - 5	
negativ	negativ	negativ	negativ	negativ	positiv	1 (20%)	nicht erfolgreich
negativ	negativ	negativ	negativ	positiv	positiv	2 (40%)	nicht erfolgreich
negativ	negativ	negativ	positiv	positiv	positiv	3 (60%)	erfolgreich
negativ	negativ	positiv	positiv	positiv	positiv	4 (80%)	erfolgreich
negativ	positiv	positiv	positiv	positiv	positiv	5 (100%)	erfolgreich

### 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 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 zugesetzte Allergen (Zusatzniveau) berechnet. Die Bezugswerte ergeben sich aus den unter 2.1 Untersuchungsmaterial in Tabelle 1 angegebenen Gehalten der Level 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 [29]. Für quantitative PCR-Bestimmungen 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 Matrix- und/oder Prozessierungseinflüssen.

### 3.2.1 Wiederfindungsraten eines Versuchs zur Präzision

In Ringversuchen der ASU §64 Methoden wurden abhängig von Matrix bzw. Prozessierung und Konzentrationsbereich Wiederfindungsraten im Bereich von 57 – 119% für die ELISA-Methoden und 33 – 161% für die PCR-Methoden erhalten (s. Tab. 5a und 5b). Die angegebenen Zielstandardabweichungen  $\sigma_{pt}$  wurden für eine Anzahl von  $m = 2$  Wiederholmessungen berechnet.

Tabelle 5a: ELISA-Methoden – Wiederfindungsraten und Präzisionsdaten ausgewählter Auswertungen von Versuchen zur Präzision [36-37]

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

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 5b:** PCR-Methoden - Relative Wiederholstandardabweichungen ( $RSD_r$ ) und relative Vergleichsstandardabweichungen ( $RSD_R$ ) gemäß ausgewählter Auswertungen von Versuchen zur Präzision und die resultierende Zielstandardabweichung  $\sigma_{pt}$  [38-42]

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 [28], von der Arbeitsgruppe 12 „Lebensmittelallergene“ des Technischen Komitees CEN/TC 275 [25-27], von einer internationalen "Food Allergen Working Group" unter der Leitung der AOAC Presidential Task Force on Food Allergens [29] und vom Codex Alimentarius Committee (CAC/GL 74-2010) [24] erarbeitet worden.

Die hier relevanten ELISA- bzw. PCR-Validierungskriterien der Gremien sind in den Tabellen 6 und 7 angegeben.

Tabelle 6: ELISA-Validierungskriterien

Literatur [24-29]	Wiederfindungsrate	Wiederholstandard- abweichung	Vergleichsstandard- abweichung
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 7: PCR-Validierungskriterien

Literatur [24]	Wiederfindungsrate	Wiederholstandard- abweichung	Vergleichsstandard- abweichung
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 für die relative Zielstandardabweichung  $\sigma_{pt}$  einen 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.

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

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, werden 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	Level 0	Level 1	Level 2	Level 3 (Action Level)	Level 4	Level 5	ALM-Score qualitativ	Methode	Hinweis
	„Null“	0,1 mg/kg	0,5 mg/kg	1,0 mg/kg	5,0 mg/kg	15 mg/kg			
	pos/neg	pos/neg	pos/neg	pos/neg	pos/neg	pos/neg	Anzahl erfasster Level 1 - 5		

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

Auswertenummer	Level 1 – 0,1 mg/kg		Level 2 – 0,5 mg/kg		Level 3 – 1,0 mg/kg (Action Level)		Level 4 – 5,0 mg/kg		Level 5 – 15 mg/kg		WFR-Score	Methode	Hinweis
	Ergebnis	WFR *	Ergebnis	WFR *	Ergebnis	WFR *	Ergebnis	WFR *	Ergebnis	WFR *			
	[mg/kg]	[%]	[mg/kg]	[%]	[mg/kg]	[%]	[mg/kg]	[%]	[mg/kg]	[%]			

\* WFR = Wiederfindungsrate

## 4.1 Vergleichsuntersuchung Ei

### 4.1.1 Qualitativ: Action Level Matrix-Scores

#### 4.1.1.1 ELISA-Methoden

Auswertenummer	Level 0	Level 1	Level 2	Level 3 (Action Level)	Level 4	Level 5	ALM-Score qualitativ	Methode	Hinweis
	„Null“	0,10 mg/kg	0,5 mg/kg	1,0 mg/kg	5,0 mg/kg	15 mg/kg			
	pos/neg	pos/neg	pos/neg	pos/neg	pos/neg	pos/neg	Anzahl erfasster Level 1 - 5		
8a	negativ	negativ	negativ	negativ	negativ	negativ	0/5 (0%)	AQ	
10	negativ	negativ	negativ	negativ	negativ	negativ	0/5 (0%)	AQ-P	
8b	negativ	negativ	negativ	negativ	negativ	negativ	0/5 (0%)	AQ-P	
5a	negativ	negativ	negativ	negativ	negativ	negativ	0/5 (0%)	BK	
4	negativ	negativ	negativ	negativ	positiv	positiv	2/5 (40%)	MI-II	
7	negativ	negativ	negativ	negativ	positiv	positiv	2/5 (40%)	MI-II	
2	negativ	negativ	negativ	positiv	positiv	positiv	3/5 (60%)	RS	
9	negativ	negativ	negativ	positiv	positiv	positiv	3/5 (60%)	RS	
3a	negativ	negativ	negativ	negativ	positiv	positiv	2/5 (40%)	RS	
6a	negativ	negativ	negativ	negativ	positiv	positiv	2/5 (40%)	RS	
1a	positiv	negativ	positiv	negativ	negativ	positiv	-	RS-F	nicht bewertet
3b	negativ	negativ	negativ	negativ	negativ	negativ	0/5 (0%)	RS-F	
5b	negativ	negativ	negativ	negativ	negativ	negativ	0/5 (0%)	RS-F	
6b	negativ	negativ	negativ	negativ	negativ	negativ	0/5 (0%)	RS-F	
1b	positiv	negativ	positiv	negativ	negativ	negativ	-	VT	nicht bewertet

