



**Auswertungs-Bericht**

Laborvergleichsuntersuchung

**ptAL02 (2020)**

**Allergene II:**

**Soja und Weizen (Gluten)**

**in „glutenfreier“ Backware (Kekse)**

***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)**

<p><i>EP-Anbieter PT-Provider</i></p>	<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>
<p><i>EP-Nummer PT-Number</i></p>	<p>ptAL02 (2020)</p>
<p><i>EP-Koordinator PT-Coordinator</i></p>	<p>Dr. Matthias Besler-Scharf</p>
<p><i>Status des EP-Bericht Status of PT-Report</i></p>	<p>Abschlussbericht / Final report (8. Juni 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>
<p><i>EP-Bericht Freigabe PT-Report Authorization</i></p>	<p>Dr. Matthias Besler-Scharf (Technischer Leiter / Technical Manager) - <i>gezeichnet / signed M. Besler-Scharf</i> Alexandra Scharf MSc. (QM-Beauftragte / Quality Manager) - <i>gezeichnet / signed A. Scharf</i> Datum / Date: 8. Juni 2020</p>
<p><i>Unteraufträge Subcontractors</i></p>	<p>Im Rahmen dieser Eignungsprüfung wurden nachstehende Leistungen im Unterauftrag vergeben: Homogenitätsprüfung der EP-Parameter, Proteinbestimmung As part of the present proficiency test the following services were subcontracted: Homogeneity tests of PT-parameter(s), protein determination</p>
<p><i>Vertraulichkeit Confidentiality</i></p>	<p>Die Teilnehmerergebnisse sind im EP-Bericht in anonymisierter Form mit Auswertenummern benannt. Daten einzelner Teilnehmer werden ausschließlich nach vorheriger Zustimmung des Teilnehmers an Dritte weitergegeben. Participant result are named anonymously with evaluation numbers in the PT report. Data of individual participants will be passed on to third parties only with prior consent of the participant.</p>

## Inhalt

1. Einleitung.....	4
2. Durchführung.....	4
2.1 Untersuchungsmaterial.....	4
2.1.1 Homogenität.....	6
2.1.2 Stabilität.....	9
2.2 Probenversand und Informationen zur Untersuchung.....	9
2.3 Ergebnisübermittlung.....	9
3. Auswertung.....	10
3.1 Konsenswert der Teilnehmer (zugewiesener Wert).....	10
3.2 Robuste Standardabweichung.....	11
3.3 Ausschluss von Ergebnissen und Ausreißer.....	11
3.4 Zielstandardabweichung (für die Eignungsbeurteilung).....	12
3.4.1 Allgemeines Modell nach Horwitz.....	12
3.4.2 Auswertung eines Versuchs zur Präzision.....	12
3.4.3 Werte aus Erkenntnissen.....	15
3.5 z-Score.....	16
3.5.1 Warn- und Eingriffssignale.....	16
3.6 z'-Score.....	17
3.7 Quotient $S^*/opt$ .....	17
3.8 Standardunsicherheit und Rückführbarkeit.....	17
3.9 Graphische Darstellung der Bezugswerte.....	18
3.10 Wiederfindungsraten: Dotierung.....	18
4. Ergebnisse.....	19
4.1 Vergleichsuntersuchung Soja.....	21
4.1.1 ELISA-Ergebnisse: Soja (als Sojaprotein).....	21
4.1.2 PCR-Ergebnisse: Soja.....	31
4.2 Vergleichsuntersuchung Weizen (Gluten).....	35
4.2.1 ELISA-Ergebnisse: Gluten.....	35
4.2.2 PCR-Ergebnisse: Weizen (Gluten).....	47
4.2.3 PCR-Ergebnisse: Andere.....	50
4.3 z-Scores der Teilnehmer: Übersichtstabelle.....	51
5. Dokumentation.....	53
5.1 Angaben der Teilnehmer.....	53
5.1.1 ELISA: Soja.....	53
5.1.2 ELISA: Gluten.....	55
5.1.3 PCR: Soja.....	57
5.1.4 PCR: Glutenhaltiges Getreide - Weizen.....	58
5.1.5 PCR: Andere.....	59
5.2 Homogenität.....	60
5.2.1 Mischungshomogenität vor der Abfüllung.....	60
5.3 Informationen zur Eignungsprüfung (EP).....	61
6. Verzeichnis der Teilnehmer in alphabetischer Reihenfolge.....	62
7. Verzeichnis relevanter Literatur.....	63

## 1. Einleitung

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

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

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

## 2. Durchführung

### 2.1 Untersuchungsmaterial

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

Bei dem Untersuchungsmaterial der Lebensmittelmatrixproben handelt es sich um handelsübliche glutenfreie Kekse. Die Grundzusammensetzung war für beide Proben A und B gleich (s. Tabelle 1).

Nach Zerkleinern und Sieben mittels Schlagmühle (mesh 1,5 mm) wurde die Grundmischung homogenisiert.

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

Als weitere Zutat wurden mit den Dotierungsmaterialien gebackene Kekse (150°C, 40 min), die die allergenen Zutaten Soja und Weizen enthalten (mesh <500 µm), hergestellt. Nach Zerkleinerung, Sieben (mesh <1,5 mm) und Homogenisierung wurde die Zutat zu einem Aliquot der Grundmatrix gegeben und die Mischung homogenisiert. Anschließend wurde portionsweise erneut Grundmatrix in 4 weiteren Schritten zugegeben und jeweils maschinell homogenisiert bis die Gesamtmenge erreicht war.

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

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

Tabelle 1: Zusammensetzung der DLA-Proben

Zutaten	Probe A	Probe B	Dotierungs- niveauprobe
Reis-Kakao Kekse, glutenfrei Zutaten: Rohrzucker, Reismehl, Maisstärke, Eier, Maismehl, Reisstärke, Sonnenblumenöl, Magerkakaopulver, Sheabutter, Apfelfaser, Salz, Backtriebmittel: Kaliumtartrat, Natriumcarbonat, Ammoniumcarbonat, Verdickungsmittel: Guarkernmehl, Kakaoextrakt, natürliches Aroma, Antioxidationsmittel: Rosmarinextrakte Nährwertangaben pro 100 g: Fett 12 g, Kohlenhydrate 74 g, Eiweiß 4,8 g, Salz 0,6 g	62,1 g/100g	62,5 g/100g	-
Butterkekse, glutenfrei Zutaten: Maisstärke, Maismehl, Zucker, Sonnenblumenöl, Butterreinfett, Hühnervollei, Invertzuckersirup, Trockenmilcherzeugnis, fettarmes Kakaopulver, Verdickungsmittel: Xanthan, Salz, Aromen, Backtriebmittel: Natriumcarbonate, Ammoniumcarbonate, Säuerungsmittel: Citronensäure Nährwertangaben pro 100 g: Fett 15 g, Kohlenhydrate 78 g, Eiweiß 2,6 g	37,2 g/100 g	37,5 g/100g	-
Kekse, gebacken 150°C, 40 min Zutaten: Zucker, Maisstärke, Maismehl, Reismehl, Linsenmehl, Butter, Eier, modifizierte Tapiokastärke, Verdickungsmittel: Johannisbrotkernmehl, Salz und Allergene Lebensmittel Sojamehl und Weizenmehl (siehe unten)	0,689 g/100g	-	-
Kartoffelpulver Zutaten: Kartoffeln, E471, E304, E223, E100	-	-	99,9 g/100 g
<i>Soja:</i> - als Sojamehl, ungetoastet* - davon 33,8% Gesamtprotein** - davon Sojatrypsinkinhibitor***	65,9 mg/kg° 22,3 mg/kg° 3,35 mg/kg°	-	69,6 mg/kg 23,5 mg/kg 3,53 mg/kg
<i>Weizen:</i> Weizenmehl-Mischung (21 Produkte aus Europa, Asien, USA) - als Weizenmehl* - davon 10,1% Gesamtprotein** - davon Gluten***	208 mg/kg° 21,0 mg/kg° 18,1 mg/kg°	-	409 mg/kg 41,3 mg/kg 35,6 mg/kg
<i>weitere Zutaten:</i> Maltodextrin und Siliciumdioxid	<0,1 g/100 g	-	<0,1 g/100 g

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

\*\* Proteingehalte gemäß Laboranalyse des Rohstoffs (Gesamtstickstoff nach Kjeldahl mit F=5,71 für Sojaprotein und F=5,7 für Weizenprotein)

\*\*\* Proteingehalte gemäß Literaturangaben berechnet ca. 8,7% Gluten in Weizenmehlen [36 - 38]); ca. 15% Soja Trypsin Inhibitor in Sojaprotein [39])

°Angegebene Mengen der allergenen Zutaten sind Bestandteil der gebackenen Kekse

**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-Probe A und der Dotierungsniveauprobe hat eine Wahrscheinlichkeit von 90% 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 0,8 bzw. 0,4 erhalten. Die Ergebnisse der Microtracer-Analyse sind in der Dokumentation angegeben.

### **Homogenität der abgefüllten dotierten Probe A**

#### Durchführung der Homogenitätstests

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

#### Bewertung der Homogenität

Die Homogenität wird mit einer Standardabweichung zwischen den Proben von  $S_s \leq 15\%$  („Heterogenitätsstandardabweichung“) als hinreichend gesichert angesehen. Dieses Kriterium wird für die untersuchte Probe A in allen ELISA-Tests für Weizenprotein/Gluten/Gliadin (Immunolab, Morinaga und AgraQuant G12) sowie Soja (AgraQuant) erfüllt (s. Seite 7). Die Anforderung an Wiederholstandardabweichungen von ELISA- und PCR-Verfahren ist üblicherweise  $\leq 25\%$  [18, 19, 22, 23].

Falls die Kriterien für eine ausreichende Homogenität des Probenmaterials bezüglich eines Parameters nicht erfüllt sind, werden die Auswirkungen auf die Zielstandardabweichung geprüft. Ggf. erfolgt die Bewertung der Ergebnisse der Teilnehmer unter Berücksichtigung der Standardunsicherheit des zugewiesenen Wertes anhand von z'-Scores (s. 3.6 und 3.8) [3].

**ELISA-Tests: Homogenität Weizenprotein / Homogeneity Wheat protein**

**Immunolab Gliadin ELISA**

Sample weights: 1,0 g (0,9 – 1,1 g)  
 Number of replicates: 2  
 Overall result: Gliadin 11,8 ± 0,56 mg/kg

Sample A	Subsample 1 mg/kg	Subsample 2 mg/kg	Mean mg/kg
1	11,2	11,4	11,3
2	9,36	13,2	11,3
3	12,2	13,2	12,7
4	11,2	8,9	10,1
5	12,5	14,0	13,3
6	10,0	12,2	11,1
7	12,2	11,1	11,7
8	12,2	12,3	12,3
9	12,3	11,7	12,0
10	14,4	10,7	12,6

General average X: 11,8  
 SD of sample means Sx: 0,93 (7,9%)  
 SD within-samples Sw: 1,05 (8,9%)  
 SD between-samples Ss: 0,56 (4,8%)

**Morinaga Wheat/Gluten ELISA Kit II**

Sample weights: 1,0 g (0,9 – 1,1 g)  
 Number of replicates: 2  
 Overall result: Wheat protein 7,02 ± 0,39 mg/kg

Sample A	Subsample 1 mg/kg	Subsample 2 mg/kg	Mean mg/kg
1	6,18	7,34	6,76
2	6,84	6,56	6,70
3	6,15	7,60	6,88
4	7,67	6,91	7,29
5	6,38	7,46	6,92
6	7,29	7,65	7,47
7	6,31	5,59	5,95
8	7,26	6,20	6,73
9	7,89	7,55	7,72
10	6,66	8,87	7,77

General average X: 7,02  
 SD of sample means Sx: 0,55 (7,9%)  
 SD within-samples Sw: 0,55 (7,8%)  
 SD between-samples Ss: 0,39 (5,6%)

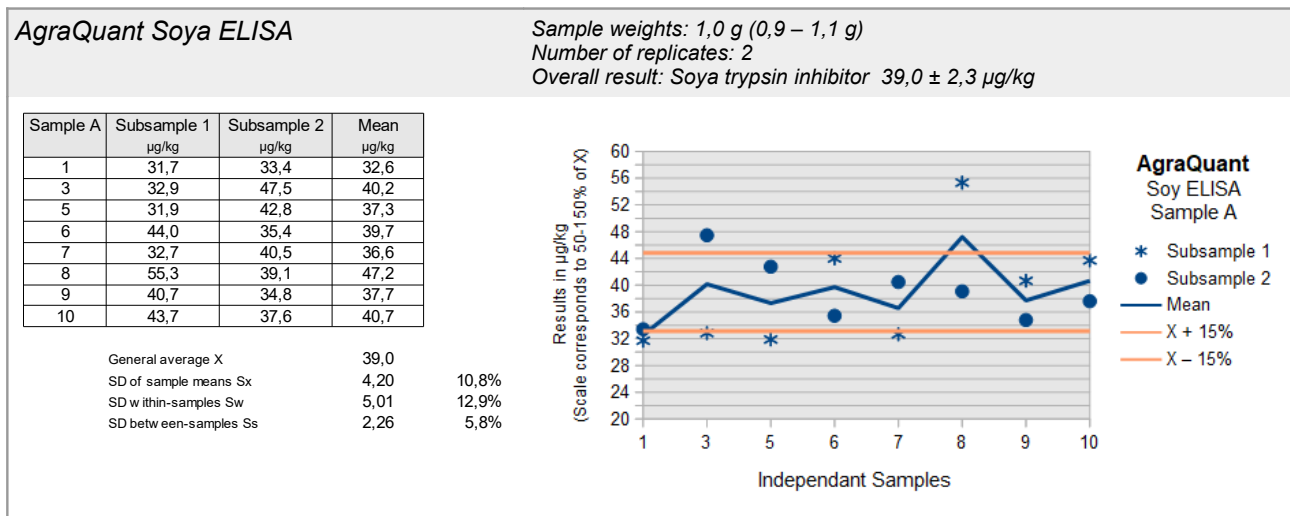
**AgraQuant G12 ELISA**

Sample weights: 1,0 g (0,9 – 1,1 g)  
 Number of replicates: 2  
 Overall result: Gluten 18,2 ± 0,68 mg/kg

Sample A	Subsample 1 mg/kg	Subsample 2 mg/kg	Mean mg/kg
2	20,7	18,1	19,4
3	17,6	17,3	17,5
4	20,0	17,4	18,7
5	17,4	19,2	18,3
6	16,5	17,7	17,1
7	19,1	18,8	19,0
8	16,9	17,0	17,0
9	17,8	17,5	17,7
10	21,7	17,4	19,5

General average X: 18,2  
 SD of sample means Sx: 0,98 (5,4%)  
 SD within-samples Sw: 1,00 (5,5%)  
 SD between-samples Ss: 0,68 (3,7%)

**ELISA-Tests: Homogenität Soja / Homogeneity Soya**





### 2.1.2 Stabilität

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

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

Der  $a_w$ -Wert der EP-Proben lag bei ca.  $0,33$  ( $17^\circ\text{C}$ ). Die Stabilität des Probenmaterials war somit während des Untersuchungszeitraums unter den angegebenen Lagerbedingungen gewährleistet.

## 2.2 Probenversand und Informationen zur Untersuchung

An jeden Teilnehmer wurden in der 8. Kalenderwoche 2020 je eine Portion der Untersuchungsmaterialien A und B sowie eine Dotierungsniveauprobe verschickt. Die Untersuchungsverfahren wurden freigestellt. Die Untersuchungen waren durchzuführen bis spätestens 04. Mai 2020 (verlängert).

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

*Es handelt sich um zwei unterschiedliche Proben A und B mit möglichen Gehalten an den allergenen Parametern **Soja und Weizen (Gluten)** im mg/kg Bereich in der Matrix „**glutenfreier**“ **Keks**. Eine der beiden Proben sowie die "Dotierungsniveauprobe" wurden mit den allergenen Zutaten hergestellt. Die "Dotierungsniveauprobe" enthält die Allergene in einfacher Matrix mit ähnlichen Gehalten ohne weitere Prozessierung. Die Dotierungsniveauprobe soll wie eine normale Probe untersucht werden.*

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

## 2.3 Ergebnisübermittlung

Die Ergebnisabgabe erfolgte einheitlich mittels an die teilnehmenden Labore übergebenen Übermittlungstabellen (per eMail).

Zur Auswertung kamen einerseits die Ergebnisse als positiv/negativ Angaben und andererseits angegebene Gehalte an allergenen Zutaten in mg/kg z.B. als allergenes Lebensmittel oder Protein.

Abgefragt und dokumentiert wurden die o.g. Ergebnisse sowie Angaben zu den Testmethoden wie Spezifitäten, Bestimmungsgrenzen, Testkit-Hersteller und Stichpunkte zur Durchführung der Methoden.

Falls Teilnehmer mehrere Ergebnisse für denselben Parameter abgegeben haben, die mit unterschiedlichen Methoden erhalten wurden, wurden diese Ergebnisse mit derselben Auswertenummer mit einem Buchstaben als Suffix unter Angabe der jeweiligen Methode ausgewertet.

Von 25 Teilnehmern haben 24 Teilnehmer ihre Ergebnisse fristgerecht abgegeben. Ein Teilnehmer hat keine Ergebnisse abgegeben.

### 3. Auswertung

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

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

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

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

#### 3.1 Konsenswert der Teilnehmer (zugewiesener Wert)

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

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

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

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

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

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

### 3.2 Robuste Standardabweichung

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

Folgende robuste Standardabweichungen werden herangezogen:

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

### 3.3 Ausschluss von Ergebnissen und Ausreißer

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

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

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

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

### 3.4 Zielstandardabweichung (für die Eignungsbeurteilung)

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

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

#### 3.4.1 Allgemeines Modell nach Horwitz

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

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

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

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

#### 3.4.2 Auswertung eines Versuchs zur Präzision

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

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

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

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

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

Aus den Präzisionsdaten der ASU §64 Methoden ergeben sich abhängig von Matrix bzw. Prozessierung und Konzentrationsbereich relative Zielstandardabweichungen im Bereich von 12 - 33% für die ELISA-Methoden und 18 - 37% für die PCR-Methoden (s. Tab. 2a und 2b).

