



Auswertungs-Bericht

Laborvergleichsuntersuchung

DLA ptAL03 (2020)

Allergene III:

β-Lactoglobulin, Casein und Gluten

in Kindernahrung

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 / Alexandra Scharf MSc.

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

<i>EP-Anbieter</i> <i>PT-Provider</i>	DLA - Proficiency Tests GmbH Kalte Weide 21, 24641 Sievershütten, Germany Geschäftsführer/CEO: Dr. Matthias Besler-Scharf Stellv. Leitung/Deputy Lead: Alexandra Scharf MSc. Tel. ++49-(0)4532-9183358 Mob. ++49(0)171-1954375 Fax. ++49(0)4102-9944976 eMail. proficiency-testing@dla-lvu.de
<i>EP-Nummer</i> <i>PT-Number</i>	DLA ptAL03 (2020)
<i>EP-Koordinator</i> <i>PT-Coordinator</i>	Dr. Matthias Besler-Scharf / Alexandra Scharf MSc.
<i>Status des EP-Bericht</i> <i>Status of PT-Report</i>	Abschlussbericht / Final report (20. Juli 2020) Entwurf / Draft Gültig ist die jeweils letzte Version/Korrektur des Berichts. Sie ersetzt alle vorangegangenen Versionen. Only the latest version/correction of the report is valid. It replaces all preceding versions.
<i>EP-Bericht Freigabe</i> <i>PT-Report Authorization</i>	Dr. Matthias Besler-Scharf (Technischer Leiter / Technical Manager) - <i>gezeichnet / signed M. Besler-Scharf</i> Alexandra Scharf MSc. (QM-Beauftragte / Quality Manager) - <i>gezeichnet / signed A. Scharf</i> Datum / Date: 20. Juli 2020
<i>Unteraufträge</i> <i>Subcontractors</i>	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
<i>Vertraulichkeit</i> <i>Confidentiality</i>	Die Teilnehmerergebnisse sind im EP-Bericht in anonymisierter Form mit Auswertenummern benannt. Daten einzelner Teilnehmer werden ausschließlich nach vorheriger Zustimmung des Teilnehmers an Dritte weitergegeben. Participant result are named anonymously with evaluation numbers in the PT report. Data of individual participants will be passed on to third parties only with prior consent of the participant.

Inhalt

1. Einleitung.....	4
2. Durchführung.....	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 Milch.....	21
4.1.1 ELISA-Ergebnisse: β -Lactoglobulin.....	21
4.1.2 ELISA-Ergebnisse: Casein.....	31
4.1.3 ELISA-Ergebnisse: Milch (als Gesamt-Milchprotein).....	41
4.1.4 PCR-Ergebnisse: Milch.....	48
4.2 Vergleichsuntersuchung Weizen (Gluten).....	49
4.2.1 ELISA-Ergebnisse: Gluten.....	49
4.2.2 PCR-Ergebnisse: Gluten.....	59
4.3 z-Scores der Teilnehmer: Übersichtstabelle.....	60
5. Dokumentation.....	63
5.1 Angaben der Teilnehmer.....	63
5.1.1 ELISA: β -Lactoglobulin.....	63
5.1.2 ELISA: Casein.....	65
5.1.3 ELISA: Milch.....	66
5.1.4 ELISA: Gluten.....	67
5.1.5 PCR: Milch.....	69
5.1.6 PCR: Gluten.....	69
5.2 Homogenität.....	70
5.2.1 Mischungshomogenität vor der Abfüllung.....	70
5.3 Informationen zur Eignungsprüfung (EP).....	71
6. Verzeichnis der Teilnehmer in alphabetischer Reihenfolge.....	72
7. Verzeichnis relevanter Literatur.....	73

1. Einleitung

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

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

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

2. Durchführung

2.1 Untersuchungsmaterial

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

Bei dem Untersuchungsmaterial der Lebensmittelmatrixproben handelt es sich um ein handelsübliches Kindernahrungsmittel "Getreide-Brei" ab dem 4. Monat (gekennzeichnet als milchfrei und glutenfrei). 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 und jeweils ein Aliquot für Probe A und für Probe B abgenommen.

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

Die Dotierungsmaterialien, die die allergenen Zutaten Magermilchpulver, Molkenpulver und Weizenmehl enthalten, wurden mittels Zentrifugalmühle zerkleinert und gesiebt (mesh <250 µm bzw. <500 µm), dann zu einem Aliquot der Grundmatrix gegeben und die Mischung homogenisiert.

Danach wurden die zubereiteten Breiprobe A und B jeweils gemäß der Herstellerangaben unter Rühren und Zugabe von 50°C erhitztem Wasser hergestellt.

Die **Dotierungsniveauprobe** wurde mit den oben genannten allergenhaltigen Dotierungsmaterialien unter mehrstufiger Zugabe von Kartoffelpulver und Homogenisierung hergestellt. Anschließend wurde die gesamte Menge mittels Zentrifugalmühle (mesh 500 µm) gesiebt.

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

Tabelle 1: Zusammensetzung der DLA-Proben

Zutaten	Probe A	Probe B	Dotierungs- niveauprobe
Bio-Getreide-Brei, Kinderbrei ab dem 4. Monat Zutaten: Reisvollkornmehl 32%, Maismehl 30%, Hirsevollkornmehl 23%, Buchweizenvoll- kornmehl 15%, Thiamin sowie Konservie- rungsstoff: Sorbinsäure Nährwertangaben pro 100 g Pulver: Fett 2,8 g, Kohlenhydrate 79 g, Ei- weiß 9,4 g	8,99 g/100 g	9,87 g/100g	-
Wasser	90,8 g/100g	90,1 g/100g	
Kartoffelpulver Zutaten: Kartoffeln, E471, E304, E223, E100	-	-	99,8 g/100 g
<i>Milch-Anteil 1:</i> Magermilchpulver-Mischung (9 Produkte aus Europa, USA) - als Magermilchpulver* - davon 33,0% Gesamtprotein** - davon Casein*** - davon β -Lactoglobulin***	66,3 mg/kg 21,9 mg/kg 17,5 mg/kg 2,19 mg/kg	-	66,6 mg/kg 22,0 mg/kg 17,6 mg/kg 2,20 mg/kg
<i>Milch-Anteil 2:</i> Molkenpulver-Mischung (4 Produkte aus Deutschland) - als Molkenpulver* - davon 15,9% Gesamtprotein** - davon β -Lactoglobulin***	331 mg/kg 52,6 mg/kg 26,1 mg/kg	-	343 mg/kg 54,4 mg/kg 27,2 mg/kg
<i>Summen der Milchanteile</i> - davon Gesamtprotein - davon Casein - davon β -Lactoglobulin	397 mg/kg 74,5 mg/kg 17,5 mg/kg 28,3 mg/kg	-	410 mg/kg 76,4 mg/kg 17,6 mg/kg 29,4 mg/kg
<i>Weizen:</i> Weizenmehl-Mischung (21 Produkte aus Euro- pa, Asien, USA) - als Weizenmehl* - davon 10,1% Gesamtprotein** - davon Gluten***	254 mg/kg 25,7 mg/kg 22,1 mg/kg	-	229 mg/kg 23,1 mg/kg 19,9 mg/kg
<i>weitere Zutaten:</i> Maltodextrin, Natriumsulfat und Siliciumdi- oxid	<0,02 g/100 g	-	<0,02 g/100 g

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

** Proteingehalte gemäß Laboranalyse des Rohstoffs (Gesamtstickstoff nach Kjeldahl mit $F=6,38$ für Milchprotein und $F=5,7$ für Weizenprotein)

*** Proteingehalte gemäß Literaturangaben berechnet (ca. 80% Caseine und ca. 10% β -Lactoglobulin in Gesamt-Milchprotein [31]; ca. 50% β -Lactoglobulin in Molkenprotein [36]; ca. 8,7% Gluten in Weizenmehlen [37, 38])

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

2.1.1 Homogenität

Die **Mischungshomogenität vor der Abfüllung** wurde in 8-fach Bestimmung mittels **Microtracer-Analyse** untersucht. Es handelt sich um eine normierte Methode, die Bestandteil des internationalen GMP-Zertifizierungssystems für Futtermittel ist [14]. Vor der Mischung werden mit Farbstoff beschichtete Eisenpartikel in μm -Größe zur Probe gegeben und die Partikelzahl wird nach der Homogenisierung in entnommenen Aliquoten bestimmt. Die Bewertung der Mischungshomogenität erfolgt auf Grundlage der Poissonverteilung anhand des chi-Quadrat-Tests. Eine Wahrscheinlichkeit von $\geq 5\%$ ist gleichzusetzen mit einer guten homogenen Mischung und von $\geq 25\%$ mit einer exzellenten Mischung [14, 15]. Die Microtracer-Analyse der vorliegenden Dotierungsniveauprobe hat eine Wahrscheinlichkeit von 84% 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 wurde ein HorRat-Wert von 0,8 erhalten. Die Ergebnisse der Microtracer-Analyse sind in der Dokumentation angegeben.

Homogenität der abgefüllten dotierten Probe A

Durchführung der Homogenitätstests

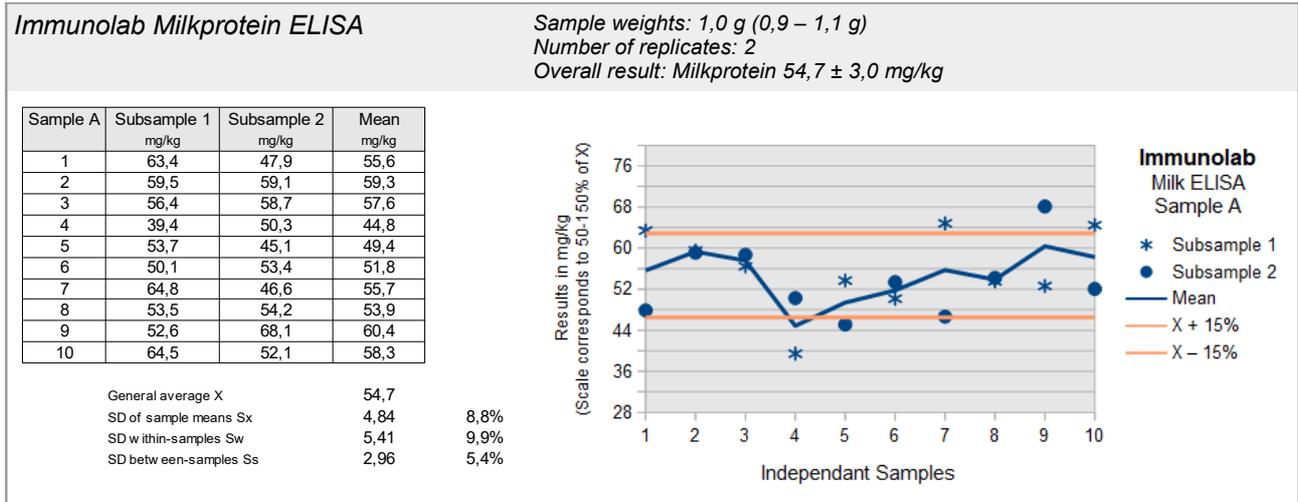
Die Homogenitätstests wurden in Kooperation mit den Labors der angegebenen Testkit-Anbieter durchgeführt. Von DLA wurden zufällig 10 Muster der abgefüllten dotierten Probe ausgewählt und davon jeweils 2 Teilproben in zuvor zufällig-codierte Extraktionsbehälter eingewogen und anschließend den Labors zur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

Bewertung der Homogenität

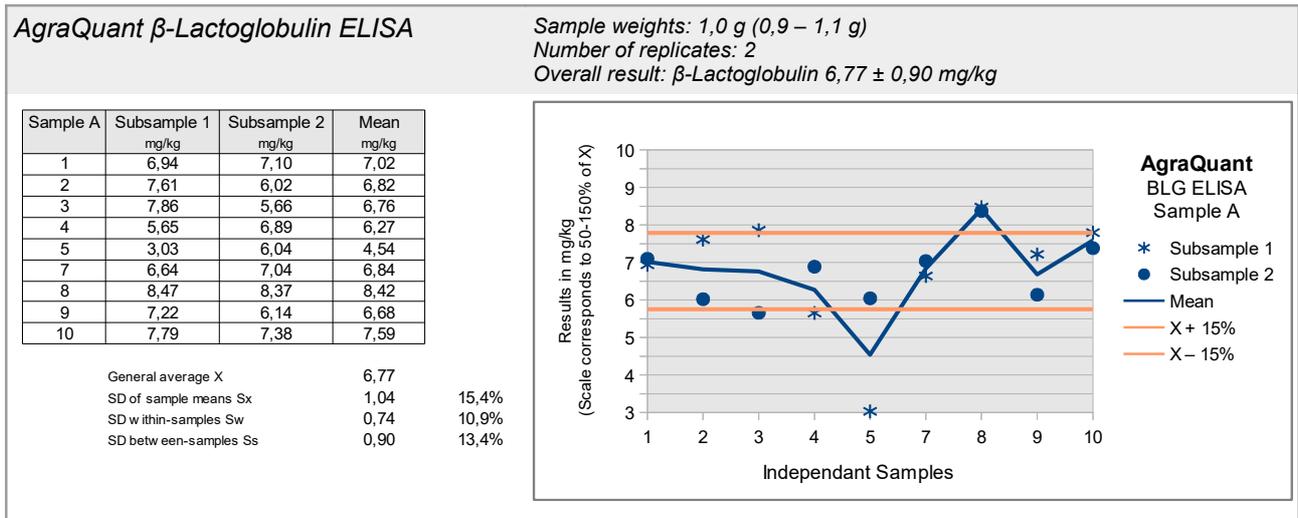
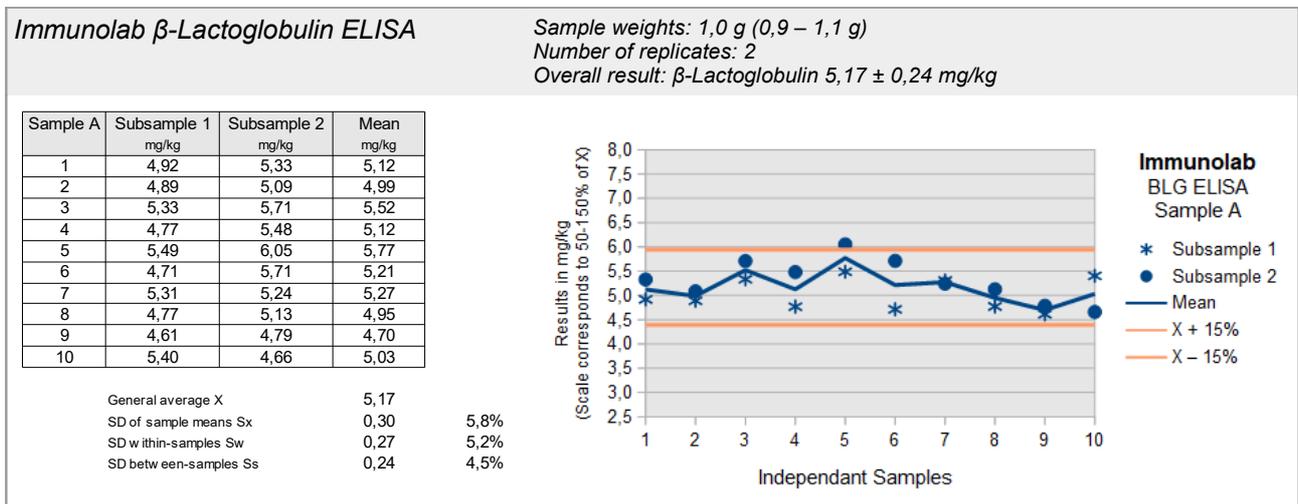
Die Homogenität wird mit einer Standardabweichung zwischen den Proben von $S_s \leq 15\%$ („Heterogenitätsstandardabweichung“) als hinreichend gesichert angesehen. Dieses Kriterium wird für die untersuchte Probe A in allen ELISA-Tests für Milchprotein und β -Lactoglobulin (Immunolab und AgraQuant) sowie Gluten/Gliadin (Immunolab) 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].

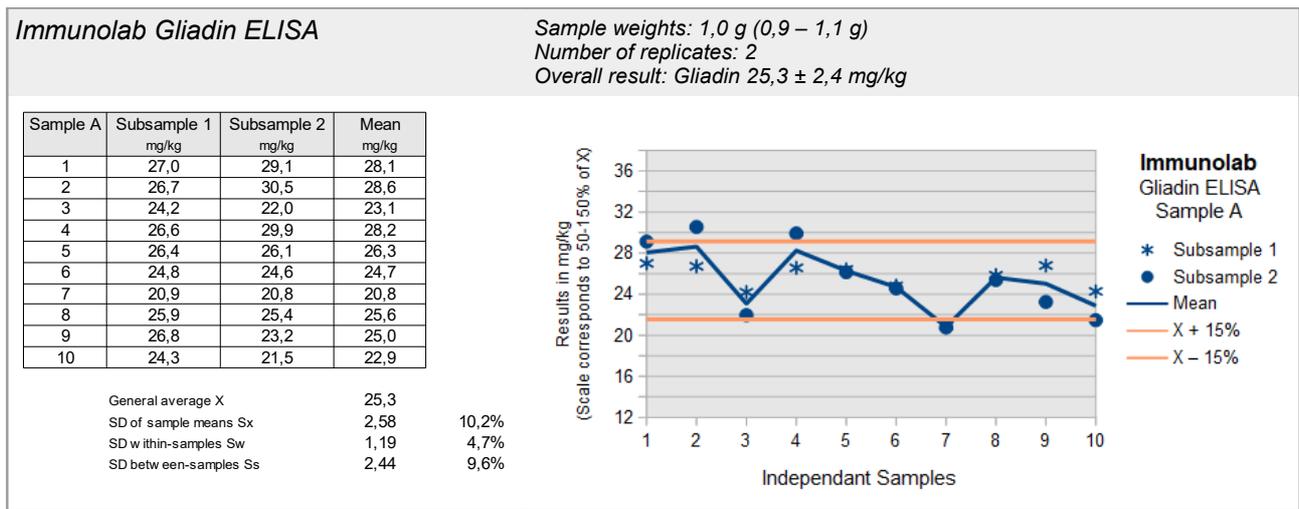
ELISA-Tests: Homogenität Milch / Homogeneity Milk



ELISA-Tests: Homogenität β-Lactoglobulin / Homogeneity β-Lactoglobulin



ELISA-Tests: Homogenität Gluten / Homogeneity Gluten



2.1.2 Stabilität

Bei den Breiprobe n handelt es sich um mit Sorbinsäure konservierte Zubereitungen. Die Stabilität des Probenmaterials war somit während des Untersuchungszeitraums unter den angegebenen Lagerbedingungen gewährleistet.