	Level 0	Level 1	Level 2	Level 3	Level 4	Level 5
Anzahl positiv	2	0	2	2	6	7
Anzahl negativ	13	15	13	13	9	8
Prozent positiv	13	0	13	13	40	47
Prozent negativ	87	100	87	87	60	53
Konsenswert	negativ	negativ	negativ	negativ	keiner	keiner
Dotierung	negativ	positiv	positiv	positiv	positiv	positiv

#### Methoden:

AQ = AgraQuant, RomerLabs  
 AQ-P = AgraQuant Plus, RomerLabs  
 BK = BioKits, Neogen  
 MI-II = Morinaga Institute ELISA II  
 RS = Ridascreen®, R-Biopharm  
 RS-F = Ridascreen® Fast, R-Biopharm  
 VT = Veratox, Neogen

#### Anmerkung:

Die beiden höchsten Level 4 (5 mg/kg) und 5 (15 mg/kg) wurden von den Teilnehmern mit den Methoden MI-II und RS erfolgreich erfasst. Der Action Level 3 wurde von 2 Teilnehmern mit der Methode RS als positiv detektiert (beide Ergebnisse lagen an bzw. unter der Bestimmungsgrenze der Methode). Mit den anderen ELISA-Methoden wurden für keinen der 5 Level (plausible) positive Ergebnisse erhalten.

### 4.1.2 Quantitativ: Wiederfindungs-Scores

#### 4.1.2.1 ELISA-Ergebnisse (als Volleipulver)

Auswertenummer	Level 1 – 0,10 mg/kg		Level 2 – 0,50 mg/kg		Level 3 – 1,0 mg/kg (Action Level)		Level 4 - 5,0 mg/kg		Level 5 - 15 mg/kg		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 im AB**				
8a	<LOD		<LOD		<LOD		<LOD		<LOD			AQ			
10	< LOQ		< LOQ		< LOQ		< LOQ		< LOQ			AQ-P			
8b	<LOD		<LOD		<LOD		<LOD		<LOD			AQ-P			
5a	-		-		-		-		-			BK			
4	-		-		-		1,17	23	4,38	29	0/0 (0%)	MI-II	Ergebnis umgerechnet °		
7	<0,64		<0,64		<0,64		1,19	24	6,25	41	0/0 (0%)	MI-II	Ergebnis umgerechnet °		
2	< 0,1		< 0,1		< 0,25		0,72	14	2,40	16	0/0 (0%)	RS			
9	<0,25		<0,25		0,25	25	0,70	14	25,0	165	0/0 (0%)	RS			
3a	< 0,25		< 0,25		< 0,25		0,39	7,7	0,84	5,6	0/0 (0%)	RS			
6a	0,03	25	0,084	17	0,11	11	0,60	12	3,31	22	0/0 (0%)	RS			
1a	<0,1		<0,5		<0,1		<0,1		<0,5			RS-F			
3b	< 0,5		< 0,5		< 0,5		< 0,5		< 0,5			RS-F			
5b												RS-F			
6b	< 0,5		< 0,5		< 0,5		< 0,5		< 0,5			RS-F			
1b	<0,6		<2,5		<0,6		<0,6		<2,5			VT			
											° Umrechnung S. 15				
<b>AB**</b>		<b>50-150 %</b>		<b>AB**</b>		<b>50-150 %</b>		<b>AB**</b>		<b>50-150 %</b>		<b>AB**</b>		<b>50-150 %</b>	
Anzahl im AB		0		Anzahl im AB		0		Anzahl im AB		0		Anzahl im AB		0	
Prozent im AB		0		Prozent im AB		0		Prozent im AB		0		Prozent im AB		0	

