



Auswertungs-Bericht

Laborvergleichsuntersuchung

DLA ptAL08/2020

Allergene VIII:

Mandel und Cashew

in Bratlingsmischung

DLA - Proficiency Tests GmbH

*Hauptstr. 80
23845 Oering/Germany*

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

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

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

<p><i>EP-Anbieter PT-Provider</i></p>	<p>DLA - Proficiency Tests GmbH Hauptstr. 80, 23845 Oering, Germany</p> <p>Geschäftsführer/CEO: Dr. Matthias Besler-Scharf Stellv. Leitung/Deputy Lead: Alexandra Scharf MSc.</p> <p>Tel. ++49-(0)4532-9183358 Mob. ++49(0)171-1954375 Fax. ++49(0)4102-9944976 eMail. proficiency-testing@dla-lvu.de</p>
<p><i>EP-Nummer PT-Number</i></p>	<p>DLA ptAL08/2020</p>
<p><i>EP-Koordinator PT-Coordinator</i></p>	<p>Dr. Matthias Besler-Scharf</p>
<p><i>Status des EP-Bericht Status of PT-Report</i></p>	<p>Abschlussbericht / Final report (17. Mai 2021)</p> <p>Gültig ist die jeweils letzte Version/Korrektur des Berichts. Sie ersetzt alle vorangegangenen Versionen. Only the latest version/correction of the report is valid. It replaces all preceding versions.</p>
<p><i>EP-Bericht Freigabe PT-Report Authorization</i></p>	<p>Dr. Matthias Besler-Scharf (Technischer Leiter / Technical Manager) - <i>gezeichnet / signed M. Besler-Scharf</i> Alexandra Scharf MSc. (QM-Beauftragte / Quality Manager) - <i>gezeichnet / signed A. Scharf</i> Datum / Date: 17. Mai 2021</p>
<p><i>Unteraufträge Subcontractors</i></p>	<p>Im Rahmen dieser Eignungsprüfung wurden nachstehende Leistungen im Unterauftrag vergeben: Homogenitätsprüfung der EP-Parameter, Proteinbestimmung As part of the present proficiency test the following services were subcontracted: Homogeneity tests of PT-parameter(s), protein determination</p>
<p><i>Vertraulichkeit Confidentiality</i></p>	<p>Die Teilnehmerergebnisse sind im EP-Bericht in anonymisierter Form mit Auswertenummern benannt. Daten einzelner Teilnehmer werden ausschließlich nach vorheriger Zustimmung des Teilnehmers an Dritte weitergegeben. Participant result are named anonymously with evaluation numbers in the PT report. Data of individual participants will be passed on to third parties only with prior consent of the participant.</p>

Inhalt

1. Einleitung.....	4
2. Durchführung.....	4
2.1 Untersuchungsmaterial.....	4
2.1.1 Homogenität.....	6
2.1.2 Stabilität.....	9
2.2 Probenversand und Informationen zur Untersuchung.....	9
2.3 Ergebnisübermittlung.....	9
3. Auswertung.....	10
3.1 Konsenswert der Teilnehmer (zugewiesener Wert).....	10
3.2 Robuste Standardabweichung.....	11
3.3 Ausschluss von Ergebnissen und Ausreißer.....	11
3.4 Zielstandardabweichung (für die Eignungsbeurteilung).....	12
3.4.1 Allgemeines Modell nach Horwitz.....	12
3.4.2 Auswertung eines Versuchs zur Präzision.....	12
3.4.3 Werte aus Erkenntnissen.....	15
3.5 z-Score.....	16
3.5.1 Warn- und Eingriffssignale.....	16
3.6 z'-Score.....	17
3.7 Quotient S^*/opt	17
3.8 Standardunsicherheit und Rückführbarkeit.....	17
3.9 Graphische Darstellung der Bezugswerte.....	18
3.10 Wiederfindungsraten: Dotierung.....	18
4. Ergebnisse.....	19
4.1 Vergleichsuntersuchung Mandel.....	21
4.1.1 ELISA-Ergebnisse: Mandel.....	21
4.1.2 PCR-Ergebnisse: Mandel.....	31
4.2 Vergleichsuntersuchung Cashew.....	34
4.2.1 ELISA-Ergebnisse: Cashew.....	34
4.2.2 PCR-Ergebnisse: Cashew.....	44
4.3 z-Scores der Teilnehmer: Übersichtstabelle.....	48
5. Dokumentation.....	50
5.1 Angaben der Teilnehmer.....	50
5.1.1 ELISA: Mandel.....	50
5.1.2 ELISA: Cashew.....	52
5.1.3 PCR: Mandel.....	54
5.1.4 PCR: Cashew.....	55
5.2 Homogenität.....	56
5.2.1 Mischungshomogenität vor der Abfüllung.....	56
5.3 Informationen zur Eignungsprüfung (EP).....	57
6. Verzeichnis der Teilnehmer in alphabetischer Reihenfolge.....	58
7. Verzeichnis relevanter Literatur.....	59

1. Einleitung

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

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

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

2. Durchführung

2.1 Untersuchungsmaterial

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

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

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

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

Die Dotierungsmaterialien, die die allergenen Zutaten Mandel und Cashew enthalten, wurden zerkleinert und homogenisiert, dann zu einem Aliquot der Grundmatrix gegeben und die Mischung homogenisiert. Anschließend wurde portionsweise erneut Grundmatrix in 3 weiteren Schritten zugegeben und jeweils homogenisiert bis die Gesamtmenge erreicht war.

Die **Dotierungsniveauprobe** wurde mit den oben genannten allergenhaltigen Dotierungsmaterialien unter mehrstufiger Zugabe von Kartoffelpulver und Homogenisierung hergestellt.