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 (Dotierungsniveauprobe) lag bei ca. $0,35$ ($17,9^\circ\text{C}$). 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 11. Kalenderwoche 2020 je eine Portion der Untersuchungsmaterialien A und B sowie eine Dotierungsmaterialprobe verschickt. Die Untersuchungsverfahren wurden freigestellt. Die Untersuchungen waren durchzuführen bis spätestens 22. 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 **β -Lactoglobulin, Casein und Gluten** im mg/kg Bereich in der Matrix **Kindernahrung** (verzehrfertiger Brei, erhitzt). 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.*

Hinweis: Bitte die Proben bei Ankunft kühl lagern ($2-10^\circ\text{C}$).

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 19 Teilnehmern haben 18 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: Δ Median - rob. Mittelwert $> 0,3 \sigma_{pt}$) [3].

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

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

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

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

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

3.2 Robuste Standardabweichung

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

Folgende robuste Standardabweichungen werden herangezogen:

- i) **Robuste Standardabweichung aller Ergebnisse** - S^*_{ALL}
- ii) **Robuste Standardabweichung von 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 σ_{pt} (= Standardabweichung für die Eignungsbeurteilung) kann nach unten dargestellten, unterschiedlichen Verfahren bestimmt werden.

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

3.4.1 Allgemeines Modell nach Horwitz

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

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

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 mg/kg Bereich nur in Ausnahmefällen erreicht.

3.4.2 Auswertung eines Versuchs zur Präzision

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

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

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

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

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

Aus den Präzisionsdaten der ASU §64 Methoden ergeben sich abhängig von Matrix bzw. Prozessierung und Konzentrationsbereich relative Zielstandardabweichungen im Bereich von 12 – 33% für die ELISA-Methoden und 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 σ_{pt} [32-35]

Parameter	Matrix	Mittelwerte [mg/kg]	Wiederfindung	rob RSD_r	RSD_r	RSD_R	σ_{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

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

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

Tabelle 4: PCR-Validierungskriterien

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

(a) = Trueness / Richtigkeit

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

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

3.5 z-Score

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

Die Berechnung erfolgt nach:

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

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

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

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

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

3.5.1 Warn- und Eingriffssignale

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

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

3.6 z'-Score

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

Die Berechnung erfolgt nach:

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

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

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

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

Zu Warn- und Eingriffssignalen siehe 3.5.1.

3.7 Quotient S*/ σ_{pt}

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

3.8 Standardunsicherheit und Rückführbarkeit

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

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

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

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

3.9 Graphische Darstellung der Bezugswerte

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

Ein ELISA-Ergebnis, das als **Gliadin** angegeben wurde, ist in **Gluten** umgerechnet worden. Dabei wurde die Gliadin-Angabe mit dem Faktor 2 multipliziert.

Ein Milchprotein-spezifisches ELISA-Ergebnis, das als **Magermilchpulver** angegeben wurde (Methode ELISA Fast, ifp), ist in **Gesamt-Milchprotein** umgerechnet worden. Dabei wurde ein Gehalt von 33% Gesamt-Milchprotein in Magermilchpulver zu Grunde gelegt (s. S.5).

In der vorliegenden LVU wurden die anderen ELISA-Ergebnisse einheitlich als Casein oder β -Lactoglobulin angegeben, sodass keine weiteren Umrechnungen vorgenommen wurden.

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

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

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

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

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

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

^o Zielbereich berechnet mit z-Score oder z'-Score

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

4.1 Vergleichsuntersuchung Milch

4.1.1 ELISA-Ergebnisse: β -Lactoglobulin

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		
5a	positiv	>400	negativ	<0,01	2/2 (100%)	AQ	
16a	positiv	23,2	negativ	0	2/2 (100%)	EF	
13	positiv	>1	negativ	<0,1	2/2 (100%)	ES	
16b	positiv		negativ		2/2 (100%)	IF	Lateral Flow
3	positiv	5,70	negativ	<0,01	2/2 (100%)	IL	
4	positiv	13,0	negativ	<0,031	2/2 (100%)	MI-II	
2	positiv	9,53	negativ		2/2 (100%)	RS	
17	positiv	43,6	negativ	<	2/2 (100%)	RS	
5b	positiv	>4,5	negativ	<0,17	2/2 (100%)	RS-F	
6	positiv	27,5	negativ	<LOD	2/2 (100%)	RS-F	
7	positiv	17,0	negativ	<0,5	2/2 (100%)	RS-F	
8	positiv	16,2	negativ		2/2 (100%)	RS-F	
9	positiv	20,5	negativ		2/2 (100%)	RS-F	
12	positiv	20,7	negativ	<0,167	2/2 (100%)	RS-F	
14	positiv	18,9	negativ	<0,2	2/2 (100%)	RS-F	
15	positiv	22,2	negativ	<0,167	2/2 (100%)	RS-F	
18	positiv	5,40	negativ	<0,01	2/2 (100%)	SP	

	Probe A	Probe B
Anzahl positiv	17	0
Anzahl negativ	0	17
Prozent positiv	100	0
Prozent negativ	0	100
Konsenswert	positiv	negativ

Methoden:

- AQ = AgraQuant, RomerLabs
- EF = ELISAFast, ipf
- ES = ELISA-Systems
- IF = ImmunoFast (Lateral Flow), ipf
- IL = Immunolab
- MI-II = Morinaga Institute ELISA Kit II
- RS = Ridascreen®, R-Biopharm
- RS-F= Ridascreen® Fast, R-Biopharm
- SP = SensiSpec ELISA Kit, Eurofins

Anmerkung:

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

Quantitative Auswertung ELISA: Probe A

Auswertenummer	β -Lactoglobulin	z-Score $X_{pt,ALL}$	z-Score $X_{pt,RS-F}$	Methode	Hinweis
	[mg/kg]				
5a	>400			AQ	
16a	23,2	1,2		EF	
13	>1			ES	
16b				IF	
3	5,70	-2,7		IL	
4	13,0	-1,1		MI-II	
2	9,53	-1,9		RS	
17	43,6	5,8		RS	
5b	>4,5			RS-F	
6	27,5	2,2	1,5	RS-F	
7	17,0	-0,17	-0,63	RS-F	
8	16,2	-0,36	-0,79	RS-F	
9	20,5	0,62	0,07	RS-F	
12	20,7	0,66	0,11	RS-F	
14	18,9	0,26	-0,25	RS-F	
15	22,2	1,0	0,41	RS-F	
18	5,40	-2,8		SP	

Methoden:

- AQ = AgraQuant, RomerLabs
- EF = ELISAFast, ipf
- ES = ELISA-Systems
- IF = ImmunoFast (Lateral Flow), ipf
- IL = Immunolab
- MI-II = Morinaga Institute ELISA Kit II
- RS = Ridascreen®, R-Biopharm
- RS-F= Ridascreen® Fast, R-Biopharm
- SP = SensiSpec ELISA Kit, Eurofins

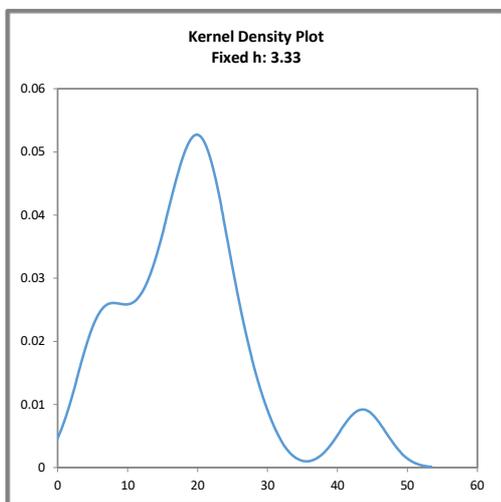


Abb. / Fig. 1:

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

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

Anmerkung:

Die Kerndichte-Schätzung zeigt annähernd eine symmetrische Verteilung der Ergebnisse mit einer Schulter bei ca. 8 mg/kg (mehrere Methoden) und einem Nebenpeak bei 44 mg/kg, der auf einen Einzelwert außerhalb des Zielbereiches zurückgeht.

Kenndaten: Quantitative Auswertung ELISA β -Lactoglobulin**Probe A**

Kenndaten	Alle Ergebnisse [mg/kg]	Methode RS-F [mg/kg]
Zugewiesener Wert (X_{pt})	X_{pt_ALL}	$X_{pt_METHOD\ RS-F}$
Anzahl der Messergebnisse	13	7
Anzahl der Ausreißer	0	0
Mittelwert	18,7	20,4
Median	18,9	20,5
Robuster Mittelwert (X_{pt})	17,8	20,2
Robuste Standardabweichung (S^*)	8,84	3,65
<i>Zielkenndaten:</i>		
Zielstandardabweichung σ_{pt}	4,44	5,04
Untere Grenze des Zielbereichs	8,88	10,1
Obere Grenze des Zielbereichs	26,6	30,2
Quotient S^*/σ_{pt}	2,0	0,73
Standardunsicherheit $U(X_{pt})$	3,07	1,73
Ergebnisse im Zielbereich	9	7
Prozent im Zielbereich	69	100

Methoden:

RS-F = R-Biopharm, Ridascreen® Fast

Anmerkungen zu den Kenndaten und Vergleich der Bezugswerte:

Die Kerndichte-Schätzung zeigte keine eindeutigen methodenabhängigen Unterschiede.

Die Auswertungen der Ergebnisse aller Methoden und von Methode RS-F zeigten eine normale bis geringe Variabilität der Ergebnisse. Die Quotienten S^*/σ_{pt} lagen unter bzw. bei 2,0. Die robusten Standardabweichungen liegen im bzw. 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 63% bzw. 71% vom Zusatzniveau von β -Lactoglobulin zu Probe A, innerhalb der relevanten Anforderungen für die eingesetzten Methoden (s. 3.4.3 und S.30 "Wiederfindungsraten mit z-Scores ELISA für β -Lactoglobulin").

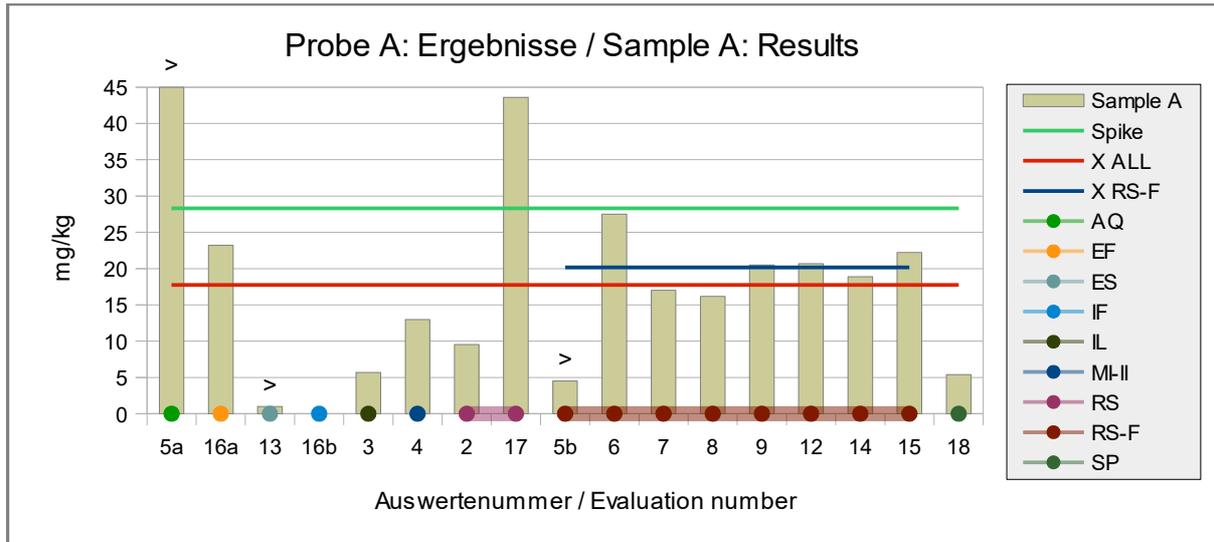


Abb./Fig. 2: ELISA-Ergebnisse β -Lactoglobulin
 grüne Linie = Zusatzniveau (Spike)
 rote Linie = robuster Mittelwert aller Ergebnisse
 blaue Linie = robuster Mittelwert Ergebnisse Methode RS-F
 runde Symbole = Zuordnung der Methoden (s. Legende)

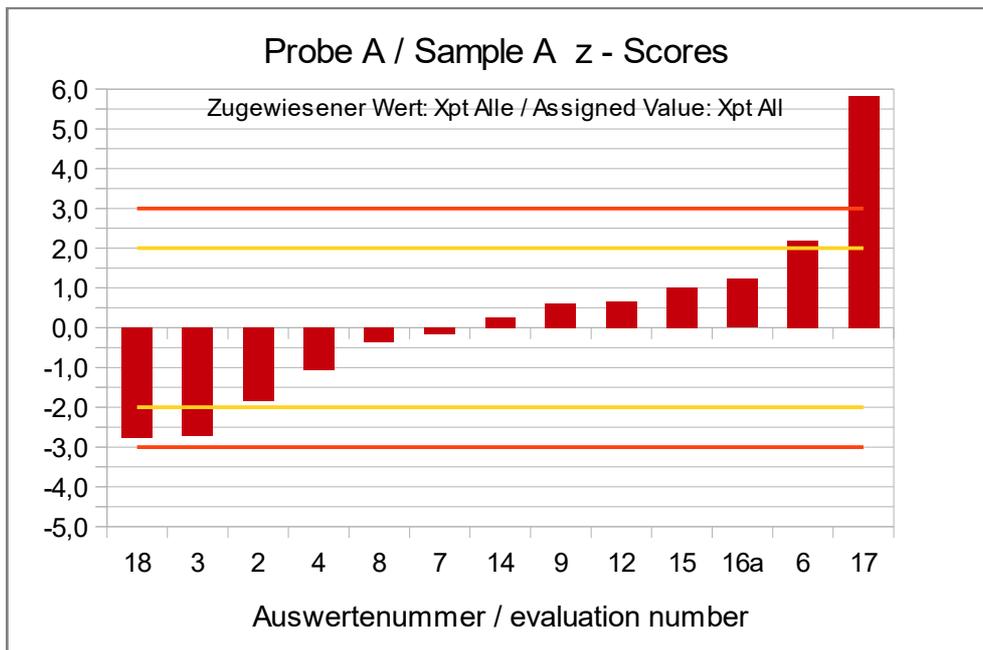


Abb./Fig. 3:
 z-Scores ELISA-Ergebnisse als β -Lactoglobulin
 Zugewiesener Wert: robuster Mittelwert aller Ergebnisse

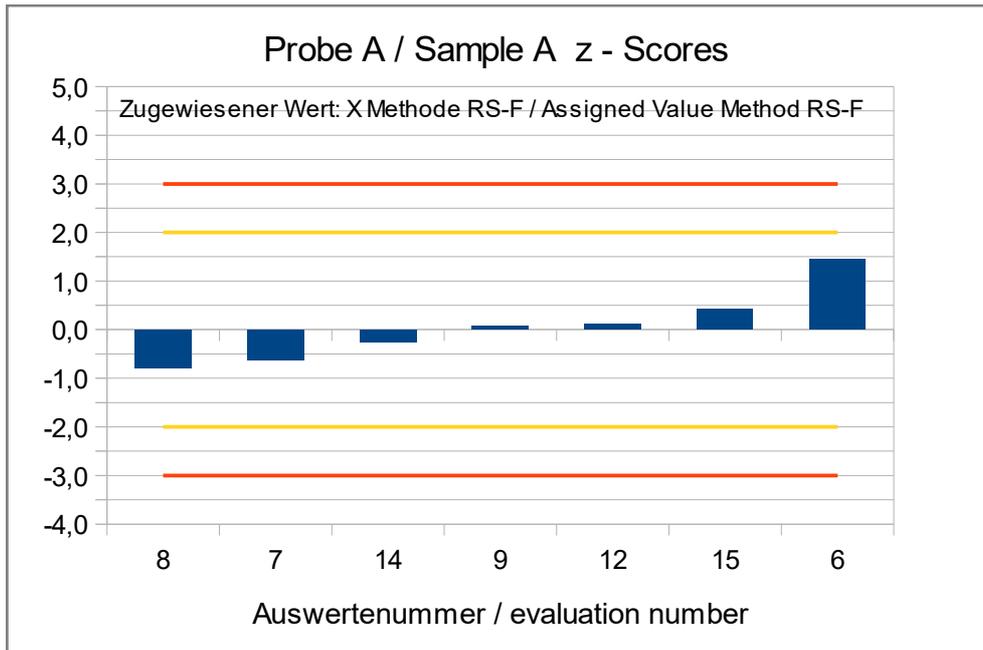


Abb./Fig. 4:

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

Quantitative Auswertung ELISA: Dotierungsniveauprobe

Auswertenummer	β -Lactoglobulin	z-Score Xpt _{ALL}	z-Score Xpt _{RS-F}	Methode	Hinweis
	[mg/kg]				
5a	>400			AQ	
16a	24,4	2,0		EF	
13	>1			ES	
16b				IF	
3	6,50	-2,4		IL	
4	17,0	0,19		MI-II	
2	12,4	-0,94		RS	
17	24,8	2,1		RS	
5b	>4,5			RS-F	
6	22,4	1,5	1,3	RS-F	
7	28,0	2,9	2,6	RS-F	
8	8,76	-1,8	-1,9	RS-F	
9	10,0	-1,5	-1,7	RS-F	
12	15,7	-0,13	-0,32	RS-F	
14	16,1	-0,03	-0,22	RS-F	
15	18,4	0,53	0,31	RS-F	
18	6,60	-2,4		SP	

Methoden:

- AQ = AgraQuant, RomerLabs
- EF = ELISAFast, ipf
- ES = ELISA-Systems
- IF = ImmunoFast (Lateral Flow), ipf
- IL = Immunolab
- MI-II = Morinaga Institute ELISA Kit II
- RS = Ridascreen®, R-Biopharm
- RS-F = Ridascreen® Fast, R-Biopharm
- SP = SensiSpec ELISA Kit, Eurofins

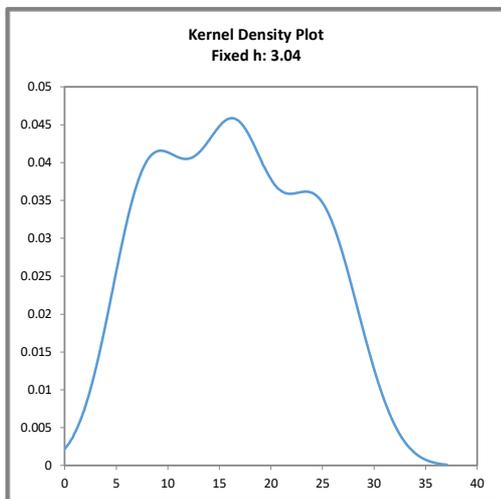


Abb. / Fig. 5:

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 breite Verteilung mit zwei Nebenmaxima bei ca. 9 mg/kg und ca. 24 mg/kg neben dem Hauptmaximum bei ca. 17 mg/kg. Eine Methodenabhängigkeit ist dabei nicht erkennbar.