Die Working Group on Prolamin Analysis and Toxicity (WGPAT) hat Ringversuche zur Validierung von zwei kommerziellen ELISA-Test-Kits zur Gluten-Bestimmung mittels monoklonalem R5 Antikörper durchgeführt [24]. Es wurden 12 Lebensmittelproben mit Gliadinegehalten im Bereich von 0 - 168 mg/kg von 20 Laboratorien untersucht. Die Wiederfindungsraten lagen zwischen 65 und 110%, die relativen Wiederholstandardabweichungen lagen bei 13 - 25% (1. Methode) bzw. 11 - 22% (2. Methode) und die relativen Vergleichsstandardabweichungen bei 23 - 47% (1. Methode) bzw. 25 - 33% (2. Methode). Laut den Autoren erfüllten beide ELISA-Test-Kits damit die Validierungskriterien für ELISA Methoden [24].

Das IRMM (Institute for Reference Materials and Measurements) hat in einem Ringversuch die Eignung fünf verschiedener ELISA-Test-Kits zur Bestimmung von Erdnuss getestet [27]. Die Mittelwerte lagen im Konzentrationsbereich von 0,3 - 16,1 mg/kg bzw. 1,2 - 20,4 mg/kg. Die jeweils niedrigsten relativen Vergleichsstandardabweichungen der fünf Test-Kits lagen für die Matrix Bitterschokolade bei 20 - 42% und für Kekse bei 23 - 61%.

**Tabelle 2b:** PCR-Methoden - Relative Wiederholstandardabweichungen ( $RSD_r$ ) und relative Vergleichsstandardabweichungen ( $RSD_R$ ) gemäß ausgewählter Auswertungen von Versuchen zur Präzision und die resultierende Zielstandardabweichung  $\sigma_{pt}$  [32-35]

Parameter	Matrix	Mittelwerte [mg/kg]	Wiederfindung	rob $RSD_r$	$RSD_r$	$RSD_R$	$\sigma_{pt}$	Methode / Literatur
Soja	Weizenmehl	107	107 %	63 %	-	31 %	-	rt-PCR ASU 16.01-9
	Maismehl	145	145 %	34 %	-	24 %	-	
Sojamehl	Brühwurst (100°C, 60 min)	114,1	114 %	-	14,7%	22,2%	19,6%	rt-PCR ASU 08.00-65
		64,4	161 %		27,7%	41,4%	36,5%	
Sojamehl	Wurst, autoklaviert	33,1	33,1 %	-	21,5%	30,8	26,8%	rt-PCR ASU 08.00-65
Sojamehl	Brühwurst (100°C, 60 min)	82,0	82 %	-	17,3%	24,1%	20,8%	rt-PCR ASU 08.00-59
		39,6	99 %		22,9%	31,8%	27,4%	
		19,6	98 %		22,9%	24,0%	17,7%	
		9,3	93 %		31,1%	30,2%	-	
Weizen + Roggen	Brühwurst (100°C, 60 min)	96,1	120 %	-	21,3%	35,4%	32,0%	rt-PCR ASU 08.00-66
Weizen + Roggen	Wurst, autoklaviert	74,9	11,0 %	-	24,6%	32,7%	27,7%	rt-PCR ASU 08.00-66

### 3.4.3 Werte aus Erkenntnissen

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

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

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

Tabelle 3: ELISA-Validierungskriterien

<b>Literatur</b> [18-24]	<b>Wiederfindungsrate</b>	<b>Wiederholstandardabweichung</b>	<b>Vergleichsstandardabweichung</b>
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 4: PCR-Validierungskriterien

<b>Literatur</b> [18]	<b>Wiederfindungsrate</b>	<b>Wiederholstandardabweichung</b>	<b>Vergleichsstandardabweichung</b>
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% fest.

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

### 3.5 z-Score

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

Die Berechnung erfolgt nach:

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

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

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

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

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

#### 3.5.1 Warn- und Eingriffssignale

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

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



### **3.6 z'-Score**

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

Die Berechnung erfolgt nach:

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

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

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

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

Zu Warn- und Eingriffssignalen siehe 3.5.1.

### **3.7 Quotient $S^*/\sigma_{pt}$**

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

### **3.8 Standardunsicherheit und Rückführbarkeit**

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

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

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

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

### **3.9 Graphische Darstellung der Bezugswerte**

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

### **3.10 Wiederfindungsraten: Dotierung**

Für die Ergebnisse von Dotierungsniveauprobe und dotierter Probe werden Wiederfindungsraten in Bezug auf die zugesetzten Allergene (Zusatzniveau) berechnet. Die Bezugswerte ergeben sich aus den unter 2.1 Untersuchungsmaterial in Tabelle 1 angegebenen Gehalten. Als Akzeptanzbereich AB für die Bewertung der Teilnehmerergebnisse wird der von der AOAC vorgeschlagene Bereich von 50 - 150% für die Wiederfindungsraten von Allergen-ELISAs herangezogen [23]. Für quantitative PCR- oder LC/MS-Bestimmungen wird ebenfalls dieser Akzeptanzbereich herangezogen. Die Berechnung der zugehörigen z-Scores erfolgte gemäß 3.5 mit der Zielstandardabweichung von 25% (s. 3.4.3).

## 4. Ergebnisse

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

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

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

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

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

Die ELISA-Ergebnisse, die als **Sojamehl** angegeben wurden, sind mit dem experimentell bestimmten Proteingehalt des Sojamehls in **Sojaprotein** umgerechnet worden (siehe S. 5).

Ein ELISA-Ergebnis, das als **Sojatripsininhibitor (STI)** angegeben wurde, wurde mit den Vorgaben des Testkit-Herstellers (Immunolab: Faktor 42) zuerst in Sojamehl und dann mit dem experimentell bestimmten Proteingehalt des Sojamehls in **Sojaprotein** umgerechnet.

ELISA-Ergebnisse, die als **Gliadin** angegeben wurden, sind in **Gluten** umgerechnet worden. Dabei wurde die Gliadin-Angabe mit dem Faktor 2 multipliziert.

Qualitativ werden die Ergebnisse anhand des Prozentsatzes positiver bzw. negativer Ergebnisse bewertet. Sofern  $\geq 75$  % positive oder negative Ergebnisse vorlagen, wurde für die betreffende Probe ein Konsens-Ergebnis (positiv oder negativ) festgestellt. Für jeden Teilnehmer wird in Bezug auf die Konsens-Ergebnisse eine qualitative Bewertung vorgenommen. Hier wurde die Übereinstimmung mit den Konsens-Werten in Prozent angegeben.

Gegebenenfalls werden anschließend die Ergebnisse aller Methoden und von Einzelmethoden mit mindestens 5 quantitativen Ergebnissen statistisch ausgewertet.

In den Fällen, in denen eine statistische Auswertung der quantitativen Messergebnisse durchgeführt wurde, werden die Ergebnisse tabellarisch folgendermaßen aufgeführt:

Auswertenummer	Ergebnis	Ergebnis	z-Score $X_{pt_{ALL}}$	z-Score $X_{pt_{Mi}}$	Methode	Hinweis
	pos/neg	[mg/kg]				

Die Kenndaten der jeweiligen Vergleichsuntersuchung werden aufgeführt, falls wenigstens 50% positive Ergebnisangaben und mindestens 5 quantitative Messergebnisse vorliegen:

Kenndaten	Alle Ergebnisse [mg/kg]	Methode i [mg/kg]
Zugewiesener Wert ( $X_{pt}$ )	$X_{pt_{ALL}}$	$X_{pt_{METHOD i}}$
Anzahl der Messergebnisse		
Anzahl der Ausreißer		
Mittelwert		
Median		
Robuster Mittelwert ( $X_{pt}$ )		
Robuste Standardabweichung ( $S^*$ )		
Zielkenndaten <sup>o</sup> :		
Zielstandardabweichung $\sigma_{pt}$ bzw. $\sigma_{pt}'$		
untere Grenze des Zielbereichs ( $X_{pt} - 2\sigma_{pt}$ ) bzw. ( $X_{pt} - 2\sigma_{pt}'$ ) <sup>o</sup>		
obere Grenze des Zielbereichs ( $X_{pt} + 2\sigma_{pt}$ ) bzw. ( $X_{pt} + 2\sigma_{pt}'$ ) <sup>o</sup>		
Quotient $S^*/\sigma_{pt}$ bzw. $S^*/\sigma_{pt}'$		
Standardunsicherheit $U_{(X_{pt})}$		
Ergebnisse im Zielbereich		
Prozent im Zielbereich		

<sup>o</sup> Zielbereich berechnet mit z-Score oder z'-Score

Im Anschluss erfolgt die Darstellung der Wiederfindungsraten für die Ergebnisse von Dotierungsniveauprobe und dotierter Probe. Die Anzahl der Ergebnisse im Akzeptanzbereich von 50-150% wird aufsummiert.

### 4.1 Vergleichsuntersuchung Soja

#### 4.1.1 ELISA-Ergebnisse: Soja (als Sojaprotein)

#### Qualitative Auswertung der Ergebnisse: Proben A und B

Auswertenummer	Probe A	Probe A	Probe B	Probe B	Qualitative Bewertung	Methode	Hinweis
	pos/neg	[mg/kg]	pos/neg	[mg/kg]	Übereinstimmungen mit Konsenswerten		
6	negativ	< LOQ	negativ	< LOQ	1/2 (50%)	AQ	
8	positiv	2,60	negativ	<LOD	2/2 (100%)	AQ	
17	negativ	0,0200	negativ	-4,13	1/2 (50%)	AT	
23	positiv	25,0	negativ	<0,5	2/2 (100%)	IL-SP	
2	positiv	0,341	negativ	<0,57	2/2 (100%)	IL-STI	Ergebnis Probe A kleiner BG, Ergebnis umgerechnet °
20	positiv	0,0500	negativ	<0,04	2/2 (100%)	IL-STI	Ergebnis als STI angegeben?
5	positiv	16,0	negativ	<0,31	2/2 (100%)	MI-II	
4	positiv	17,0	negativ	< BG	2/2 (100%)	RS-F	
7	positiv	13,8	negativ	<2,5	2/2 (100%)	RS-F	
9a	positiv	10,4	negativ	<2,5	2/2 (100%)	RS-F	
10	positiv	4,39	negativ	<0,85	2/2 (100%)	RS-F	Ergebnis umgerechnet °
12	positiv	20,3	negativ		2/2 (100%)	RS-F	
14	positiv	16,4	negativ		2/2 (100%)	RS-F	
19	positiv	18,4	positiv	5,70	1/2 (50%)	RS-F	
21	positiv	13,4	negativ	<2,5	2/2 (100%)	RS-F	
22a	positiv	13,1	negativ	<2,5	2/2 (100%)	RS-F	
9b	-		negativ	<1,17	1/1 (100%)	VT	
13	positiv	2,80	negativ	0	2/2 (100%)	VT	Ergebnis als Sojamehl angegeben?
22b	negativ	<0,85	negativ	<0,85	1/2 (50%)	VT	Ergebnis umgerechnet °
24	positiv	2,53	negativ	<2,5	2/2 (100%)	VT	Ergebnis als Sojamehl angegeben?

° Umrechnung S. 19

	Probe A	Probe B
Anzahl positiv	16	1
Anzahl negativ	3	19
Prozent positiv	84	5
Prozent negativ	16	95
Konsenswert	positiv	negativ

#### Methoden:

AQ = AgraQuant, RomerLabs  
 AT = AlerTox Sticks (Lateral Flow), Biomedal  
 IL-SP = Immunolab Soy Protein Total  
 IL-STI = Immunolab Soy Trypsin Inhibitor  
 MI-II = Morinaga Institute ELISA Kit II  
 RS-F= Ridascreen® Fast, R-Biopharm  
 VT = Veratox, Neogen

#### Anmerkung:

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

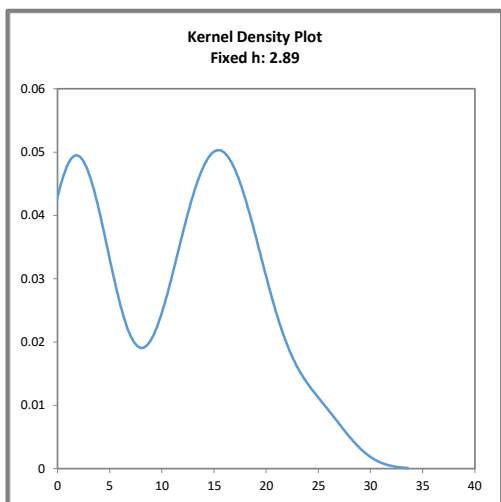
**Quantitative Auswertung ELISA: Probe A**

Auswertenummer	Sojaprotein [mg/kg]	z-Score Xpt <sub>ALL</sub>	z-Score Xpt <sub>RS-F</sub>	Methode	Hinweis
6	< LOQ			AQ	
8	2,60			AQ	Ergebnis ausgeschlossen
17	0,0200			AT	Ergebnis ausgeschlossen
23	25,0	2,5		IL-SP	
2	0,341			IL-STI	Ergebnis kleiner BG und umgerechnet °, Ergebnis ausgeschlossen
20	0,0500			IL-STI	Ergebnis als STI angegeben? Ergebnis ausgeschlossen
5	16,0	0,15		MI-II	
4	17,0	0,41	0,69	RS-F	
7	13,8	-0,43	-0,21	RS-F	
9a	10,4	-1,3	-1,1	RS-F	
10	4,39	-2,9	-2,8	RS-F	Ergebnis umgerechnet °
12	20,3	1,3	1,6	RS-F	
14	16,4	0,25	0,52	RS-F	
19	18,4	0,77	1,1	RS-F	
21	13,4	-0,53	-0,31	RS-F	
22a	13,1	-0,60	-0,38	RS-F	
9b				VT	
13	2,80			VT	Ergebnis ausgeschlossen
22b	<0,85			VT	Ergebnis umgerechnet °
24	2,53			VT	Ergebnis ausgeschlossen

° Umrechnung S. 19

**Methoden:**

- AQ = AgraQuant, RomerLabs
- AT = AlerTox Sticks (Lateral Flow), Biomedal
- IL-SP = Immunolab Soy Protein Total
- IL-STI = Immunolab Soy Trypsin Inhibitor
- MI-II = Morinaga Institute ELISA Kit II
- RS-F= Ridascreen® Fast, R-Biopharm
- VT = Veratox, Neogen



**Abb. / Fig. 1:**

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

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

**Anmerkung:**

Die Kerndichte-Schätzung zeigt eine bimodale Verteilung der Ergebnisse mit zwei Maxima bei ca. 2,5 mg/kg und ca. 16 mg/kg.

**Kenndaten: Quantitative Auswertung ELISA Soja (als Sojaprotein)****Probe A**

<b>Kenndaten</b>	<b>Alle Ergebnisse</b> [mg/kg]	<b>Methode RS-F</b> [mg/kg]
Zugewiesener Wert ( $X_{pt}$ )	$X_{pt}_{ALL}$	$X_{pt}_{METHOD\ RS-F}$
Anzahl der Messergebnisse	11 <sup>°</sup>	9
Anzahl der Ausreißer	6	0
Mittelwert	15,3	14,1
Median	16,0	13,8
<b>Robuster Mittelwert (<math>X_{pt}</math>)</b>	<b>15,4</b>	<b>14,5</b>
<b>Robuste Standardabweichung (<math>S^*</math>)</b>	<b>4,74</b>	<b>4,46</b>
<i>Zielkenndaten:</i>		
<b>Zielstandardabweichung <math>\sigma_{pt}</math></b>	<b>3,85</b>	<b>3,63</b>
<b>Untere Grenze des Zielbereichs</b>	<b>7,71</b>	<b>7,25</b>
<b>Obere Grenze des Zielbereichs</b>	<b>23,1</b>	<b>21,8</b>
Quotient $S^*/\sigma_{pt}$	1,2	1,2
Standardunsicherheit $U(X_{pt})$	1,79	1,86
Ergebnisse im Zielbereich	9	8
Prozent im Zielbereich	82	89

<sup>°</sup> ohne Ergebnisse Nr. 2, 8, 13, 17, 20 und 24 (Methoden AQ, AT, IL und VT vorab ausgeschlossen)

**Methoden:**

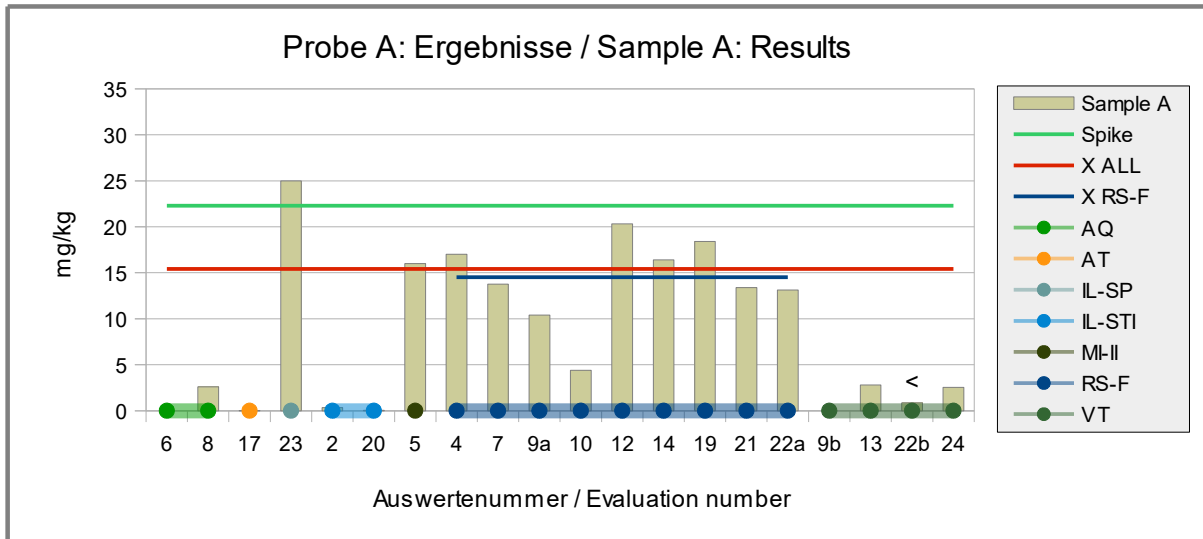
RS-F = R-Biopharm, Ridascreen® Fast

Anmerkungen zu den Kenndaten und Vergleich der Bezugswerte:

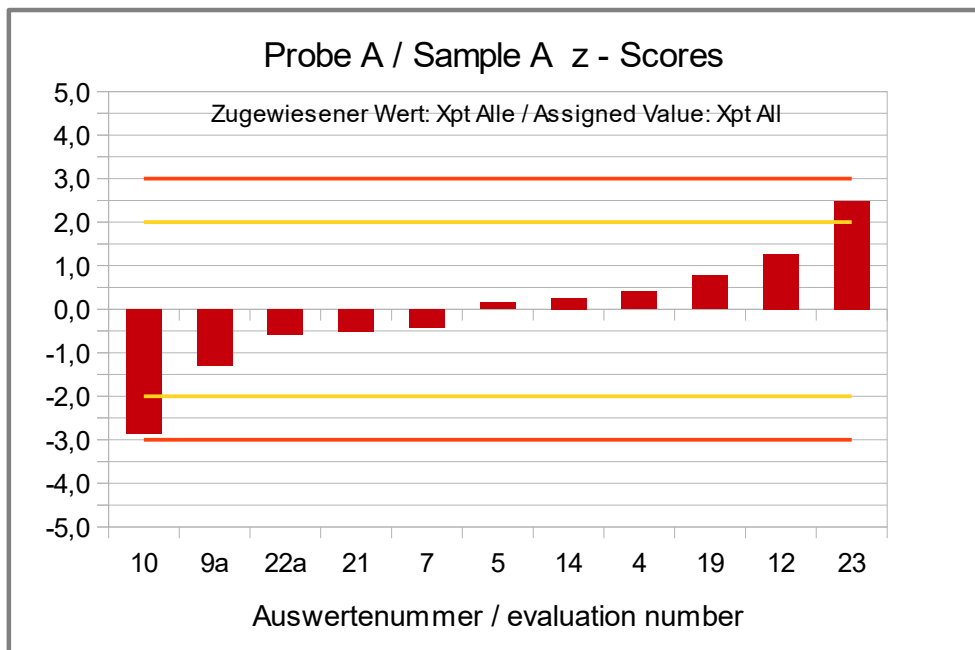
Die Kerndichte-Schätzung zeigte methodenabhängige Unterschiede. Ergebnisse der Methoden, die dem Maximum bei ca. 16 mg/kg zuzuordnen waren, wurden für die statistische Bewertung berücksichtigt. Aufgrund teilweise nicht plausibler quantitativer Ergebnisangaben, wurden die Methoden des niedrigeren Maximums bei ca. 2,5 mg/kg nicht für eine quantitative Auswertung berücksichtigt.