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

Tabelle 1: Zusammensetzung der DLA-Proben

Zutaten	Probe A	Probe B	Dotierungs-niveauprobe
Bratlingsmischung Zutaten: Hafervollkornflocken, Dinkelvollkorn Grieß, Dinkelvollkornflocken, Cornflakes (Maismehl, Rohrohrzucker, Meersalz), Zwiebeln, Lauch, Karotten, Sonnenblumenöl, Meersalz, Tomatenpulver, Zucchini, Knoblauch, Gewürze (Pfeffer, Macis, Kurkuma), Kräuter (Liebstöckelblätter, Oregano) Nährwertangaben pro 100g: Fett 6,2 g, Kohlenhydrate 57 g, Eiweiß 12 g, Salz 2,1 g	99,86 g/100 g	100 g/100g	-
Kartoffelpulver Zutaten: Kartoffeln, E471, E304, E223, E100	-	-	99,8 g/100 g
Mandeln, geröstet: gemahlen, Mischung (19 Produkte, 6 Länder, USA, Europa, Australien, Vorderasien) - als Mandel* - davon 21,1% Gesamtprotein**	19,2 mg/kg 4,06 mg/kg	-	18,5 mg/kg 3,91 mg/kg
Cashew, geröstet: gemahlen, Mischung (9 Produkte, Asien und unbekannter Herkunft) - als Cashew* - davon 18,5% Gesamtprotein**	10,1 mg/kg 1,86 mg/kg	-	12,3 mg/kg 2,28 mg/kg
weitere Zutaten: Maltodextrin und Siliciumdioxid	<0,2 g/100 g	-	<0,2 g/100 g

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

** Proteingehalte gemäß Laboranalyse des Rohstoffs (Gesamtstickstoff nach Kjeldahl mit F=5,18 für Mandelprotein und F=5,30 für Cashewprotein)

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

2.1.1 Homogenität

Die **Mischungshomogenität vor der Abfüllung** wurde in 8-fach Bestimmung mittels **Microtracer-Analyse** untersucht. Es handelt sich um eine normierte Methode, die Bestandteil des internationalen GMP-Zertifizierungssystems für Futtermittel ist [14]. Vor der Mischung werden mit Farbstoff beschichtete Eisenpartikel in μm -Größe zur Probe gegeben und die Partikelzahl wird nach der Homogenisierung in entnommenen Aliquoten bestimmt. Die Bewertung der Mischungshomogenität erfolgt auf Grundlage der Poissonverteilung anhand des chi-Quadrat-Tests. Eine Wahrscheinlichkeit von $\geq 5\%$ ist gleichzusetzen mit einer guten homogenen Mischung und von $\geq 25\%$ mit einer exzellenten Mischung [14, 15]. Die Microtracer-Analyse der vorliegenden LVU-Proben A und Dotierungsmaterialprobe hat eine Wahrscheinlichkeit von 68% bzw. 100% ergeben. Die Partikel-Ergebnisse wurden zusätzlich in Konzentrationen umgerechnet, statistisch als Normalverteilung ausgewertet und mit der Standardabweichung nach Horwitz verglichen. Für die Beurteilung sind HorRat-Werte zwischen 0,3 und 1,3 unter Wiederholbedingungen (Messungen innerhalb des Labors) zu akzeptieren [17]. Es wurden HorRat-Werte von 1,3 bzw. 0,42 erhalten. Die Ergebnisse der Microtracer-Analyse sind in der Dokumentation angegeben.

Homogenität der abgefüllten dotierten Probe A

Durchführung der Homogenitätstests

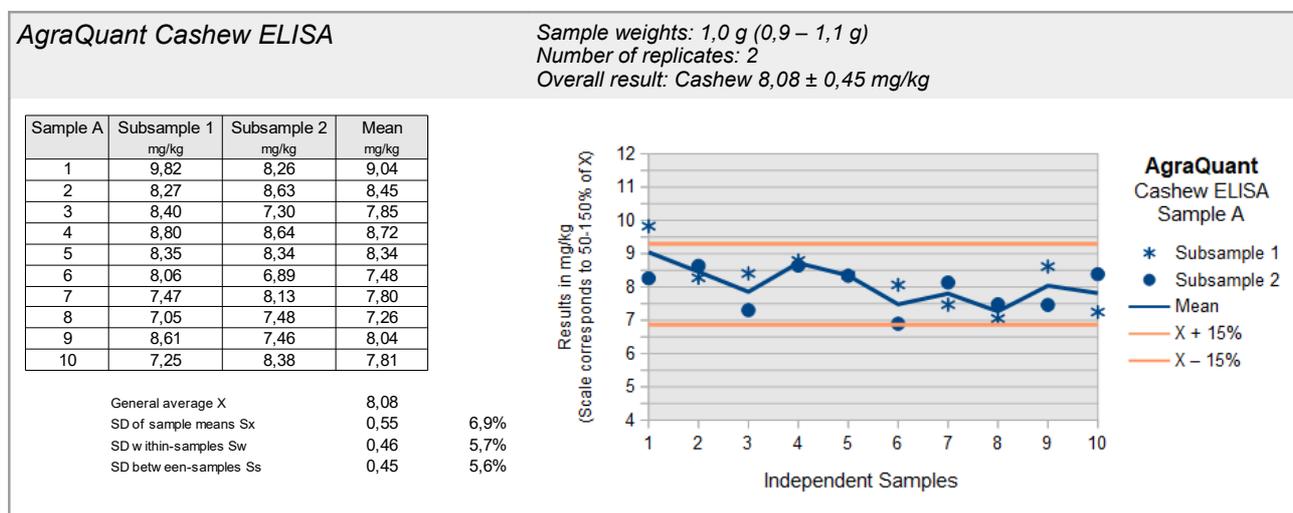
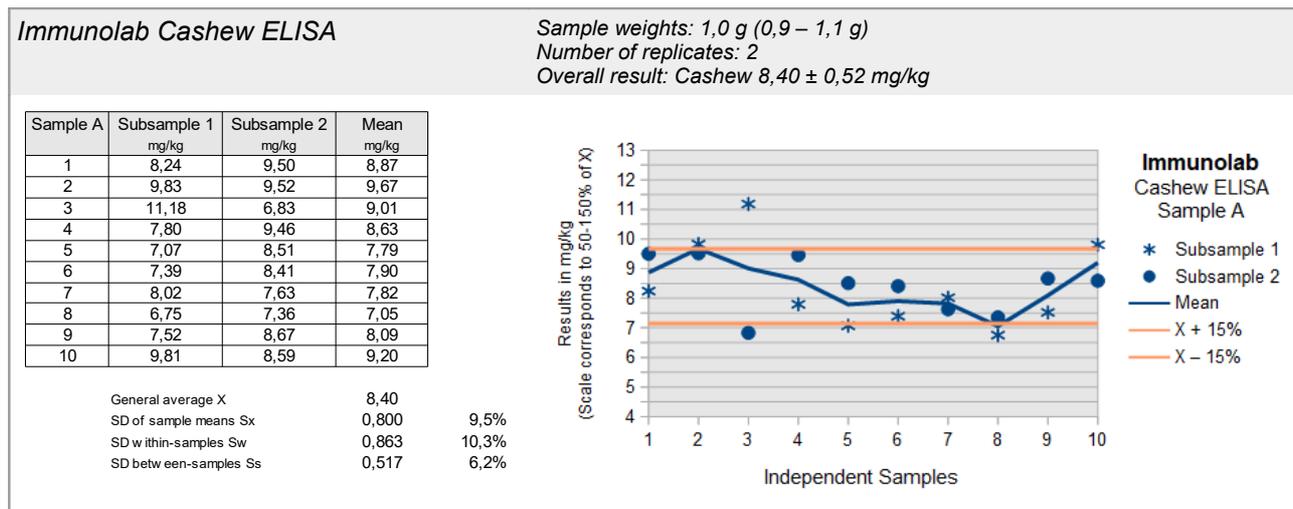
Die Homogenitätstests wurden in Kooperation mit den Labors der angegebenen Testkit-Anbieter durchgeführt. Von DLA wurden zufällig 10 Muster der abgefüllten dotierten Probe ausgewählt und davon jeweils 2 Teilproben in zuvor zufällig-coodierte Extraktionsbehälter eingewogen und anschließend den Labors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