Kenndaten: Quantitative Auswertung ELISA β -Lactoglobulin**Dotierungsniveauprobe**

Kenndaten	Alle Ergebnisse [mg/kg]	Methode RS-F [mg/kg]
Zugewiesener Wert (X_{pt})	X_{pt}^{ALL}	$X_{pt}^{METHOD\ RS-F}$
Anzahl der Messergebnisse	13	7
Anzahl der Ausreißer	0	0
Mittelwert	16,2	17,1
Median	16,1	16,1
Robuster Mittelwert (X_{pt})	16,2	17,1
Robuste Standardabweichung (S^*)	8,14	7,63
<i>Zielkenndaten:</i>		
Zielstandardabweichung σ_{pt}	4,06	4,26
Untere Grenze des Zielbereichs	8,12	8,53
Obere Grenze des Zielbereichs	24,4	26
Quotient S^*/σ_{pt}	2,0	1,8
Standardunsicherheit $U(X_{pt})$	2,82	3,61
Ergebnisse im Zielbereich	8	6
Prozent im Zielbereich	62	86

Methoden:

RS-F = R-Biopharm, Ridascreen® Fast

Anmerkungen zu den Kenndaten und Vergleich der Bezugswerte:

Die Kerndichte-Schätzung zeigte eine breite Verteilung ohne eindeutige Methoden abhängige Unterschiede.

Die Verteilung der Ergebnisse aller Methoden sowie für Methode RS-F zeigte jeweils eine normale Variabilität. Die Quotienten S^*/σ_{pt} lagen im Bereich bis 2,0. Die robusten Standardabweichungen liegen 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 55% bzw. 58% vom Zusatzniveau von β -Lactoglobulin zur Dotierungsniveauprobe innerhalb der relevanten Anforderungen für die eingesetzten Methoden (s. 3.4.3 und S.30 "Wiederfindungsraten mit z-Scores ELISA für β -Lactoglobulin").

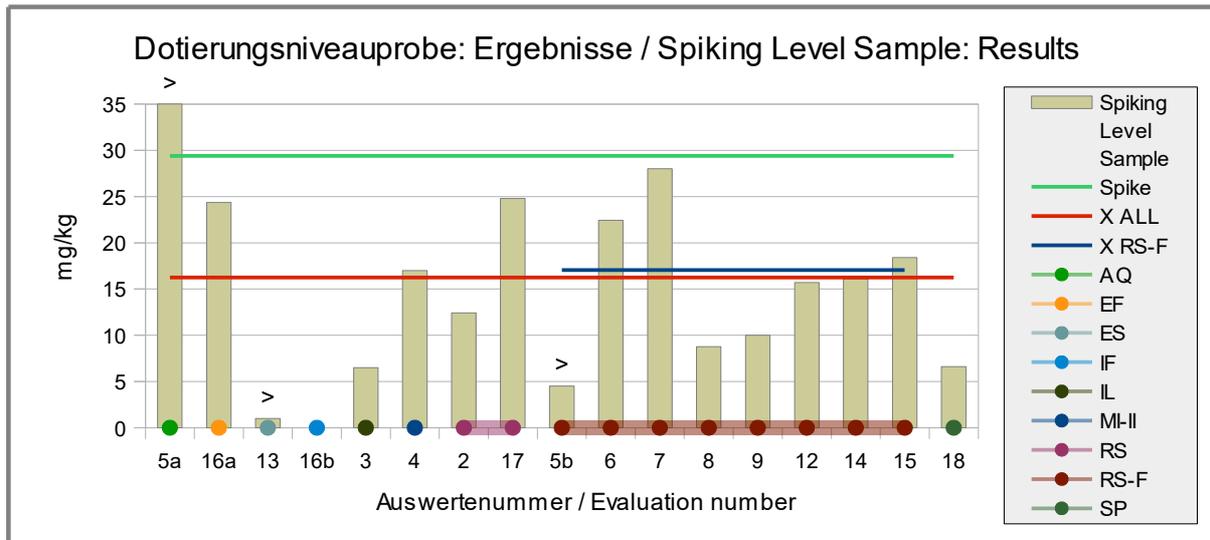


Abb./Fig. 6: ELISA-Ergebnisse β -Lactoglobulin
 grüne Linie = Zusatzniveau (Spike)
 rote Linie = robuster Mittelwert aller Ergebnisse
 blaue Linie = robuster Mittelwert Ergebnisse Methode RS-F
 runde Symbole = Zuordnung der Methoden (s. Legende)

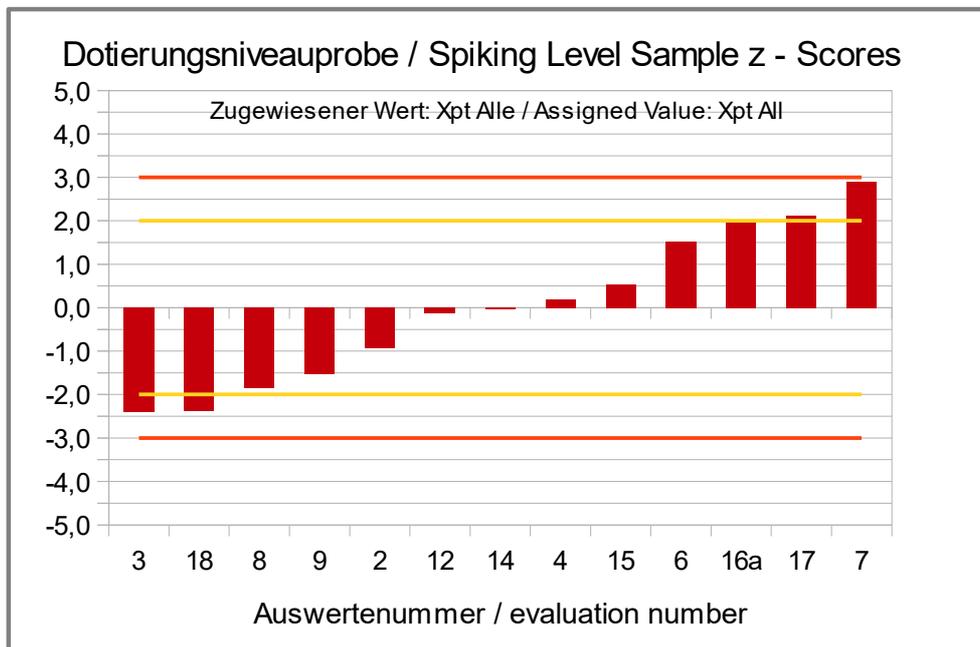


Abb./Fig. 7:
 z-Scores ELISA-Ergebnisse als β -Lactoglobulin
 Zugewiesener Wert: robuster Mittelwert aller Ergebnisse

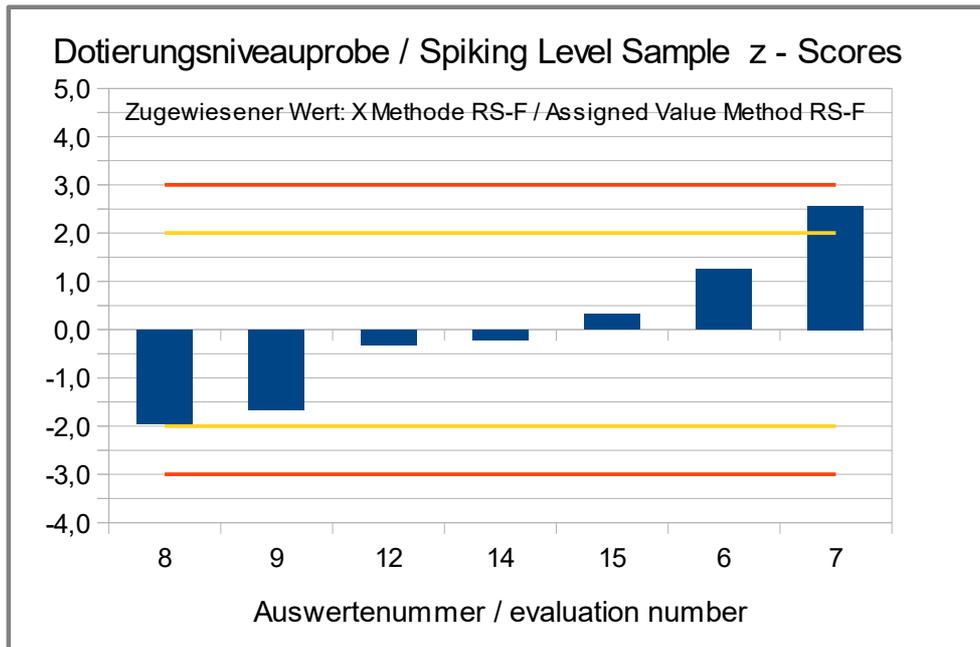


Abb./Fig. 8:

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

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

Auswertenummer	Dotierungsniveauprobe	Wiederfindungsrate*		Probe A	Wiederfindungsrate*		Methode	Hinweis
		[mg/kg]	[%] [Z _{RR}]		[mg/kg]	[%] [Z _{RR}]		
5a	>400			>400			AQ	
16a	24,4	83	-0,69	23,2	82	-0,72	EF	
13	>1			>1			ES	
16b							IF	
3	6,50	22	-3,1	5,70	20	-3,2	IL	
4	17,0	58	-1,7	13,0	46	-2,2	MI-II	
2	12,4	42	-2,3	9,53	34	-2,7	RS	
17	24,8	84	-0,63	43,6	154	2,2	RS	
5b	>4,5			>4,5			RS-F	
6	22,4	76	-0,95	27,5	97	-0,11	RS-F	
7	28,0	95	-0,19	17,0	60	-1,6	RS-F	
8	8,76	30	-2,8	16,2	57	-1,7	RS-F	
9	10,0	34	-2,6	20,5	72	-1,1	RS-F	
12	15,7	53	-1,9	20,7	73	-1,1	RS-F	
14	16,1	55	-1,8	18,9	67	-1,3	RS-F	
15	18,4	63	-1,5	22,2	79	-0,9	RS-F	
18	6,60	22	-3,1	5,40	19	-3,2	SP	

AB**	50-150 %	AB**	50-150 %
Anzahl im AB	8	Anzahl im AB	8
Prozent im AB	62	Prozent im AB	62

* Wiederfindungsrate 100% Bezugsgröße: β -Lactoglobulin, s. Seite 5

** Akzeptanzbereich der AOAC für Allergen-ELISAs

Methoden:

AQ = AgraQuant, RomerLabs
 EF = ELISAFast, ipf
 ES = ELISA-Systems
 IF = ImmunoFast (Lateral Flow), ipf
 IL = Immunolab
 MI-II = Morinaga Institute ELISA Kit II
 RS = Ridascreen®, R-Biopharm
 RS-F = Ridascreen® Fast, R-Biopharm
 SP = SensiSpec ELISA Kit, Eurofins

Anmerkung:

Jeweils 62% (8) der Teilnehmer haben mit der Dotierungsniveauprobe und mit der prozessierten dotierten Lebensmittelmatrix-Probe A mittels ELISA eine Wiederfindungsrate im Bereich der AOAC-Anforderung von 50-150% erhalten.

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

4.1.2 ELISA-Ergebnisse: Casein

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		
5a	positiv	8,40	negativ	< 1	2/2 (100%)	AQ	
9	positiv	14,8	negativ		2/2 (100%)	AQ	
11	positiv	13,2	negativ	<0,2	2/2 (100%)	AQ	
10	positiv	11,3	negativ	<LOQ	2/2 (100%)	BF	
16a	positiv	8,69	negativ	0	2/2 (100%)	EF	
13	positiv	>10	negativ	<1	2/2 (100%)	ES	
17	positiv	8,80	negativ	<	2/2 (100%)	ES	
16b	positiv		negativ		2/2 (100%)	IF	Lateral Flow
3	positiv	4,90	negativ	<0,2	2/2 (100%)	IL	
4	positiv	18,0	negativ	<0,25	2/2 (100%)	MI-II	
5b	positiv	10,5	negativ	< 0,5	2/2 (100%)	RS-F	
6	positiv	21,0	negativ	<LOD	2/2 (100%)	RS-F	
7	positiv	15,0	negativ	<2,5	2/2 (100%)	RS-F	
8	positiv	15,9	negativ		2/2 (100%)	RS-F	
12	positiv	23,6	negativ	<2,5	2/2 (100%)	RS-F	
14	positiv	18,2	negativ	<0,71	2/2 (100%)	RS-F	
18	positiv	30,0	negativ	<0,1	2/2 (100%)	SP	

	Probe A	Probe B
Anzahl positiv	17	0
Anzahl negativ	0	17
Prozent positiv	100	0
Prozent negativ	0	100
Konsenswert	positiv	negativ

Methoden:

- AQ = AgraQuant, RomerLabs
- BF = MonoTrace ELISA, BioFront Technologies
- EF = ELISAFast, ifp
- ES = ELISA-Systems
- IF = ImmunoFast (Lateral Flow), ifp
- IL = Immunolab
- MI-II = Morinaga Institute ELISA Kit II
- RS-F= Ridascreen® Fast, R-Biopharm
- SP = SensiSpec ELISA Kit, Eurofins

Anmerkung:

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

Quantitative Auswertung ELISA: Probe A

Auswertenummer	Casein [mg/kg]	z-Score Xpt _{ALL}	z-Score Xpt _{RS-F}	Methode	Hinweis
5a	8,40	-1,7		AQ	
9	14,8	0,10		AQ	
11	13,2	-0,35		AQ	
10	11,3	-0,87		BF	
16a	8,69	-1,6		EF	
13	>10			ES	
17	8,80	-1,6		ES	
16b				IF	
3	4,90	-2,6		IL	Lateral Flow
4	18,0	0,99		MI-II	
5b	10,5	-1,1	-1,6	RS-F	
6	21,0	1,8	0,84	RS-F	
7	15,0	0,16	-0,54	RS-F	
8	15,9	0,40	-0,34	RS-F	
12	23,6	2,5	1,4	RS-F	
14	18,2	1,0	0,19	RS-F	
18	30,0	4,3		SP	

Methoden:

- AQ = AgraQuant, RomerLabs
- BF = MonoTrace ELISA, BioFront Technologies
- EF = ELISAFast, ifp
- ES = ELISA-Systems
- IF = ImmunoFast (Lateral Flow), ifp
- IL = Immunolab
- MI-II = Morinaga Institute ELISA Kit II
- RS-F= Ridascreeen® Fast, R-Biopharm
- SP = SensiSpec ELISA Kit, Eurofins

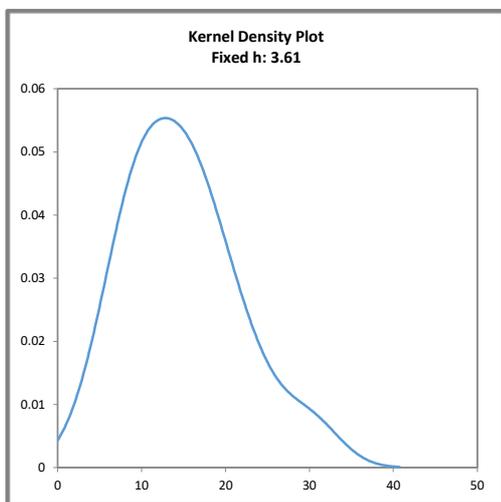


Abb. / Fig. 9:

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 einer leichten Schulter bei >25 mg/kg.

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

Kenndaten	Alle Ergebnisse [mg/kg]	Methode RS-F [mg/kg]
Zugewiesener Wert (X_{pt})	X_{pt_ALL}	$X_{pt_METHOD\ RS-F}$
Anzahl der Messergebnisse	15	6
Anzahl der Ausreißer	0	0
Mittelwert	14,8	17,4
Median	14,8	17,0
Robuster Mittelwert (X_{pt})	14,4	17,4
Robuste Standardabweichung (S^*)	6,59	5,26
<i>Zielkenndaten:</i>		
Zielstandardabweichung σ_{pt}	3,61	4,34
Untere Grenze des Zielbereichs	7,22	8,68
Obere Grenze des Zielbereichs	21,7	26,0
Quotient S^*/σ_{pt}	1,8	1,2
Standardunsicherheit $U(X_{pt})$	2,13	2,69
Ergebnisse im Zielbereich	12	6
Prozent im Zielbereich	80	100

Methoden:

RS-F = R-Biopharm, Ridascreen® Fast

Anmerkungen zu den Kenndaten und Vergleich der Bezugswerte:

Die Kerndichte-Schätzung zeigt annähernd eine symmetrische Verteilung der Ergebnisse.

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

Die robusten Mittelwerte der Auswertungen lagen mit 82% bzw. 99% vom Zusatzniveau von Casein zu Probe A, innerhalb der relevanten Anforderungen für die eingesetzten Methoden (s. 3.4.3 und S.40 "Wiederfindungsraten mit z-Scores ELISA für Casein").