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

Die robusten Mittelwerte der Auswertungen lagen mit 69% bzw. 65% vom Zusatzniveau von Sojaprotein zu Probe A, innerhalb der relevanten Anforderungen für die eingesetzten Methoden (s. 3.4.3 und S.30 "Wiederfindungsraten für Soja").

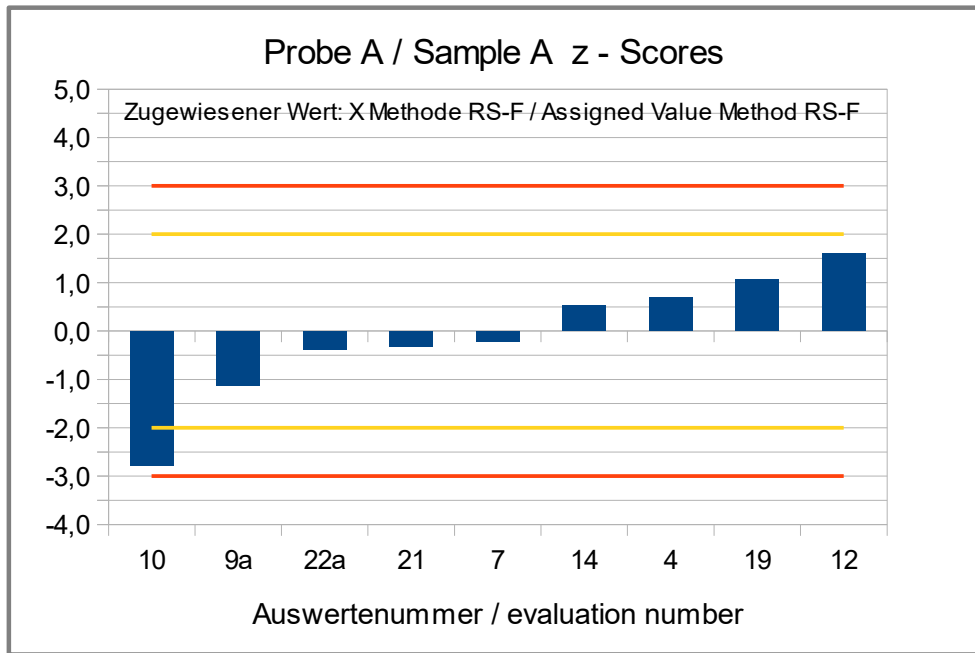


**Abb./Fig. 2:** ELISA-Ergebnisse Soja (als Sojaprotein)  
 grüne Linie = Zusatzniveau (Spike)  
 rote Linie = robuster Mittelwert aller Ergebnisse  
 blaue Linie = robuster Mittelwert Ergebnisse Methode RS-F  
 runde Symbole = Zuordnung der Methoden (s. Legende)



**Abb./Fig. 3:**  
 z-Scores ELISA-Ergebnisse Soja (als Sojaprotein)  
 Zugewiesener Wert: robuster Mittelwert aller Ergebnisse





**Abb./Fig. 4:**

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

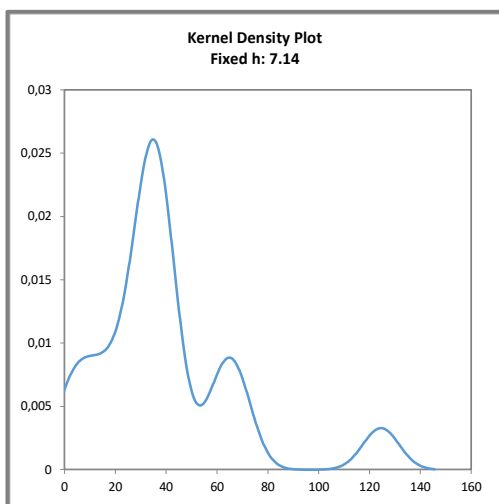
**Quantitative Auswertung ELISA: Dotierungsniveauprobe**

Auswertenummer	Sojaprotein [mg/kg]	z-Score X <sub>pt</sub> <sub>ALL</sub>	z-Score X <sub>pt</sub> <sub>RS-F</sub>	Methode	Hinweis
6	60,0	2,3		AQ	
8	68,0	3,1		AQ	
17	124			AT	Ausreißer ausgeschlossen
23	35,0	-0,32		IL-SP	
2	13,3	-2,6		IL-STI	Ergebnis umgerechnet °
20	1,54			IL-STI	Ergebnis als STI angegeben? Ausreißer ausgeschlossen
5	19,0	-2,0		MI-II	
4	32,0	-0,64	-0,32	RS-F	
7	33,2	-0,51	-0,19	RS-F	
9a	>20			RS-F	
10	5,41		-3,4	RS-F	Ergebnis umgerechnet ° Ausreißer bei X <sub>pt</sub> <sub>ALL</sub> ausgeschlossen
12	39,7	0,17	0,56	RS-F	
14	39,0	0,10	0,48	RS-F	
19	37,1	-0,10	0,26	RS-F	
21	31,7	-0,67	-0,36	RS-F	
22a	38,6	0,06	0,44	RS-F	
9b	>11,8			VT	
13	66,0	2,9		VT	Ergebnis als Sojamehl angegeben?
22b	27,4	-1,1		VT	Ergebnis umgerechnet °
24	>25			VT	Ergebnis als Sojamehl angegeben?

° Umrechnung S. 19

**Methoden:**

- AQ = AgraQuant, RomerLabs
- AT = AlerTox Sticks (Lateral Flow ), Biomedal
- IL-SP = Immunolab Soy Protein Total
- IL-STI = Immunolab Soy Trypsin Inhibitor
- MI-II = Morinaga Institute ELISA Kit II
- RS-F= Ridascreeen® Fast, R-Biopharm
- VT = Veratox, Neogen



**Abb. / Fig. 5:**

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

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

Anmerkung:

Die Kerndichte-Schätzung zeigt annähernd eine symmetrische Verteilung mit einer Schulter bei ca. 10 mg/kg und zwei Nebenpeaks bei ca. 65 mg/kg und 124 mg/kg, die auf Einzelwerte außerhalb des Zielbereichs zurückgehen.

**Kenndaten: Quantitative Auswertung ELISA Soja (als Sojaprotein)****Dotierungsniveauprobe**

<b>Kenndaten</b>	<b>Alle Ergebnisse</b> [mg/kg]	<b>Methode RS-F</b> [mg/kg]
Zugewiesener Wert ( $X_{pt}$ )	$X_{pt\_ALL}$	$X_{pt\_METHOD\ RS-F}$
Anzahl der Messergebnisse	14 <sup>°</sup>	8
Anzahl der Ausreißer	3	-
Mittelwert	38,6	32,1
Median	36,1	35,2
<b>Robuster Mittelwert (<math>X_{pt}</math>)</b>	<b>38,1</b>	<b>34,8</b>
<b>Robuste Standardabweichung (<math>S^*</math>)</b>	<b>17,2</b>	<b>5,04</b>
<i>Zielkenndaten:</i>		
<b>Zielstandardabweichung <math>\sigma_{pt}</math></b>	<b>9,52</b>	<b>8,71</b>
<b>Untere Grenze des Zielbereichs</b>	<b>19,0</b>	<b>17,4</b>
<b>Obere Grenze des Zielbereichs</b>	<b>57,1</b>	<b>52,2</b>
Quotient $S^*/\sigma_{pt}$	1,8	0,58
Standardunsicherheit $U(X_{pt})$	5,75	2,23
Ergebnisse im Zielbereich	9	7
Prozent im Zielbereich	64	88

<sup>°</sup> ohne Ergebnisse Nr. 2, 10 und 20 (vorab ausgeschlossen)

**Methoden:**

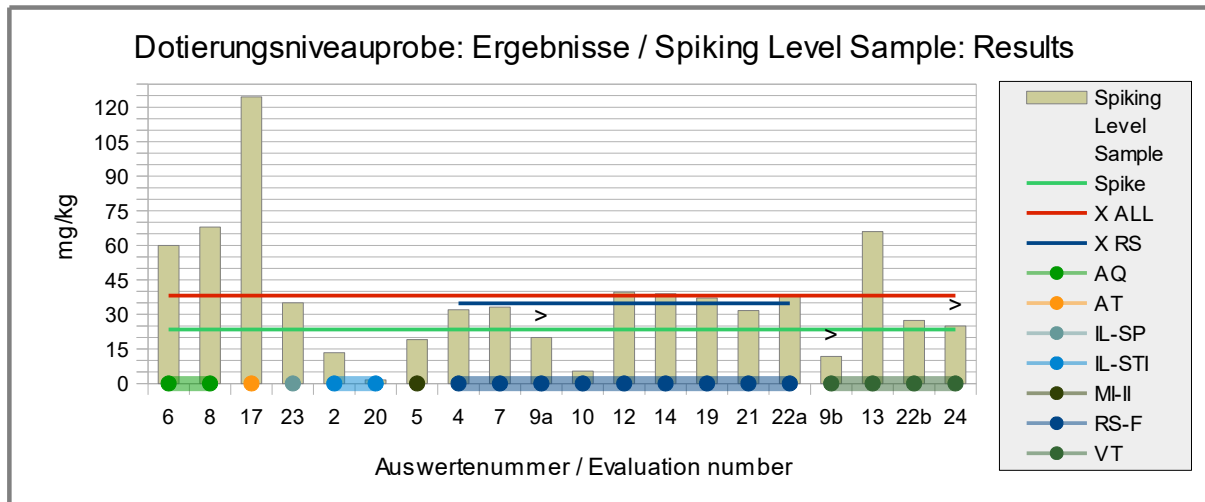
RS-F = R-Biopharm, Ridascreen® Fast

Anmerkungen zu den Kenndaten und Vergleich der Bezugswerte:

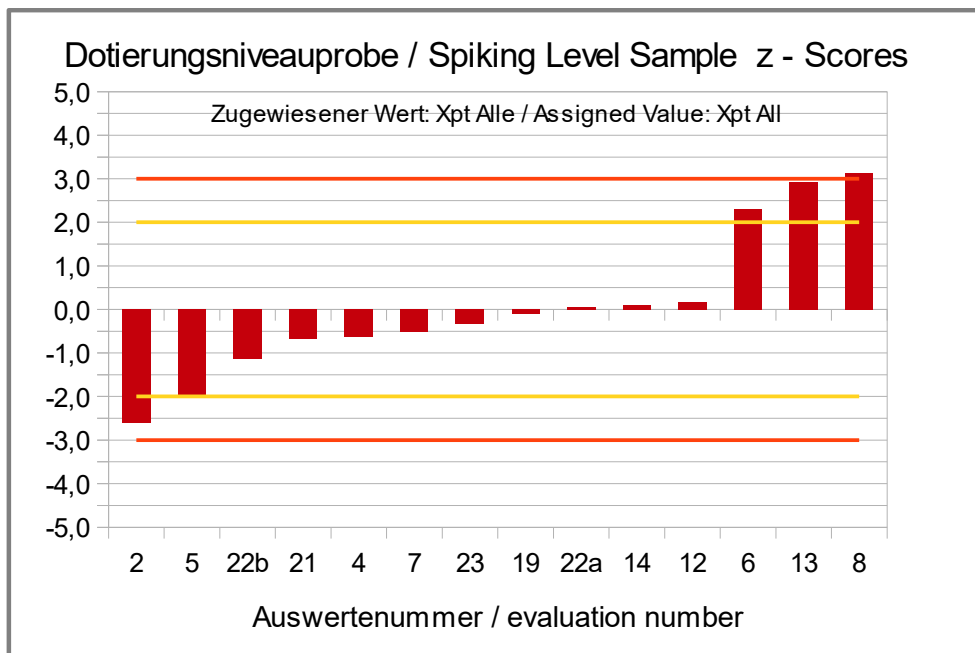
Die Kerndichte-Schätzung zeigte keine eindeutigen methodenabhängigen Unterschiede.

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

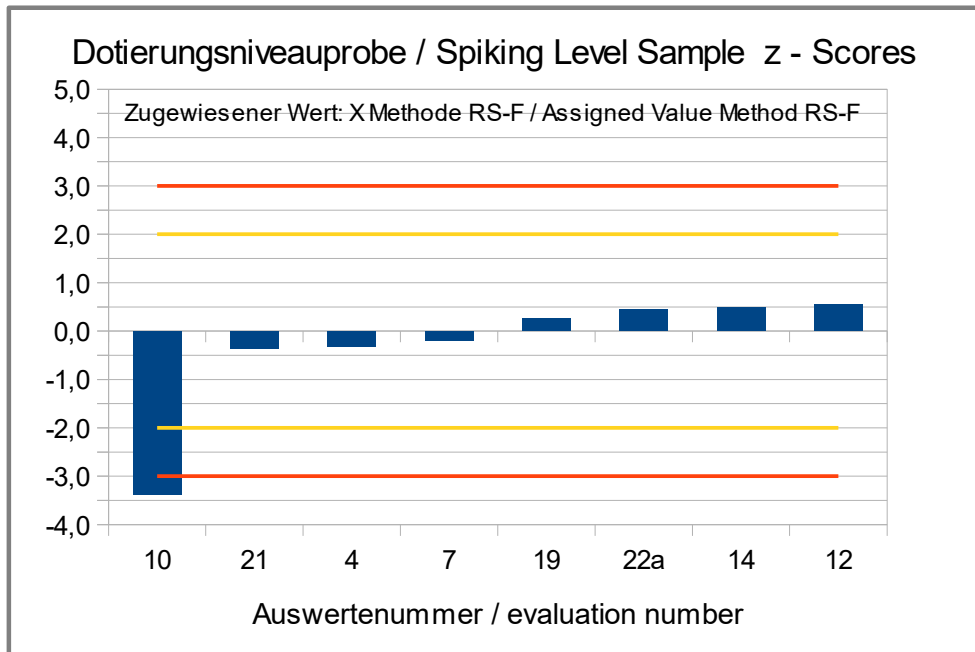
Die robusten Mittelwerte der Auswertungen lagen mit 162% bzw. 148% vom Zusatzniveau von Sojaprotein zur Dotierungsniveauprobe oberhalb bzw. im oberen Bereich der relevanten Anforderungen für die eingesetzten Methoden (s. 3.4.3 und S.30 "Wiederfindungsraten für Soja").



**Abb./Fig. 6:** ELISA-Ergebnisse Soja (als Sojaprotein)  
 grüne Linie = Zusatzniveau (Spike)  
 rote Linie = robuster Mittelwert aller Ergebnisse  
 blaue Linie = robuster Mittelwert Ergebnisse Methode RS-F  
 runde Symbole = Zuordnung der Methoden (s. Legende)



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



**Abb./Fig. 8:**

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

**Wiederfindungsraten mit z-Scores ELISA für Soja (als Sojaprotein):  
Dotierungsniveauprobe und Probe A**

Auswertenummer	Dotierungsniveauprobe	Wiederfindungsrate*		Probe A	Wiederfindungsrate*		Methode	Hinweis
		[mg/kg]	[%] [Z <sub>RR</sub> ]		[mg/kg]	[%] [Z <sub>RR</sub> ]		
6	60,0	255	6,2	< LOQ			AQ	
8	68,0	289	7,6	2,60	12	-3,5	AQ	
17	124	530	17	0,0200	0	-4,0	AT	
23	35,0	<b>149</b>	2,0	25,0	<b>112</b>	0,48	IL-SP	
2	13,3	<b>57</b>	-1,7	0,341	2	-3,9	IL-STI	Ergebnis Probe A kleiner BG, Ergebnis umgerechnet °
20	1,54	7	-3,7	0,0500	0	-4,0	IL-STI	Ergebnis als STI angegeben?
5	19,0	<b>81</b>	-0,77	16,0	<b>72</b>	-1,1	MI-II	
4	32,0	<b>136</b>	1,4	17,0	<b>76</b>	-0,95	RS-F	
7	33,2	<b>141</b>	1,7	13,8	<b>62</b>	-1,5	RS-F	
9a	>20			10,4	47	-2,1	RS-F	
10	5,41	23	-3,1	4,39	20	-3,2	RS-F	Ergebnis umgerechnet °
12	39,7	169	2,8	20,3	<b>91</b>	-0,36	RS-F	
14	39,0	166	2,6	16,4	<b>74</b>	-1,1	RS-F	
19	37,1	158	2,3	18,4	<b>83</b>	-0,70	RS-F	
21	31,7	<b>135</b>	1,4	13,4	<b>60</b>	-1,6	RS-F	
22a	38,6	164	2,6	13,1	<b>59</b>	-1,6	RS-F	
9b	>11,8						VT	
13	66,0	281	7,2	2,80	13	-3,5	VT	Ergebnis als Sojamehl angegeben?
22b	27,4	<b>117</b>	0,66	<0,85		-4,0	VT	Ergebnis umgerechnet °
24	>25			2,53	11	-3,5	VT	Ergebnis als Sojamehl angegeben?