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

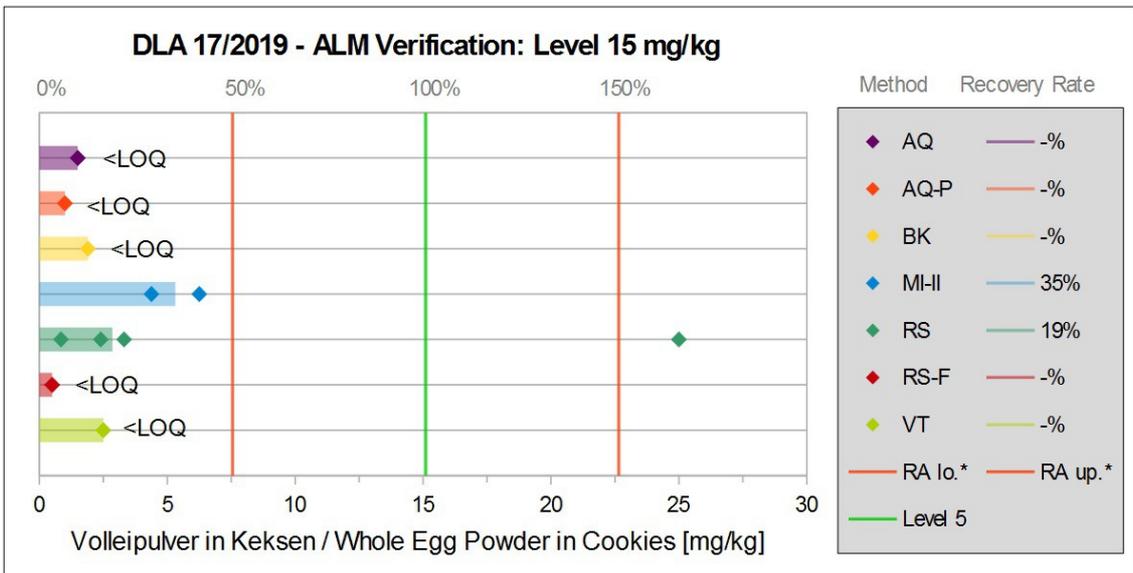
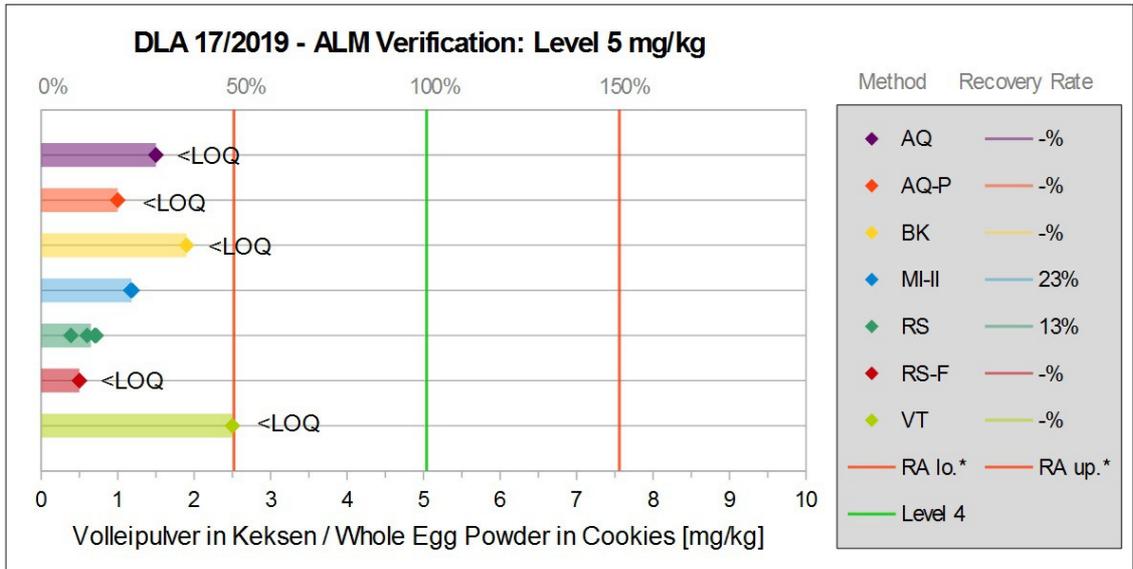
\*\* Akzeptanzbereich der AOAC für Allergen-ELISAs

#### Methoden:

AQ = AgraQuant, RomerLabs  
 AQ-P = AgraQuant Plus, RomerLabs  
 BK = BioKits, Neogen  
 MI-II = Morinaga Institute ELISA II  
 RS = Ridascreen®, R-Biopharm  
 RS-F= Ridascreen® Fast, R-Biopharm  
 VT = Veratox, Neogen

#### Anmerkung:

Die Wiederfindungsraten der Teilnehmerergebnisse für die Level 4 und 5 lagen zwischen 23% und 41% (Methode MI-II) bzw. zwischen 6% und 25% (Methode RS, ohne Ergebnis-Nr. 9 für Level 5) und somit unterhalb des Bereichs der AOAC-Anforderungen von 50-150%.