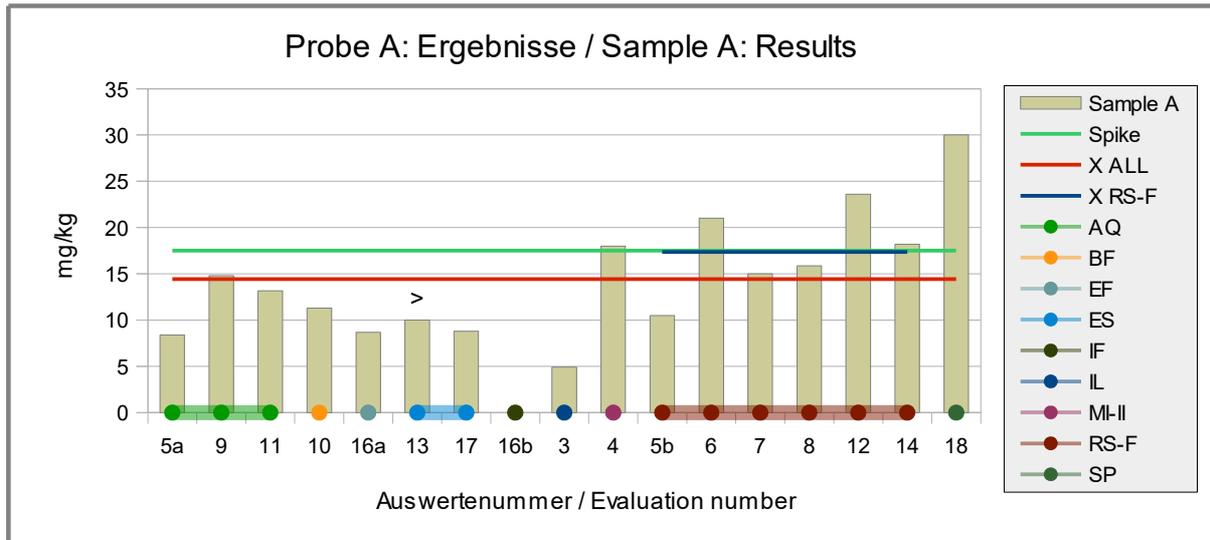


Abb./Fig. 10: ELISA-Ergebnisse Casein
 grüne Linie = Zusatzniveau (Spike)
 rote Linie = robuster Mittelwert aller Ergebnisse
 blaue Linie = robuster Mittelwert Ergebnisse Methode RS-F
 runde Symbole = Zuordnung der Methoden (s. Legende)

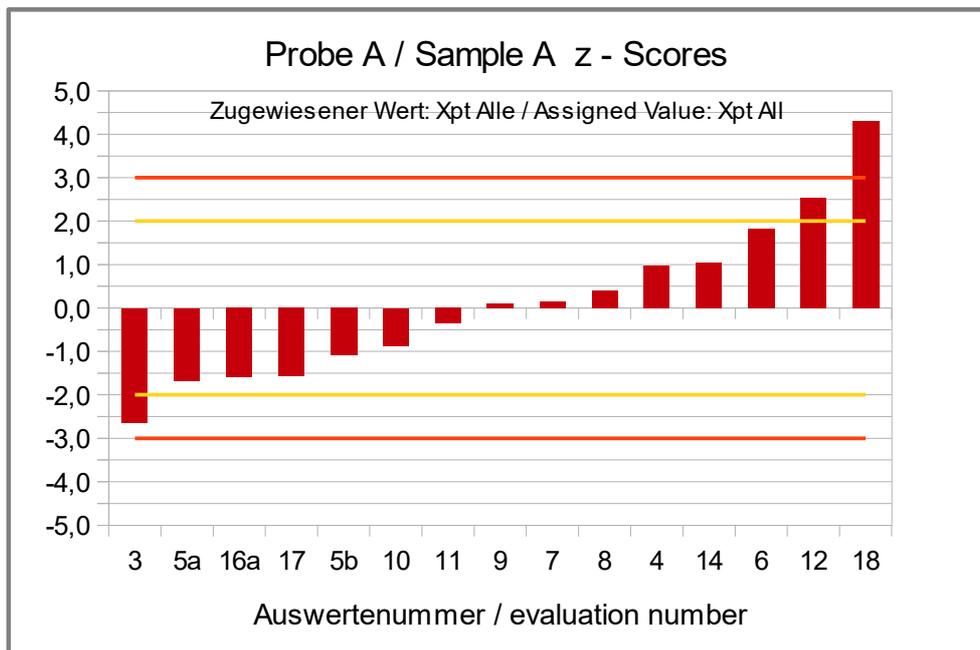


Abb./Fig. 11:
 z-Scores ELISA-Ergebnisse als Casein
 Zugewiesener Wert: robuster Mittelwert aller Ergebnisse

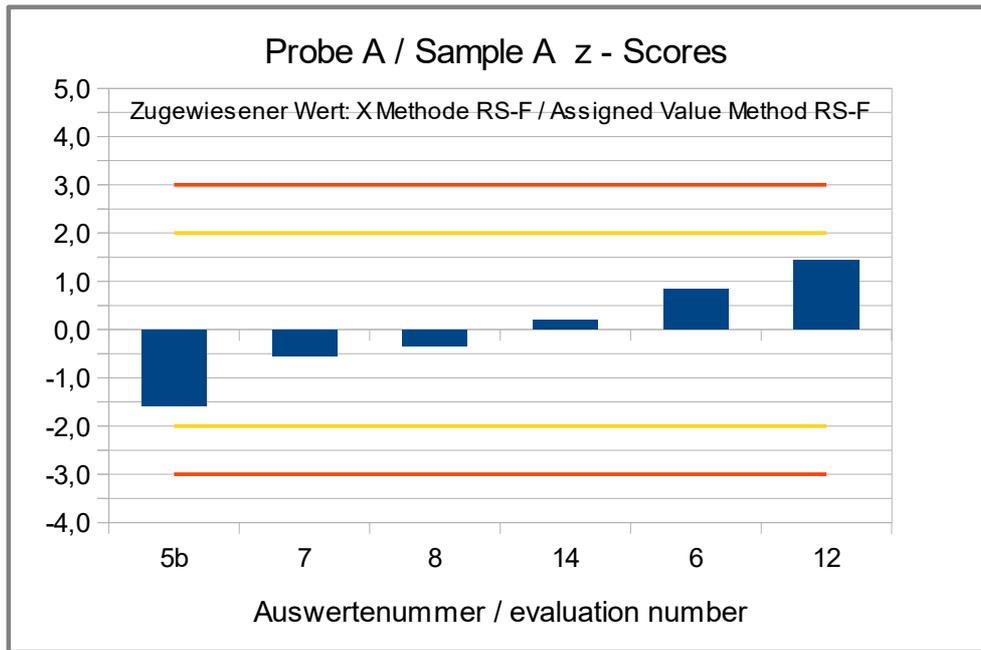


Abb./Fig. 12:

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

Quantitative Auswertung ELISA: Dotierungsniveauprobe

Auswertenummer	Casein [mg/kg]	z-Score X _{ptALL}	z-Score X _{ptRS-F}	Methode	Hinweis
5a	11,0	-1,7		AQ	
9	27,7	1,8		AQ	
11	30,3	2,3		AQ	
10	12,3	-1,4		BF	
16a	8,33	-2,3		EF	
13	8,30	-2,3		ES	
17	1,90	-3,6		ES	
16b				IF	
3	16,5	-0,56		IL	
4	20,0	0,17		MI-II	
5b	>13,5			RS-F	
6	27,7	1,8	0,78	RS-F	
7	27,0	1,6	0,66	RS-F	
8	19,9	0,16	-0,56	RS-F	
12	25,1	1,2	0,33	RS-F	
14	16,1	-0,64	-1,2	RS-F	
18	34,0	3,1		SP	

Methoden:

- AQ = AgraQuant, RomerLabs
- BF = MonoTrace ELISA, BioFront Technologies
- EF = ELISAFast, ifp
- ES = ELISA-Systems
- IF = ImmunoFast (Lateral Flow), ifp
- IL = Immunolab
- MI-II = Morinaga Institute ELISA Kit II
- RS-F = Ridascreen® Fast, R-Biopharm
- SP = SensiSpec ELISA Kit, Eurofins

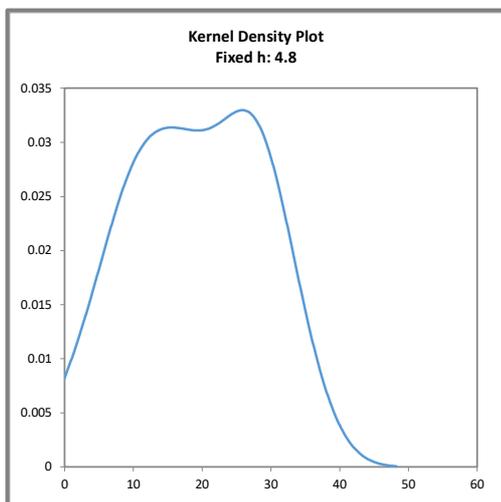


Abb. / Fig. 13:

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 breite Verteilung mit zwei Maxima bei ca. 15 mg/kg und ca. 27 mg/kg. Eine Methodenabhängigkeit ist dabei nicht erkennbar.

Kenndaten: Quantitative Auswertung ELISA Casein**Dotierungsniveauprobe**

Kenndaten	Alle Ergebnisse [mg/kg]	Methode RS-F [mg/kg]
Zugewiesener Wert (X_{pt})	X_{pt}^{ALL}	$X_{pt}^{METHOD\ RS-F}$
Anzahl der Messergebnisse	15	5
Anzahl der Ausreißer	0	0
Mittelwert	19,1	23,2
Median	19,9	25,1
Robuster Mittelwert (X_{pt})	19,2	23,2
Robuste Standardabweichung (S^*)	10,5	5,65
<i>Zielkenndaten:</i>		
Zielstandardabweichung σ_{pt}	4,80	5,79
Untere Grenze des Zielbereichs	9,59	11,6
Obere Grenze des Zielbereichs	28,8	34,8
Quotient S^*/σ_{pt}	2,2	0,98
Standardunsicherheit $U(X_{pt})$	3,39	3,16
Ergebnisse im Zielbereich	10	5
Prozent im Zielbereich	67	100

Methoden:

RS-F = R-Biopharm, Ridascreen® Fast

Anmerkungen zu den Kenndaten und Vergleich der Bezugswerte:

Die Kerndichte-Schätzung zeigte eine breite Verteilung mit zwei Maxima ohne eindeutige Methoden abhängige Unterschiede.

Die Verteilung der Ergebnisse aller Methoden zeigte eine leicht erhöhte Variabilität und für Methode RS-F eine geringe Variabilität. Die Quotienten S^*/σ_{pt} lagen bei 2,2 bzw. unter 1,0. Die robusten Standardabweichungen liegen oberhalb des Bereiches bzw. 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 für die methodenübergreifende Auswertung nur eingeschränkt gültig, da für einige Methoden nur wenige Ergebnisse vorlagen.

Die robusten Mittelwerte der Auswertungen lagen mit 109% bzw. 132% vom Zusatzniveau von Casein zur Dotierungsniveauprobe innerhalb der relevanten Anforderungen für die eingesetzten Methoden (s. 3.4.3 und S.40 "Wiederfindungsraten mit z-Scores ELISA für Casein").

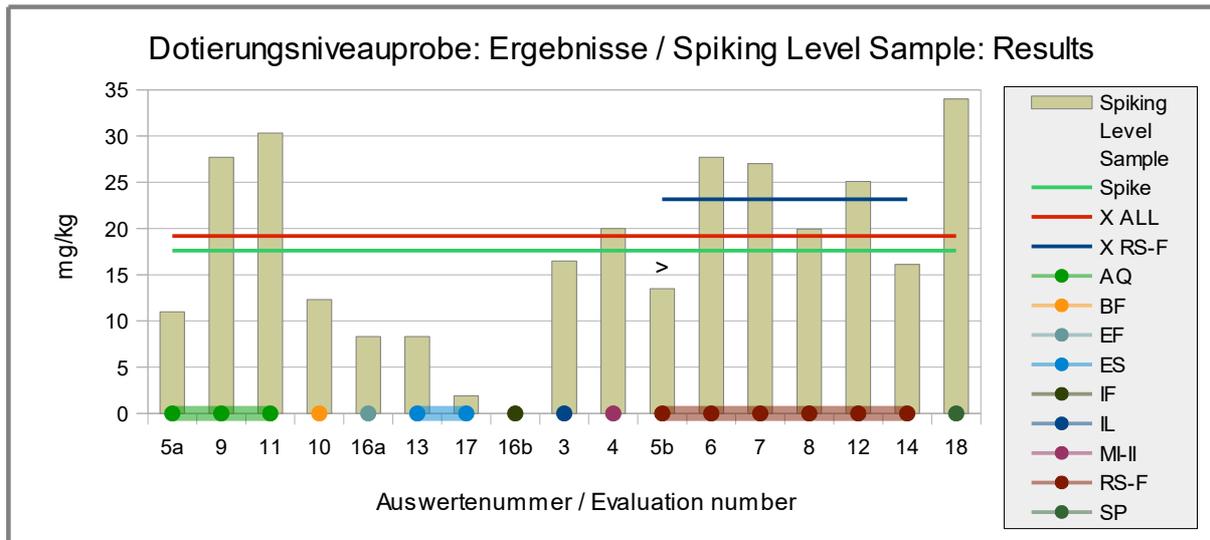


Abb./Fig. 14: ELISA-Ergebnisse Casein
 grüne Linie = Zusatzniveau (Spike)
 rote Linie = robuster Mittelwert aller Ergebnisse
 blaue Linie = robuster Mittelwert Ergebnisse Methode RS-F
 runde Symbole = Zuordnung der Methoden (s. Legende)

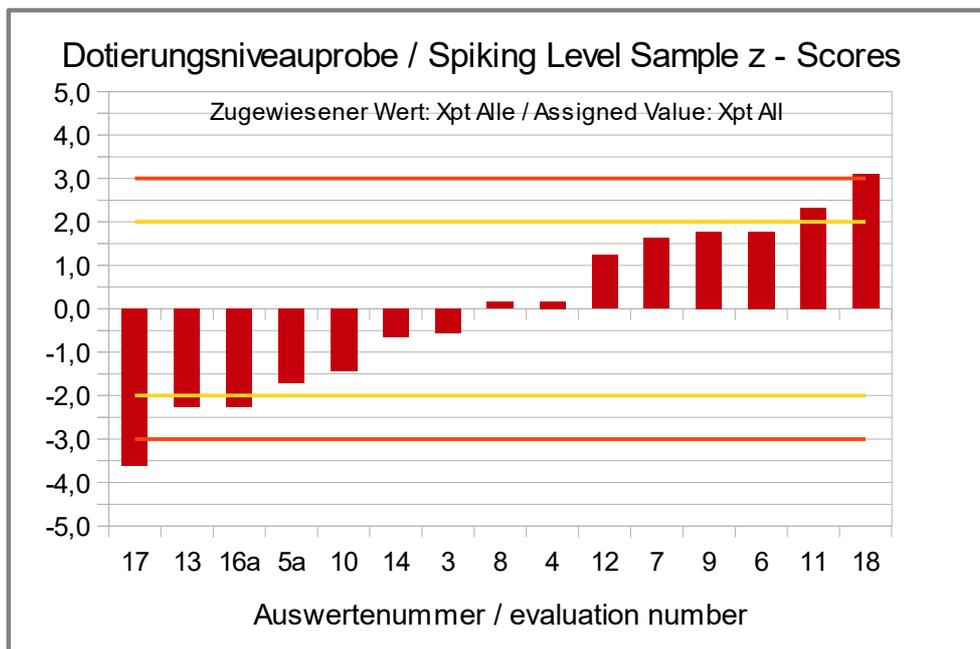


Abb./Fig. 15:
 z-Scores ELISA-Ergebnisse als Casein
 Zugewiesener Wert: robuster Mittelwert aller Ergebnisse

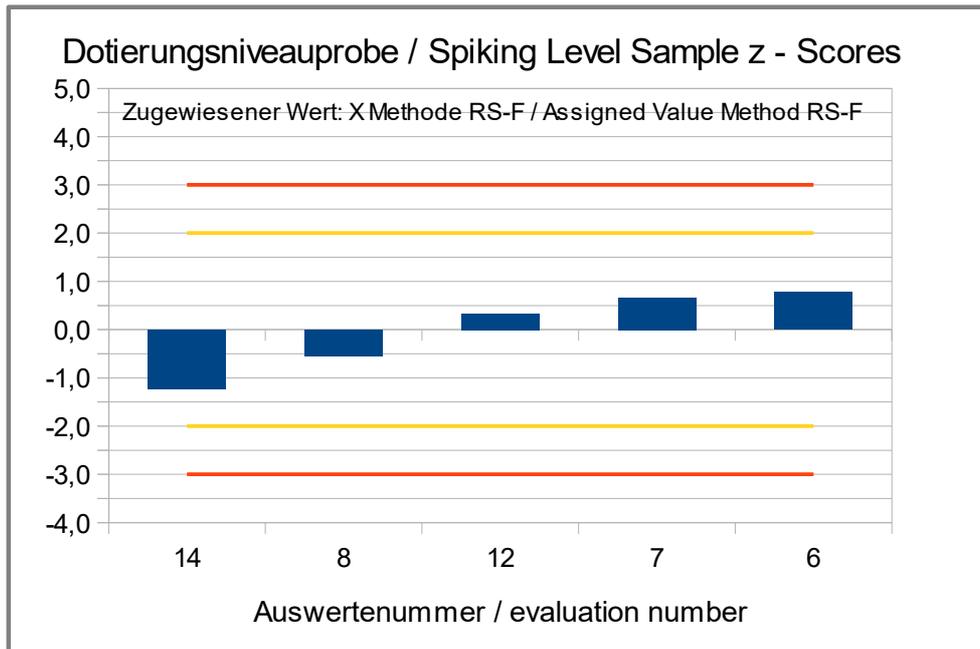


Abb./Fig. 16:

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

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

Auswertenummer	Dotierungsniveauprobe	Wiederfindungsrate*		Probe A	Wiederfindungsrate*		Methode	Hinweis
		[mg/kg]	[%] [Z _{RR}]		[mg/kg]	[%] [Z _{RR}]		
5a	11,0	63	-1,5	8,40	48	-2,1	AQ	
9	27,7	157	2,3	14,8	85	-0,6	AQ	
11	30,3	172	2,9	13,2	75	-1,0	AQ	
10	12,3	70	-1,2	11,3	65	-1,4	BF	
16a	8,33	47	-2,1	8,69	50	-2,0	EF	
13	8,30	47	-2,1	>10			ES	
17	1,90	11	-3,6	8,80	50	-2,0	ES	
16b							IF	
3	16,5	94	-0,3	4,90	28	-2,9	IL	
4	20,0	114	0,55	18,0	103	0,11	MI-II	
5b	>13,5			10,5	60	-1,6	RS-F	
6	27,7	157	2,3	21,0	120	0,80	RS-F	
7	27,0	153	2,1	15,0	86	-0,6	RS-F	
8	19,9	113	0,53	15,9	91	-0,4	RS-F	
12	25,1	143	1,7	23,6	135	1,4	RS-F	
14	16,1	91	-0,3	18,2	104	0,16	RS-F	
18	34,0	193	3,7	30,0	171	2,9	SP	

AB**	50-150 %	AB**	50-150 %
Anzahl im AB	7	Anzahl im AB	12
Prozent im AB	47	Prozent im AB	80

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

** Akzeptanzbereich der AOAC für Allergen-ELISAs

Methoden:

AQ = AgraQuant, RomerLabs
 BF = MonoTrace ELISA, BioFront Technologies
 EF = ELISAFast, ifp
 ES = ELISA-Systems
 IF = ImmunoFast (Lateral Flow), ifp
 IL = Immunolab
 MI-II = Morinaga Institute ELISA Kit II
 RS-F= Ridascreen® Fast, R-Biopharm
 SP = SensiSpec ELISA Kit, Eurofins

Anmerkung:

47% (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 80% (12) der Wiederfindungsraten in diesem Akzeptanzbereich. Die zugehörigen z-Scores basieren auf der Zielstandardabweichung von 25%.