° Umrechnung S. 19

AB**	50-150 %	AB**	50-150 %
Anzahl im AB	<b>7</b>	Anzahl im AB	<b>9</b>
Prozent im AB	<b>41</b>	Prozent im AB	<b>53</b>

\* Wiederfindungsrate 100% Bezugsgröße: Sojaprotein, s. Seite 5

\*\* Akzeptanzbereich der AOAC für Allergen-ELISAs

**Methoden:**

- AQ = AgraQuant, RomerLabs
- AT = AlerTox Sticks (Lateral Flow), Biomedal
- IL-SP = Immunolab Soy Protein Total
- IL-STI = Immunolab Soy Trypsin Inhibitor
- MI-II = Morinaga Institute ELISA Kit II
- RS-F = Ridascreen® Fast, R-Biopharm
- VT = Veratox, Neogen

Anmerkung:

41% (7) der Teilnehmer haben mit der Dotierungsniveauprobe mittels ELISA eine Wiederfindungsrate im Bereich der AOAC-Anforderung von 50-150% erhalten. Für die prozessierte dotierte Lebensmittelmatrix-Probe A lagen 53% (9) der Wiederfindungsraten in diesem Akzeptanzbereich. Die zugehörigen z-Scores basieren auf der Zielstandardabweichung von 25%.

4.1.2 PCR-Ergebnisse: Soja

Qualitative Auswertung der Ergebnisse: Proben A und B

Auswertenummer	Probe A pos/neg	Probe A [mg/kg]	Probe B pos/neg	Probe B [mg/kg]	Qualitative Bewertung Übereinstimmungen mit Konsenswerten	Methode	Hinweis
4	positiv		negativ		2/2 (100%)	ASU	
7	positiv		negativ		2/2 (100%)	ASU	
11	positiv	4,00	negativ		2/2 (100%)	ASU	
12a	positiv		negativ		2/2 (100%)	ASU	
14	positiv		negativ		2/2 (100%)	ASU	
9	positiv		negativ		2/2 (100%)	SFA	
15	positiv		positiv		1/2 (50%)	SFA	
22	positiv	49,6	negativ	<1	2/2 (100%)	SFA-ID	Angegeben als Soja-DNA
5	positiv		negativ		2/2 (100%)	div	
12b	positiv		negativ		2/2 (100%)	div	
16	positiv	10,4	negativ	<2,5	2/2 (100%)	div	

	Probe A	Probe B
Anzahl positiv	11	1
Anzahl negativ	0	10
Prozent positiv	100	9
Prozent negativ	0	91
Konsenswert	positiv	negativ

**Methoden:**

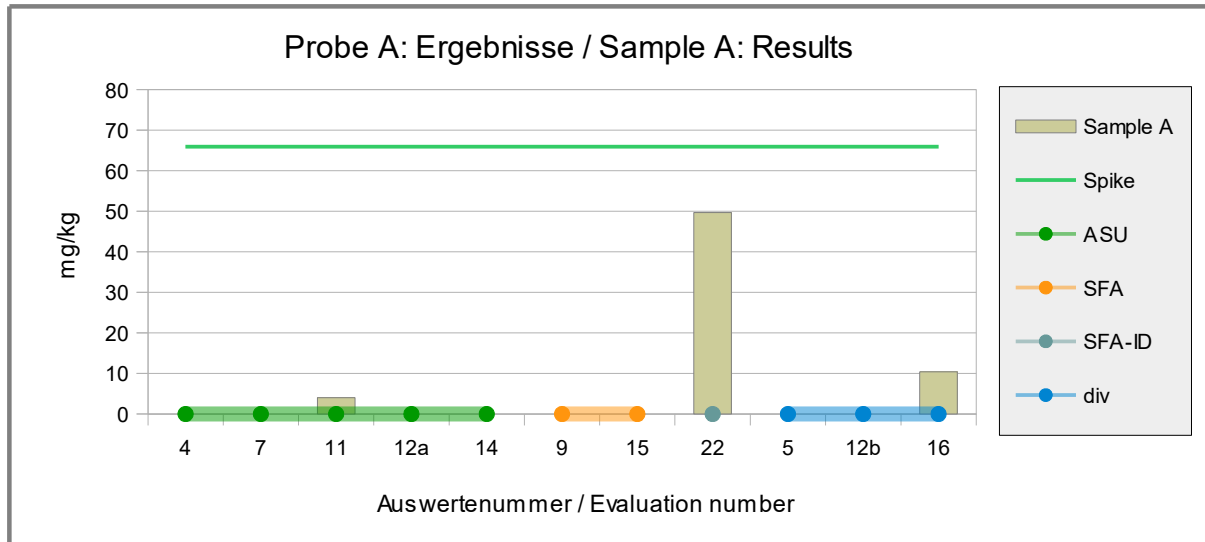
ASU = ASU §64 Methode/method  
 SFA = Sure Food ALLERGEN, R-Biopharm / Congen  
 SFA-ID = Sure Food Allergen ID, R-Biopharm / Congen  
 div = keine genaue Angabe / andere Methode  
 div = not indicated / other method

Anmerkung:

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

**Quantitative Auswertung PCR: Probe A**

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



**Abb./Fig. 9:** PCR-Ergebnisse Soja

grüne Linie = Zusatzniveau (Spike)

runde Symbole = Zuordnung der Methoden (s. Legende)



**Quantitative Auswertung PCR: Dotierungsniveauprobe**

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

Auswertenummer	Soja pos/neg	Soja [mg/kg]	z-Score X <sub>pt</sub> <sub>ALL</sub>	Methode	Hinweis
4	positiv			ASU	
7	positiv			ASU	
11	positiv	21,0		ASU	
12a	positiv			ASU	
14	positiv			ASU	
9	positiv			SFA	
15	positiv			SFA	
22	positiv	43,6		SFA-ID	Angegeben als Soja-DNA
5	positiv			div	
12b	positiv			div	
16	positiv	84,7		div	

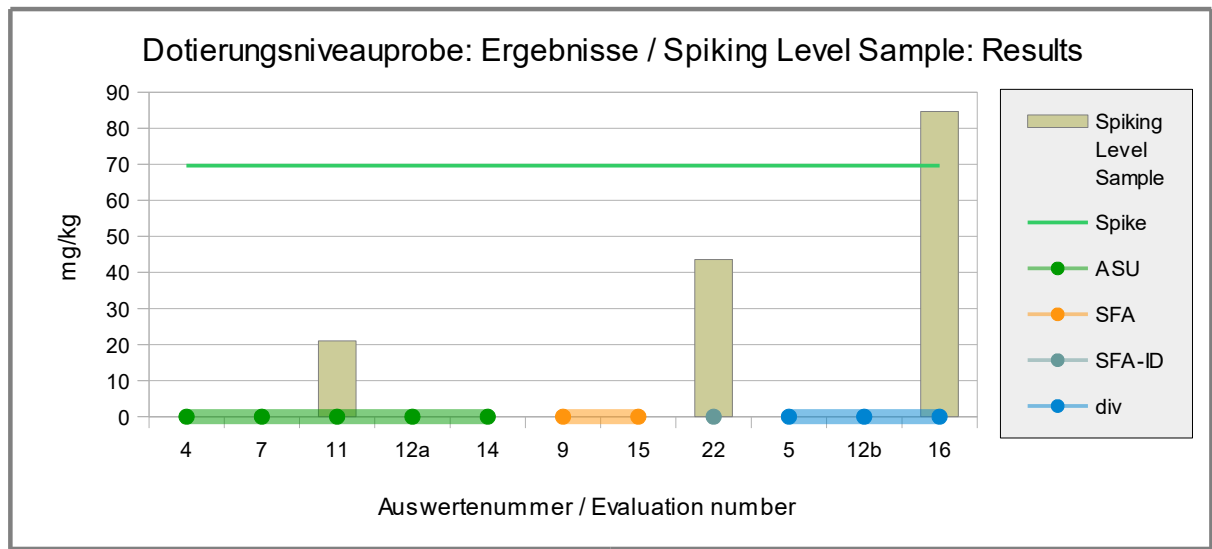
Anzahl positiv	11
Anzahl negativ	0
Prozent positiv	100
Prozent negativ	0
Konsenswert	positiv

**Methoden:**

ASU = ASU §64 Methode/method  
 SFA = Sure Food ALLERGEN, R-Biopharm / Congen  
 SFA-ID = Sure Food Allergen ID, R-Biopharm / Congen  
 div = keine genaue Angabe / andere Methode  
 div = not indicated / other method

Anmerkung:

Für die Dotierungsniveauprobe wurden ausschließlich positive Ergebnisse erhalten.



**Abb./Fig. 10:** PCR-Ergebnisse Soja  
 grüne Linie = Zusatzniveau (Spike)  
 runde Symbole = Zuordnung der Methoden (s. Legende)

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

Auswertenummer	Dotierungsniveauprobe	Wiederfindungsrate*		Probe A	Wiederfindungsrate*		Methode	Hinweis
		[mg/kg]	[%] [Z <sub>RR</sub> ]		[mg/kg]	[%] [Z <sub>RR</sub> ]		
4							ASU	
7							ASU	
11	21,0	30	-2,8	4,00	6	-3,8	ASU	
12a							ASU	
14							ASU	
9							SFA	
15							SFA	
22	43,6	<b>63</b>	-1,5	49,6	<b>75</b>	-0,99	SFA-ID	Angegeben als Soja-DNA (?)
5							div	
12b							div	
16	84,7	<b>122</b>	0,86	10,4	16	-3,4	div	

AB**	50-150 %	AB**	50-150 %
Anzahl im AB	<b>2</b>	Anzahl im AB	<b>1</b>
Prozent im AB	<b>67</b>	Prozent im AB	<b>33</b>

\* Wiederfindungsrate 100% Bezugsgröße: Soja/Sojamehl, s. Seite 5

\*\* Akzeptanzbereich der AOAC für Allergen-ELISAs

**Methoden:**

ASU = ASU §64 Methode/method

SFA = Sure Food ALLERGEN, R-Biopharm / Congen

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

div = keine genaue Angabe / andere Methode

div = not indicated / other method

Anmerkung:

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

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

## 4.2 Vergleichsuntersuchung Weizen (Gluten)

### 4.2.1 ELISA-Ergebnisse: Gluten

#### Qualitative Auswertung der Ergebnisse: Proben A und B

Auswertenummer	Probe A	Probe A	Probe B	Probe B	Qualitative Bewertung	Methode	Hinweis
	pos/neg	[mg/kg]	pos/neg	[mg/kg]			
6	positiv	27,0	negativ	< LOQ	2/2 (100%)	AQ-G12	
8a	positiv	26,0	negativ	<LOD	2/2 (100%)	AQ-G12	
1	negativ	<5	negativ	<5	1/2 (50%)	AS-G12	
2	positiv	45,0	negativ	< 4	2/2 (100%)	IL	
20	positiv	26,1	negativ	<4,00	2/2 (100%)	IL	
23	positiv	26,0	negativ	< 1	2/2 (100%)	IL	Ergebnis umgerechnet °
3	positiv	26,6	negativ	<5,00	2/2 (100%)	RS	
4	positiv	23,0	negativ	< BG	2/2 (100%)	RS	
5a	positiv	19,0	negativ	<5	2/2 (100%)	RS	
7	positiv	14,4	negativ	<5,0	2/2 (100%)	RS	
8b	positiv	20,0	negativ	<LOD	2/2 (100%)	RS	
10a	positiv	15,0	negativ	<5	2/2 (100%)	RS	
12	positiv	19,5	negativ		2/2 (100%)	RS	
14	positiv	22,1	negativ		2/2 (100%)	RS	
16	positiv	18,1	negativ	<3,0	2/2 (100%)	RS	
17	positiv	23,0	negativ	<5	2/2 (100%)	RS	
19	positiv	17,9	negativ	<5	2/2 (100%)	RS	
21	positiv	22,8	negativ	<5	2/2 (100%)	RS	
22	positiv	18,2	negativ	<5	2/2 (100%)	RS	
24	positiv	14,5	negativ	<10	2/2 (100%)	RS-C	
11	positiv	8,00	negativ		2/2 (100%)	RS-F	
18	negativ	10,4	negativ	<10	1/2 (50%)	RS-F	Ergebnis Probe A liegt an der BG
10b	positiv	17,0	negativ	<2,5	2/2 (100%)	RS-S	
5b	positiv	17,0	negativ	<3,12	2/2 (100%)	SP-R5	
13	positiv	14,7	negativ	0	2/2 (100%)	VT	

° Umrechnung S. 19

	Probe A	Probe B
Anzahl positiv	23	0
Anzahl negativ	2	25
Prozent positiv	92	0
Prozent negativ	8	100
Konsenswert	positiv	negativ

#### Methoden:

AQ-G12 = AgraQuant, RomerLabs  
 AS-G12 = AgraStrip (Lateral Flow), RomerLabs  
 IL = Immunolab  
 RS = Ridascreen®, R-Biopharm  
 RS-C = Ridascreen® competitive, R-Biopharm  
 RS-F = Ridascreen® Fast, R-Biopharm  
 RS-S = Ridascreen® Fast sensitive, R-Biopharm  
 SP-R5 = SensiSpec Ingezim Gluten R5, Eurofins  
 VT = Veratox, Neogen

#### Anmerkung:

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

Hinweis: Teilnehmer 18 hat das Ergebnis von 10,4 mg/kg für Probe A als „negativ“ eingestuft, möglicherweise weil der Wert unterhalb der zu kennzeichnenden Menge von 20 mg/kg liegt.

**Quantitative Auswertung ELISA: Probe A**

Auswertenummer	Gluten [mg/kg]	z-Score Xpt <sub>ALL</sub>	z-Score Xpt <sub>RS</sub>	Methode	Hinweis
6	27,0	1,4		AQ-G12	
8a	26,0	1,2		AQ-G12	
1	<5			AS-G12	
2	45,0	5,0		IL	
20	26,1	1,2		IL	
23	26,0	1,2		IL	Ergebnis umgerechnet °
3	26,6	1,3	1,4	RS	
4	23,0	0,61	0,63	RS	
5a	19,0	-0,19	-0,18	RS	
7	14,4	-1,1	-1,1	RS	
8b	20,0	0,01	0,02	RS	
10a	15,0	-0,99	-0,98	RS	
12	19,5	-0,09	-0,08	RS	
14	22,1	0,43	0,45	RS	
16	18,1	-0,37	-0,36	RS	
17	23,0	0,62	0,63	RS	
19	17,9	-0,41	-0,40	RS	
21	22,8	0,57	0,59	RS	
22	18,2	-0,35	-0,34	RS	
24	14,5	-1,1		RS-C	
11	8,00	-2,4		RS-F	
18	10,4	-1,9		RS-F	Ergebnis Probe A liegt an der BG
10b	17,0	-0,59		RS-S	
5b	17,0	-0,59		SP-R5	
13	14,7	-1,1		VT	

° Umrechnung S. 19

**Methoden:**

AQ-G12 = AgraQuant, RomerLabs

AS-G12 = AgraStrip (Lateral Flow ), RomerLabs

IL = Immunolab

RS = Ridascreen®, R-Biopharm

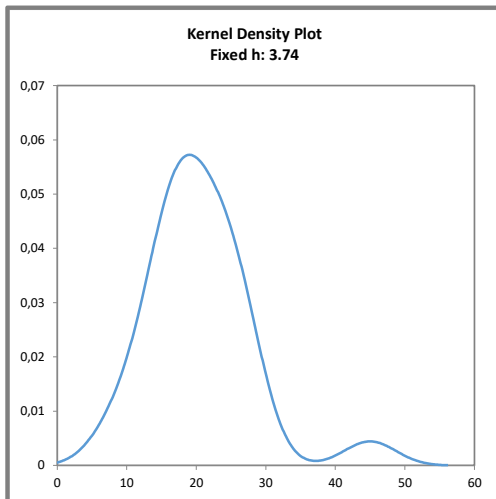
RS-C = Ridascreen® competitive, R-Biopharm

RS-F= Ridascreen® Fast, R-Biopharm

RS-S= Ridascreen® Fast sensitive, R-Biopharm

SP-R5 = SensiSpec Ingezim Gluten R5, Eurofins

VT = Veratox, Neogen

**Abb. / Fig. 11:**

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

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

**Anmerkung:**

Die Kerndichte-Schätzung zeigt annähernd eine symmetrische Verteilung der Ergebnisse mit einem Nebenpeak bei 45 mg/kg, der auf ein Ergebnis außerhalb des Zielbereiches zurückgeht.