Bewertung der Homogenität

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

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

ELISA-Tests: Homogenität Cashew / Homogeneity Cashew



2.1.2 Stabilität

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

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

Der a_w -Wert der EP-Proben lag bei ca. $0,37$ (18°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 49. Kalenderwoche 2020 je eine Portion der Untersuchungsmaterialien A und B sowie eine Dotierungsmaterialprobe verschickt. Die Untersuchungsverfahren wurden freigestellt. Die Untersuchungen waren durchzuführen bis spätestens 12. Februar 2021.

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 Mandel und Cashew im mg/kg Bereich in der Matrix Bratlingmischung (Pulver). Eine der beiden Proben sowie die "Dotierungsniveauprobe" wurden mit den allergenen Zutaten hergestellt. Die "Dotierungsniveauprobe" enthält die Allergene in einfacher Matrix mit ähnlichen Gehalten ohne weitere Prozessierung. Die Dotierungsniveauprobe soll wie eine normale Probe untersucht werden.

Bitte beachten Sie die beiliegenden Informationen zur Eignungsprüfung. (siehe Dokumentation unter Punkt 5.4 EP-Informationen)

2.3 Ergebnisübermittlung

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

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

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

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

Alle 22 Teilnehmer haben fristgerecht Ergebnisse abgegeben.

3. Auswertung

Verschiedene ELISA-Methoden zur quantitativen Bestimmung von Allergenen in Lebensmitteln können verschiedene Antikörper-Spezifitäten aufweisen, mit unterschiedlichem Referenzmaterial kalibriert worden sein und sich unterschiedlicher Extraktionsverfahren bedienen. Die verschiedenen ELISA-Methoden können daher zu einer unterschiedlichen Bewertung des Gehalts eines Analyten führen [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
$\sigma_R = 0,22c$	$c < 1,2 \times 10^{-7}$	$< 120 \mu\text{g/kg}$
$\sigma_R = 0,02c^{0,8495}$	$1,2 \times 10^{-7} \leq c \leq 0,138$	$\geq 120 \mu\text{g/kg}$
$\sigma_R = 0,01c^{0,5}$	$c > 0,138$	$> 13,8 \text{ g/100g}$

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

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

3.4.2 Auswertung eines Versuchs zur Präzision

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

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

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

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

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

Aus den Präzisionsdaten der ASU §64 Methoden ergeben sich abhängig von Matrix bzw. Prozessierung und Konzentrationsbereich relative Zielstandardabweichungen im Bereich von 12 - 33% für die ELISA-Methoden und 25 - 42% für die PCR-Methoden (s. Tab. 2a und 2b).

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

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

Tabelle 2b: PCR-Methoden - Relative Wiederholstandardabweichungen (RSD_r) und relative Vergleichsstandardabweichungen (RSD_R) gemäß ausgewählter Auswertungen von Versuchen zur Präzision und die resultierende Zielstandardabweichung σ_{pt} [33-35]

Parameter	Matrix	Mittelwerte [mg/kg]	Wiederfindung	rob RSD	RSD _r	RSD _R	σ_{pt}	Methode / Literatur
Mandel	Reiskekse	105,2	105 %	-	19,3%	27,5%	23,9%	rt-PCR ASU 18.00-20
		18,0	90 %		44,0%	49,1%	38,0%	
		10,5	105 %		32,0%	38,8%	31,5%	
Mandel	Weizenkekse Soßenpulver	114,3	94,6 %	-	22,1%	41,8%	38,8%	rt-PCR ASU 18.00-20
		88,1	88,1 %		43,9%	43,1%	- %	
Mandel	Reiskekse	109	109 %	-	17,6%	32,8%	30,3%	rt-PCR multiplex ASU 18.00-22
		21,3	107 %		35,8%	45,0%	37,2%	
		12,3	121 %		32,0%	47,8%	42,1%	
Mandel	Weizenkekse Soßenpulver	120,7	98,2 %	-	15,7%	32,5%	30,5%	rt-PCR multiplex ASU 18.00-22
		112	94,1 %		36,2%	42,8%	34,3%	
Paranuss	Reiskekse	89,1	89,1 %	-	34,1%	34,4%	24,5%	rt-PCR ASU 18.00-21
		17,3	86,5 %		36,2%	38,2%	28,4%	
		9,8	98 %		40,2%	41,8%	30,6%	
Paranuss	Weizenkekse Soßenpulver	80,8	65,7 %	-	25,6%	36,4%	31,6%	rt-PCR ASU 18.00-21
		42,6	42,6 %		27,5%	39,7%	34,6%	
Paranuss	Reiskekse	96,6	96,6 %	-	16,8%	31,8%	29,5%	rt-PCR multiplex ASU 18.00-22
		14,2	71 %		54,2%	56,5%	41,5%	
Paranuss	Weizenkekse Soßenpulver	76,5	62,2 %	-	15,6%	35,8%	34,1%	rt-PCR multiplex ASU 18.00-22
		48,4	48,4 %		34,4%	37,5%	28,5%	

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	Wiederholstandard- abweichung	Vergleichsstandard- abweichung
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	Wiederholstandard- abweichung	Vergleichsstandard- abweichung
CAC 2010	± 25% ^(a)	≤ 25%	≤ 35%

(a) = Trueness / Richtigkeit

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

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

3.5 z-Score

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

Die Berechnung erfolgt nach:

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

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

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

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

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

3.5.1 Warn- und Eingriffssignale

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

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

3.6 z'-Score

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

Die Berechnung erfolgt nach:

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

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

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

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

Zu Warn- und Eingriffssignalen siehe 3.5.1.