4.1.3 ELISA-Ergebnisse: Milch (als Gesamt-Milchprotein)

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		
16a	positiv	246	negativ	0	2/2 (100%)	ES	Ergebnis umgerechnet °
16b	positiv		negativ		2/2 (100%)	IF	Lateral Flow
6	positiv	252	negativ	<LOD	2/2 (100%)	RS-F	
8	positiv	251	negativ		2/2 (100%)	RS-F	
15	positiv	279	negativ	<2,5	2/2 (100%)	RS-F	
18	positiv	34,0	negativ	< 0.2	2/2 (100%)	SP	Ergebnisse Summe aus Casein und β-Lactoglobulin

° Umrechnung S. 19

	Probe A	Probe B
Anzahl positiv	6	0
Anzahl negativ	0	6
Prozent positiv	100	0
Prozent negativ	0	100
Konsenswert	positiv	negativ

Methoden:

ES = ELISA-Systeme
 IF = ImmunoFast (Lateral Flow), ifp
 RS-F= Ridascreen® Fast, R-Biopharm
 SP = SensiSpec ELISA Kit, Eurofins

Anmerkung:

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

Quantitative Auswertung ELISA: Probe A (informativ)

Auswertenummer	Gesamt-Milchprotein	z-Score Xpt _{ALL}	Methode	Hinweis
	[mg/kg]			
16a	246	-0,01	ES	Ergebnis umgerechnet °
16b			IF	
6	252	0,10	RS-F	
8	251	0,07	RS-F	
15	279	0,52	RS-F	
18	34,0	-3,4	SP	Ergebnisse Summe aus Casein und β-Lactoglobulin

° Umrechnung S. 19

Methoden:

ES = ELISA-Systeme
 IF = ImmunoFast, ifp
 RS-F= Ridascreen® Fast, R-Biopharm
 SP = SensiSpec ELISA Kit, Eurofins

Anmerkung:

Aufgrund der geringen Anzahl von Ergebnissen wurde die Auswertung ausschließlich zur Information durchgeführt. Eine Kerndichte-Schätzung wurde nicht vorgenommen.

Kenndaten: Quantitative Auswertung ELISA Milch (als Gesamt-Milchprotein) (informativ)

Probe A

Kenndaten	Alle Ergebnisse [mg/kg]
Zugewiesener Wert (X_{pt})	X_{pt_ALL}
Anzahl der Messergebnisse	5
Anzahl der Ausreißer	-
Mittelwert	212
Median	251
Robuster Mittelwert (X_{pt})	247
Robuste Standardabweichung (S^*)	30,3
Zielkenndaten:	
Zielstandardabweichung σ_{pt}	61,6
Untere Grenze des Zielbereichs	123
Obere Grenze des Zielbereichs	370
Quotient S^*/σ_{pt}	0,49
Standardunsicherheit $U(X_{pt})$	17,0
Ergebnisse im Zielbereich	4
Prozent im Zielbereich	80

Anmerkungen zu den Kenndaten und Vergleich der Bezugswerte:

Aufgrund der geringen Anzahl von Ergebnissen wurde die Auswertung ausschließlich zur Information durchgeführt.

Der robuste Mittelwert der Auswertung lag mit 331% vom Zusatzniveau von Gesamt-Milchprotein zu Probe A, deutlich oberhalb der relevanten Anforderungen für die eingesetzten Methoden (s. 3.4.3 und S.47 "Wiederfindungsraten mit z-Scores ELISA für Milch").

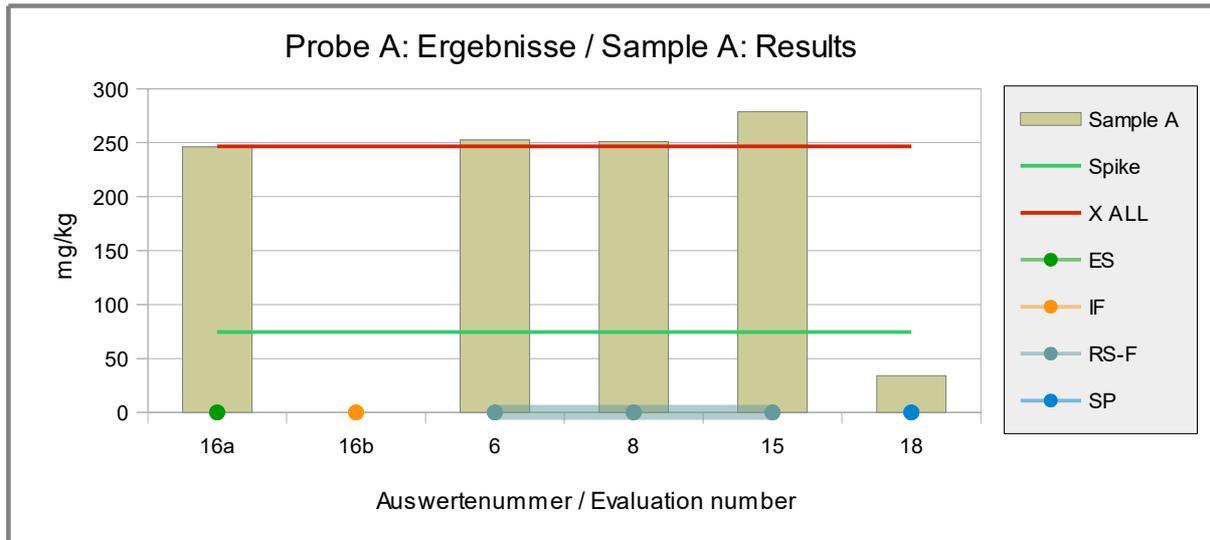


Abb./Fig. 17: ELISA-Ergebnisse Milch (als Gesamt-Milchprotein)
 grüne Linie = Zusatzniveau (Spike)
 rote Linie = robuster Mittelwert aller Ergebnisse
 runde Symbole = Zuordnung der Methoden (s. Legende)

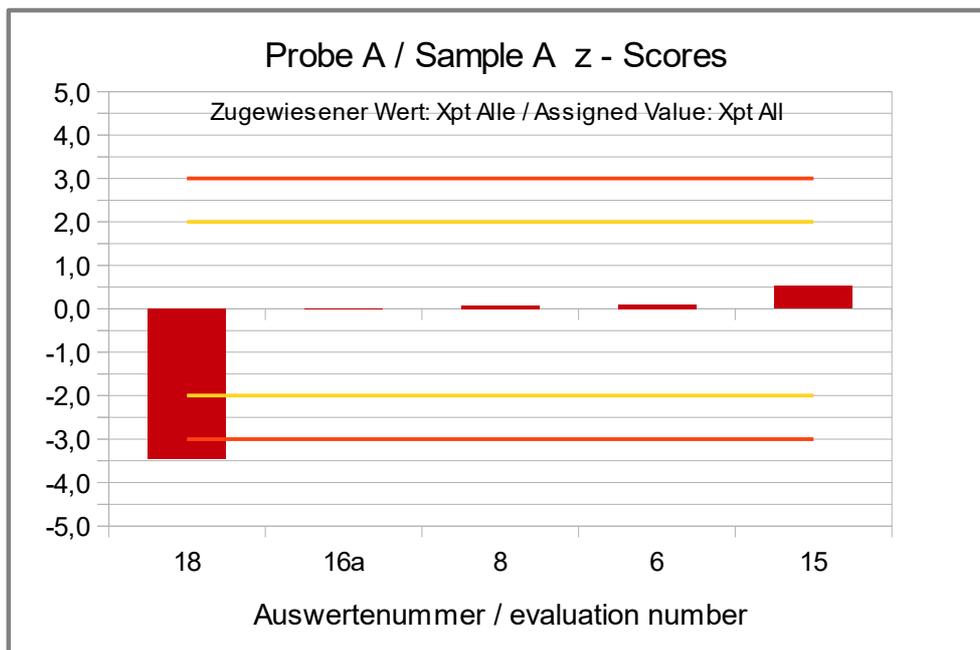


Abb./Fig. 18:
 z-Scores ELISA-Ergebnisse Milch als Gesamt-Milchprotein
 Zugewiesener Wert: robuster Mittelwert aller Ergebnisse

Quantitative Auswertung ELISA: Dotierungsniveauprobe (informativ)

Auswertenummer	Gesamt-Milchprotein [mg/kg]	z-Score $X_{pt_{ALL}}$	Methode	Hinweis
16a	252	0,90	ES	Ergebnis umgerechnet °
16b			IF	
6	214	0,16	RS-F	
8	176	-0,59	RS-F	
15	206	0,00	RS-F	
18	45,0	-3,1	SP	Ergebnisse Summe aus Casein und β -Lactoglobulin

° Umrechnung S. 19

Methoden:

ES = ELISA-Systeme

IF = ImmunoFast, ifp

RS-F= Ridascreen® Fast, R-Biopharm

SP = SensiSpec ELISA Kit, Eurofins

Anmerkung:

Aufgrund der geringen Anzahl von Ergebnissen wurde die Auswertung ausschließlich zur Information durchgeführt. Eine Kerndichte-Schätzung wurde aufgrund der Anzahl von < 8 Ergebnissen nicht vorgenommen.

Kenndaten: Quantitative Auswertung ELISA Milch (als Gesamt-Milchprotein) (informativ)

Dotierungsniveauprobe

Kenndaten	Alle Ergebnisse [mg/kg]
Zugewiesener Wert (X_{pt})	X_{pt_ALL}
Anzahl der Messergebnisse	5
Anzahl der Ausreißer	0
Mittelwert	179
Robuster Mittelwert	184
Median (X_{pt})	206
Robuste Standardabweichung (S^*)	76,9
<i>Zielkenndaten:</i>	
Zielstandardabweichung σ_{pt}	51,5
Untere Grenze des Zielbereichs	103
Obere Grenze des Zielbereichs	309
Quotient S^*/σ_{pt}	1,5
Standardunsicherheit $U_{(X_{pt})}$	43,0
Ergebnisse im Zielbereich	4
Prozent im Zielbereich	80

Anmerkungen zu den Kenndaten und Vergleich der Bezugswerte:

Aufgrund der geringen Anzahl von Ergebnissen wurde die Auswertung ausschließlich zur Information durchgeführt.

Der Median der Auswertung lag mit 269% vom Zusatzniveau von Gesamt-Milchprotein zur Dotierungsniveauprobe deutlich oberhalb der relevanten Anforderungen für die eingesetzten Methoden (s. 3.4.3 und S.47 "Wiederfindungsraten mit z-Scores ELISA für Milch").

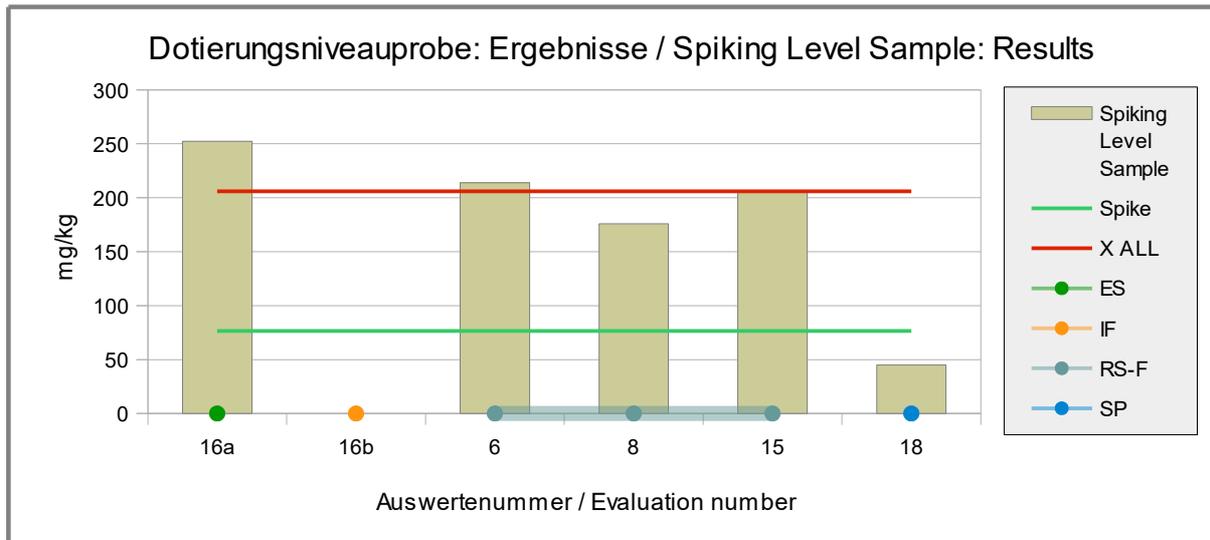


Abb./Fig. 19: ELISA-Ergebnisse Milch als Gesamt-Milchprotein
 grüne Linie = Zusatzniveau (Spike)
 rote Linie = robuster Mittelwert aller Ergebnisse
 runde Symbole = Zuordnung der Methoden (s. Legende)

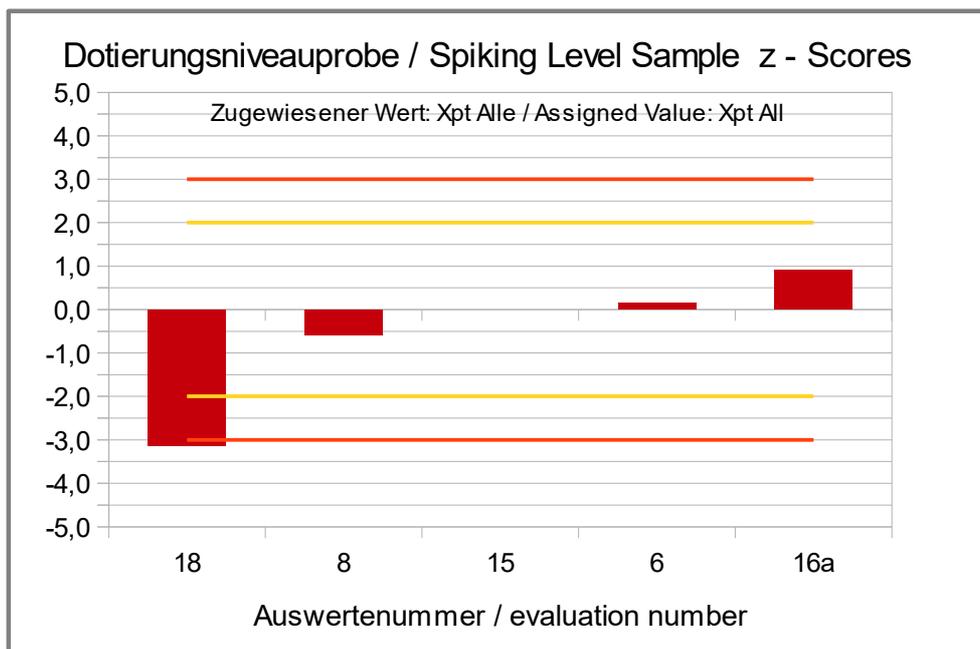


Abb./Fig. 20: z-Scores ELISA-Ergebnisse Milch als Gesamt-Milchprotein
 Zugewiesener Wert: Median aller Ergebnisse

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

Auswertenummer	Dotierungsniveauprobe	Wiederfindungsrate*		Probe A	Wiederfindungsrate*		Methode	Hinweis
		[mg/kg]	[%] [Z _{RR}]		[mg/kg]	[%] [Z _{RR}]		
16a	252	330	9,2	246	330	9,2	ES	Ergebnis umgerechnet °
16b							IF	
6	214	280	7,2	252	339	9,6	RS-F	
8	176	230	5,2	251	337	9,5	RS-F	
15	206	269	6,8	279	374	11,0	RS-F	
18	45,0	59	-1,6	34,0	46	-2,2	SP	Ergebnis Summe aus Casein und β-Lactoglobulin

° Umrechnung S. 19

AB**	50-150 %	AB**	50-150 %
Anzahl im AB	1	Anzahl im AB	0
Prozent im AB	20	Prozent im AB	0

Methoden:

ES = ELISA-Systeme
 IF = ImmunoFast, ifp
 RS-F= Ridascreen® Fast, R-Biopharm
 SP = SensiSpec ELISA Kit, Eurofins

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

** Akzeptanzbereich der AOAC für Allergen-ELISAs

Anmerkung:

Die Wiederfindungsraten von 4 Teilnehmern (Methoden ES und RS-F) lagen sowohl für die Dotierungsniveauprobe als auch für die prozessierte dotierte Lebensmittelmatrix-Probe A im Bereich von 230–330% bzw. 330–374%. Ein Teilnehmer hat mit der Methode SP für die beiden Proben Wiederfindungsraten von etwa 50% erhalten.

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

Es ist zu beachten, dass die Milchprotein-Zusammensetzung der EP-Proben nicht dem natürlichen Verhältnis von Casein zu Molkenprotein entspricht. Der Molkenproteinanteil ist erhöht (s. Seite 5). Dies kann je nach Spezifität der eingesetzten Methoden zu einer veränderten Response für Gesamt-Milchprotein führen.

4.1.4 PCR-Ergebnisse: Milch

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 Dotierung		
17	positiv		negativ		2/2 (100%)	div	Nachweis von Kuh-DNA

	Probe A		Probe B	
Dotierung	positiv		negativ	

Methoden:

div = keine genaue Angabe / andere Methode
 div = not indicated / other method

Anmerkung:

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

Qualitative Auswertung der Ergebnisse: Dotierungsniveauprobe

Auswertenummer	Milch	Milch	Methode	Hinweis
	pos/neg	[mg/kg]		
17	positiv		div	Nachweis von Kuh-DNA

Dotierungsniveauprobe	
Dotierung	positiv

Methoden:

div = keine genaue Angabe / andere Methode
 div = not indicated / other method

Anmerkung:

Das Ergebnis des Teilnehmers steht in qualitativer Übereinstimmung mit der Dotierungsniveauprobe.