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

<b>Kenndaten</b>	<b>Alle Ergebnisse</b> [mg/kg]	<b>Methode RS</b> [mg/kg]
Zugewiesener Wert ( $X_{pt}$ )	$X_{pt\_ALL}$	$X_{pt\_METHOD\_RS}$
Anzahl der Messergebnisse	24	13
Anzahl der Ausreißer	–	0
Mittelwert	20,5	20,0
Median	19,3	19,5
<b>Robuster Mittelwert (<math>X_{pt}</math>)</b>	<b>20,0</b>	<b>19,9</b>
<b>Robuste Standardabweichung (<math>S^*</math>)</b>	<b>5,83</b>	<b>3,72</b>
<i>Zielkenndaten:</i>		
<b>Zielstandardabweichung <math>\sigma_{pt}</math></b>	<b>4,99</b>	<b>4,97</b>
<b>Untere Grenze des Zielbereichs</b>	<b>10,0</b>	<b>9,94</b>
<b>Obere Grenze des Zielbereichs</b>	<b>29,9</b>	<b>29,8</b>
Quotient $S^*/\sigma_{pt}$	1,2	0,75
Standardunsicherheit $U(X_{pt})$	1,49	1,29
Ergebnisse im Zielbereich	22	13
Prozent im Zielbereich	92	100

**Methoden:**

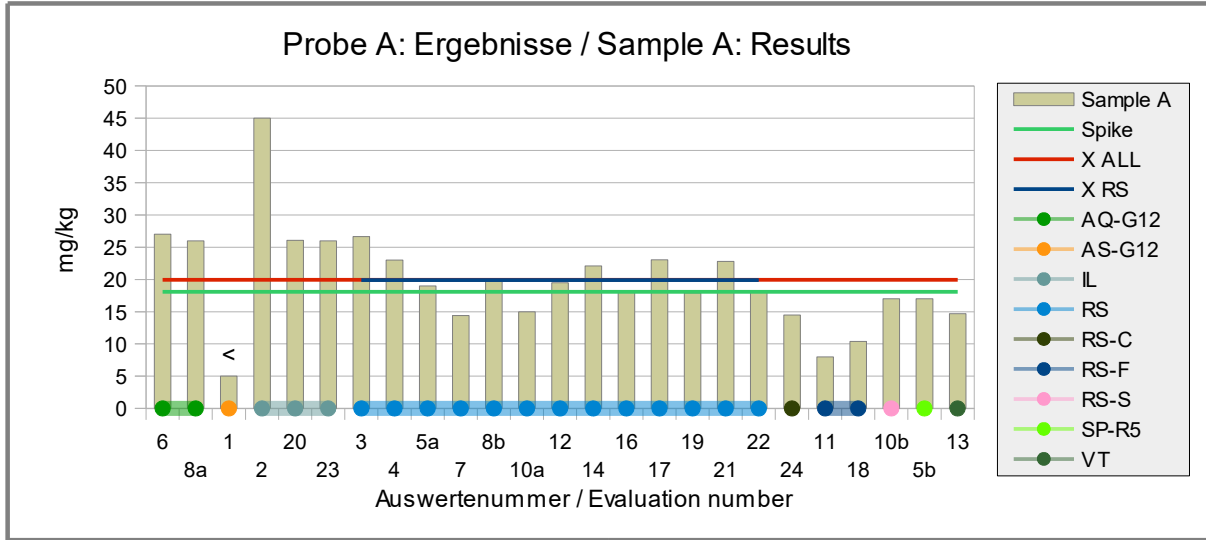
RS = R-Biopharm, Ridascreen®

Anmerkungen zu den Kenndaten und Vergleich der Bezugswerte:

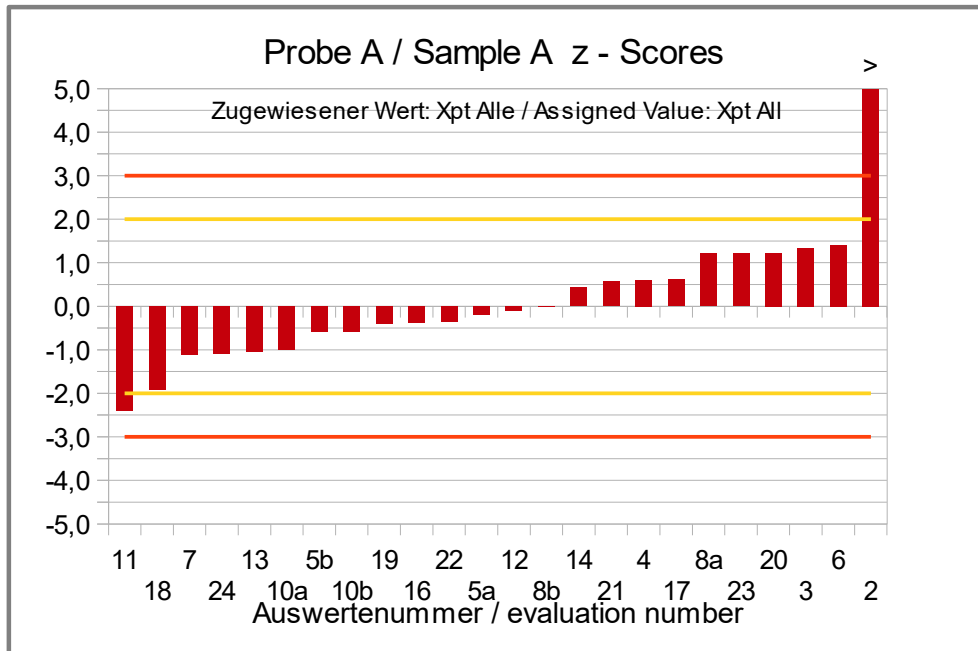
Die Kerndichte-Schätzung zeigte annähernd eine symmetrische Verteilung (ein hoher Einzelwert).

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

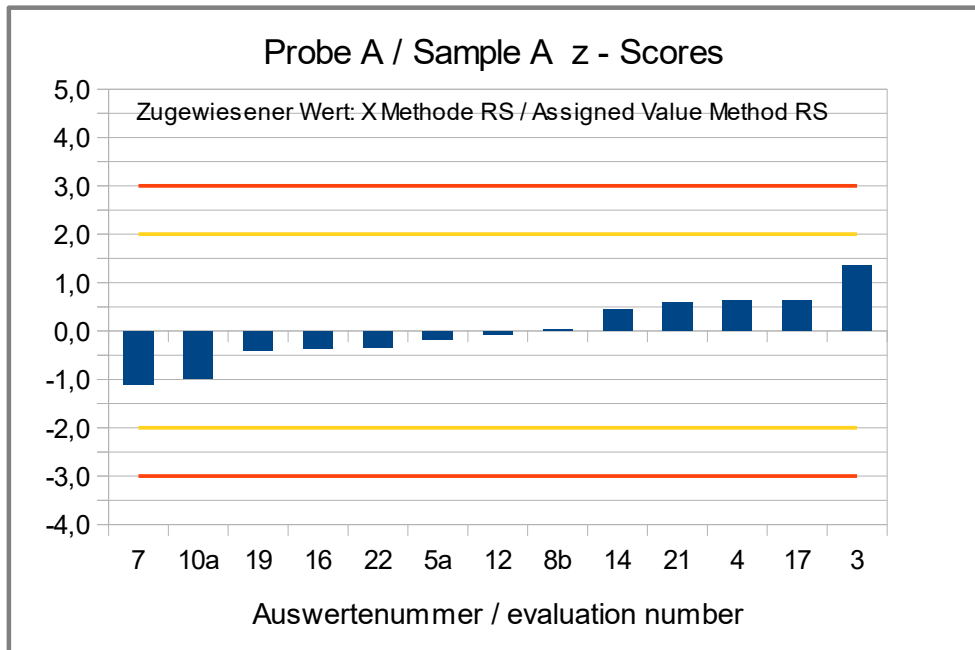
Die robusten Mittelwerte der Auswertungen lagen mit jeweils 110% vom Zusatzniveau von Gluten zu Probe A innerhalb der relevanten Anforderungen für die eingesetzten Methoden (s. 3.4.3 und S.46 "Wiederfindungsraten für Gluten").



**Abb./Fig. 12:** ELISA-Ergebnisse Gluten  
 grüne Linie = Zusatzniveau (Spike)  
 rote Linie = robuster Mittelwert aller Ergebnisse  
 blaue Linie = robuster Mittelwert Ergebnisse Methode RS  
 runde Symbole = Zuordnung der Methoden (s. Legende)



**Abb./Fig. 13:**  
 z-Scores ELISA-Ergebnisse als Gluten  
 Zugewiesener Wert: robuster Mittelwert aller Ergebnisse



**Abb./Fig. 14:**

z-Scores ELISA-Ergebnisse als Gluten Bezugswert robuster Mittelwert  
Ergebnisse Methode RS (R-Biopharm, Ridascreen)



**Quantitative Auswertung ELISA: Dotierungsniveauprobe**

Auswertenummer	Gluten	z-Score X <sub>pt,ALL</sub>	z-Score X <sub>pt,RS</sub>	Methode	Hinweis
	[mg/kg]				
6	49,0	0,37		AQ-G12	
8a	45,0	0,01		AQ-G12	
1	<5			AS-G12	
2	94,4			IL	Ergebnis ausgeschlossen
20	176			IL	Ergebnis ausgeschlossen
23	148			IL	Ergebnis umgerechnet ° Ergebnis ausgeschlossen
3	56,2	1,0	0,88	RS	
4	43,6	-0,12	-0,21	RS	
5a	53,0	0,72	0,60	RS	
7	46,4	0,13	0,03	RS	
8b	51,0	0,54	0,43	RS	
10a	26,0	-1,7	-1,7	RS	
12	39,1	-0,52	-0,60	RS	
14	43,5	-0,12	-0,22	RS	
16	48,2	0,29	0,19	RS	
17	40,5	-0,39	-0,48	RS	
19	39,0	-0,53	-0,61	RS	
21	57,2	1,1	0,96	RS	
22	47,0	0,18	0,08	RS	
24	58,5	1,2		RS-C	
11	25,0	-1,8		RS-F	
18	38,3	-0,59		RS-F	
10b	>20			RS-S	
5b	42,0	-0,26		SP-R5	
13	37,5	-0,66		VT	

° Umrechnung S. 19

**Methoden:**

AQ-G12 = AgraQuant, RomerLabs

AS-G12 = AgraStrip (Lateral Flow ), RomerLabs

IL = Immunolab

RS = Ridascreen®, R-Biopharm

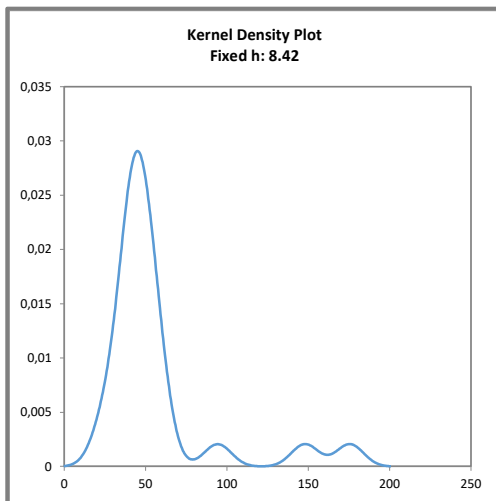
RS-C = Ridascreen® competitive, R-Biopharm

RS-F= Ridascreen® Fast, R-Biopharm

RS-S= Ridascreen® Fast sensitive, R-Biopharm

SP-R5 = SensiSpec Ingezim Gluten R5, Eurofins

VT = Veratox, Neogen



**Abb. / Fig. 15:**

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

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

**Anmerkung:**

Die Kerndichte-Schätzung zeigt annähernd eine symmetrische Verteilung mit mehreren Nebenpeaks bei 90-180 mg/kg, die auf Ergebnisse der Methode IL zurückgehen.

**Kenndaten: Quantitative Auswertung ELISA Gluten****Dotierungsniveauprobe**

<b>Kenndaten</b>	<b>Alle Ergebnisse</b> [mg/kg]	<b>Methode RS</b> [mg/kg]
Zugewiesener Wert ( $X_{pt}$ )	$X_{pt\_ALL}$	$X_{pt\_METHOD\ RS}$
Anzahl der Messergebnisse	20 <sup>°</sup>	13
Anzahl der Ausreißer	3	0
Mittelwert	44,3	45,4
Median	44,3	46,4
<b>Robuster Mittelwert (<math>X_{pt}</math>)</b>	<b>44,9</b>	<b>46,1</b>
<b>Robuste Standardabweichung (<math>S^*</math>)</b>	<b>8,74</b>	<b>7,93</b>
<i>Zielkenndaten:</i>		
<b>Zielstandardabweichung <math>\sigma_{pt}</math></b>	<b>11,2</b>	<b>11,5</b>
<b>Untere Grenze des Zielbereichs</b>	<b>22,4</b>	<b>23,0</b>
<b>Obere Grenze des Zielbereichs</b>	<b>67,3</b>	<b>69,1</b>
<i>Quotient <math>S^*/\sigma_{pt}</math></i>	<i>0,78</i>	<i>0,69</i>
<i>Standardunsicherheit <math>U(X_{pt})</math></i>	<i>2,44</i>	<i>2,75</i>
<i>Ergebnisse im Zielbereich</i>	<i>20</i>	<i>13</i>
<i>Prozent im Zielbereich</i>	<i>100</i>	<i>100</i>

<sup>°</sup> ohne Ergebnisse Nr. 2, 20 u. 23 (Methode IL vorab ausgeschlossen)

**Methoden:**

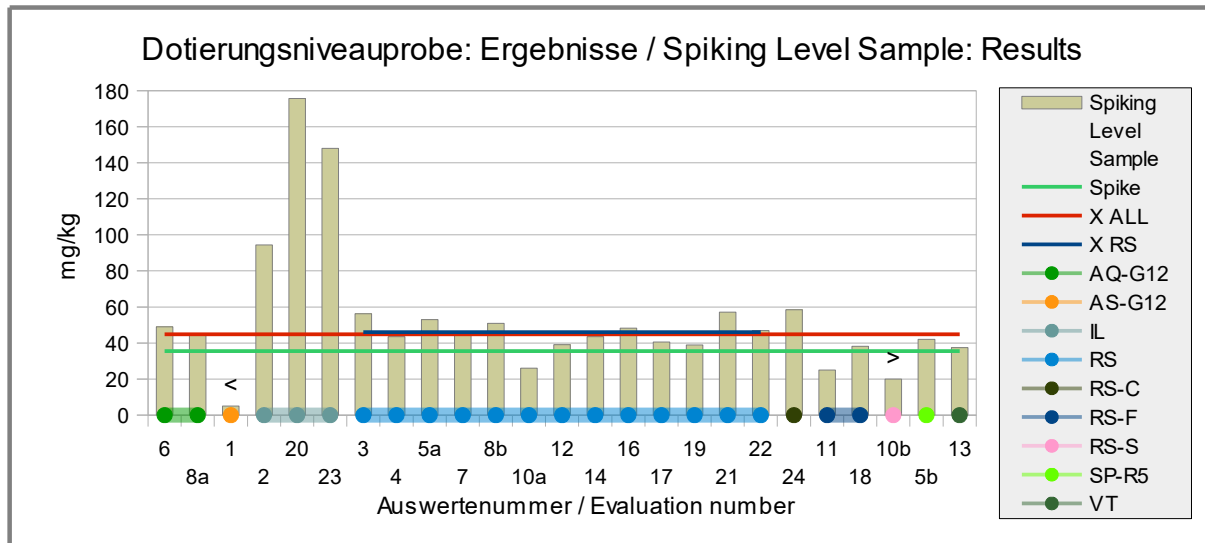
RS = R-Biopharm, Ridascreen®

Anmerkungen zu den Kenndaten und Vergleich der Bezugswerte:

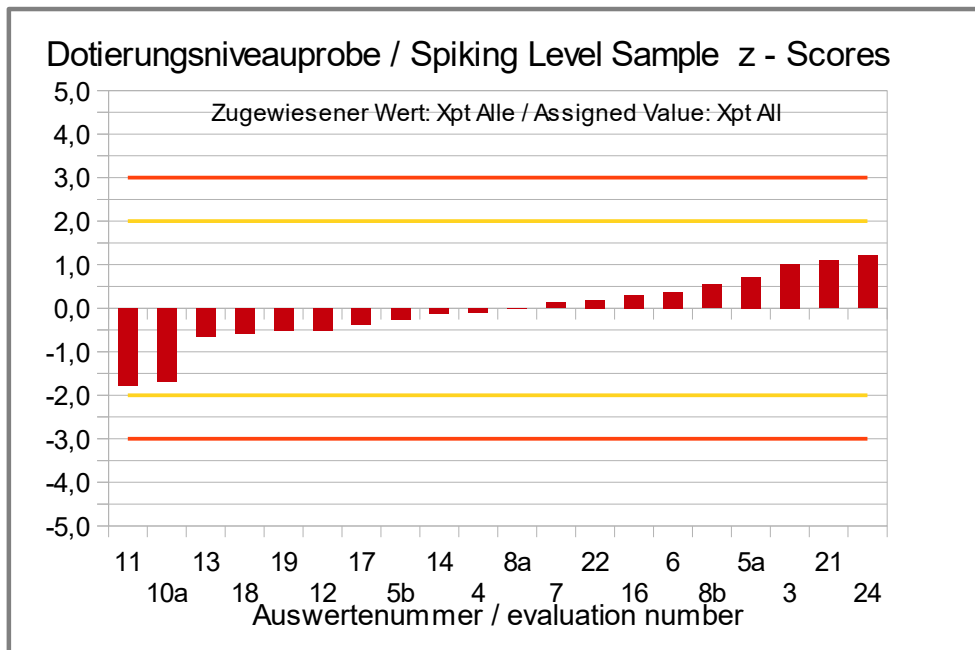
Die Kerndichte-Schätzung zeigte einen methodenabhängigen Unterschied der Methode IL. Die Ergebnisse wurden daher nicht für die quantitative Auswertung berücksichtigt.

Die Verteilung der Ergebnisse aller Methoden sowie für Methode RS zeigte jeweils eine geringe Variabilität. Die Quotienten  $S^*/\sigma_{pt}$  lagen unter 1,0. Die robusten Standardabweichungen liegen im unteren Bereich von etablierten Werten für die Wiederhol- und Vergleichsstandardabweichung der eingesetzten Bestimmungsmethoden (vgl. 3.4.2 Auswertung eines Versuchs zur Präzision und 3.4.3 Werte aus Erkenntnissen). Die Vergleichbarkeit der Ergebnisse ist gegeben. Diese Aussage ist für die methodenübergreifende Auswertung nur eingeschränkt gültig, da für einige Methoden nur wenige Ergebnisse vorlagen.

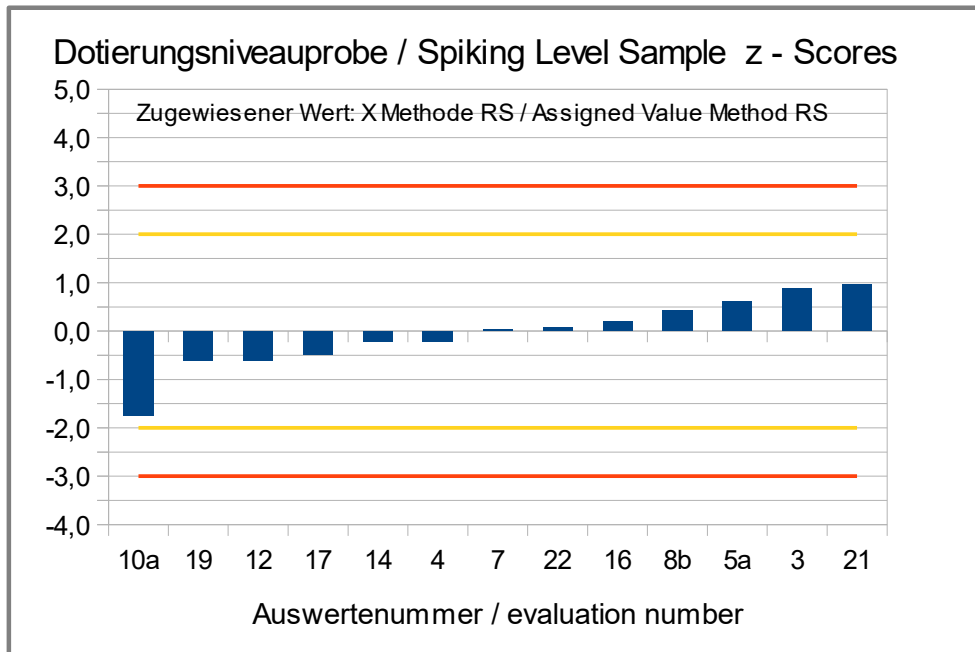
Die robusten Mittelwerte der Auswertungen lagen mit 126% bzw. 129% vom Zusatzniveau von Gluten zur Dotierungsniveauprobe innerhalb der relevanten Anforderungen für die eingesetzten Methoden (s. 3.4.3 und S.46 "Wiederfindungsraten für Gluten").