3.7 Quotient S^*/σ_{pt}

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

3.8 Standardunsicherheit und Rückführbarkeit

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

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

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

Die Rückführbarkeit des zugewiesenen Wertes wird anhand des Konsenswertes

als robuster Mittelwert der Teilnehmerergebnisse gewährleistet.

3.9 Graphische Darstellung der Bezugswerte

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

3.10 Wiederfindungsraten: Dotierung

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

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.

ELISA-Ergebnisse, die als Mandel- oder Cashewprotein angegeben wurden, sind mit dem experimentell bestimmten Proteingehalt des Rohstoffes auf das Gesamtlebensmittel (Mandel bzw. Cashew) umgerechnet worden (s. Seite 5).

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

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

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

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

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

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

° Zielbereich berechnet mit z-Score oder z'-Score

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

4.1 Vergleichsuntersuchung Mandel

4.1.1 ELISA-Ergebnisse: Mandel

Qualitative Auswertung der Ergebnisse: Proben A und B

Auswertenummer	Probe A	Probe A	Probe B	Probe B	Qualitative Bewertung	Methode	Hinweis
	pos/neg	[mg/kg]	pos/neg	[mg/kg]	Übereinstimmungen mit Konsenswerten		
7	positiv	9,15	negativ		2/2 (100%)	AQ	
2	positiv	35,1	negativ	0,95	2/2 (100%)	IL	Ergebnis umgerechnet *
8	positiv	11,0	negativ	<1	2/2 (100%)	NL	
13	positiv	8,30	negativ	<0,2	2/2 (100%)	NL	
1	positiv	16,3	negativ	<0,1	2/2 (100%)	RS-F	
3	positiv	17,8	negativ	<2,5	2/2 (100%)	RS-F	
6	positiv	16,6	negativ	<2,5	2/2 (100%)	RS-F	
10	positiv	17,0	negativ	<2,5	2/2 (100%)	RS-F	
14	positiv	18,0	negativ	<2,5	2/2 (100%)	RS-F	
15	positiv	13,0	negativ	<2,50	2/2 (100%)	RS-F	
16	positiv	17,8	negativ		2/2 (100%)	RS-F	
18	positiv	19,0	negativ	<2,5	2/2 (100%)	RS-F	
19	positiv		negativ		2/2 (100%)	RS-F	
21	positiv	16,9	negativ	<2,50	2/2 (100%)	RS-F	
22	positiv	23,3	negativ	<2,5	2/2 (100%)	RS-F	
4	positiv	12,0	negativ	0	2/2 (100%)	SP	
11	positiv	9,30	negativ	<0,4	2/2 (100%)	SP	
5	positiv	9,16	negativ	<2,5	2/2 (100%)	VT	
17	positiv	8,20	negativ	<2,5	2/2 (100%)	VT	
20	positiv	9,00	negativ		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:

AQ = AgraQuant, RomerLabs
 IL = Immunolab
 NL = nutriLinia® Allergen-ELISA
 RS-F= Ridascree® 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	Mandel [mg/kg]	z-Score Xpt _{Peak10}	z-Score Xpt _{RS-F}	Methode	Hinweis
7	9,15	-0,13		AQ	
2	35,1			IL	Ergebnis umgerechnet *
8	11,0	0,66		NL	
13	8,30	-0,48		NL	
1	16,3		-0,26	RS-F	
3	17,8		0,09	RS-F	
6	16,6		-0,19	RS-F	
10	17,0		-0,10	RS-F	
14	18,0		0,13	RS-F	
15	13,0		-1,0	RS-F	
16	17,8		0,09	RS-F	
18	19,0		0,36	RS-F	
21	16,9		-0,12	RS-F	
22	23,3		1,4	RS-F	
4	12,0	1,1		SP	
11	9,30	-0,06		SP	
5	9,16	-0,12		VT	
17	8,20	-0,53		VT	
20	9,00	-0,19		VT	

* Umrechnung S. 19

Methoden:

- AQ = AgraQuant, RomerLabs
- IL = Immunolab
- NL = nutriLinia® Allergen-ELISA
- RS-F= Ridascreen® Fast, R-Biopharm
- SP = SensiSpec ELISA Kit, Eurofins
- VT = Veratox, Neogen

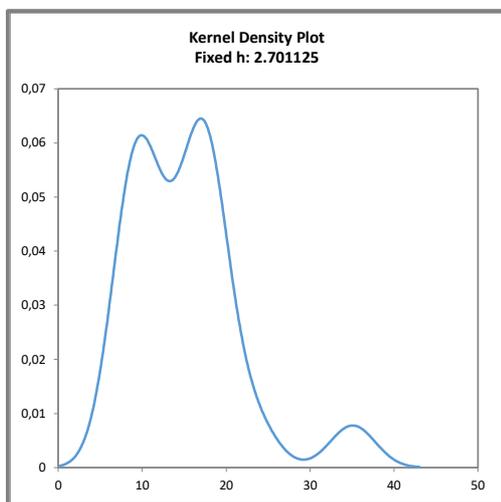


Abb. / Fig. 1:

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

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

Anmerkung:

Die Kerndichte-Schätzung zeigt eine zweigipflige Verteilung der Ergebnisse, wobei der Peak bei ca. 17 mg/kg der Methode RS-F zuzuordnen ist und der Peak bei ca. 10 mg/kg auf die übrigen Methoden zurückgeht.

Kenndaten: Quantitative Auswertung ELISA Mandel

Probe A

Kenndaten	Ergebn. Peak10* [mg/kg]	Methode RS-F** [mg/kg]
Zugewiesener Wert (X_{pt})	$X_{pt_{Peak10}}$	$X_{pt_{METHODE RS-F}}$
Anzahl der Messergebnisse	8	10
Anzahl der Ausreißer	0	0
Mittelwert	9,51	17,6
Median	9,15	17,4
Robuster Mittelwert (X_{pt})	9,44	17,4
Robuste Standardabweichung (S^*)	1,33	1,48
<i>Zielkenndaten:</i>		
Zielstandardabweichung σ_{pt}	2,36	4,36
Untere Grenze des Zielbereichs	4,72	8,71
Obere Grenze des Zielbereichs	14,2	26,1
Quotient S^*/σ_{pt}	0,56	0,34
Standardunsicherheit $U(X_{pt})$	0,586	0,585
Ergebnisse im Zielbereich	8	10
Prozent im Zielbereich	100	100

Methoden:

* „Peak10“: AQ = AgraQuant, RomerLabs, NL = NutriLinie (R) Allergen-ELISA, SP = SensiSpec ELISA Kit, Eurofins, VT = Veratox, Neogen

** RS-F = Ridascreen® Fast, R-Biopharm

Anmerkungen zu den Kenndaten und Vergleich der Bezugswerte:

Die Kerndichte-Schätzung zeigte eine zweigipflige Verteilung der Ergebnisse, wobei der Peak bei ca. 17 mg/kg der Methode RS-F zuzuordnen war. Eine gemeinsame Auswertung der Ergebnisse aller Methoden erfolgte daher nicht. Die übrigen Methoden, die einen Peak bei ca. 10 mg/kg zeigten, wurden separat ausgewertet.