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

### 4.1.3 Informative Angaben: Statistische Kenndaten Ei

#### 4.1.3.1 ELISA-Methoden (als Volleipulver)

Probe: Level 5,0 mg/kg

Kenndaten	Alle Ergebnisse <sup>°</sup> [mg/kg]
Zugewiesener Wert ( $X_{pt}$ )	$X_{pt\_ALL}$
Anzahl der Messergebnisse	6
Anzahl der Ausreißer	0
Mittelwert	0,795
Median	0,710
<b>Robuster Mittelwert (<math>X_{pt}</math>)</b>	<b>0,795</b>
<b>Robuste Standardabweichung (<math>S^*</math>)</b>	<b>0,364</b>
<i>Zielkenndaten:</i>	
<b>Zielstandardabweichung <math>\sigma_{pt}</math></b>	<b>0,199</b>
<b>Untere Grenze des Zielbereichs</b>	<b>0,397</b>
<b>Obere Grenze des Zielbereichs</b>	<b>1,19</b>
Quotient $S^*/\sigma_{pt}$	1,8
Standardunsicherheit $U(X_{pt})$	0,186
Ergebnisse im Zielbereich	5
Prozent im Zielbereich	83

<sup>°</sup> Methoden MI-II und RS

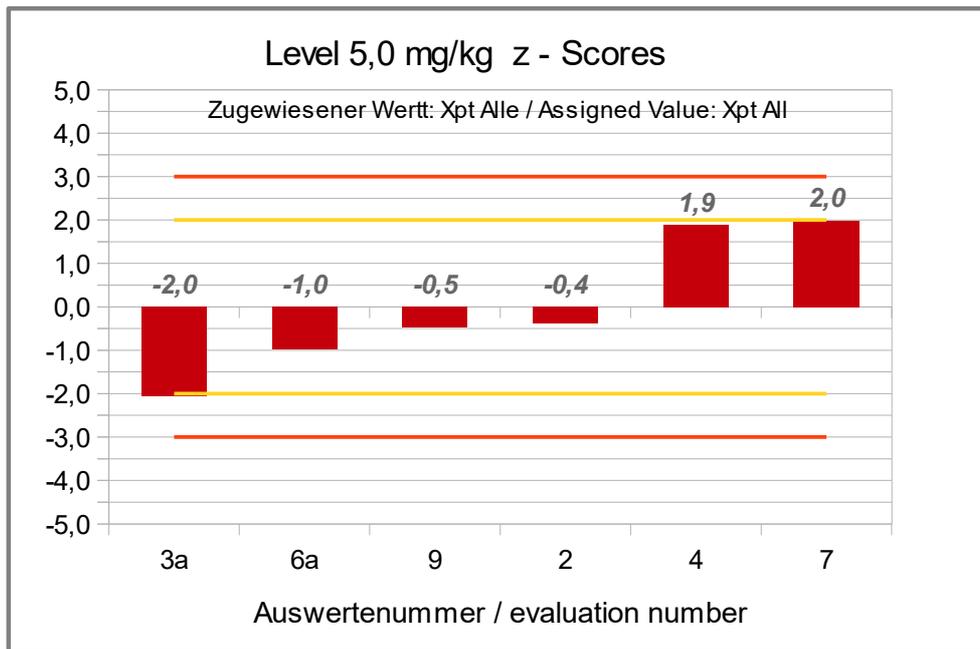
#### Anmerkungen zu den Kenndaten:

Da für keine Einzelmethode mindestens 5 Ergebnisse vorlagen, wurde als zugewiesener Wert der robuste Mittelwert der Ergebnisse der Methoden MI-II und RS verwendet.

Für die Ermittlung der z-Scores wurde eine Zielstandardabweichung von 25% zugrunde gelegt (s. Abb. 3, S.19).

Alle Angaben haben rein informativen Charakter.

**Hinweis:** Es ist zu beachten, dass die Ergebnisse für die beiden Methoden eine unterschiedliche Response vermuten lassen. Die Vergleichbarkeit der Ergebnisse ist daher eingeschränkt.



**Abb./Fig. 3:**

z-Scores Level 5,0 mg/kg (ELISA-Ergebnisse als Volleipulver)  
 Zugewiesener Wert: robuster Mittelwert (Alg. A) aller Ergebnisse