**Abb./Fig. 16:** ELISA-Ergebnisse Gluten  
 grüne Linie = Zusatzniveau (Spike)  
 rote Linie = robuster Mittelwert aller Ergebnisse  
 blaue Linie = robuster Mittelwert Ergebnisse Methode RS  
 runde Symbole = Zuordnung der Methoden (s. Legende)



**Abb./Fig. 17:**  
 z-Scores ELISA-Ergebnisse als Gluten  
 Zugewiesener Wert: robuster Mittelwert aller Ergebnisse



**Abb./Fig. 18:**

z-Scores ELISA-Ergebnisse als Gluten Bezugswert robuster Mittelwert  
 Ergebnisse Methode RS (R-Biopharm, Ridascreen)

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

Auswertenummer	Dotierungsniveauprobe	Wiederfindungsrate*		Probe A	Wiederfindungsrate*		Methode	Hinweis
		[mg/kg]	[%] [Z <sub>RR</sub> ]		[mg/kg]	[%] [Z <sub>RR</sub> ]		
6	49,0	<b>138</b>	1,5	27,0	<b>149</b>	2,0	AQ-G12	
8a	45,0	<b>126</b>	1,1	26,0	<b>144</b>	1,7	AQ-G12	
1	<5			<5			AS-G12	
2	94,4	265	6,6	45,0	249	5,9	IL	
20	176	493	16	26,1	<b>144</b>	1,8	IL	
23	148	416	13	26,0	<b>144</b>	1,7	IL	Ergebnis umgerechnet °
3	56,2	158	2,3	26,6	<b>147</b>	1,9	RS	
4	43,6	<b>122</b>	0,90	23,0	<b>127</b>	1,1	RS	
5a	53,0	<b>149</b>	2,0	19,0	<b>105</b>	0,20	RS	
7	46,4	<b>130</b>	1,2	14,4	<b>80</b>	-0,82	RS	
8b	51,0	<b>143</b>	1,7	20,0	<b>110</b>	0,42	RS	
10a	26,0	<b>73</b>	-1,1	15,0	<b>83</b>	-0,69	RS	
12	39,1	<b>110</b>	0,39	19,5	<b>108</b>	0,31	RS	
14	43,5	<b>122</b>	0,89	22,1	<b>122</b>	0,88	RS	
16	48,2	<b>135</b>	1,4	18,1	<b>100</b>	0,00	RS	
17	40,5	<b>114</b>	0,55	23,0	<b>127</b>	1,1	RS	
19	39,0	<b>110</b>	0,38	17,9	<b>99</b>	-0,04	RS	
21	57,2	161	2,4	22,8	<b>126</b>	1,0	RS	
22	47,0	<b>132</b>	1,3	18,2	<b>101</b>	0,02	RS	
24	58,5	164	2,6	14,5	<b>80</b>	-0,80	RS-C	
11	25,0	<b>70</b>	-1,2	8,00	44	-2,2	RS-F	
18	38,3	<b>108</b>	0,30	10,4	<b>57</b>	-1,7	RS-F	Ergebnis liegt an der BG
10b	>20			17,0	<b>94</b>	-0,24	RS-S	
5b	42,0	<b>118</b>	0,72	17,0	<b>94</b>	-0,24	SP-R5	
13	37,5	<b>105</b>	0,21	14,7	<b>81</b>	-0,75	VT	

° Umrechnung S. 19

AB**	50-150 %	AB**	50-150 %
Anzahl im AB	<b>17</b>	Anzahl im AB	<b>22</b>
Prozent im AB	<b>74</b>	Prozent im AB	<b>92</b>

\* Wiederfindungsrate 100% Bezugsgröße: Gluten, s. Seite 5

\*\* Akzeptanzbereich der AOAC für Allergen-ELISAs

**Methoden:**

- AQ-G12 = AgraQuant, RomerLabs
- AS-G12 = AgraStrip (Lateral Flow), RomerLabs
- IL = Immunolab
- RS = Ridascreen®, R-Biopharm
- RS-C = Ridascreen® competitive, R-Biopharm
- RS-F = Ridascreen® Fast, R-Biopharm
- RS-S = Ridascreen® Fast sensitive, R-Biopharm
- SP-R5 = SensiSpec Ingezim Gluten R5, Eurofins
- VT = Veratox, Neogen

Anmerkung:

74% (17) der Teilnehmer haben mit der Dotierungsniveauprobe mittels ELISA eine Wiederfindungsrate im Bereich der AOAC-Anforderung von 50-150% erhalten. Für die prozessierte dotierte Lebensmittelmatrix-Probe A lagen 92% (22) der Wiederfindungsraten in diesem Akzeptanzbereich. Die zugehörigen z-Scores basieren auf der Zielstandardabweichung von 25%.

4.2.2 PCR-Ergebnisse: Weizen (Gluten)

Qualitative Auswertung der Ergebnisse: Proben A und B

Auswertenummer	Probe A	Probe A	Probe B	Probe B	Qualitative Bewertung	Methode	Hinweis
	pos/neg	[mg/kg]	pos/neg	[mg/kg]	Übereinstimmungen mit Konsenswerten		
12	positiv		negativ		2/2 (100%)	ASU	
15	positiv		positiv		1/2 (50%)	SFA	Probe A in Spuren positiv
22a	positiv	15,1	negativ	<1	2/2 (100%)	SFA-ID	Angegeben als „Glutenhaltiges Getreide“
22b	positiv	14,0	negativ	<1	2/2 (100%)	SFA-ID	Angegeben als „Weizen“
5	positiv		negativ		2/2 (100%)	div	
11	positiv	3,00	negativ		2/2 (100%)	div	
14	positiv		negativ		2/2 (100%)	div	Probe A in Spuren positiv

	Probe A	Probe B
Anzahl positiv	7	1
Anzahl negativ	0	6
Prozent positiv	100	14
Prozent negativ	0	86
Konsenswert	positiv	negativ

Methoden:

ASU = ASU §64 Methode/method  
 SFA = Sure Food ALLERGEN, R-Biopharm / Congen  
 SFA-ID = Sure Food Allergen ID, R-Biopharm / Congen  
 div = keine genaue Angabe / andere Methode  
 div = not indicated / other method

Anmerkung:

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

Quantitative Auswertung PCR: Probe A

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

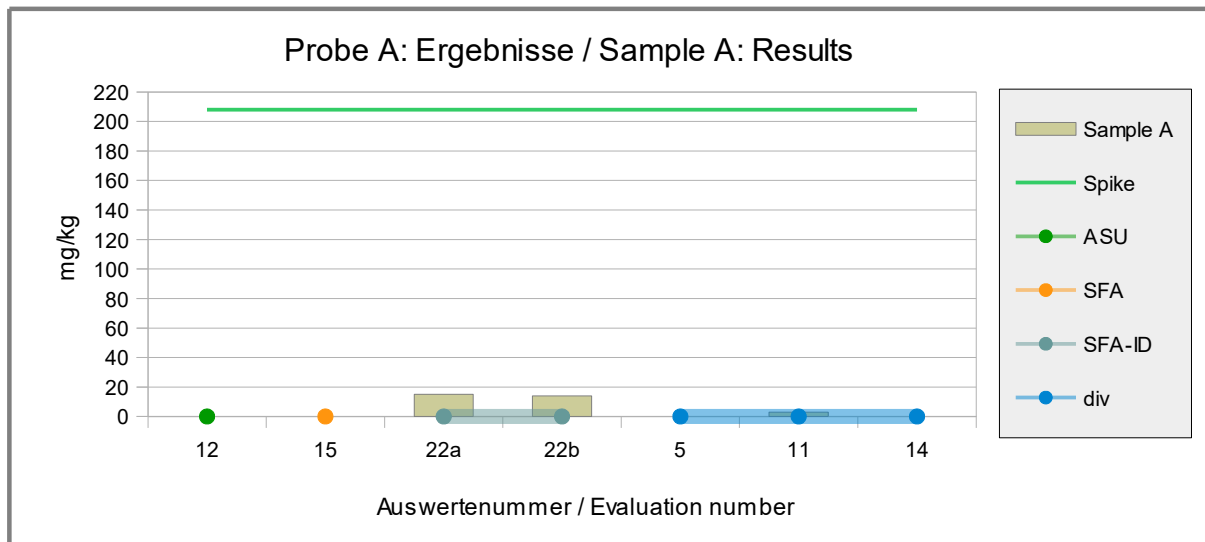


Abb./Fig. 19: PCR-Ergebnisse glutenhaltiges Getreide – Weizen  
 grüne Linie = Zusatzniveau (Spike)  
 runde Symbole = Zuordnung der Methoden (s. Legende)

**Quantitative Auswertung PCR: Dotierungsniveauprobe**

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

Auswertenummer	Glutenhaltige Getreide	Glutenhaltige Getreide	z-Score X <sub>pt</sub> ALL	Methode	Hinweis
	pos/neg	[mg/kg]			
12	positiv			ASU	
15	positiv			SFA	
22a	positiv	107		SFA-ID	Angegeben als „Glutenhaltige Getreide“
22b	positiv	140		SFA-ID	Angegeben als „Weizen“
5	positiv			div	
11	positiv	780		div	
14	positiv			div	

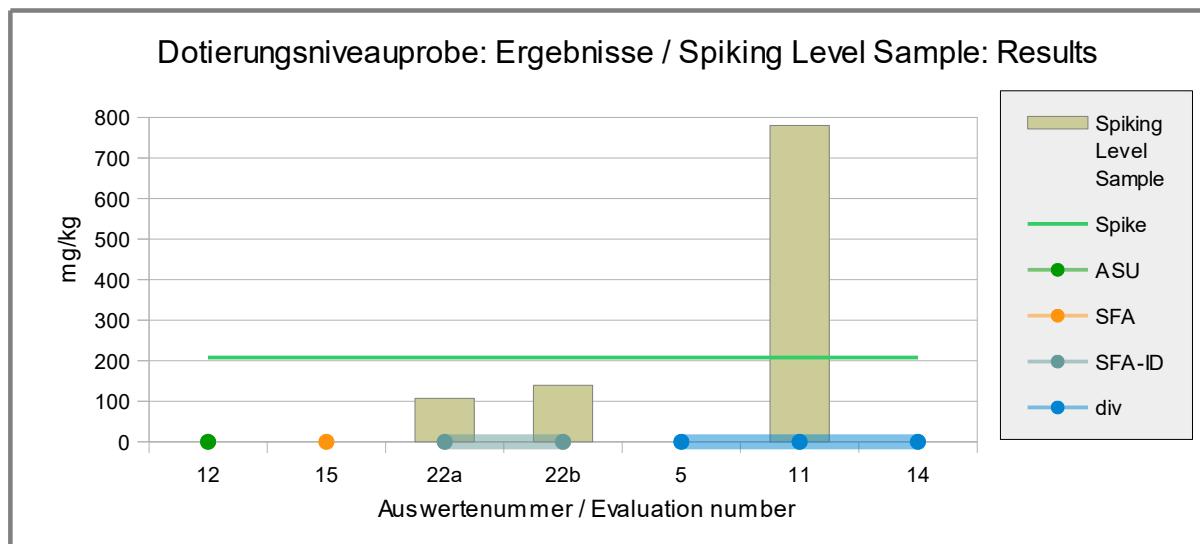
Anzahl positiv	7
Anzahl negativ	0
Prozent positiv	100
Prozent negativ	0
Konsenswert	positiv

**Methoden:**

ASU = ASU §64 Methode/method  
 SFA = Sure Food ALLERGEN, R-Biopharm / Congen  
 SFA-ID = Sure Food Allergen ID, R-Biopharm / Congen  
 div = keine genaue Angabe / andere Methode  
 div = not indicated / other method

Anmerkung:

Für die Dotierungsniveauprobe wurden ausschließlich positive Ergebnisse erhalten.



**Abb./Fig. 20:** PCR-Ergebnisse glutenhaltige Getreide – Weizen  
 grüne Linie = Zusatzniveau (Spike)  
 runde Symbole = Zuordnung der Methoden (s. Legende)



**Wiederfindungsraten mit z-Scores PCR für Weizen (Gluten):  
Dotierungsniveauprobe und Probe A**

Auswertenummer	Dotierungsniveauprobe	Wiederfindungsrate*		Probe A	Wiederfindungsrate*		Methode	Hinweis
		[m g/kg]	[%] [Z <sub>RR</sub> ]		[m g/kg]	[%] [Z <sub>RR</sub> ]		
12							ASU	
15							SFA	
22a	107	26	-3,0	15,1	7,3	-3,7	SFA-ID	Angegeben als „Glutenhaltige Getreide“
22b	140	34	-2,6	14,0	6,7	-3,7	SFA-ID	Angegeben als „Weizen“
5							div	
11	780	191	3,6	3,00	1,4	-3,9	div	
14							div	

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

**Methoden:**

ASU = ASU §64 Methode/method  
 SFA = Sure Food ALLERGEN, R-Biopharm / Congen  
 SFA-ID = Sure Food Allergen ID, R-Biopharm / Congen  
 div = keine genaue Angabe / andere Methode  
 div = not indicated / other method

\* Wiederfindungsrate 100% Bezugsgröße: Weizen, s. Seite 5

\*\* Akzeptanzbereich der AOAC für Allergen-ELISAs

Anmerkung:

Keiner der Teilnehmer hat mit der Dotierungsniveauprobe oder mit der prozessierten dotierten Lebensmittelmatrix-Probe A mittels PCR eine Wiederfindungsrate im Bereich der AOAC-Anforderung von 50-150% erhalten. Die zugehörigen z-Scores basieren auf der Zielstandardabweichung von 25%.

4.2.3 PCR-Ergebnisse: Andere**Qualitative Auswertung der Ergebnisse**

Auswertenummer	Probe A	Probe B	Dotierungsniveauprobe	Methode	Hinweis
	pos/neg	pos/neg	pos/neg		
12	positiv	positiv	negativ	div	Buchweizen
12	negativ	negativ	negativ	div	Gerste
12	negativ	negativ	negativ	div	Hafer
12	negativ	negativ	negativ	div	Roggen

**Methoden:**

div = keine genaue Angabe / andere Methode

div = not indicated / other method

### 4.3 z-Scores der Teilnehmer: Übersichtstabelle

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

Auswertenummer	ELISA Soja: Xpt (div. Methoden)		ELISA Soja: Xpt (Methode: RS-F)		ELISA Gluten: Xpt (div. Methoden)		ELISA Gluten: Xpt (Methode: RS)	
	Probe A	Dot. Probe	Probe A	Dot. Probe	Probe A	Dot. Probe	Probe A	Dot. Probe
1	-	-	-	-	-	-	-	-
2	-	-2,6	-	-	5,0	-	-	-
3	-	-	-	-	1,3	1,0	1,4	0,88
4	0,41	-0,64	0,69	-0,32	0,61	-0,12	0,63	-0,21
5 / 5a	0,15	-2,0	-	-	-0,19	0,72	-0,18	0,60
5b	-	-	-	-	-0,59	-0,26	-	-
6	-	2,3	-	-	1,4	0,37	-	-
7	-0,43	-0,51	-0,21	-0,19	-1,1	0,13	-1,1	0,03
8 / 8a	-	3,1	-	-	1,2	0,01	-	-
8b	-	-	-	-	0,01	0,54	0,02	0,43
9 / 9a	-1,3	-	-1,1	-	-	-	-	-
9b	-	-	-	-	-	-	-	-
10 / 10a	-2,9	-	-2,8	-3,4	-0,99	-1,7	-0,98	-1,7
10b	-	-	-	-	-0,59	-	-	-
11	-	-	-	-	-2,4	-1,8	-	-
12	1,3	0,17	1,6	0,56	-0,09	-0,52	-0,08	-0,60
13	-	2,9	-	-	-1,1	-0,66	-	-
14	0,25	0,10	0,52	0,48	0,43	-0,12	0,45	-0,22
15	-	-	-	-	-	-	-	-
16	-	-	-	-	-0,37	0,29	-0,36	0,19
17	-	-	-	-	0,62	-0,39	0,63	-0,48
18	-	-	-	-	-1,9	-0,59	-	-
19	0,77	-0,10	1,1	0,26	-0,41	-0,53	-0,40	-0,61
20	-	-	-	-	1,2	-	-	-
21	-0,53	-0,67	-0,31	-0,36	0,57	1,1	0,59	0,96
22 / 22a	-0,60	0,06	-0,38	0,44	-0,35	0,18	-0,34	0,08
22b	-	-1,1	-	-	-	-	-	-
23	2,5	-0,32	-	-	1,2	-	-	-
24	-	-	-	-	-1,1	1,2	-	-

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

Bewertung des z-Scores / valuation of z-score (DIN ISO 13528:2009-01):  
 -2 ≤ z-score ≤ 2 erfolgreich / successful (in green)  
 -2 > z-score > 2 „Warnsignal“ / warning signal (in yellow)  
 -3 > z-score > 3 „Eingriffssignal“ / action signal (in red)

**Z-Scores für die zugewiesenen Werte des Zusatzniveaus (Wiederfindungsraten)**

Auswertenummer	ELISA Soja: Xpt (div. Methoden)		ELISA Gluten: Xpt (div. Methoden)		PCR Soja: Xpt (div. Methoden)		PCR Gluten: Xpt (div. Methoden)	
	Probe A	Dot. Probe	Probe A	Dot. Probe	Probe A	Dot. Probe	Probe A	Dot. Probe
1	-	-	-	-	-	-	-	-
2	-3,9	-1,7	5,9	6,6	-	-	-	-
3	-	-	1,9	2,3	-	-	-	-
4	-0,95	1,4	1,1	0,90	-	-	-	-
5 / 5a	-1,1	-0,77	0,20	2,0	-	-	-	-
5b	-	-	-0,24	0,72	-	-	-	-
6	-	6,2	2,0	1,5	-	-	-	-
7	-1,5	1,7	-0,82	1,2	-	-	-	-
8 / 8a	-3,5	7,6	1,7	1,1	-	-	-	-
8b	-	-	0,42	1,7	-	-	-	-
9 / 9a	-2,1	-	-	-	-	-	-	-
9b	-	-	-	-	-	-	-	-
10 / 10a	-3,2	-3,1	-0,69	-1,1	-	-	-	-
10b	-	-	-0,24	-	-	-	-	-
11	-	-	-2,2	-1,2	-3,8	-2,8	-3,9	3,6
12	-0,4	2,8	0,31	0,39	-	-	-	-
13	-3,5	7,2	-0,75	0,21	-	-	-	-
14	-1,1	2,6	0,88	0,89	-	-	-	-
15	-	-	-	-	-	-	-	-
16	-	-	0,00	1,4	-3,4	0,86	-	-
17	-4,0	17	1,1	0,55	-	-	-	-
18	-	-	-1,7	0,30	-	-	-	-
19	-0,70	2,3	-0,04	0,38	-	-	-	-
20	-4,0	-3,7	1,8	16	-	-	-	-
21	-1,6	1,4	1,0	2,4	-	-	-	-
22 / 22a	-1,6	2,6	0,02	1,3	-0,99	-1,5	-3,7	-3,0
22b	-4,0	0,7	-	-	-	-	-3,7	-2,6
23	0,48	2,0	1,7	13	-	-	-	-
24	-3,5	-	-0,80	2,6	-	-	-	-

Bewertung des z-Scores / valuation of z-score (DIN ISO 13528:2009-01):

-2 ≤ z-score ≤ 2 erfolgreich / successful (in green)

-2 > z-score > 2 „Warnsignal“ / warning signal (in yellow)

-3 > z-score > 3 „Eingriffssignal“ / action signal (in red)

## 5. Dokumentation

### 5.1 Angaben der Teilnehmer

Hinweis: Angaben in englischer Sprache wurden von DLA nach bestem Wissen ins Deutsche übersetzt (ohne Gewähr der Richtigkeit).