Die Auswertungen der Ergebnisse vom „Peak 10“ und von Methode RS-F zeigten eine geringe Variabilität der Ergebnisse. Der Quotient S^*/σ_{pt} lag jeweils unter 1,0. Die robuste Standardabweichung liegt 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 49% bzw. 91% vom Zusatzniveau von Mandel zu Probe A für „Peak“ knapp unterhalb und für Methode RS-F innerhalb der relevanten Anforderungen für die eingesetzten Methoden (s. 3.4.3 und S.31 "Wiederfindungsraten für Mandel").

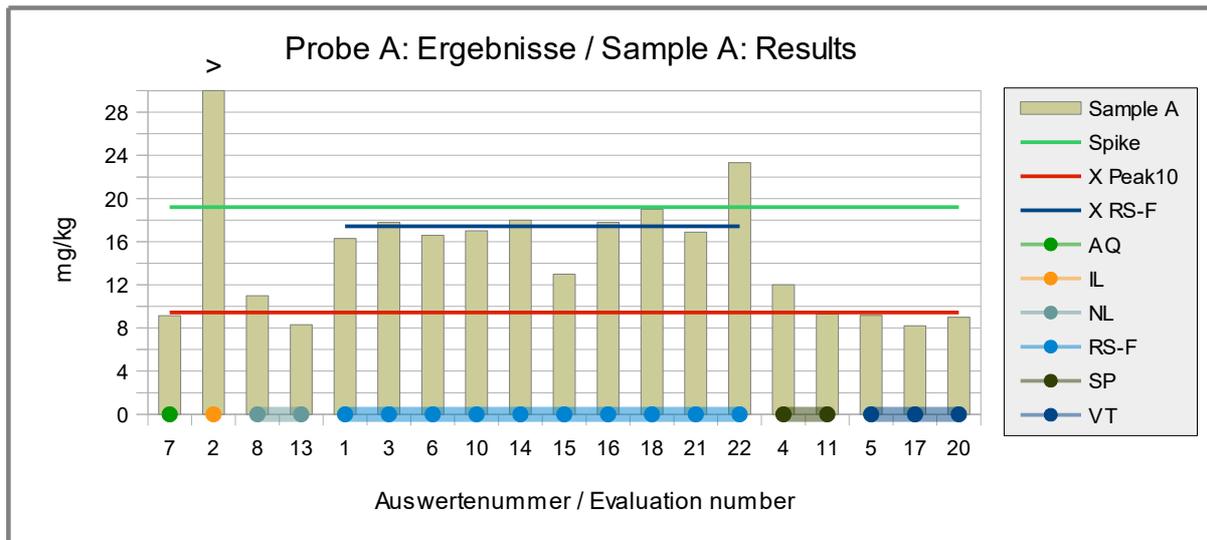


Abb./Fig. 2: ELISA-Ergebnisse Mandel
 grüne Linie = Zusatzniveau (Spike)
 rote Linie = robuster Mittelwert Ergebnisse „Peak10“
 blaue Linie = robuster Mittelwert Ergebnisse Methode RS-F
 runde Symbole = Zuordnung der Methoden (s. Legende)

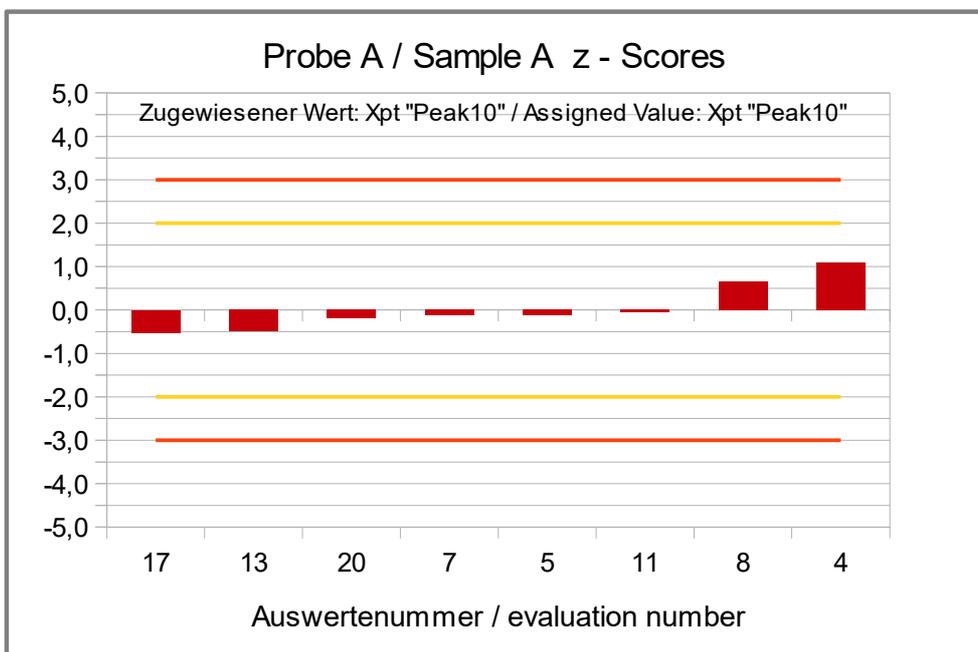


Abb./Fig. 3:
 z-Scores (ELISA-Ergebnisse Mandel)
 Zugewiesener Wert: robuster Mittelwert aller Ergebnisse von „Peak 10“