## 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 Level 0,5 mg/kg		Ergebnis Probe 2 Level 0,1 mg/kg		Ergebnis Probe 3 Level 5,0 mg/kg		Ergebnis Probe 4 Level 1,0 mg/kg		Ergebnis Probe 5 Level 15 mg/kg		Ergebnis Probe 6 Nullprobe		NWG / LOD *	BG / LOQ *	MU*	Quantitatives Ergebnis als	Methode
			qualitativ	mg/kg	qualitativ	mg/kg	qualitativ	mg/kg	qualitativ	mg/kg	qualitativ	mg/kg	qualitativ	mg/kg	mg/kg	mg/kg	mg/kg		
AQ	8a	20.12.19	negativ	<LOD	negativ	<LOD	negativ	<LOD	negativ	<LOD	negativ	<LOD	negativ	<LOD	0,05	0,4		Eiklarproteine, gesamt	AgraQuant ELISA Egg White COKAL0848, RomerLabs
AQ-P	10	28.11.19	negativ	< LOQ	negativ	< LOQ	negativ	< LOQ	negativ	< LOQ	negativ	< LOQ	negativ	< LOQ	0,5	1		Volleipulver	AgraQuant Plus ELISA Egg COKAL1848F, RomerLabs
AQ-P	8b	18.12.19	negativ	<LOD	negativ	<LOD	negativ	<LOD	negativ	<LOD	negativ	<LOD	negativ	<LOD	0,5	1		Volleipulver	AgraQuant Plus ELISA Egg COKAL1848F, RomerLabs
BK	5a	19.12.19	negativ		negativ		negativ		negativ		negativ		negativ		0,5	0,5		Eiklarproteine, gesamt	BioKits Egg Assay Kit, Neogen
MI-II	4	20/12 und 06/01	negativ		negativ		positiv	0,56	negativ		positiv	2,1	negativ		0,3	0,3		Eiprotein	Morinaga Egg (Ovalbumin) ELISA Kit II (M2111)
MI-II	7	06.12.19	negativ	<0,31	negativ	<0,31	positiv	0,57	negativ	<0,31	positiv	3	negativ	<0,31	0,31	0,31		Volleiprotein	Morinaga Egg (Ovalbumin) ELISA Kit II (M2111)
RS	2	10.01.20	negativ	< 0,1	negativ	< 0,1	positiv	0,72	positiv	< 0,25	positiv	2,4	negativ	< 0,1	0,1	0,25		Volleipulver	RIDASCREEN Egg R6411
RS	9	09.01.20	negativ	<0.25	negativ	<0.25	positiv	0.7	positiv	0.25	positiv	25	negativ	<0.25	0.13	0.25	30%	Volleipulver	Ridascreen® Egg; R6411, R-Biopharm
RS	3a	06.01.20	negativ	< 0,25	negativ	< 0,25	positiv	0,388	negativ	< 0,25	positiv	0,844	negativ	< 0,25		< 0,25		Volleipulver	RIDASCREEN Egg R6411, R-Biopharm
RS	6a	18/12	negativ	0,084	negativ	0,025	positiv	0,601	negativ	0,108	positiv	3,31	negativ	0,016	0,13	0,25		Volleipulver	Ridascreen® Egg R6411, R-Biopharm
RS-F	1a	07.01.20	positiv	<0.5	negativ	<0.1	negativ	<0.1	negativ	<0.1	positiv	<0.5	positiv	<0.5	0,1	0,5		Volleipulver	Ridascreen® FAST Egg Protein R6402, R-Biopharm
RS-F	3b	10.12.19	negativ	< 0,5	negativ	< 0,5	negativ	< 0,5	negativ	< 0,5	negativ	< 0,5	negativ	< 0,5		< 0,5		Volleipulver	RIDASCREEN FAST Egg Protein R6402, R-Biopharm
RS-F	5b	19.12.19	negativ		negativ		negativ		negativ		negativ		negativ		0,5	0,5		Volleipulver	Ridascreen® FAST Egg Protein R6402, R-Biopharm
RS-F	6b	09/12	negativ	< 0,5	negativ	< 0,5	negativ	< 0,5	negativ	< 0,5	negativ	< 0,5	negativ	< 0,5	0,1	0,5		Volleipulver	Ridascreen® FAST Egg Protein R6402, R-Biopharm
VT	1b	19.12.19	positiv	<2.5	negativ	<0.6	negativ	<0.6	negativ	<0.6	negativ	<2.5	positiv	<2.5	0,6	2,5		Volleipulver	Veratox Egg Allergen, Neogen

\* NWG Nachweisgrenze / BG Bestimmungsgrenze

\* LOD limit of detection / LOQ limit of quantitation

\* MU Messunsicherheit / MU measurement uncertainty

Fortsetzung Angaben der Teilnehmer:

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	8a			ja	
AQ-P	10		Wasser (60°C) / 1 Minute	nein	
AQ-P	8b			nein	
BK	5a	Ovomucoid (Gal d1)		ja	
MI-II	4		Short Time Extraction Method	ja	
MI-II	7	erkennt das Eiklarprotein Ovalbumin	t. Herstellereangaben	ja	
RS	2		laut Manual		
RS	9	Eiklarproteine (Ovalbumin; Ovomucoid)	Allergenextraktionspuffer mit Ei-Extraktor, Additiv und Magermilch; 10 min / 60°C	nein	prozessierte Matrix
RS	3a		Proteinextraktion nach Herstelleranleitung 9.2	nein	
RS	6a	Antikörper erfassen Eiklar-Proteine Ovalbumin und Ovomucoid (auch erhitzte Proben)	Probenextraktion für prozessierte/erhitzte Proben; 1 g Probe + 0,5 g Magermilchpulver / 1 ml Extraktor Ei + 19 ml Allergenextraktionspuffer mit Additiv; 10 min bei 60 °C	nein	Qualitative Beurteilung nach Action Level 1 von 1 ppm Volleipulver Probe 3 schwach positiv
RS-F	1a		gemäss Kitanleitung mit Zugabe von Casein		Resultat für Proben 1+6 im Bereich der technischen Nachweisgrenze
RS-F	3b		nach Herstelleranleitung	ja	nach Verdünnung des Standards 0,25mg/kg bis 0,05mg/kg, Probe 3 = 0,061mg/kg, Probe 5 = 0,166mg/kg
RS-F	5b	Ovalbumin und Ovomucoid		ja	
RS-F	6b	Antikörper erfassen Eiklar-Proteine Ovalbumin und Ovomucoid	1 g Probe / 20 ml Allergenextraktionspuffer 10 min bei 60 °C	nein	Qualitative Beurteilung nach Action Level 1 von 1 ppm Volleipulver
VT	1b		gemäss Kitanleitung		Resultat für Proben 1+6 im Bereich der technischen Nachweisgrenze