#### 5.1.1 ELISA: Soja

Meth. Abk.	Auswertenummer	Datum der Analyse	Ergebnis Probe A		Ergebnis Probe B		Ergebnis Dotierungsneueprobe		NWG / LOD *	BG / LOQ *	MU*	Angabe quantitatives Ergebnis als z.B. Lebensmittel / Protein	Methode
			qualitativ	mg/kg	qualitativ	mg/kg	qualitativ	mg/kg					
		Tag/Monat											ELISA Test-Kit + Anbieter
AQ	6	04.03.20	negativ	< LOQ	negativ	< LOQ	positiv	60	0,87	2,2	40	Sojaprotein	AgraQuant ELISA Soy COKAL0448, RomerLabs
AQ	8	27.03.20	positiv	2,6	negativ	<LOD	positiv	68	0,87	2,18	40	Sojaprotein	AgraQuant ELISA Soy COKAL0448, RomerLabs
AT	17	23.04.20	negativ	0,02	negativ	-4,13	positiv	124,48	9,5	114		Sojaprotein	AlerTox Soy (STI) ELISA, Biomedal
IL-SP	23	25.02.20	positiv	25	negativ	< 0,5	positiv	35	0,2	2		Sojaprotein	SENSISpec Soy Protein Total ELISA
IL-STI	2	26.02.20	positiv	0,024	negativ	< 0,04	positiv	0,94	0,04			Sojaprotein	Immunolab Soy ELISA
IL-STI	20	19.03.20	positiv	0,05	negativ	<0,04	positiv	1,54	0,016	0,04		Sojaprotein	Immunolab Soy ELISA
MHI	5	28.02.	positiv	16	negativ	<0,31	positiv	19	0,31	0,31		Sojaprotein	Morinaga Soya ELISA Kit II
RS-F	4	03.03.20	-	17	-	< BG	-	32		2,5		Sojaprotein	Ridascreen® FAST Soya R7102, R-Biopharm
RS-F	7	27.02.20	positiv	13,76	negativ	<2,5	positiv	33,2	0,24	2,5		Sojaprotein	Ridascreen® FAST Soya R7102, R-Biopharm
RS-F	9a		positiv	10,4	negativ	< 2,5	positiv	> 20		2,5		Sojaprotein	Ridascreen® FAST Soya R7102, R-Biopharm
RS-F	10	20.03.20	positiv	13	negativ	<2,5	positiv	16		2,5		Sojamehl	Ridascreen® FAST Soya R7102, R-Biopharm
RS-F	12	3.+17.03.2020	positiv	20,3	negativ		positiv	39,7	0,31	2,5	25	Sojaprotein	Ridascreen® FAST Soya R7102, R-Biopharm
RS-F	14	13.03.	positiv	16,4	negativ		positiv	39	2,5	2,5	50	Sojaprotein	Ridascreen® FAST Soya R7102, R-Biopharm
RS-F	19	29.04.	-	18,4	-	5,7	positiv	37,1	0,24	2,5	63,1	Sojaprotein	Ridascreen® FAST Soya R7102, R-Biopharm
RS-F	21	15.04.	positiv	13,38	negativ	<2,5	positiv	31,71	0,24	2,5		Sojaprotein	Ridascreen® FAST Soya R7102, R-Biopharm
RS-F	22a	05.03.20	positiv	13,12	negativ	<2,5	positiv	38,64	2,5	2,5		Sojaprotein	Ridascreen® Fast Soya R7102, R-Biopharm
VT	9b		-		negativ	< 1,17	positiv	> 11,8		1,17		Sojaprotein	Veratox Soy Allergen, Neogen
VT	13	19.03.20	-	2,8	-	0	-	66				Protein	NEOGEN Veratox Soja Allergen Test
VT	22b	05.03.2020	negativ	<2,5	negativ	<2,5	positiv	81	2,5	2,5		Sojamehl	Veratox Soy Allergen, Neogen
VT	24	16.03.20	-	2,53	-	<2,5	-	>25		2,5		Protein	Selection Soya-Kits: Neogen Veratox

\* NWG Nachweisgrenze / BG Bestimmungsgrenze

\* LOD limit of detection / LOQ limit of quantitation

\* MU Messunsicherheit / MU measurement uncertainty

Fortsetzung ELISA Soja:

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	6	STI	wässriger Puffer/15 Minuten/60°C	nein	
AQ	8			ja	
AT	17				
IL-SP	23				Umrechnungsfaktor für geröstetes Sojamehl: 2.2 -> 55 ppm für Probe A
IL-STI	2				Um aus dem ermittelten STI-Gehalt den Gehalt eines zugrundeliegenden Rohprodukts zu erhalten, muss das Ergebnis mit einem entsprechenden Umrechnungsfaktor (F) multipliziert werden. (Soja-Mehl ungeröstet: 42, Soja-Mehl geröstet: 470)
IL-STI	20	STI	Extraktionspuffer (im Kit enthalten) /15min/ 60°C	ja	
MH-I	5	erkennt das Sojaprotein Beta-Conglycinin	lt. Herstellerangaben	ja	M2117
RS-F	4	Antikörper erkennen spezifisch erhitze Sojaproteine	nach Testanleitung	ja	
RS-F	7		lt. Testkitbeschreibung	ja	
RS-F	9a			ja	
RS-F	10				
RS-F	12	Die eingesetzten Antikörper erkennen spezifisch erhitze Sojaproteine.	lt. Kit	ja	-
RS-F	14	Sojaprotein		ja	
RS-F	19			ja	
RS-F	21	AK für erhitze Sojaproteine	nach Testkitanleitung	nein	
RS-F	22a	Gemäß Kitanleitung	Gemäß Kitanleitung	nein	
VT	9b			ja	
VT	13	Soja	15 min / 60°C		
VT	22b	Gemäß Kitanleitung	Gemäß Kitanleitung	ja	
VT	24			ja	

5.1.2 ELISA: Gluten

Meth. Abk.	Auswertenummer	Datum der Analyse	Ergebnis Probe A		Ergebnis Probe B		Ergebnis Dotierungsneveuprobe		NWG / LOD *	BG / LOQ *	MU*	Angabe quantitatives Ergebnis als z.B. Lebensmittel / Protein	Methode
			qualitativ	mg/kg	qualitativ	mg/kg	qualitativ	mg/kg					
		Tag/Monat											ELISA Test-Kit + Anbieter
AQ-G12	6	04.03.20	positiv	27	negativ	< LOQ	positiv	49	2	4	40	Gluten	AgraQuant ELISA Gluten G12 COKAL0200, RomerLabs
AQ-G12	8a	26.03.20	positiv	26	negativ	<LOD	positiv	45	2	4	40	Gluten	AgraQuant ELISA Gluten G12 COKAL0200, RomerLabs
AS-G12	1		negativ	5–20	negativ	5–20	positiv	5–20	5ppm	5–20ppm		Gluten	Glutenschnelltest Agrastrip Allergen Gluten G12 (Romer Labs)
IL	2	26.02.20	positiv	45	negativ	< 4	positiv	94,4	4			Gluten	Immunolab Gliadin/Gluten ELISA
IL	20	19.03.20	positiv	26,06	negativ	<4,00	positiv	175,56	0,6	4		Gluten	Immunolab Gliadin/Gluten ELISA
IL	20	04.05.20	positiv	78,66	negativ		positiv	186,17				Gluten	Immunolab Gliadin/Gluten ELISA
IL	23	14.04.20	positiv	13	negativ	< 0.5	positiv	74	0.3	2		Gliadin	Immunolab Gliadin/Gluten ELISA
RS	3	18.03.20	positiv	26,63	negativ	<5,00	positiv	56,17	1	5		Gluten	Ridascreen® Gliadin R7001, R-Biopharm
RS	4	26/27/02/20	-	23	-	< BG	-	43,6		5		Gluten	Ridascreen® Gliadin R7001, R-Biopharm
RS	5a	25.02.	positiv	19	negativ	<5	positiv	53	3	5		Gluten	Ridascreen® Gliadin R7001, R-Biopharm
RS	7	03.03.20	positiv	14,4	negativ	<5,0	positiv	46,35	1	5		Gluten	Ridascreen® Gliadin R7001, R-Biopharm
RS	8b	03.11.20	positiv	20	negativ	<LOD	positiv	51	1	5	50	Gluten	Ridascreen® Gliadin R7001, R-Biopharm
RS	10a		positiv	15	negativ	<5	positiv	26		5		Gluten	Ridascreen® Gliadin R7001, R-Biopharm
RS	12	2.+12.3.20	positiv	19,5	negativ		positiv	39,1	1	5	25	Gluten	Ridascreen® Gliadin R7001, R-Biopharm
RS	14	19.03.	positiv	22,1	negativ		positiv	43,5	5	5	50	Gluten	Ridascreen® Gliadin R7001, R-Biopharm
RS	16	03.03.20	-	18,1	-	<3.0	-	48,2				Gluten	Ridascreen® Gliadin R7001, R-Biopharm
RS	17	24.04.20	positiv	23,04	negativ	<5	positiv	40,52	5	80		Gluten	Ridascreen® Gliadin R7001, R-Biopharm
RS	19	26.03.	-	17,9	-	<5	positiv	39	1	5	52	Gluten	Ridascreen® Gliadin R7001, R-Biopharm
RS	21	15.04.	positiv	22,8	negativ	<5	positiv	57,15	1	5		Gluten	Ridascreen® Gliadin R7001, R-Biopharm
RS	22	23.03.2020	positiv	18,21	negativ	<5	positiv	46,95	5	5		Gluten	Ridascreen® Gliadin R7001, R-Biopharm
RS-C	24	15.03.20	-	14,5	-	<10	-	58,5		10		Protein	Selection Gluten-Kits: r-biopharm Ridascreen competitive
RS-F	11		positiv	8	negativ		positiv	25	5	10	50	Bitte auswählen!	Ridascreen® FAST Gliadin R7002, R-Biopharm
RS-F	18	29.04.20	negativ	10,38	negativ	<10	positiv	38,28	1	10		Gluten	Ridascreen® FAST Gliadin R7002, R-Biopharm
RS-S	10b		positiv	17	negativ	<2,5	positiv	>20		2,5		Gluten	Ridascreen® Fast Gliadin Sensitive R7051, R-Biopharm
SP-R5	5b	28.02.	positiv	17	negativ	<3,12	positiv	42	3,12	3,12		Gluten	SENSISpec Ingezim Gluten R5 30.GLU.K2, Eurofins
VT	13	19.03.20	-	14,7	-	0	-	37,5				Protein	NEOGEN Veratox Gliadin R5

\* NWG Nachweisgrenze / BG Bestimmungsgrenze  
 \* LOD limit of detection / LOQ limit of quantitation  
 \* MU Messunsicherheit / MU measurement uncertainty

Fortsetzung ELISA Gluten:

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-G12	6	Gluten	Extraktionspuffer/40 Minuten 50°C/Ethanol/60 Minuten Orbitalshaker	nein	
AQ-G12	8a			ja	
AS-G12	1				
IL	2				
IL	20		40% Ethanol / 5 min/ Raumtemperatur	ja	
IL	20		Immunolab: wie oben (E-Mail vom 5/6/2020)	nein	
IL	23				
RS	3	R5		ja	Akkreditierung nach ISO 17025 ist erfolgt, Bescheid ist noch ausständig
RS	4	R 5	nach Testanleitung	ja	
RS	5a	R5 Mendez, erkennt Prolamine aus Weizen, Roggen und Gerste	lt. Herstellerangaben	ja	
RS	7		lt. Testkitbeschreibung	ja	
RS	8b			ja	
RS	10a				
RS	12	R5	lt. Kit	ja	--
RS	14	Gliadine (R5-Antikörper)		ja	
RS	16				
RS	17				
RS	19		Aufarbeitung mit Cocktail R7006	ja	
RS	21	R5	nach Testkitanleitung	nein	
RS	22	Gemäß Kitanleitung	Gemäß Kitanleitung	ja	
RS-C	24			ja	
RS-F	11		nach manual	ja	
RS-F	18	Peroxidase-gekoppeltes R5 Antikörper	Rida Extraction Solution (colorless) Art. Nr R7098 / Methode nach Arbeitsanweisung von R-biopharm	nein	
RS-S	10b				
SP-R5	5b	R5 Mendez, erkennt Prolamine aus Weizen, Roggen und Gerste	lt. Herstellerangaben	ja	
VT	13	Gluten	40 min / 50°C		



5.1.3 PCR: Soja

Meth. Abk.	Auswertenummer	Datum der Analyse	Ergebnis Probe A		Ergebnis Probe B		Ergebnis Dotierungsneueprobe		NWG / LOD *	BG / LOQ *	MU*	Angabe quantitatives Ergebnis als z.B. Lebensmittel / Protein	Methode
			positiv / negativ	mg/kg	positiv / negativ	mg/kg	positiv / negativ	mg/kg					
ASU	4	27.02.20	positiv		negativ		positiv					Soja-DNA	ASU §64 Methode/method
ASU	7	12.03.20	positiv		negativ		positiv					Soja-DNA	ASU §64 Methode/method
ASU	11		positiv	4	negativ		positiv	21	5	10	30	Bitte auswählen!	Auswahl PCR-Methoden
ASU	12a	03.03.20	positiv		negativ		positiv					Soja-DNA	ASU §64 Methode/method
ASU	14	22.04.20	positiv		negativ		positiv					Soja-DNA	ASU L 00.00-105
SFA	9		positiv		negativ		positiv		0,4			Soja-DNA	Sure Food ALLERGEN, R-Biopharm / Congen
SFA	15	25.02.20	positiv		positiv		positiv		0,4			Soja-DNA	Sure Food ALLERGEN, R-Biopharm / Congen
SFA-ID	22	17.04.20	positiv	49,64	negativ	<1	positiv	43,56	1	1		Soja-DNA	Sure Food Allergen ID, R-Biopharm / Congen
div	5	27.02.	positiv		negativ		positiv		10			Soja DNA	interne Methode
div	12b	03.03.20	positiv		negativ		positiv					Soja-DNA	QT-EVE-GM-009, 2013-01
div	16	19.04.20	-	10,4	-	<2.5	-	84,65				Sojamehl	Hausmethode

\* NWG Nachweisgrenze / BG Bestimmungsgrenze

\* LOD limit of detection / LOQ limit of quantitation

\* MU Messunsicherheit / MU measurement uncertainty

Meth. Abk.	Auswertenummer	Spezifität	Hinweise zur Methode (Extraktion und Bestimmung)	Methode akkreditiert nach ISO/IEC 17025	Sonstige Hinweise
		Target-Sequenz / -DNA	z.B. Extraktion / Enzyme / Clean-Up / Real Time PCR / Gelelektrophorese / Cyclen	ja/nein	
ASU	4	Soja-Lectin-Gen 81bp	SureFood Prep Advanced r-biopharm/ Proteinase K/ Real Time PCR/ 45 Zyklen	ja	
ASU	7	Lectin Gen le1 (74 bp)	Extraktion nach ASU § 64 LFGB L 15.05-1 (SDS/Guanidiniumchlorid-Puffer mit Proteinase K, Aufreinigung mittels Wizard-Kit der Fa. Promega); Real-time PCR mit 45 Zyklen	ja	
ASU	11	lectin	Wizard/Realtime PCR	ja	
ASU	12a	Lectin-Gen 81 Bp	Maxwell RSC Pure Food GMO and Authentication KIT	ja	4-plex
ASU	14		Wizard-DNA-Präparation / Realtime PCR, 45 Zyklen		
SFA	9			ja	
SFA	15				
SFA-ID	22	Gemäß Kitanleitung	Gemäß Kitanleitung	nein	
div	5		CTAB, Proteinase K / Promega Wizard DNA CleanUp / Real-time PCR 45 Zyklen	ja	
div	12b	Lectin-Gen 74 Bp	Maxwell RSC Pure Food GMO and Authentication KIT	ja	1-plex PCR
div	16				

5.1.4 PCR: Glutenthaltiges Getreide - Weizen

Meth. Abk.	Auswertenummer	Datum der Analyse	Ergebnis Probe A		Ergebnis Probe B		Ergebnis Dotierungsneueuprobe		NWG / LOD *	BG / LOQ *	MU*	Angabe quantitatives Ergebnis als z.B. Lebensmittel / Protein	Methode
			positiv / negativ	mg/kg	positiv / negativ	mg/kg	positiv / negativ	mg/kg					
ASU	12	03.03.20	positiv		negativ		positiv					Weizen-DNA	ASU §64 Methode/method
SFA	15	25.02.20	Spuren		positiv		positiv		0,4			glutenfreies Getreide-DNA	Sure Food ALLERGEN, R-Biopharm / Congen
SFA-ID	22a	05.03.20	positiv	15,08	negativ	<1	positiv	107,14	1	1		glutenthaltiges Getreide	Sure Food Allergen ID, R-Biopharm / Congen
SFA-ID	22b	05.03.20	positiv	14	negativ	<1	positiv	139,51	1	1		Weizen	Sure Food Allergen ID, R-Biopharm / Congen
div	5	27.02.	positiv		negativ		positiv		40			Weizen DNA_	interne Methode
div	11		positiv	3	negativ		positiv	780	5	10	30	Bitte auswählen!	Auswahl PCR-Methoden
div	14	22.04.20	Spuren positiv		negativ		positiv					Weizen-DNA	Alary et al. 2002