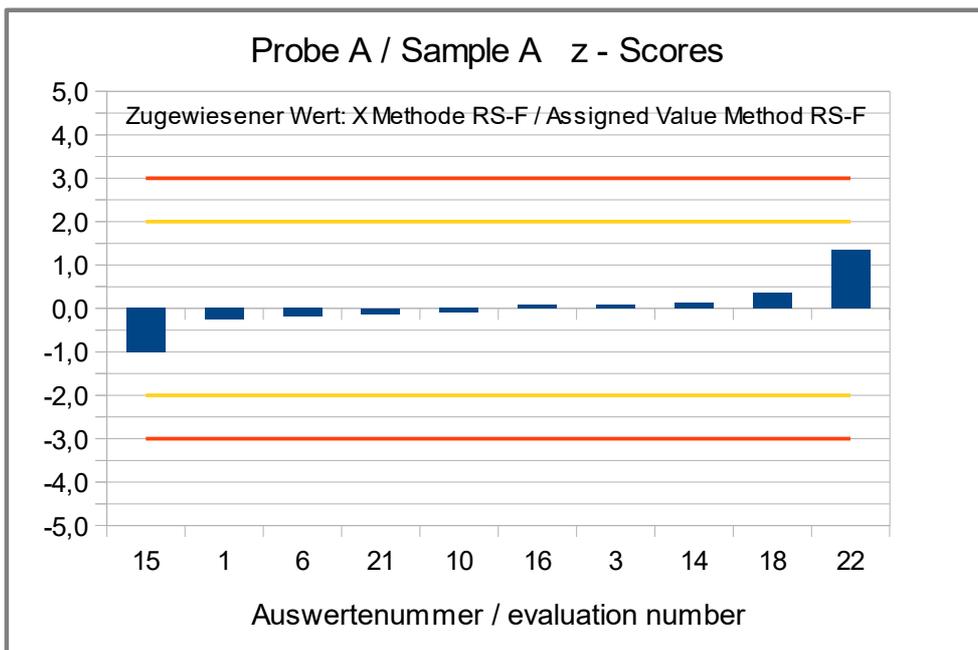


Abb./Fig. 4:

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

Quantitative Auswertung ELISA: Dotierungsniveauprobe

Auswertenummer	Mandel [mg/kg]	z-Score X _{pt,ALL}	z-Score X _{pt,RS-F}	Methode	Hinweis
7	12,7	-1,0		AQ	
2	52,1	8,3		IL	Ergebnis umgerechnet °
8	12,0	-1,2		NL	
13	13,0	-0,94		NL	
1	21,0	0,95	0,45	RS-F	
3	21,0	0,95	0,45	RS-F	
6	17,6	0,14	-0,27	RS-F	
10	18,6	0,38	-0,06	RS-F	
14	17,0	0,01	-0,39	RS-F	
15	14,0	-0,70	-1,03	RS-F	
16	21,6	1,1	0,58	RS-F	
18	>20,0			RS-F	
21	16,2	-0,19	-0,57	RS-F	
22	22,8	1,4	0,83	RS-F	
4	14,0	-0,70		SP	
11	12,0	-1,2		SP	
5	16,2	-0,19		VT	
17	17,5	0,12		VT	
20	15,1	-0,44		VT	

° Umrechnung S. 19

Methoden:

- AQ = AgraQuant, RomerLabs
- IL = Immunolab
- NL = nutriLinia® Allergen-ELISA
- RS-F= Ridascreen® Fast, R-Biopharm
- SP = SensiSpec ELISA Kit, Eurofins
- VT = Veratox, Neogen

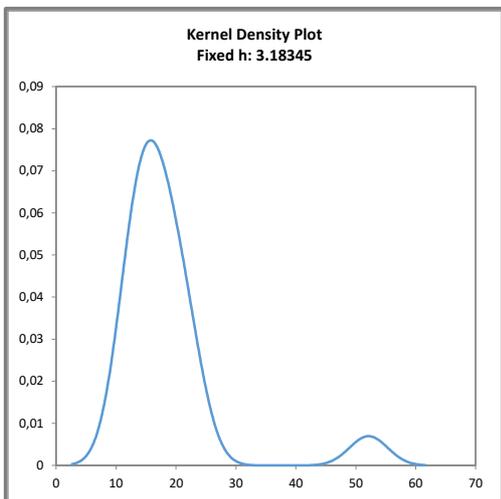


Abb. / Fig. 5:

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

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

Anmerkung:

Die Kerndichte-Schätzung zeigt annähernd eine symmetrische Verteilung mit einem Nebenpeak bei 52 mg/kg, der auf einen Einzelwert zurückgeht (Methode IL).

Kenndaten: Quantitative Auswertung ELISA Mandel

Dotierungsniveauprobe

Kenndaten	Alle Ergebnisse [mg/kg]	Methode RS-F [mg/kg]
Zugewiesener Wert (X_{pt})	X_{pt}_{ALL}	$X_{pt}_{METHOD\ RS-F}$
Anzahl der Messergebnisse	18	9
Anzahl der Ausreißer	0	0
Mittelwert	18,6	18,9
Median	16,6	18,6
Robuster Mittelwert (X_{pt})	17,0	18,9
Robuste Standardabweichung (S^*)	4,23	3,31
<i>Zielkenndaten:</i>		
Zielstandardabweichung σ_{pt}	4,24	4,72
Untere Grenze des Zielbereichs	8,49	9,43
Obere Grenze des Zielbereichs	25,5	28,3
<i>Quotient S^*/σ_{pt}</i>	<i>1,0</i>	<i>0,70</i>
<i>Standardunsicherheit $U(X_{pt})$</i>	<i>1,25</i>	<i>1,38</i>
<i>Ergebnisse im Zielbereich</i>	<i>17</i>	<i>9</i>
<i>Prozent im Zielbereich</i>	<i>94</i>	<i>100</i>

Methoden:

RS-F = Ridascreen® Fast, R-Biopharm

Anmerkungen zu den Kenndaten und Vergleich der Bezugswerte:

Die Kerndichte-Schätzung zeigte keine eindeutigen methodenabhängigen Unterschiede (ein hoher Einzelwert).

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

Die robusten Mittelwerte der Auswertungen lagen mit 92% bzw. 102% vom Zusatzniveau von Mandel zur Dotierungsniveauprobe innerhalb der relevanten Anforderungen für die eingesetzten Methoden (s. 3.4.3 und S.31 "Wiederfindungsraten für Mandel").