## 5.2 Homogenität

### 5.2.1 Mischungshomogenität vor der Abfüllung

#### Microtracer Homogenitätstest

##### DLA 17-2019 Probe 1

Gewicht Gesamtprobe	1,00	kg
Microtracer	FSS-rot lake	
Teilchengröße	75 – 300	µm
Gewicht pro Partikel	2,0	µg
Tracerzugabe	25,3	mg/kg

#### Analysenergebnisse:

Probe	Einwaage [g]	Partikel Anzahl	Partikel [mg/kg]
1	5,04	65	25,8
2	5,10	81	31,8
3	5,15	73	28,3
4	5,15	75	29,1
5	4,96	63	25,4
6	5,03	73	29,0
7	4,71	72	30,6
8	5,07	81	32,0

Poisson-Verteilung		
Probenanzahl	8	
Freiheitsgrad	7	
Mittelwert	72,9	Partikel
Standardabweichung	6,19	Partikel
$\chi^2$ (CHI-Quadrat)	3,68	
<b>Wahrscheinlichkeit</b>	<b>82</b>	%
Wiederfindungsrate	115	%

Normalverteilung		
Probenanzahl	8	
Mittelwert	29,0	mg/kg
Standardabweichung	2,46	mg/kg
rel. Standardabweichung	8,50	%
Horwitz Standardabweichung	9,64	%
<b>HorRat-Wert</b>	<b>0,88</b>	
Wiederfindungsrate	115	%

#### Microtracer Homogenitätstest

##### DLA 17-2019 Probe 2

Gewicht Gesamtprobe	1,00	kg
Microtracer	FSS-rot lake	
Teilchengröße	75 – 300	µm
Gewicht pro Partikel	2,0	µg
Tracerzugabe	36,0	mg/kg

#### Analysenergebnisse:

Probe	Einwaage [g]	Partikel Anzahl	Partikel [mg/kg]
1	4,83	106	43,9
2	5,09	117	46,0
3	5,09	110	43,2
4	4,89	104	42,5
5	4,82	95	39,4
6	4,97	115	46,3
7	4,95	100	40,4
8	5,07	104	41,0

Poisson-Verteilung		
Probenanzahl	8	
Freiheitsgrad	7	
Mittelwert	106,3	Partikel
Standardabweichung	6,22	Partikel
$\chi^2$ (CHI-Quadrat)	2,54	
<b>Wahrscheinlichkeit</b>	<b>92</b>	%
Wiederfindungsrate	119	%

Normalverteilung		
Probenanzahl	8	
Mittelwert	42,8	mg/kg
Standardabweichung	2,50	mg/kg
rel. Standardabweichung	5,85	%
Horwitz Standardabweichung	9,09	%
<b>HorRat-Wert</b>	<b>0,64</b>	
Wiederfindungsrate	119	%

**Microtracer Homogenitätstest**

**DLA 17-2019 Probe 3**

Gewicht Gesamtprobe	1,40	kg
Microtracer	FSS-rot lake	
Teilchengröße	75 – 300	µm
Gewicht pro Partikel	2,0	µg
Tracerzugabe	21,8	mg/kg

**Analysenergebnisse:**

Probe	Einwaage [g]	Partikel Anzahl	Partikel [mg/kg]
1	4,97	80	32,2
2	5,01	70	27,9
3	5,00	74	29,6
4	5,02	75	29,9
5	5,01	72	28,7
6	4,91	78	31,8
7	5,12	79	30,9
8	5,04	72	28,6

Poisson-Verteilung		
Probenanzahl	8	
Freiheitsgrad	7	
Mittelwert	75,0	Partikel
Standardabweichung	3,87	Partikel
χ <sup>2</sup> (CHI-Quadrat)	1,40	
<b>Wahrscheinlichkeit</b>	<b>99</b>	%
Wiederfindungsrate	137	%

Normalverteilung		
Probenanzahl	8	
Mittelwert	29,9	mg/kg
Standardabweichung	1,54	mg/kg
rel. Standardabweichung	5,16	%
Horwitz Standardabweichung	9,59	%
<b>HorRat-Wert</b>	<b>0,54</b>	
Wiederfindungsrate	137	%

**Microtracer Homogenitätstest**

**DLA 17-2019 Probe 4**

Gewicht Gesamtprobe	1,20	kg
Microtracer	FSS-rot lake	
Teilchengröße	75 – 300	µm
Gewicht pro Partikel	2,0	µg
Tracerzugabe	22,8	mg/kg

**Analysenergebnisse:**

Probe	Einwaage [g]	Partikel Anzahl	Partikel [mg/kg]
1	5,02	62	24,7
2	4,97	66	26,6
3	4,87	70	28,7
4	5,03	67	26,6
5	5,06	71	28,1
6	4,89	62	25,4
7	5,07	71	28,0
8	5,03	62	24,7