\* NWG Nachweisgrenze / BG Bestimmungsgrenze  
 \* LOD limit of detection / LOQ limit of quantitation  
 \* MU Messunsicherheit / MU measurement uncertainty

Meth. Abk.	Auswertenummer	Spezifität	Hinweise zur Methode (Extraktion und Bestimmung)	Methode akkreditiert nach ISO/IEC 17025	Sonstige Hinweise
		Target-Sequenz / -DNA	z.B. Extraktion / Enzyme / Clean-Up / Real Time PCR / Gelelektrophorese / Cyclen	ja/nein	
ASU	12	Gluteninsystem von Weizen und Roggen	Maxwell RSC Pure Food GMO and Authentication KIT	ja	1-plex PCR
SFA	15				
SFA-ID	22a	Gemäß Kitanleitung	Gemäß Kitanleitung	nein	
SFA-ID	22b	Gemäß Kitanleitung	Gemäß Kitanleitung	nein	
div	5		CTAB, Proteinase K / Promaga Wizard DNA CleanUp / Real-time PCR 45 Zyklen	ja	
div	11	2020	Wizard/Realtime PCR	ja	
div	14		Wizard-DNA-Präparation / Realtime PCR, 45 Zyklen		

5.1.5 PCR: Andere

Parameter	Meth. Abk.	Auswertenummer	Datum der Analyse	Ergebnis Probe A		Ergebnis Probe B		Ergebnis Dotierungsprobe		NWG / LOD *	BG / LOQ *	MU*	Angabe quantitatives Ergebnis als z.B. Lebensmittel / Protein	Methode
				positiv / negativ	mg/kg	positiv / negativ	mg/kg	positiv / negativ	mg/kg					
PCR-Ergebnisse														PCR Test-Kit + Anbieter
Buchweizen	div	12	04.03.20	positiv		positiv		negativ					Buchweizen-DNA	Yamakawa et al.: Biosci. Biotechnol. Biochem. 72 (8), 2228-2231, 2008
Gerste	div	12	09.03.20	negativ		negativ		negativ					Gerste-DNA	Dolch et al.; Food Control 101 (2019) 180-188
Hafer	div	12	09.03.20	negativ		negativ		negativ					Hafer-DNA	Dolch et al.; Food Control 101 (2019) 180-188
Roggen	div	12	09.03.20	negativ		negativ		negativ					Roggen-DNA	Dolch et al.; Food Control 101 (2019) 180-188

\* NWG Nachweisgrenze / BG Bestimmungsgrenze

\* LOD limit of detection / LOQ limit of quantitation

\* MU Messunsicherheit / MU measurement uncertainty

Parameter	Meth. Abk.	Auswertenummer	Spezifität	Hinweise zur Methode (Extraktion und Bestimmung)	Methode akkreditiert nach ISO/IEC 17025	Sonstige Hinweise
PCR-Ergebnisse			Target-Sequenz / -DNA	z.B. Extraktion / Enzyme / Clean-Up / Real Time PCR / Gelelektrophorese / Cyclen	ja/nein	
Buchweizen	div	12	Hauptallergenes Speicherprotein	Maxwell RSC Pure Food GMO and Authentication KIT	ja	konv. PCR
Gerste	div	12	γ-Hordein-Gen	Maxwell RSC Pure Food GMO and Authentication KIT		3-plex
Hafer	div	12	12s Samenlagerungsprotein-Gen	Maxwell RSC Pure Food GMO and Authentication KIT		3-plex
Roggen	div	12	O-methyltransferase-Gen	Maxwell RSC Pure Food GMO and Authentication KIT		3-plex

## 5.2 Homogenität

### 5.2.1 Mischungshomogenität vor der Abfüllung

#### Microtracer Homogenitätstest

##### DLA ptAL02 Probe A

Gewicht Gesamtprobe	1,74	kg
Microtracer	FSS-rot lake	
Teilchengröße	75 – 300	µm
Gewicht pro Partikel	2,0	µg
Tracerzugabe	26,8	mg/kg

#### Analysenergebnisse:

Probe	Einwaage [g]	Partikel Anzahl	Partikel [mg/kg]
1	5,03	72	28,6
2	5,05	68	26,9
3	5,06	68	26,9
4	5,07	75	29,6
5	5,03	61	24,3
6	4,98	72	28,9
7	5,02	63	25,1
8	5,00	75	30,0

#### Poisson-Verteilung

Probenanzahl	8	
Freiheitsgrad	7	
Mittelwert	69,3	Partikel
Standardabweichung	5,28	Partikel
$\chi^2$ (CHI-Quadrat)	2,82	
<b>Wahrscheinlichkeit</b>	<b>90</b>	%
Wiederfindungsrate	103	%

#### Normalverteilung

Probenanzahl	8	
Mittelwert	27,5	mg/kg
Standardabweichung	2,10	mg/kg
rel. Standardabweichung	7,63	%
Horwitz Standardabweichung	9,71	%
<b>HorRat-Wert</b>	<b>0,79</b>	
Wiederfindungsrate	103	%

#### Microtracer Homogenitätstest

##### DLA ptAL02 Dotierungsniveauprobe

Gewicht Gesamtprobe	1,51	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]
1	5,02	64	25,5
2	4,98	65	26,1
3	5,02	66	26,3
4	4,97	61	24,5
5	4,96	63	25,4
6	4,98	69	27,7
7	4,99	69	27,7
8	4,98	67	26,9

#### Poisson-Verteilung

Probenanzahl	8	
Freiheitsgrad	7	
Mittelwert	65,5	Partikel
Standardabweichung	2,79	Partikel
$\chi^2$ (CHI-Quadrat)	0,83	
<b>Wahrscheinlichkeit</b>	<b>100</b>	%
Wiederfindungsrate	125	%

#### Normalverteilung

Probenanzahl	8	
Mittelwert	26,3	mg/kg
Standardabweichung	1,12	mg/kg
rel. Standardabweichung	4,26	%
Horwitz Standardabweichung	9,78	%
<b>HorRat-Wert</b>	<b>0,43</b>	
Wiederfindungsrate	125	%

### 5.3 Informationen zur Eignungsprüfung (EP)

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

EP-Nummer	<b>ptAL02- 2020</b>
EP-Name	<b>Allergene II: Soja und Weizen (Gluten) in „glutenfreier“ Backware</b>
Probenmatrix (Prozessierung)	<b>Proben A + B:</b> "glutenfreie" Kekse (gebacken ca. 150°C)/ Zutaten: Zucker, Reismehl, Maisstärke, Maismehl, Eier, Reisstärke, Sonnenblumenöl, Butterreinfett, fettarmes Kakaopulver 1,7%, Invertzuckersirup, Sheabutter, Apfelfaser, Salz, Backtriebmittel: Kaliumtartrat, Natriumcarbonat, Ammoniumcarbonat, Verdickungsmittel: Guar gummi, Xanthan, Kakaoextrakt, Aromen, Säuerungsmittel: Citronensäure, Antioxidationsmittel: Rosmarinextrakt, weitere Zusatzstoffe und Allergene Lebensmittel Sojamehl und Weizenmehl (eine der beiden Proben) <b>Dotierungsniveauprobe:</b> Kartoffelpulver, weitere Zusatzstoffe und Allergene Lebensmittel
Probenzahl und Probenmenge	2 unterschiedliche Proben A + B: je 25 g + 1 Dotierungsniveauprobe: 15 g
Lagerungsinformation	Proben A, B + Dotierungsniveauprobe: Raumtemperatur (EP-Zeitraum), gekühlt 2 - 10 °C (Langzeit)
Verwendungszweck	Ausschließlich für Laboruntersuchungen (Qualitätskontrollproben)
Parameter	qualitativ + quantitativ: Soja (Sojaprotein, DNA), Weizen (Gluten, DNA) Proben A + B: < 500 mg/kg Dotierungsniveauprobe: < 500 mg/kg
Untersuchungsmethoden	Methode ist freigestellt
Hinweis zur Analyse	Die Untersuchung der Eignungsprüfung soll entsprechend einer laborüblichen Routineanalyse vorgenommen werden. Generell empfehlen wir vor der Analyse, insbesondere bei kleinen Analyseeinwaagen, eine repräsentative Probenmenge entsprechend guter Laborpraxis zu homogenisieren. Vorzugsweise wird jeweils die gesamte Probenmenge homogenisiert.
Ergebnisangabe	Es werden für jede Probe A , B und Dotierungsniveauprobe je ein Ergebnis ermittelt. Die Einzelergebnisse sind in die Ergebnisabgabe-Datei einzutragen.
Einheiten	mg/kg
Anzahl von Stellen	mindestens 2 signifikante Stellen
Ergebnisabgabe	Die Ergebnisabgabe-Datei wird per eMail übermittelt an: <b>pt@dla-lvu.de</b>
Letzter Abgabetermin	<b>spätestens 03. April 2020</b>
Auswertebereich	Der Auswertebereich wird voraussichtlich 6 Wochen nach Abgabetermin der Ergebnisse fertiggestellt und per eMail als PDF-Datei zugesandt.
Koordinator und Ansprechpartner der EP	Dr. Matthias Besler-Scharf

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

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

Teilnehmer / Participant	Ort / Town	Land / Country
		Deutschland
		SCHWEIZ
		CANADA
		ITALIEN
		Deutschland
		SPANIEN
		SCHWEIZ
		Deutschland
		Deutschland
		USA
		Deutschland
		Deutschland
		Deutschland
		SCHWEIZ
		Deutschland
		Deutschland
		Deutschland
		Deutschland
		Deutschland
		GROSSBRITANNIEN
		GRIECHENLAND
		ÖSTERREICH
		ÖSTERREICH
		ÖSTERREICH
		SPANIEN

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

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

## 7. Verzeichnis relevanter Literatur

1. DIN EN ISO/IEC 17025:2005; Allgemeine Anforderungen an die Kompetenz von Prüf- und Kalibrierlaboratorien / General requirements for the competence of testing and calibration laboratories
2. DIN EN ISO/IEC 17043:2010; Konformitätsbewertung – Allgemeine Anforderungen an Eignungsprüfungen / Conformity assessment – General requirements for proficiency testing
3. ISO 13528:2015 & DIN ISO 13528:2009; Statistische Verfahren für Eignungsprüfungen durch Ringversuche / Statistical methods for use in proficiency testing by inter-laboratory comparisons
4. ASU §64 LFGB: Planung und statistische Auswertung von Ringversuchen zur Methodenvalidierung / DIN ISO 5725 series part 1, 2 and 6 Accuracy (trueness and precision) of measurement methods and results
5. Verordnung / Regulation 882/2004/EU; Verordnung über amtliche Kontrollen zur Überprüfung der Einhaltung des Lebensmittel- und Futtermittelrechts sowie der Bestimmungen über Tiergesundheit und Tierschutz / Regulation on official controls performed to ensure the verification of compliance with feed and food law, animal health and animal welfare rules
6. Evaluation of analytical methods used for regulation of food and drugs; W. Horwitz; Analytical Chemistry, 54, 67-76 (1982)
7. The International Harmonised Protocol for the Proficiency Testing of Analytical Laboratories ; J.AOAC Int., 76(4), 926 – 940 (1993)
8. A Horwitz-like funktion describes precision in proficiency test; M. Thompson, P.J. Lowthian; Analyst, 120, 271-272 (1995)
9. Protocol for the design, conduct and interpretation of method performance studies; W. Horwitz; Pure & Applied Chemistry, 67, 331-343 (1995)
10. Recent trends in inter-laboratory precision at ppb and sub-ppb concentrations in relation to fitness for purpose criteria in proficiency testing; M. Thompson; Analyst, 125, 385-386 (2000)
11. The International Harmonised Protocol for the Proficiency Testing of Analytical Chemistry Laboratories; Pure Appl Chem, 78, 145 – 196 (2006)
12. AMC Kernel Density – Representing data distributions with kernel density estimates, amc technical brief, Editor M Thompson, Analytical Methods Committee, AMCTB No 4, Revised March 2006 and Excel Add-in Kernel.xla 1.0e by Royal Society of Chemistry
13. EURACHEM/CITAC Leitfaden, Ermittlung der Messunsicherheit bei analytischen Messungen (2003); Quantifying Uncertainty in Analytical Measurement (1999)
14. GMP+ Feed Certification scheme, Module: Feed Safety Assurance, chapter 5.7 Checking procedure for the process accuracy of compound feed with micro tracers in GMP+ BA2 Control of residues, Version: 1st of January 2015 GMP+ International B.V.
15. MTSE SOP No. 010.01 (2014): Quantitative measurement of mixing uniformity and carry-over in powder mixtures with the rotary detector technique, MTSE Micro Tracers Services Europe GmbH
16. Homogeneity and stability of reference materials; Linsinger et al.; Accred Qual Assur, 6, 20-25 (2001)
17. AOAC Official Methods of Analysis: Guidelines for Standard Method Performance Requirements, Appendix F, p. 2, AOAC Int (2016)
18. Codex Alimentarius Commission (2010) – Guidelines on performance criteria and validation of methods for detection, identification and quantification of specific DNA sequences and specific proteins in foods, CAC/GL 74-2010
19. DIN EN ISO 15633-1:2009; Nachweis von Lebensmittelallergenen mit immunologischen Verfahren – Teil 1: Allgemeine Betrachtungen / Foodstuffs – Detection of food allergens by immunological methods – Part 1: General considerations
20. DIN EN ISO 15634-1:2009; Nachweis von Lebensmittelallergenen mit molekularbiologischen Verfahren – Teil 1: Allgemeine Betrachtungen / Foodstuffs – Detection of food allergens by molecular biological methods – Part 1: General considerations
21. DIN EN ISO 15842:2010 Lebensmittel – Nachweis von Lebensmittelallergenen – Allgemeine Betrachtungen und Validierung von Verfahren / Foodstuffs – Detection of food allergens – General considerations and validation of methods
22. Ministry of Health and Welfare, JSM, Japan 2006
23. Working Group Food Allergens, Abbott et al., Validation Procedures for Quantitative Food Allergen ELISA Methods: Community Guidance and Best Practices JAOAC Int. 93:442-50 (2010)
24. Working Group on Prolamin Analysis and Toxicity (WGPAT): Méndez et al. Report of a

- collaborative trial to investigate the performance of the R5 enzyme linked immunoassay to determine gliadin in gluten-free food. Eur J Gastroenterol Hepatol. 17:1053-63 (2005)
25. DLA Publikation: Performance of ELISA and PCR methods for the determination of allergens in food: an evaluation of six years of proficiency testing for soy (Glycine max L.) and wheat gluten (Triticum aestivum L.); Scharf et al.; J Agric Food Chem. 61(43):10261-72 (2013)
  26. EFSA (2014) Scientific Opinion on the evaluation of allergenic foods and food ingredients for labelling 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
  27. IRMM, Poms et al.; Inter-laboratory validation study of five different commercial ELISA test kits for determination of peanut residues in cookie and dark chocolate; European Commission, Joint Research Centre, Belgium; GE/R/FSQ/D08/05/2004
  28. Jayasena et al. (2015) Comparison of six commercial ELISA kits for their specificity and sensitivity in detecting different major peanut allergens. J Agric Food Chem. 2015 Feb 18;63(6):1849-55
  29. ASU §64 LFGB L 06.00-56 Bestimmung von Sojaprotein in Fleisch und Fleischerzeugnissen Enzymimmunologisches Verfahren (2007) [Determination of soyprotein in meat and meat products by enzyme immunoassay]
  30. ASU §64 LFGB L 00.00-69 Bestimmung von Erdnuss-Kontaminationen in Lebensmitteln mittels ELISA im Mikrotiterplattensystem (2003) [Foodstuffs, determination of peanut contaminations in foodstuffs by ELISA in microtiterplates]
  31. ASU §64 LFGB L 44.00-7 Bestimmung von Haselnuss-Kontaminationen in Schokolade und Schokoladenwaren mittels ELISA im Mikrotiterplattensystem (2006) [Foodstuffs, determination of hazelnut contaminations in chocolate and chocolate products by ELISA in microtiterplates]
  32. ASU §64 LFGB L 16.01-9 Untersuchung von Lebensmitteln - Bestimmung von Soja (Glycine max) in Getreidemehl mittels real-time PCR (2016) [Foodstuffs, determination of soya (Glycine max) in cereal flour by real-time PCR]
  33. ASU §64 LFGB L 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]
  34. 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]
  35. ASU §64 LFGB L 08.00-66 Untersuchung von Lebensmitteln - Nachweis und Bestimmung von Weizen (Triticum L.) und Roggen (Secale cereale) in Brühwurst mittels real-time PCR (2016) [Foodstuffs, detection and determination of wheat (Triticum L.) and rye (Secale cereale) in boiled sausages by real-time PCR]
  36. 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
  37. Bruins-Slot et al. (2015) Evaluating the performance of gluten ELISA test kits: The numbers do not tell the tale, Cereal Chem 92(5):513-521
  38. Köhler & Andersen (2014) Analyse von Glutengehalten in Getreide und getreidehaltigen Produkten, Tabellenwerk zum Nährstoffgehalt von Lebensmitteln 3.1.5.1, Deutsche Forschungsanstalt für Lebensmittelchemie Leibniz Institut Jahresbericht 2014 [Analysis of gluten contents in cereals and cereal products, nutrient tables of foods]
  39. Allergen Data Collection - Update (2002): Soybean (Glycine max), Besler M., Helm R.M., Ogawa T., Internet Symposium on Food Allergens 2(Suppl.3): 1-35 (2000) <http://www.food-allergens.de>



**ptAL02 (2020) - Allergene II**

24 von 25 Teilnehmern haben mindestens ein Ergebnis eingereicht. Die Auswertung erfolgte für ELISA-Methoden hinsichtlich der Parameter Gluten und Soja qualitativ und quantitativ. Die PCR-Methoden wurden für alle Parameter qualitativ bewertet. Zusätzlich wurden für jeden Teilnehmer Wiederfindungsraten für die Dotierungsniveauprobe und die dotierte Probe ermittelt. Details zu den einzelnen Parametern inklusive separater Auswertung nach Testkit-Herstellern sind dem Auswertebericht zu entnehmen. 11 Teilnehmer hatten ihren Sitz im Europäischen Ausland (Griechenland, Großbritannien, Italien, Österreich, Spanien, Schweiz), ein Teilnehmer in den USA und ein Teilnehmer in Kanada.