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]	Übereinstimmungen mit Konsenswerten		
10	positiv	25,5	negativ	<LOQ	2/2 (100%)	BF	
16a	positiv	38,8	negativ	0	2/2 (100%)	EF	
16b	positiv		negativ		2/2 (100%)	IF	Lateral Flow
3	positiv	87,5	negativ	<4	2/2 (100%)	IL	
18	positiv	42,0	negativ	<2	2/2 (100%)	IL	Ergebnis umgerechnet °
4a	positiv	22,0	negativ	<5	2/2 (100%)	RS	
5	positiv	28,9	negativ	<3	2/2 (100%)	RS	
7	positiv	15,0	negativ	<5	2/2 (100%)	RS	
8	positiv	21,4	negativ		2/2 (100%)	RS	
9	positiv	27,7	negativ		2/2 (100%)	RS	
11	positiv	23,1	negativ	<5	2/2 (100%)	RS	
12	positiv	25,7	negativ	<5	2/2 (100%)	RS	
13a	positiv	14,0	negativ	<5	2/2 (100%)	RS	
14	positiv	16,5	negativ	< 2,7	2/2 (100%)	RS	
15	positiv	14,6	negativ	<5	2/2 (100%)	RS	
17	positiv	31,0	negativ	<	2/2 (100%)	RS	
6	positiv	25,9	negativ	<LOD	2/2 (100%)	RS-F	
13b	positiv	17,0	negativ	<2,5	2/2 (100%)	RS-F	
4b	positiv	22,0	negativ	<3,12	2/2 (100%)	SP	
1	positiv	14,3	negativ	0	2/2 (100%)	VT	

° Umrechnung S. 19

	Probe A	Probe B
Anzahl positiv	20	0
Anzahl negativ	0	20
Prozent positiv	100	0
Prozent negativ	0	100
Konsenswert	positiv	negativ

Methoden:

BF = MonoTrace ELISA, BioFront Technologies
 EF = ELISAFast, ifp
 IF = ImmunoFast (Lateral Flow), ifp
 IL = Immunolab
 RS = Ridascreen®, R-Biopharm
 RS-F= Ridascreen® Fast, R-Biopharm
 SP = SensiSpec ELISA Kit, Eurofins
 VT = Veratox, Neogen

Anmerkung:

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

Quantitative Auswertung ELISA: Probe A

Auswertenummer	Gluten [mg/kg]	z-Score Xpt _{ALL}	z-Score Xpt _{RS}	Methode	Hinweis
10	25,5	0,24		BF	
16a	38,8	2,4		EF	
16b				IF	
3	87,5	11		IL	
18	42,0	3,0		IL	Ergebnis umgerechnet °
4a	22,0	-0,34	0,04	RS	
5	28,9	0,80	1,3	RS	
7	15,0	-1,5	-1,2	RS	
8	21,4	-0,44	-0,07	RS	
9	27,7	0,60	1,1	RS	
11	23,1	-0,16	0,23	RS	
12	25,7	0,27	0,71	RS	
13a	14,0	-1,7	-1,4	RS	
14	16,5	-1,3	-0,97	RS	
15	14,6	-1,6	-1,3	RS	
17	31,0	1,2	1,7	RS	
6	25,9	0,31		RS-F	
13b	17,0	-1,2		RS-F	
4b	22,0	-0,34		SP	
1	14,3	-1,6		VT	

° Umrechnung S. 19

Methoden:

- BF = MonoTrace ELISA, BioFront Technologies
- EF = ELISAFast, ifp
- IF = ImmunoFast (Lateral Flow), ifp
- IL = Immunolab
- RS = Ridascreen®, R-Biopharm
- RS-F= Ridascreen® Fast, R-Biopharm
- SP = SensiSpec ELISA Kit, Eurofins
- VT = Veratox, Neogen

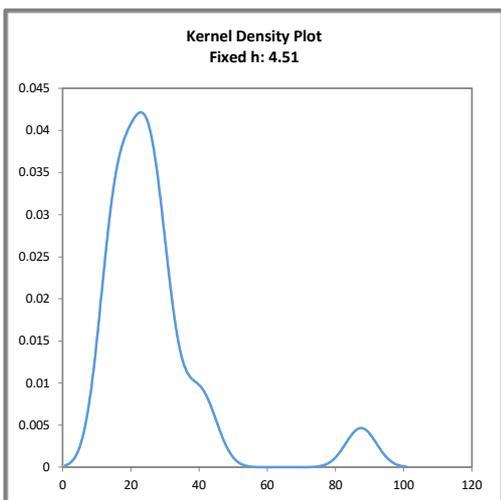


Abb. / Fig. 21:

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 einer leichten Schulter bei ca. 40 mg/kg (Methode EF und IL) und einem Nebenpeak bei 88 mg/kg, der auf einen Einzelwert außerhalb des Zielbereiches zurückgeht (Methode IL).

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

Kenndaten	Alle Ergebnisse [mg/kg]	Methode RS [mg/kg]
Zugewiesener Wert (X_{pt})	X_{pt_ALL}	$X_{pt_METHOD_RS}$
Anzahl der Messergebnisse	19	11
Anzahl der Ausreißer	-	0
Mittelwert	27,0	21,8
Median	23,1	22,0
Robuster Mittelwert (X_{pt})	24,1	21,8
Robuste Standardabweichung (S^*)	8,98	6,94
Zielkenndaten:		
Zielstandardabweichung σ_{pt}	6,02	5,45
Untere Grenze des Zielbereichs	12,0	10,9
Obere Grenze des Zielbereichs	36,1	32,7
Quotient S^*/σ_{pt}	1,5	1,3
Standardunsicherheit $U(X_{pt})$	2,58	2,61
Ergebnisse im Zielbereich	16	11
Prozent im Zielbereich	84	100

Methoden:

RS = R-Biopharm, Ridascreen®

Anmerkungen zu den Kenndaten und Vergleich der Bezugswerte:

Die Kerndichte-Schätzung zeigte annähernd eine symmetrische Verteilung.

Die Auswertungen der Ergebnisse aller Methoden und von Methode RS zeigten eine normale Variabilität der Ergebnisse. Die Quotienten S^*/σ_{pt} lagen 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 109% bzw. 99% vom Zusatzniveau von Gluten zu Probe A, innerhalb der relevanten Anforderungen für die eingesetzten Methoden (s. 3.4.3 und S.58 "Wiederfindungsraten mit z-Scores ELISA für Gluten").

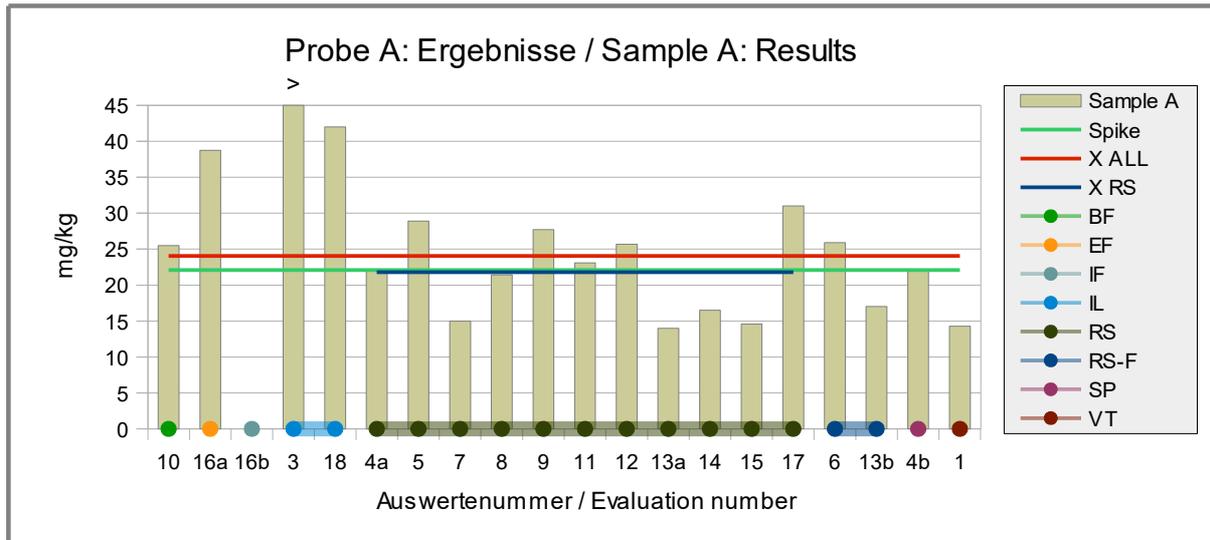


Abb./Fig. 22: ELISA-Ergebnisse Gluten
 grüne Linie = Zusatzniveau (Spike)
 rote Linie = robuster Mittelwert aller Ergebnisse
 blaue Linie = robuster Mittelwert Ergebnisse Methode RS
 runde Symbole = Zuordnung der Methoden (s. Legende)

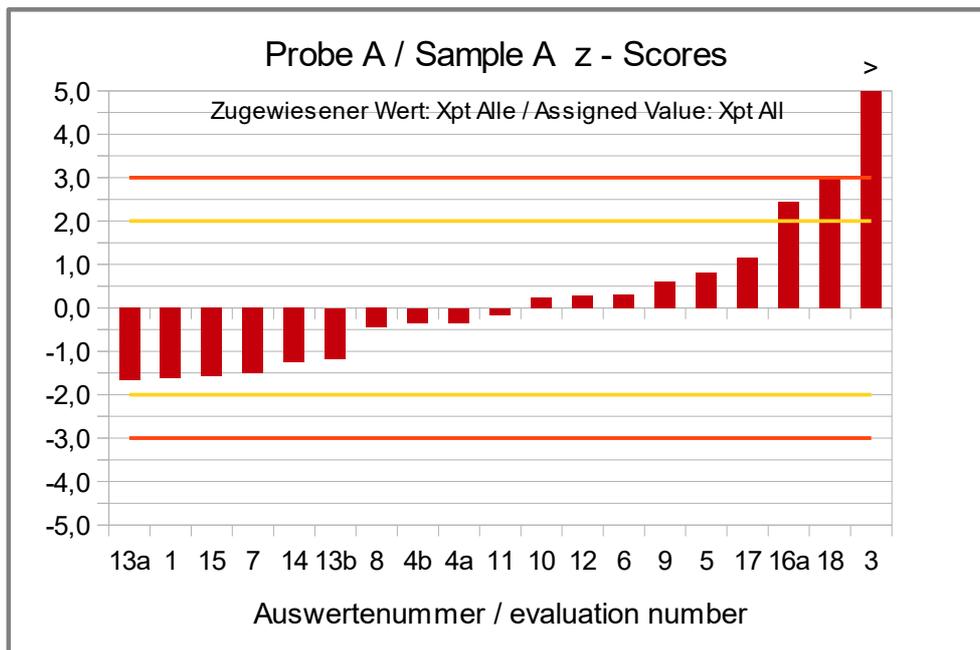


Abb./Fig. 23:
 z-Scores ELISA-Ergebnisse als Gluten
 Zugewiesener Wert: robuster Mittelwert aller Ergebnisse

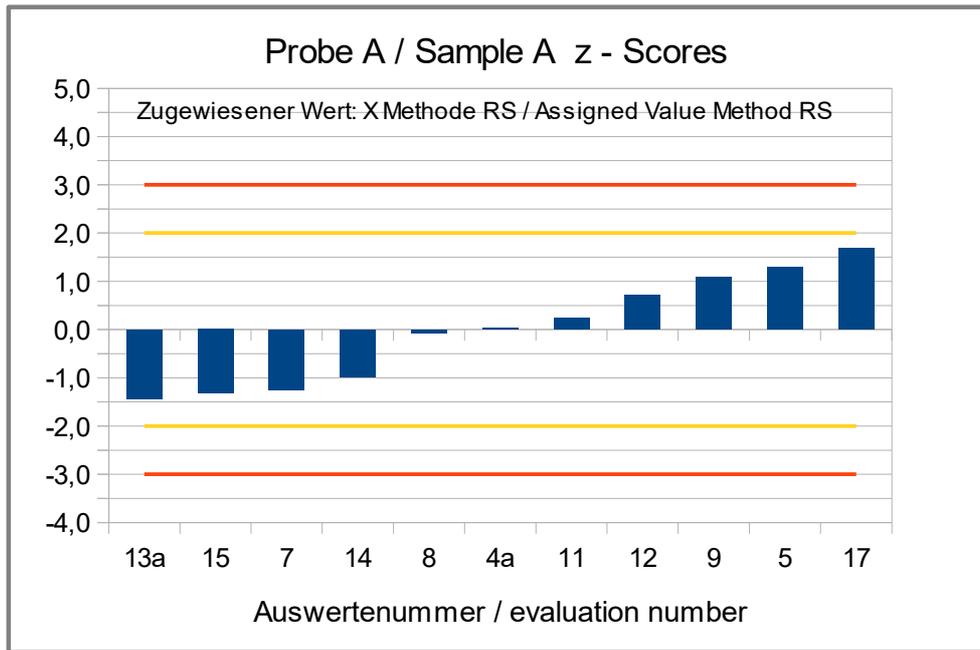


Abb./Fig. 24:

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

Quantitative Auswertung ELISA: Dotierungsniveauprobe

Auswertenummer	Gluten [mg/kg]	z-Score X _{pt} ^{ALL}	z-Score X _{pt} ^{RS}	Methode	Hinweis
10	31,5	0,98		BF	
16a	34,6	1,5		EF	
16b				IF	
3	89,5	10		IL	
18	72,0	7,4		IL	Ergebnis umgerechnet °
4a	22,0	-0,53	-0,13	RS	
5	27,7	0,38	0,87	RS	
7	25,0	-0,05	0,40	RS	
8	19,0	-0,99	-0,65	RS	
9	24,0	-0,21	0,22	RS	
11	23,1	-0,35	0,07	RS	
12	26,5	0,19	0,66	RS	
13a	16,0	-1,5	-1,2	RS	
14	15,0	-1,6	-1,4	RS	
15	26,2	0,14	0,62	RS	
17	24,8	-0,08	0,36	RS	
6	31,1	0,91		RS-F	
13b	19,0	-1,0		RS-F	
4b	24,0	-0,21		SP	
1	19,3	-0,95		VT	

° Umrechnung S. 19

Methoden:

- BF = MonoTrace ELISA, BioFront Technologies
- EF = ELISAFast, ifp
- IF = ImmunoFast (Lateral Flow), ifp
- IL = Immunolab
- RS = Ridascreen®, R-Biopharm
- RS-F= Ridascreen® Fast, R-Biopharm
- SP = SensiSpec ELISA Kit, Eurofins
- VT = Veratox, Neogen

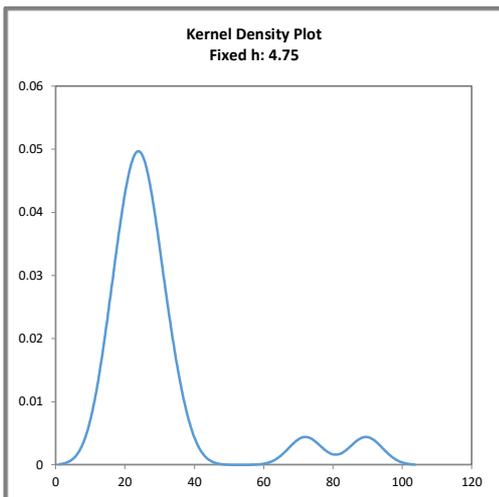


Abb. / Fig. 25:

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

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

Anmerkung:

Die Kerndichte-Schätzung zeigt eine symmetrische Verteilung mit zwei Nebenpeaks bei 72 mg/kg und 90 mg/kg, die auf Einzelwerte der Methode IL zurückgehen.

Kenndaten: Quantitative Auswertung ELISA Gluten**Dotierungsniveauprobe**

Kenndaten	Alle Ergebnisse [mg/kg]	Methode RS [mg/kg]
Zugewiesener Wert (X_{pt})	X_{pt_ALL}	$X_{pt_METHOD_RS}$
Anzahl der Messergebnisse	19	11
Anzahl der Ausreißer	-	0
Mittelwert	30,0	22,7
Median	24,8	24,0
Robuster Mittelwert (X_{pt})	25,3	22,7
Robuste Standardabweichung (S^*)	7,21	4,70
<i>Zielkenndaten:</i>		
Zielstandardabweichung σ_{pt}	6,33	5,68
Untere Grenze des Zielbereichs	12,7	11,4
Obere Grenze des Zielbereichs	38,0	34,1
Quotient S^*/σ_{pt}	1,1	0,83
Standardunsicherheit $U(X_{pt})$	2,07	1,77
Ergebnisse im Zielbereich	17	11
Prozent im Zielbereich	89	100

Methoden:

RS = R-Biopharm, Ridascreen®

Anmerkungen zu den Kenndaten und Vergleich der Bezugswerte:

Die Kerndichte-Schätzung zeigte eine annähernd symmetrische Verteilung mit zwei hohen Einzelwerten, die Auswertung mittels robuster Statistik wurde davon nicht beeinträchtigt.

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

Die robusten Mittelwerte der Auswertungen lagen mit 127% bzw. 114% vom Zusatzniveau von Gluten zur Dotierungsniveauprobe innerhalb der relevanten Anforderungen für die eingesetzten Methoden (s. 3.4.3 und S.58 "Wiederfindungsraten mit z-Scores ELISA für Gluten").

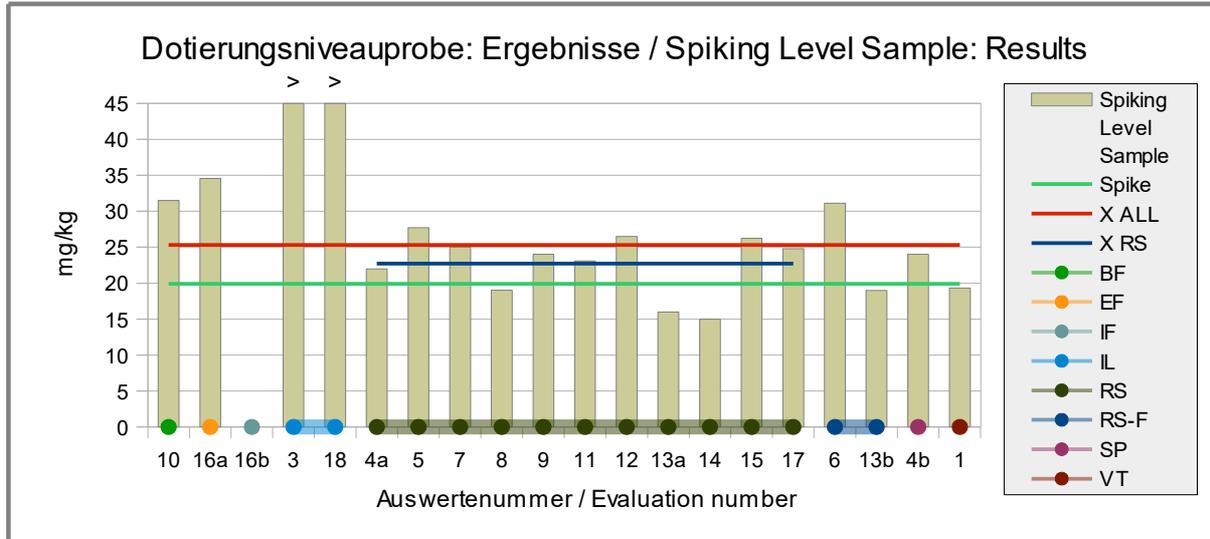


Abb./Fig. 26: ELISA-Ergebnisse Gluten
 grüne Linie = Zusatzniveau (Spike)
 rote Linie = robuster Mittelwert aller Ergebnisse
 blaue Linie = robuster Mittelwert Ergebnisse Methode RS
 runde Symbole = Zuordnung der Methoden (s. Legende)

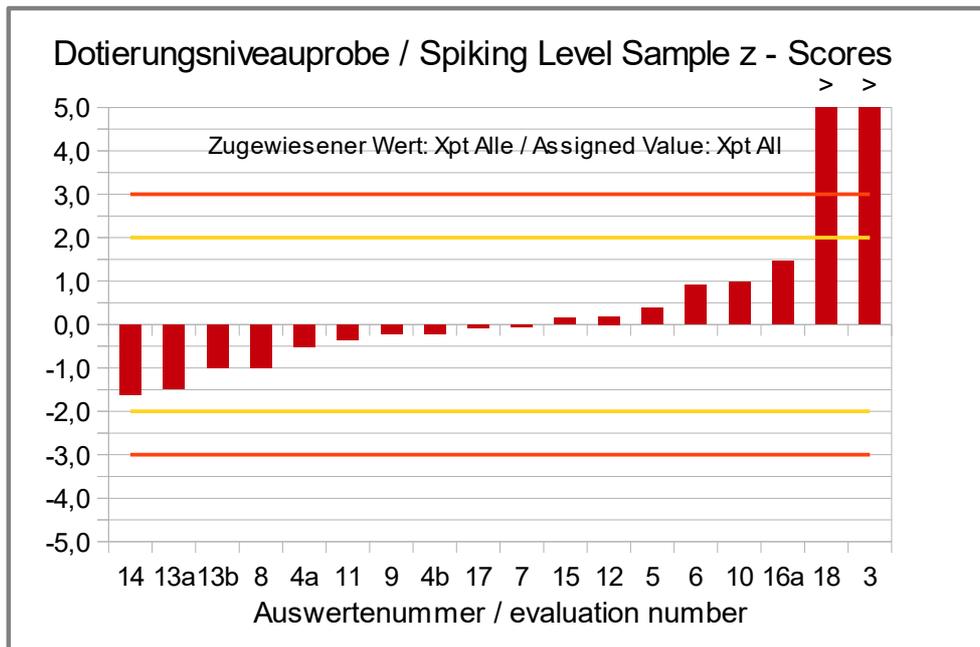


Abb./Fig. 27:
 z-Scores ELISA-Ergebnisse als Gluten
 Zugewiesener Wert: robuster Mittelwert aller Ergebnisse