Poisson-Verteilung		
Probenanzahl	8	
Freiheitsgrad	7	
Mittelwert	66,4	Partikel
Standardabweichung	3,97	Partikel
χ <sup>2</sup> (CHI-Quadrat)	1,66	
<b>Wahrscheinlichkeit</b>	<b>98</b>	%
Wiederfindungsrate	117	%

Normalverteilung		
Probenanzahl	8	
Mittelwert	26,6	mg/kg
Standardabweichung	1,59	mg/kg
rel. Standardabweichung	5,98	%
Horwitz Standardabweichung	9,77	%
<b>HorRat-Wert</b>	<b>0,61</b>	
Wiederfindungsrate	117	%

**Microtracer Homogenitätstest**

**DLA 17-2019 Probe 5**

Gewicht Gesamtprobe	1,60	kg
Microtracer	FSS-rot lake	
Teilchengröße	75 – 300	µm
Gewicht pro Partikel	2,0	µg
Tracerzugabe	27,2	mg/kg

**Analysenergebnisse:**

Probe	Einwaage [g]	Partikel Anzahl	Partikel [mg/kg]
1	5,03	66	26,2
2	5,17	83	32,1
3	4,98	68	27,3
4	5,12	62	24,2
5	4,92	69	28,0
6	5,08	63	24,8
7	4,96	64	25,8
8	5,03	66	26,2

<b>Poisson-Verteilung</b>		
Probenanzahl	8	
Freiheitsgrad	7	
Mittelwert	67,6	Partikel
Standardabweichung	6,19	Partikel
χ <sup>2</sup> (CHI-Quadrat)	3,96	
<b>Wahrscheinlichkeit</b>	<b>78</b>	%
Wiederfindungsrate	99	%

<b>Normalverteilung</b>		
Probenanzahl	8	
Mittelwert	26,8	mg/kg
Standardabweichung	2,46	mg/kg
rel. Standardabweichung	9,15	%
Horwitz Standardabweichung	9,75	%
<b>HorRat-Wert</b>	<b>0,94</b>	
Wiederfindungsrate	99	%

5.3 Informationen zur Eignungsprüfung (EP)

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

<i>EP-Nummer</i>	<b>DLA 17-2019</b>
<i>EP-Name</i>	<b>ALM-Verification Ei: 5 Proben mit Volleipulver in Keks für Kinder</b>
<i>Probenmatrix (Prozessierung)</i>	<b>Proben 1-6:</b> Kekse (gebacken ca. 150°)/ Zutaten: Weizenmehl, Zucker, Butter, Gerstenmalzextrakt, Magermilchpulver, Glucose, Glucosesirup, Backtriebmittel Ammoniumcarbonat, Salz, Vollmilchpulver, Emulgator Lecithine, weitere Zusatzstoffe und Ei (außer "Null-Probe")
<i>Probenzahl und Probenmenge</i>	5 unterschiedliche Proben je 20 g + 1 „Null-Probe“ 20 g
<i>Lagerungsinformation</i>	Proben : Raumtemperatur (Langzeit 2 - 10°C)
<i>Verwendungszweck</i>	Ausschließlich für Laboruntersuchungen (Qualitätskontrollproben)
<i>Parameter</i>	qualitativ (optional: quantitativ): Ei / Eiprotein Gehalte (als Volleipulver) 0,1 / 0,5 / 1,0 / 5,0 / 15 mg/kg
<i>Untersuchungsmethoden</i>	Methode ist freigestellt
<i>Hinweis zur Analyse</i>	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 ist die Gesamtmenge zu homogenisieren.
<i>Ergebnisangabe</i>	Je ein qualitatives Ergebnis (und optional quantitativ) wird für die Proben 1-6 ermittelt. Die Einzelergebnisse sind in die Ergebnisabgabe-Datei einzutragen.
<i>Einheiten</i>	positiv / negativ (optional: mg/kg)
<i>Anzahl von Stellen</i>	mindestens 2 signifikante Stellen
<i>Ergebnisabgabe</i>	Die Ergebnisabgabe-Datei wird per eMail übermittelt an: <b>pt@dla-lvu.de</b>
<i>Abgabetermin</i>	<b>spätestens 10. Januar 2020</b>
<i>Auswertebericht</i>	Der Auswertebericht wird voraussichtlich 6 Wochen nach Abgabetermin der Ergebnisse fertiggestellt und per eMail als PDF-Datei zugesandt.
<i>Koordinator und Ansprechpartner der EP</i>	<b>Dr. Matthias Besler-Scharf</b>

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

## 6. Verzeichnis der Teilnehmer in alphabetischer Reihenfolge

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

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

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

## 7. Verzeichnis relevanter Literatur

1. DIN EN ISO/IEC 17025:2005; Allgemeine Anforderungen an die Kompetenz von Prüf- und Kalibrierlaboratorien / General requirements for the competence of testing and calibration laboratories
2. DIN EN ISO/IEC 17043:2010; Konformitätsbewertung – Allgemeine Anforderungen an Eignungsprüfungen / Conformity assessment – General requirements for proficiency testing
3. ISO 13528:2015 & DIN ISO 13528:2009; Statistische Verfahren für Eignungsprüfungen durch Ringversuche / Statistical methods for use in proficiency testing by interlaboratory comparisons
4. ASU §64 LFGB: Planung und statistische Auswertung von Ringversuchen zur Methodenvalidierung / DIN ISO 5725 series part 1, 2 and 6 Accuracy (trueness and precision) of measurement methods and results
5. Verordnung / Regulation 882/2004/EU; Verordnung über über amtliche Kontrollen zur Überprüfung der Einhaltung des Lebensmittel- und Futtermittelrechts sowie der Bestimmungen über Tiergesundheit und Tierschutz / Regulation on official controls performed to ensure the verification of compliance with feed and food law, animal health and animal welfare rules
6. Evaluation of analytical methods used for regulation of food and drugs; W. Horwitz; Analytical Chemistry, 54, 67-76 (1982)
7. The International Harmonised Protocol for the Proficiency Testing of Analytical Laboratories ; J.AOAC Int., 76(4), 926 – 940 (1993)
8. A Horwitz-like funktion describes precision in proficiency test; M. Thompson, P.J. Lowthian; Analyst, 120, 271-272 (1995)
9. Protocol for the design, conduct and interpretation of method performance studies; W. Horwitz; Pure & Applied Chemistry, 67, 331-343 (1995)
10. Recent trends in inter-laboratory precision at ppb and sub-ppb concentrations in relation to fitness for purpose criteria in proficiency testing; M. Thompson; Analyst, 125, 385-386 (2000)
11. The International Harmonised Protocol for the Proficiency Testing of Analytical Chemistry Laboratories; Pure Appl Chem, 78, 145 – 196 (2006)
12. AMC Kernel Density – Representing data distributions with kernel density estimates, amc technical brief, Editor M Thompson, Analytical Methods Committee, AMCTB No 4, Revised March 2006 and Excel Add-in Kernel.xla 1.0e by Royal Society of Chemistry
13. EURACHEM/CITAC Leitfaden, Ermittlung der Messunsicherheit bei analytischen Messungen (2003); Quantifying Uncertainty in Analytical Measurement (1999)
14. GMP+ Feed Certification scheme, Module: Feed Safety Assurance, chapter 5.7 Checking procedure for the process accuracy of compound feed with micro tracers in GMP+ BA2 Control of residues, Version: 1st of January 2015 GMP+ International B.V.
15. MTSE SOP No. 010.01 (2014): Quantitative measurement of mixing uniformity and carry-over in powder mixtures with the rotary detector technique, MTSE Micro Tracers Services Europe GmbH
16. Homogeneity and stability of reference materials; Linsinger et al.; Accred Qual Assur, 6, 20-25 (2001)
17. AOAC Official Methods of Analysis: Guidelines for Standard Method Performance Requirements, Appendix F, p. 2, AOAC Int (2016)
18. 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. Durchführungsverordnung der Kommission/ Commission Implementing Regulation EU 828/2014; über die Anforderungen an die Bereitstellung von Informationen für Verbraucher über das Nichtvorhandensein oder das reduzierte Vorhandensein von Gluten in Lebensmitteln / on the requirements for the provision of information to consumers on the absence or reduced presence of gluten in food
22. Taylor et al. (2014) Establishment of reference doses for residues of allergenic foods: report of the VITAL Expert Panel, Food Chem Toxicol 63: 9-17

23. Demmel et al. (2015) Kap. 4.1 Existierende Aktionswerte, in: Allergene in Lebensmitteln, Behr's Verlag, Hamburg [Chapter 4.1 Existing Action Levels, in Allergens in Foods]
24. 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
25. 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
26. 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
27. 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
28. Ministry of Health and Welfare, JSM, Japan 2006
29. 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)
30. 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)
31. 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)
32. 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
33. 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
34. 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
35. 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]
36. 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]
37. 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]
38. 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]
39. 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] 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]

- 40.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]
- 41.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]
- 42.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 17/2019 - ALM Verification: Ei**

11 Teilnehmer haben mindestens ein Ergebnis eingereicht. Es wurden 5 Proben mit unterschiedlichen Egehalten von 0,1 bis 15 mg/kg in der Matrix Kekse, sowie eine Matrix-„Nullprobe“ mit ELISA-Methoden untersucht. Als „Action Level“ wurde ein Gehalt von 1,0 mg/kg gewählt. Das Dotierungsmaterial bestand aus einer Mischung von Volleipulvern (6 Produkte aus 2 Ländern).

Mit zwei ELISA-Methoden wurden die Level 4 und 5 von den Teilnehmern sicher erfasst. Die Ergebnisse für die „Action Level“-Probe lagen überwiegend unter der jeweiligen Bestimmungsgrenze. Die Ergebnisse wurden in Form von ALM-Scores (1-5) anhand der Anzahl erfasster Level bewertet. Zusätzlich wurden für jeden Teilnehmer Wiederfindungsraten für alle quantitativen Ergebnisse ermittelt (WFR-Scores). Statistische Kenndaten des 5,0 mg/kg Levels wurden informativ angegeben. Weitere Details sind dem Auswertebereich zu entnehmen.

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