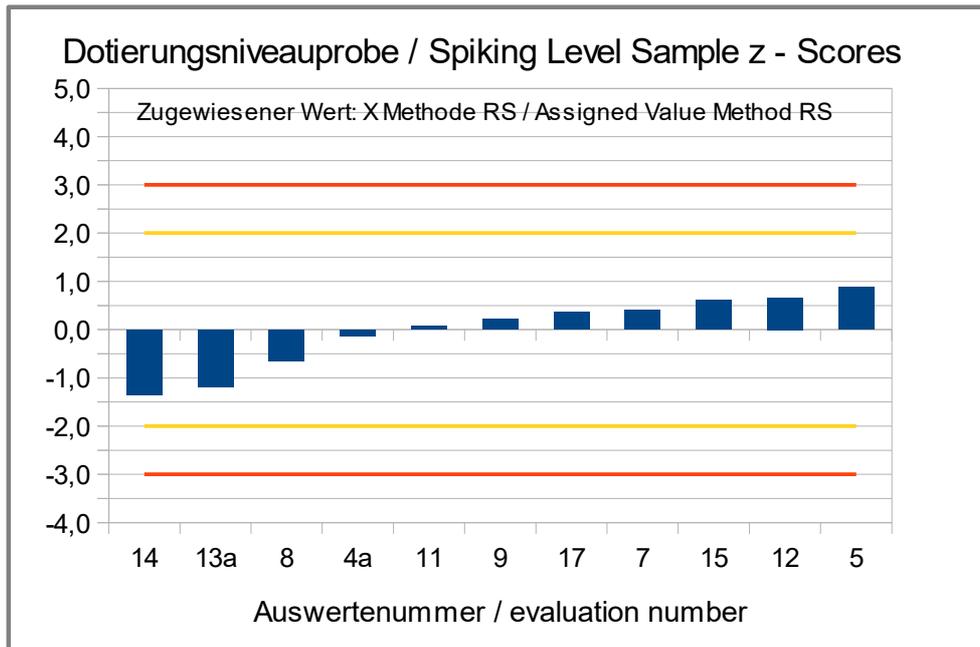


Abb./Fig. 28:

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 _{RR}]		[mg/kg]	[%] [Z _{RR}]		
10	31,5	158	2,3	25,5	115	0,6	BF	
16a	34,6	174	3,0	38,8	175	3,0	EF	
16b							IF	
3	89,5	450	14	87,5	396	12	IL	
18	72,0	362	10	42,0	190	3,6	IL	Ergebnis umgerechnet °
4a	22,0	111	0,42	22,0	100	-0,02	RS	
5	27,7	139	1,6	28,9	131	1,2	RS	
7	25,0	126	1,0	15,0	68	-1,29	RS	
8	19,0	96	-0,17	21,4	97	-0,12	RS	
9	24,0	121	0,82	27,7	125	1,0	RS	
11	23,1	116	0,65	23,1	104	0,18	RS	
12	26,5	133	1,3	25,7	116	0,7	RS	
13a	16,0	80	-0,78	14,0	63	-1,5	RS	
14	15,0	75	-1,0	16,5	75	-1,01	RS	
15	26,2	132	1,3	14,6	66	-1,36	RS	
17	24,8	125	0,98	31,0	140	1,6	RS	
6	31,1	156	2,3	25,9	117	0,7	RS-F	
13b	19,0	95	-0,18	17,0	77	-0,92	RS-F	
4b	24,0	121	0,82	22,0	100	-0,02	SP	
1	19,3	97	-0,12	14,3	65	-1,4	VT	

° Umrechnung S. 19

AB**	50-150 %	AB**	50-150 %
Anzahl im AB	14	Anzahl im AB	16
Prozent im AB	74	Prozent im AB	84

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

** Akzeptanzbereich der AOAC für Allergen-ELISAs

Methoden:

- BF = MonoTrace ELISA, BioFront Technologies
- EF = ELISAFast, ifp
- IF = ImmunoFast (Lateral Flow), ifp
- IL = Immunolab
- RS = Ridascreen®, R-Biopharm
- RS-F= Ridascreen® Fast, R-Biopharm
- SP = SensiSpec ELISA Kit, Eurofins
- VT = Veratox, Neogen

Anmerkung:

74% (14) 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 84% (16) der Wiederfindungsraten in diesem Akzeptanzbereich. Die zugehörigen z-Scores basieren auf der Zielstandardabweichung von 25%.

4.2.2 PCR-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]	Übereinstimmungen mit Dotierung		
5	positiv		negativ	< 0,4	2/2 (100%)	SFA-ID	

	Probe A		Probe B	
Dotierung	positiv		negativ	

Methoden:

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

Anmerkung:

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

Qualitative Auswertung der Ergebnisse: Dotierungsniveauprobe

Auswertenummer	Gluten	Gluten	Methode	Hinweis
	pos/neg	[mg/kg]		
5	positiv		SFA-ID	

Dotierungsniveauprobe	
Dotierung	positiv

Methoden:

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

Anmerkung:

Das Ergebnis des Teilnehmers steht in qualitativer Übereinstimmung mit der Dotierungsniveauprobe.

4.3 z-Scores der Teilnehmer: Übersichtstabelle

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

Auswertenummer	ELISA β-Lactoglobulin: Xpt (div. Methoden)		ELISA β-Lactoglobulin: Xpt (Methode: RS-F)		ELISA Casein: Xpt (div. Methoden)		ELISA Casein: Xpt (Methode: RS-F)	
	Probe A	Dot. Probe	Probe A	Dot. Probe	Probe A	Dot. Probe	Probe A	Dot. Probe
1	-	-	-	-	-	-	-	-
2	-1,9	-0,94	-	-	-	-	-	-
3	-2,7	-2,4	-	-	-2,6	-0,56	-	-
4 / 4a	-1,1	0,19	-	-	0,99	0,17	-	-
4b	-	-	-	-	-	-	-	-
5 / 5a	-	-	-	-	-1,7	-1,7	-	-
5b	-	-	-	-	-1,1	-	-1,6	-
6	2,2	1,5	1,5	1,3	1,8	1,8	0,84	0,78
7	-0,17	2,9	-0,63	2,6	0,16	1,6	-0,54	0,66
8	-0,36	-1,8	-0,79	-1,9	0,40	0,16	-0,34	-0,56
9	0,62	-1,5	0,07	-1,7	0,10	1,8	-	-
10	-	-	-	-	-0,87	-1,4	-	-
11	-	-	-	-	-0,35	2,3	-	-
12	0,66	-0,13	0,11	-0,32	2,5	1,2	1,4	0,33
13 / 13a	-	-	-	-	-	-2,3	-	-
13b	-	-	-	-	-	-	-	-
14	0,26	-0,03	-0,25	-0,22	1,0	-0,64	0,19	-1,2
15	1,0	0,53	0,41	0,31	-	-	-	-
16 / 16a	1,2	2,0	-	-	-1,6	-2,3	-	-
16b	-	-	-	-	-	-	-	-
17	5,8	2,1	-	-	-1,6	-3,6	-	-
18	-2,8	-2,4	-	-	4,3	3,1	-	-

Methoden: 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 der Teilnehmer-Ergebnisse (Konsenswerte)

Auswertenummer	ELISA Milch: Xpt (div. Methoden)		ELISA Gluten: Xpt (div. Methoden)		ELISA Gluten: Xpt (Methode: RS)	
	Probe A	Dot. Probe	Probe A	Dot. Probe	Probe A	Dot. Probe
1	-	-	-1,6	-0,95	-	-
2	-	-	-	-	-	-
3	-	-	11	10	-	-
4 / 4a	-	-	-0,34	-0,53	0,04	-0,13
4b	-	-	-0,34	-0,21	-	-
5 / 5a	-	-	0,80	0,38	1,3	0,87
5b	-	-	-	-	-	-
6	0,10	0,16	0,31	0,91	-	-
7	-	-	-1,5	-0,05	-1,2	0,40
8	0,07	-0,59	-0,44	-0,99	-0,07	-0,65
9	-	-	0,60	-0,21	1,1	0,22
10	-	-	0,24	0,98	-	-
11	-	-	-0,16	-0,35	0,23	0,07
12	-	-	0,27	0,19	0,71	0,66
13 / 13a	-	-	-1,7	-1,5	-1,4	-1,2
13b	-	-	-1,2	-1,0	-	-
14	-	-	-1,3	-1,6	-0,97	-1,4
15	0,52	0,00	-1,6	0,14	-1,3	0,62
16 / 16a	-0,01	0,90	2,4	1,5	-	-
16b	-	-	-	-	-	-
17	-	-	1,2	-0,08	1,7	0,36
18	-3,4	-3,13	3,0	7,4	-	-

Methoden: RS = Ridascreen®, 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 β-Lactoglobulin: Xpt (spiked level)		ELISA Casein: Xpt (spiked level)		ELISA Milch: Xpt (spiked level)		ELISA Gluten: Xpt (spiked level)	
	Probe A	Dot. Probe	Probe A	Dot. Probe	Probe A	Dot. Probe	Probe A	Dot. Probe
1	-	-	-	-	-	-	-1,4	-0,12
2	-2,7	-2,3	-	-	-	-	-	-
3	-3,2	-3,1	-2,9	-0,25	-	-	12	14
4 / 4a	-2,2	-1,7	0,11	0,55	-	-	-0,02	0,42
4b	-	-	-	-	-	-	-0,02	0,82
5 / 5a	-	-	-2,1	-1,5	-	-	1,2	1,6
5b	-	-	-1,6	-	-	-	-	-
6	-0,11	-0,95	0,80	2,3	9,6	7,2	0,69	2,3
7	-1,6	-0,19	-0,57	2,1	-	-	-1,3	1,0
8	-1,7	-2,8	-0,37	0,53	9,5	5,2	-0,12	-0,17
9	-1,1	-2,6	-0,62	2,3	-	-	1,0	0,82
10	-	-	-1,4	-1,2	-	-	0,62	2,3
11	-	-	-0,99	2,9	-	-	0,18	0,65
12	-1,1	-1,9	1,4	1,7	-	-	0,65	1,3
13 / 13a	-	-	-	-2,1	-	-	-1,5	-0,78
13b	-	-	-	-	-	-	-0,92	-0,18
14	-1,3	-1,8	0,16	-0,34	-	-	-1,0	-0,98
15	-0,86	-1,5	-	-	11	6,8	-1,4	1,3
16 / 16a	-0,72	-0,69	-2,0	-2,1	9,2	9,2	3,0	3,0
16b	-	-	-	-	-	-	-	-
17	2,2	-0,63	-2,0	-3,6	-	-	1,6	0,98
18	-3,2	-3,1	2,9	3,7	-2,2	-1,6	3,6	10

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: β -Lactoglobulin

Meth. Abk.	Auswertenummer	Datum der Analyse	Ergebnis Probe A		Ergebnis Probe B		Ergebnis Dotierungsprobe		NWG / LOD *	BG / LOQ *	MU*	Angabe quantitatives Ergebnis als	Methode
			qualitativ	mg/kg	qualitativ	mg/kg	qualitativ	mg/kg					
		Tag/Monat											ELISA Test-Kit + Anbieter
AQ	5a		positiv	>400	negativ	< 0,01	positiv	>400		0,01		beta-Lactoglobulin	AgraQuant ELISA β -Lactoglobulin COLAL1048, RomerLabs
EF	16a	25.03.20	positiv	23,19	negativ	0	positiv	24,36	1,5	3		beta-Lactoglobulin	ELISAFast® β -Lactoglobulin, ifp
ES	13		positiv	>1	negativ	<0,1	positiv	>1		0		beta-Lactoglobulin	ELISA Systems Beta-Lactoglobulin ESMRDBLG-48
IF	16b	09.04.20	positiv		negativ		positiv		0,2				ImmunoFast® β -Lactoglobulin, ifp
IL	3	31.03.20	positiv	5,7	negativ	< 0,01	positiv	6,5	0,01	0,01		beta-Lactoglobulin	Immunolab Beta-Lactoglobulin ELISA
MI-II	4	20.03.20	positiv	13	negativ	<0,031	positiv	17	0,031	0,031		beta-Lactoglobulin	Morinaga Beta-lactoglobulin ELISA Kit II (M2112)
RS	2	03.04.20	positiv	9,53	negativ		positiv	12,43	0,79	2,63	31	beta-Lactoglobulin	Ridascreen® β -Lactoglobulin R4901, R-Biopharm
RS	17	22/05	-	43,6	-	<	-	24,8		0		beta-Lactoglobulin	Ridascreen® β -Lactoglobulin R4901, R-Biopharm
RS-F	5b		positiv	>4,5	negativ	< 0,17	positiv	>4,5		0,17		beta-Lactoglobulin	Ridascreen® FAST β -Lactoglobulin R4902, R-Biopharm
RS-F	6	23.04.20	positiv	27,5	negativ	<LOD	positiv	22,43	0,04	0,167		beta-Lactoglobulin	Ridascreen® FAST β -Lactoglobulin R4902, R-Biopharm
RS-F	7	23.04.20	positiv	17	negativ	< 0,5	positiv	28		0,5	50	beta-Lactoglobulin	Ridascreen® FAST β -Lactoglobulin R4912, R-Biopharm
RS-F	8	22.04.20	positiv	16,17	negativ		positiv	8,76	0,04	0,167		beta-Lactoglobulin	Ridascreen® FAST β -Lactoglobulin R4902, R-Biopharm
RS-F	9	17.04.	positiv	20,5	negativ		positiv	10	0,5	1		beta-Lactoglobulin	Ridascreen® FAST β -Lactoglobulin R4902, R-Biopharm
RS-F	12	April/Mai	positiv	20,7	negativ	< 0,167	positiv	15,7	0,04	0		beta-Lactoglobulin	Ridascreen® FAST β -Lactoglobulin R4912, R-Biopharm
RS-F	14	30.04.20	positiv	18,9	negativ	< 0,2	positiv	16,1	0,2	1		beta-Lactoglobulin	Ridascreen® FAST β -Lactoglobulin R4912, R-Biopharm
RS-F	15	21.04.20	positiv	22,24	negativ	<0,167	positiv	18,39	0,04	0		beta-Lactoglobulin	Ridascreen® FAST β -Lactoglobulin R4902, R-Biopharm
SP	18	19.03.20	positiv	5,4	negativ	<0.01	positiv	6,6	0.002	0.01		beta-Lactoglobulin	SensiSpec ELISA Beta-Lactoglobulin, Eurofins

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

Fortsetzung ELISA β -Lactoglobulin:

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	5a			nein	
EF	16a			ja	
ES	13				
IF	16b			ja	
IL	3				
MI-II	4	erkennt Kuhmilch- β Lac	lt. Herstellerangaben	ja	
RS	2	Anti-BLG	Waschpuffer, 10 Minuten, 50°C.	nein	
RS	17			nein	Wir fanden keine Wiederholbarkeit für Probe A und Probe C für den Beta-Lactoglobulin-Test
RS-F	5b			ja	
RS-F	6		Extraktionslösung: Extraktor 2 + Allergenextraktionspuffer mit Additiv 1, Zeit: ca. 30min., Temperatur: 100°C.	ja	
RS-F	7			ja	
RS-F	8		lt. Testkit-Beschreibung	nein	
RS-F	9	beta-Lactoglobulin			
RS-F	12	β -Lactoglobulin aus Kuhmilch	Messungen Probe A (mg/kg): 22,6; 19,4; 20,7; 20,2 Messungen Dotierungsprobe (mg/kg): 18,2; 13,8; 16,5; 14,3		
RS-F	14			ja	
RS-F	15		nach Anleitung Testkit	nein	
SP	18				

5.1.2 ELISA: Casein

Meth. Abk.	Auswertenummer	Datum der Analyse	Ergebnis Probe A		Ergebnis Probe B		Ergebnis Dotierungsprobe		NWG / LOD *	BG / LOQ *	MU*	Angabe quantitatives Ergebnis als	Methode
			qualitativ	mg/kg	qualitativ	mg/kg	qualitativ	mg/kg					
		Tag/Monat	qualitativ	mg/kg	qualitativ	mg/kg	qualitativ	mg/kg	mg/kg	mg/kg	%	z.B. Lebensmittel / Protein	ELISA Test-Kit + Anbieter
AQ	5a		positiv	8,4	negativ	< 1	positiv	11		1		Casein	AgraQuant Casein COKAL 1200, RomerLabs
AQ	9	19.03.	positiv	14,8	negativ		positiv	27,7	0,2	0		Casein	AgraQuant Casein COKAL 1200, RomerLabs
AQ	11		positiv	13,17	negativ	<0,2	positiv	30,33	0,04	0		Casein	AgraQuant Casein COKAL 1200, RomerLabs
BF	10	21/4	positiv	11,3	negativ	bLOQ	positiv	12,3	0,11	1		Casein	MonoTrace Milk (Casein) ELISA kit, BioFront Technologies
EF	16a	25.03.20	positiv	8,69	negativ	0	positiv	8,33	0,2	1		Casein	ELISAFast® Casein, ifp
ES	13		positiv	>10	negativ	<1	positiv	8,3		1		Casein	ELISA Systems Casein ESCASPRD-48
ES	17	20/04	-	8,8	-	<	-	1,9		0	31	Casein	ELISA Systems Casein ESCASPRD-48
IF	16b	09.04.20	positiv		negativ		positiv		1				ImmunoFast® Casein, ifp
IL	3	31.03.20	positiv	4,9	negativ	< 0,2	positiv	16,5	0,2	0,2		Casein	Immunolab Casein ELISA
MI-II	4	20.03.20	positiv	18	negativ	<0,25	positiv	20	0,25	0,25		Casein	Morinaga Casein ELISA Kit II (M2113)
RS-F	5b		positiv	10,5	negativ	< 0,5	positiv	>13,5		0,5		Casein	Ridascreen® FAST Casein R4612, R-Biopharm
RS-F	6	23.04.20	positiv	21	negativ	<LOD	positiv	27,7	0,71	2,5		Casein	Ridascreen® FAST Casein R4612, R-Biopharm
RS-F	7	23.04.20	positiv	15	negativ	< 2,5	positiv	27		2,5	32,2	Casein	Ridascreen® FAST Casein R4612, R-Biopharm
RS-F	8	23.04.20	positiv	15,87	negativ		positiv	19,94	0,12	0,5		Casein	Ridascreen® FAST Casein R4612, R-Biopharm
RS-F	12	April/Mai	positiv	23,6	negativ	< 2,5	positiv	25,1	0,71	3		Casein	Ridascreen® FAST Casein R4612, R-Biopharm
RS-F	14	20.05.20	positiv	18,2	negativ	< 0,71	positiv	16,1	0,71	3		Casein	Ridascreen® FAST Casein R4612, R-Biopharm
SP	18	20.03.20	positiv	30	negativ	< 0.1	positiv	34	0.04	0.2		Casein	SensiSpec ELISA Casein, Eurofins

* NWG Nachweisgrenze / BG Bestimmungsgrenze

* LOD limit of detection / LOQ limit of quantitation

* MU Messunsicherheit / MU measurement uncertainty

Meth. Abk.	Auswertenummer	Spezifität	Hinweise zur Methode (Extraktion und Bestimmung)	Methode akkreditiert nach ISO/IEC 17025	Sonstige Hinweise
		Antikörper	z.B. Extraktionslösung / Zeit / Temperatur	ja/nein	
AQ	5a			nein	
AQ	9	Casein			
AQ	11	Casein	Extraktionslösung 15 min bei 60°C, 1:10 Verdünnung	nein	
BF	10	Monoklonal Antikörper basierter Assay	1:20 Extraktion für 10 Minuten bei 60°C	nein	
EF	16a			ja	
ES	13				
ES	17			ja	
IF	16b			ja	
IL	3				
MI-II	4	erkennt Kuhmilch-Casein	lt. Herstellerangaben	ja	
RS-F	5b			ja	
RS-F	6		Extraktionslösung: Extraktor 2 + Allergenextraktionspuffer mit Additiv 1, Zeit: ca. 30 min., Temperatur: 100°C.	ja	
RS-F	7			ja	
RS-F	8		Lt. Testkit-Beschreibung (1mal Allergenextraktionspuffer, 1mal Extraktor 2, Puffer mit AEP)	nein	
RS-F	12	Casein aus Kuhmilch	Messungen Probe A (mg/kg): 21,5; 25,2;22,8; 25,0 Messungen Dotierungsprobe (mg/kg): 21,4; 23,9;29,9;		
RS-F	14			nein	
SP	18				

5.1.3 ELISA: Milch

Meth. Abk.	Auswertenummer	Datum der Analyse	Ergebnis Probe A		Ergebnis Probe B		Ergebnis Dotierungsprobe		NWG / LOD *	BG / LOQ *	MU*	Angabe quantitatives Ergebnis als	Methode
			qualitativ	mg/kg	qualitativ	mg/kg	qualitativ	mg/kg					
		Tag/Monat											ELISA Test-Kit + Anbieter
ES	16a	12.05.20	positiv	745,62	negativ	0	positiv	764,42	1	2		Magermilchpulver	ELISAFast® Gesamtmilch
IF	16b	06.05.20	positiv		negativ		positiv		2				ImmunoFast® Gesamtmilch
RS-F	6	23.04.20	positiv	252,48	negativ	<LOD	positiv	213,94	0,7	2,5		Milchproteine, gesamt	Ridascreen® FAST Milk R4652, R-Biopharm
RS-F	8	28.04.20	positiv	251,06	negativ		positiv	175,76	0,7	2,5		Milchproteine, gesamt	Ridascreen® FAST Milk R4652, R-Biopharm
RS-F	15	21.04.20	positiv	278,62	negativ	<2,5	positiv	205,87	0,7	3		Milchproteine, gesamt	Ridascreen® FAST Milk R4652, R-Biopharm
SP	18	24.03.20	positiv	34	negativ	< 0.2	positiv	45	0.05	0.4		Casein+BLG	SensiSpec ELISA Milk, Eurofins

* NWG Nachweisgrenze / BG Bestimmungsgrenze

* LOD limit of detection / LOQ limit of quantitation

* MU Messunsicherheit / MU measurement uncertainty

Meth. Abk.	Auswertenummer	Spezifität	Hinweise zur Methode (Extraktion und Bestimmung)	Methode akkreditiert nach ISO/IEC 17025	Sonstige Hinweise
		Antikörper	z.B. Extraktionslösung / Zeit / Temperatur	ja/nein	
ES	16a			ja	Ergebnis basiert auf alpha-Lactalbumin spezifischen Antikörpern
IF	16b			ja	
RS-F	6		Extraktionslösung: Extraktor 2 + Allergenextraktionspuffer mit Additiv 1, Zeit: ca. 30 min., Temperatur: 100°C.	ja	
RS-F	8		lt. Testkit Beschreibung	ja	
RS-F	15		nach Anleitung Testkit	nein	
SP	18				

5.1.4 ELISA: Gluten

Meth. Abk.	Auswertenummer	Datum der Analyse	Ergebnis Probe A		Ergebnis Probe B		Ergebnis Dotierungsprobe		NWG / LOD *	BG / LOQ *	MU*	Angabe quantitatives Ergebnis als zB. Lebensmittel / Protein	Methode
			qualitativ	mg/kg	qualitativ	mg/kg	qualitativ	mg/kg					
		Tag/Monat											ELISA Test-Kit + Anbieter
BF	10	16/4	positiv	25,5	negativ	bLOQ	positiv	31,5	0,36	2		Gluten	MonoTrace Gluten ELISA kit, BioFront Technologies
EF	16a	06.04.20	positiv	38,76	negativ	0	positiv	34,58	3	3		Gluten	ELISAFast® Gluten, ifp
IF	16b	09.04.20	positiv		negativ		positiv		4				ImmunoFast® Gluten, ifp
IL	3	31.03.20	positiv	87,5	negativ	< 4	positiv	89,5	4	4		Gluten	Immunolab Gliadin/Gluten ELISA
IL	18	19.03.20	positiv	21	negativ	< 1	positiv	36	0,3	2		Gliadin	Immunolab Gliadin/Gluten ELISA
RS	4a	23.03.20	positiv	22	negativ	<5	positiv	22	3	5		Gluten	Ridascreen® Gliadin R7001, R-Biopharm
RS	5		positiv	28,9	negativ	< 3	positiv	27,7		3		Gluten	Ridascreen® Gliadin R7001, R-Biopharm
RS	7	15.04.20	positiv	15	negativ	< 5	positiv	25		5	17,6	Gluten	Ridascreen® Gliadin R7001, R-Biopharm
RS	8	02.04.20	positiv	21,41	negativ		positiv	19,03	1	5		Gluten	Ridascreen® Gliadin R7001, R-Biopharm
RS	9	19.03.	positiv	27,7	negativ		positiv	24	5	5		Gluten	Ridascreen® Gliadin R7001, R-Biopharm
RS	11		positiv	23,08	negativ	<5	positiv	23,11	1	5		Gluten	Ridascreen® Gliadin R7001, R-Biopharm
RS	12	April/Mai	positiv	25,7	negativ	< 5	positiv	26,5	0,5	5		Gluten	Ridascreen® Gliadin R7001, R-Biopharm
RS	13a		positiv	14	negativ	<5	positiv	16		5		Gluten	Ridascreen® Gliadin R7001, R-Biopharm
RS	14	07.04.20	positiv	16,5	negativ	< 2,7	positiv	15	2,7	5		Gliadin	Ridascreen® Gliadin R7001, R-Biopharm
RS	15	07.04.20	positiv	14,59	negativ	<5	positiv	26,24	2,5	5		Gluten	Ridascreen® Gliadin R7001, R-Biopharm
RS	17	20/04	-	31	-	<	-	24,8		5	31	Gluten	Ridascreen® Gliadin R7001, R-Biopharm
RS-F	6	23.04.20	positiv	25,9	negativ	<LOD	positiv	31,1	1	10		Gluten	Ridascreen® FAST Gliadin R7002, R-Biopharm
RS-F	13b		positiv	17	negativ	<2,5	positiv	19		3		Gluten	Ridascreen®Fast Gliadin Sensitive R7051, R-Biopharm
SP	4b	19.03.20	positiv	22	negativ	<3,12	positiv	24	3,12	3,12		Gluten	SENSISpec Ingezim Gluten R5 30.GLU.K2, Eurofins
VT	1	02.04.20		14,3		0		19,3				Gluten	Veratox Gliadin R5, Neogen

* 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	
BF	10	Monoklonaler Antikörper basierter Assay	1:40 Extraktionsverhältnis für 1 Stunde bei 60°C	nein	
EF	16a			ja	
IF	16b			ja	
IL	3				
IL	18				
RS	4a	R5 Antikörper von Mendez erkennt Prolamine (Gliadine) aus Weizen, Roggen und Gerste	lt. Herstellerangaben	ja	
RS	5			ja	
RS	7	R5		ja	
RS	8		lt. Testkit Beschreibung	ja	
RS	9	Gliadine (R5-Antikörper)			
RS	11	Gliadin	Extraktion mit Cocktail-Lösung und Ethanol, 40 min bei 50°C, 1:500 Verdünnung	nein	
RS	12	Monoklonaler Antikörper R5	Messungen Probe A (mg/kg): 27,7; 21,1; 28,2 Messungen Dotierungsprobe (mg/kg): 29; 26,1; 24,4		
RS	13a				
RS	14			ja	
RS	15	R5	nach Anleitung Testkit	nein	
RS	17			ja	
RS-F	6	R5	Extraktionslösung: Cocktail (patentiert), Zeit: ca. 2 Stunden, Temperatur: 50°C.	ja	
RS-F	13b				
SP	4b	R5 Antikörper von Mendez erkennt Prolamine (Gliadine) aus Weizen, Roggen und Gerste	lt. Herstellerangaben	ja	
VT	1		40 min / 50°C	nein	

5.1.5 PCR: Milch

Meth. Abk.	Auswertenummer	Datum der Analyse	Ergebnis Probe A		Ergebnis Probe B		Ergebnis Dotierungsprobe		NWG / LOD *	BG / LOQ *	MU*	Angabe quantitatives Ergebnis als	Methode
			positiv/negativ	mg/kg	positiv/negativ	mg/kg	positiv/negativ	mg/kg					
div	17	21/04	positiv		negativ		positiv		0,01			Kuh-DNA	Interne Methode 207 Rev. 8

* 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	
div	17		Extraktion> Nucleo Spin Food, Real Time PCRQuantStudio5.7500 Fast and CFX-96 deep well	ja	

5.1.6 PCR: Gluten

Meth. Abk.	Auswertenummer	Datum der Analyse	Ergebnis Probe A		Ergebnis Probe B		Ergebnis Dotierungsprobe		NWG / LOD *	BG / LOQ *	MU*	Angabe quantitatives Ergebnis als	Methode
			positiv/negativ	mg/kg	positiv/negativ	mg/kg	positiv/negativ	mg/kg					
SFA	5		positiv		negativ	< 0,4	positiv		0,4			Gluten	Sure Food Allergen ID, R-Biopharm / Congen

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

Meth. Abk.	Auswertenummer	Spezifität	Hinweise zur Methode (Extraktion und Bestimmung)	Methode akkreditiert nach ISO/IEC 17025	Sonstige Hinweise
		Target-Sequenz / -DNA	z.B. Extraktion / Enzyme / Clean-Up / Real Time PCR / Gelelektrophorese / Cyclen	ja/nein	
SFA	5			nein	

5.2 Homogenität

5.2.1 Mischungshomogenität vor der Abfüllung

Microtracer Homogenitätstest

DLA ptAL03 Dotierungsniveauprobe

Gewicht Gesamtprobe	1,51	kg
Microtracer	FSS-rot lake	
Teilchengröße	75 – 300	µm
Gewicht pro Partikel	2,0	µg
Tracerzugabe	33,2	mg/kg

Analysenergebnisse:

Probe	Einwaage [g]	Partikel Anzahl	Partikel [mg/kg]
1	5,02	96	38,2
2	4,97	100	40,2
3	5,01	98	39,1
4	5,01	88	35,1
5	5,02	88	35,1
6	5,00	105	42,0
7	5,04	90	35,7
8	5,03	103	41,0

Poisson-Verteilung

Probenanzahl	8	
Freiheitsgrad	7	
Mittelwert	96,0	Partikel
Standardabweichung	6,86	Partikel
χ^2 (CHI-Quadrat)	3,43	
Wahrscheinlichkeit	84	%
Wiederfindungsrate	115	%

Normalverteilung

Probenanzahl	8	
Mittelwert	38,3	mg/kg
Standardabweichung	2,74	mg/kg
rel. Standardabweichung	7,14	%
Horwitz Standardabweichung	9,24	%
HorRat-Wert	0,77	
Wiederfindungsrate	115	%

5.3 Informationen zur Eignungsprüfung (EP)

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

EP-Nummer	ptAL03- 2020
EP-Name	Allergene III β-Lactoglobulin, Casein und Gluten in Kindernahrung (Brei erhitzt) mit „Dotierungsniveauprobe“
Probenmatrix (Prozessierung)	Proben A + B: 4-Korn-Getreidebrei "glutenfrei" und "milchfrei" (zubereitet, auf 50 °C erhitzt) / Zutaten: Wasser, Reisvollkornmehl 32%, Maismehl 30%, Hirsevollkornmehl 23%, Buchweizenvollkornmehl 15%, Thiamin und weitere Zusatzstoffe und Allergene Lebensmittel Magermilchpulver, Molkenpulver und Weizenmehl (eine der beiden Proben) Dotierungsniveauprobe: Kartoffelpulver, weitere Zusatzstoffe und Allergene Lebensmittel
Probenzahl und Probenmenge	2 unterschiedliche Proben A + B: je 25 g + 1 Dotierungsniveauprobe: 15 g
Lagerungsinformation	Proben A, B + Dotierungsniveauprobe: gekühlt 2 - 10 °C (EP-Zeitraum)
Verwendungszweck	Ausschließlich für Laboruntersuchungen (Qualitätskontrollproben)
Parameter	qualitativ + quantitativ: β -Lactoglobulin, Casein und Gluten (glutenhaltige Getreide) Proben A + B: < 500 mg/kg Dotierungsniveauprobe: < 500 mg/kg
Untersuchungsmethoden	Methode ist freigestellt
Hinweis zur Analyse	Die Untersuchung der Eignungsprüfung soll entsprechend einer laborüblichen Routineanalyse vorgenommen werden. Generell empfehlen wir vor der Analyse, insbesondere bei kleinen Analyseeinwaagen, eine repräsentative Probenmenge entsprechend guter Laborpraxis zu homogenisieren. Vorzugsweise wird jeweils die gesamte Probenmenge homogenisiert.
Ergebnisangabe	Es werden für jede Probe A , B und Dotierungsniveauprobe je ein Ergebnis ermittelt. Die Einzelergebnisse sind in die Ergebnisabgabe-Datei einzutragen.
Einheiten	mg/kg
Anzahl von Stellen	mindestens 2 signifikante Stellen
Ergebnisabgabe	Die Ergebnisabgabe-Datei wird per eMail übermittelt an: pt@dla-lvu.de
Letzter Abgabetermin	Spätestens <u>22. Mai 2020.</u>
Auswertebereich	Der Auswertebereich wird voraussichtlich 6 Wochen nach Abgabetermin der Ergebnisse fertiggestellt und per eMail als PDF-Datei zugesandt.
Koordinator und Ansprechpartner der EP	Alexandra Scharf M.Sc.

* 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
		USA
		Deutschland
		CANADA
		ITALIEN
		Deutschland
		SCHWEIZ
		Deutschland
		ÖSTERREICH
		Deutschland
		Deutschland
		SPANIEN
		Deutschland
		ITALIEN
		Deutschland
		Deutschland
		UNGARN
		NIEDERLANDE
		SPANIEN
		Deutschland

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

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

7. Verzeichnis relevanter Literatur

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

- collaborative trial to investigate the performance of the R5 enzyme linked immunoassay to determine gliadin in gluten-free food. Eur J Gastroenterol Hepatol. 17:1053-63 (2005)
25. DLA Publikation: Performance of ELISA and PCR methods for the determination of allergens in food: an evaluation of six years of proficiency testing for soy (Glycine max L.) and wheat gluten (Triticum aestivum L.); Scharf et al.; J Agric Food Chem. 61(43):10261-72 (2013)
 26. EFSA (2014) Scientific Opinion on the evaluation of allergenic foods and food ingredients for labelling purposes¹, EFSA Panel on Dietetic Products, Nutrition and Allergies (NDA), European Food Safety Authority (EFSA), Parma, Italy, EFSA Journal 2014;12(11):3894
 27. IRMM, Poms et al.; Inter-laboratory validation study of five different commercial ELISA test kits for determination of peanut residues in cookie and dark chocolate; European Commission, Joint Research Centre, Belgium; GE/R/FSQ/D08/05/2004
 28. Jayasena et al. (2015) Comparison of six commercial ELISA kits for their specificity and sensitivity in detecting different major peanut allergens. J Agric Food Chem. 2015 Feb 18;63(6):1849-55
 29. ASU §64 LFGB L 06.00-56 Bestimmung von Sojaprotein in Fleisch und Fleischerzeugnissen Enzymimmunologisches Verfahren (2007) [Determination of soyprotein in meat and meat products by enzyme immunoassay]
 30. ASU §64 LFGB L 00.00-69 Bestimmung von Erdnuss-Kontaminationen in Lebensmitteln mittels ELISA im Mikrotiterplattensystem (2003) [Foodstuffs, determination of peanut contaminations in foodstuffs by ELISA in microtiterplates]
 31. ASU §64 LFGB L 44.00-7 Bestimmung von Haselnuss-Kontaminationen in Schokolade und Schokoladenwaren mittels ELISA im Mikrotiterplattensystem (2006) [Foodstuffs, determination of hazelnut contaminations in chocolate and chocolate products by ELISA in microtiterplates]
 32. ASU §64 LFGB L 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. Allergen Data Collection - Update (2002): Cow's Milk (Bos domesticus), Besler M., Eigenmann P., Schwartz R., Internet Symposium on Food Allergens 4(1): 19-106, <http://www.food-allergens.de>
 37. 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
 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]

DLA ptAL03 (2020) - Allergene III

18 von 19 Teilnehmer haben mindestens ein Ergebnis eingereicht. Die Auswertung erfolgte hinsichtlich der Parameter Milch (β -Lactoglobulin, Casein, Gesamt-Milchprotein) und Weizen (Gluten) für ELISA- (qualitativ und quantitativ) und PCR-Methoden (Milch und Gluten, qualitativ). 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 Auswertebereich zu entnehmen.

8 Teilnehmer hatten ihren Sitz im Europäischen Ausland (Italien, Niederlande, Österreich, Schweiz, Spanien, Ungarn), ein Teilnehmer in Kanada und einer in den USA.