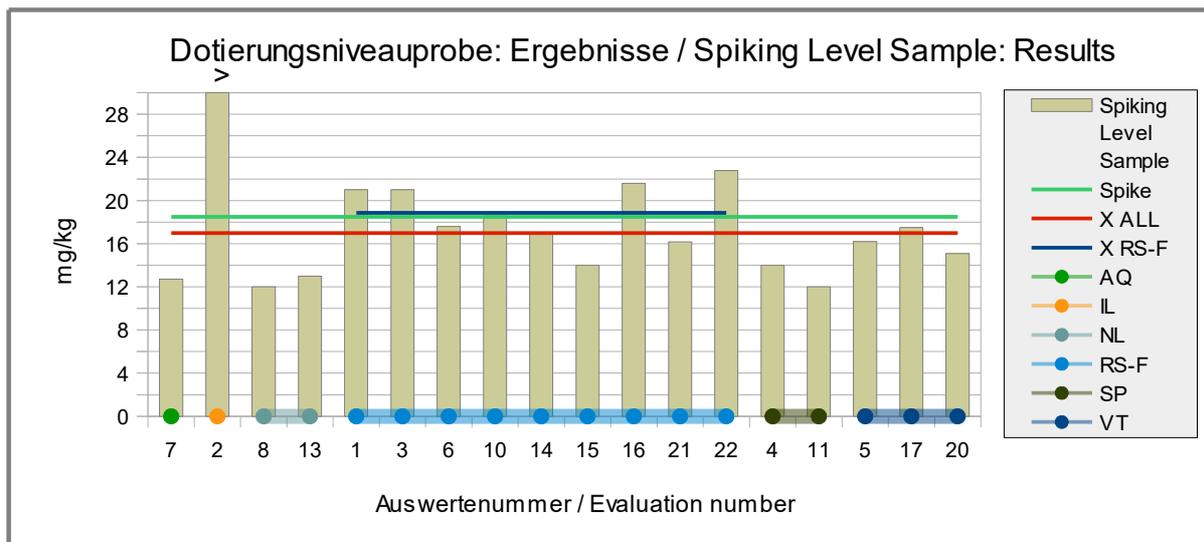


Abb./Fig. 6: ELISA-Ergebnisse Mandel
 grüne Linie = Zusatzniveau (Spike)
 rote Linie = robuster Mittelwert aller Ergebnisse
 blaue Linie = robuster Mittelwert Ergebnisse Methode RS-F
 runde Symbole = Zuordnung der Methoden (s. Legende)

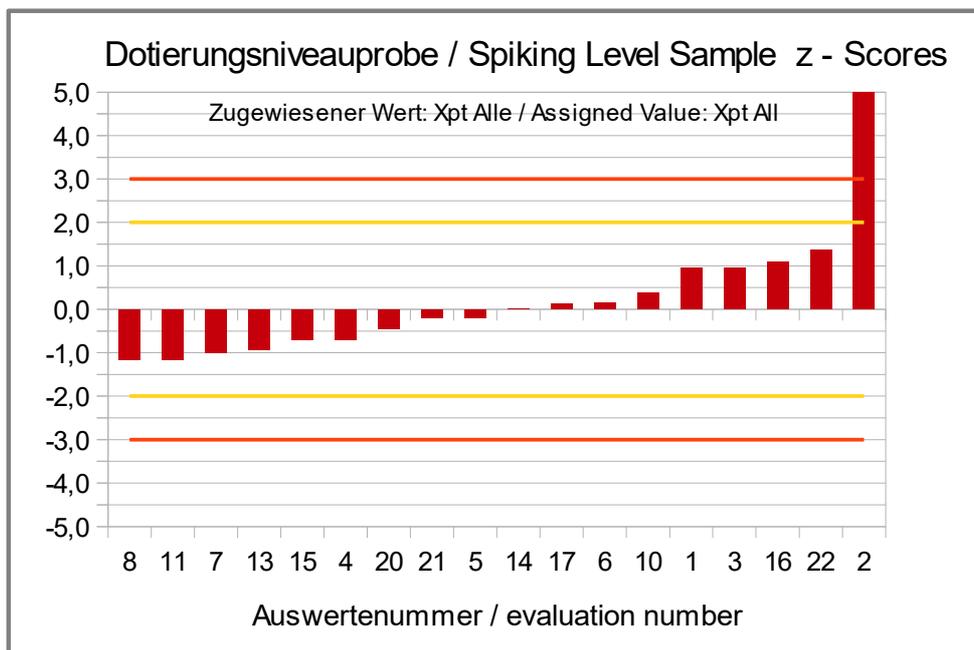


Abb./Fig. 7:
 z-Scores (ELISA-Ergebnisse Mandel)
 Zugewiesener Wert: robuster Mittelwert aller Ergebnisse

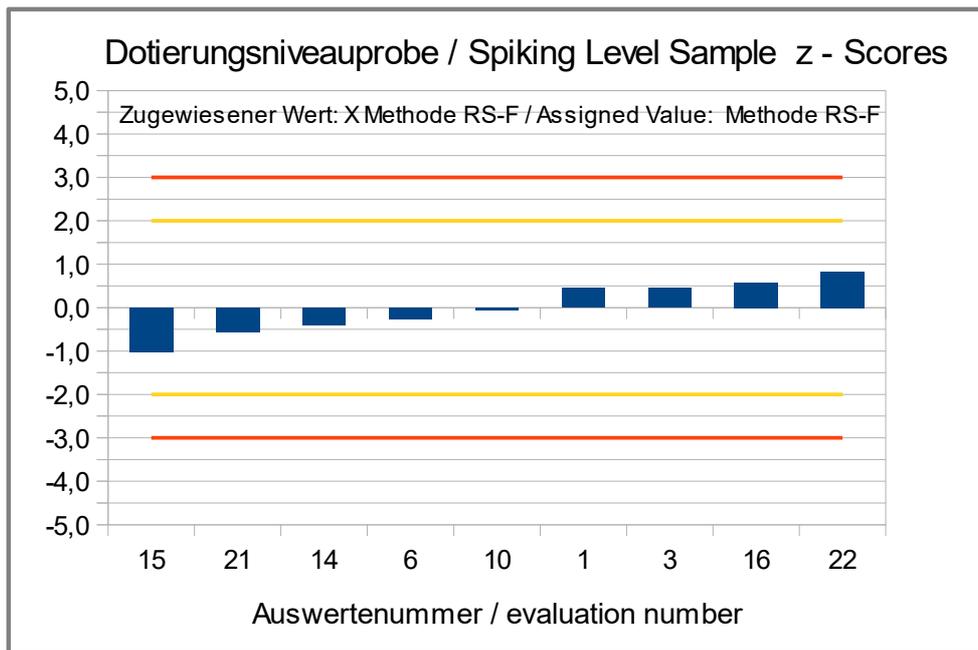


Abb./Fig. 8:

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

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

Auswertenummer	Dotierungsniveauprobe	Wiederfindungsrate*		Probe A	Wiederfindungsrate*		Methode	Hinweis
	[mg/kg]	[%]	[Z _{RR}]	[mg/kg]	[%]	[Z _{RR}]		
7	12,7	69	-1,2	9,15	48	-2,1	AQ	
2	52,1	282	7,3	35,1	183	3,3	IL	Ergebnis umgerechnet °
8	12,0	65	-1,4	11,0	57	-1,7	NL	
13	13,0	70	-1,2	8,30	43	-2,3	NL	
1	21,0	114	0,54	16,3	85	-0,61	RS-F	
3	21,0	114	0,54	17,8	93	-0,29	RS-F	
6	17,6	95	-0,19	16,6	86	-0,54	RS-F	
10	18,6	101	0,02	17,0	88	-0,46	RS-F	
14	17,0	92	-0,32	18,0	94	-0,25	RS-F	
15	14,0	76	-0,97	13,0	68	-1,29	RS-F	
16	21,6	117	0,67	17,8	93	-0,29	RS-F	
21	16,2	88	-0,50	16,9	88	-0,49	RS-F	
22	22,8	123	0,93	23,3	121	0,86	RS-F	
4	14,0	76	-0,97	12,0	62	-1,5	SP	
11	12,0	65	-1,4	9,30	48	-2,1	SP	
5	16,2	88	-0,50	9,16	48	-2,1	VT	
17	17,5	95	-0,21	8,20	43	-2,3	VT	
20	15,1	82	-0,73	9,00	47	-2,1	VT	

° Umrechnung S. 19

AB**	50-150 %	AB**	50-150 %
Anzahl im AB	17	Anzahl im AB	11
Prozent im AB	94	Prozent im AB	61

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

** Akzeptanzbereich der AOAC für Allergen-ELISAs

Methoden:

AQ = AgraQuant, RomerLabs
 IL = Immunolab
 NL = nutriLinia® Allergen-ELISA
 RS-F= Ridascreen® Fast, R-Biopharm
 SP = SensiSpec ELISA Kit, Eurofins
 VT = Veratox, Neogen

Anmerkung:

94% (17) der Teilnehmer haben mit der Dotierungsniveauprobe mittels ELISA eine Wiederfindungsrate im Bereich der AOAC-Anforderung von 50-150% erhalten. Für die dotierte Lebensmittelmatrix-Probe A lagen 61% (11) der Wiederfindungsraten in diesem Akzeptanzbereich. Die zugehörigen z-Scores basieren auf der Zielstandardabweichung von 25%.

4.1.2 PCR-Ergebnisse: Mandel

Qualitative Auswertung der Ergebnisse: Proben A und B

Auswertenummer	Probe A	Probe A	Probe B	Probe B	Qualitative Bewertung	Methode	Hinweis
	pos/neg	[mg/kg]	pos/neg	[mg/kg]	Übereinstimmungen mit Konsenswerten		
7	positiv		negativ		2/2 (100%)	SFA	
9	positiv		negativ		2/2 (100%)	SFA	
16	positiv		negativ		2/2 (100%)	SFA	
3	negativ		negativ		1/2 (50%)	div	
13a	positiv	<5 (2)	negativ		2/2 (100%)	div	
13b	positiv	0,360	negativ		2/2 (100%)	div	
13c	positiv	2,00	negativ		2/2 (100%)	div	
19	negativ		negativ		1/2 (50%)	div	

	Probe A	Probe B
Anzahl positiv	6	0
Anzahl negativ	2	8
Prozent positiv	75	0
Prozent negativ	25	100
Konsenswert	positiv	negativ

Methoden:

SFA = Sure Food ALLERGEN, R-Biopharm / Congen
 div = keine genaue Angabe / andere Methode

Anmerkung:

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

Quantitative Auswertung PCR: Probe A

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

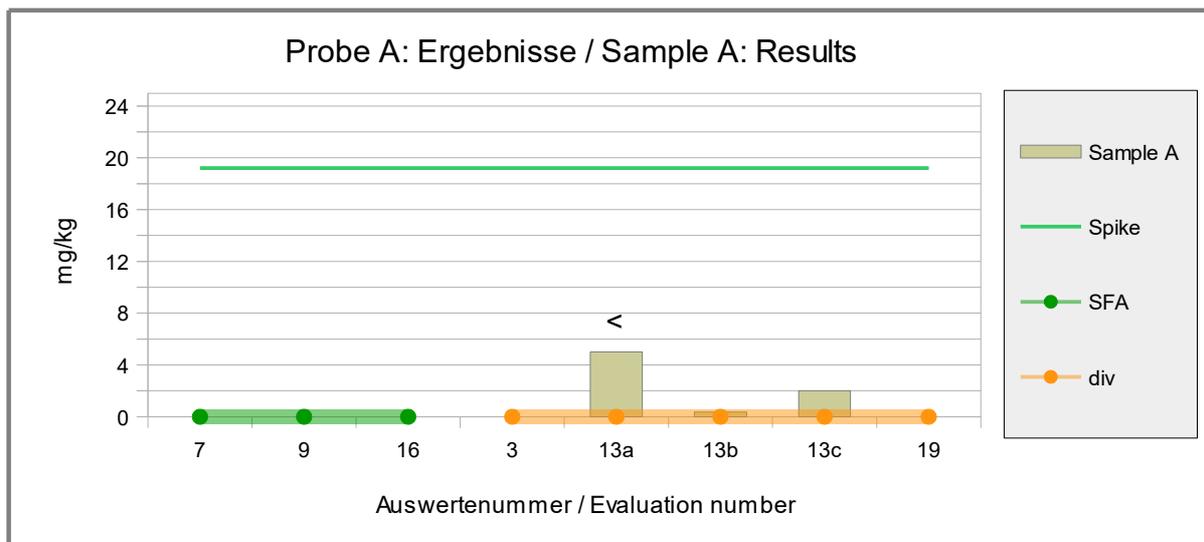


Abb./Fig. 9: PCR-Ergebnisse Mandel
 grüne Linie = Zusatzniveau (Spike)
 runde Symbole = Zuordnung der Methoden (s. Legende)

Quantitative Auswertung PCR: Dotierungsniveauprobe

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

Auswertenummer	Mandel pos/neg	Mandel [mg/kg]	z-Score X _{pt,ALL}	Methode	Hinweis
7	positiv			SFA	
9	positiv			SFA	
16	positiv			SFA	
3	positiv			div	
13a	positiv	<5 (1,4)		div	
13b	positiv	0,470		div	
13c	positiv	2,20		div	
19	positiv			div	

Anzahl positiv	8	
Anzahl negativ	0	
Prozent positiv	100	
Prozent negativ	0	
Konsenswert	positiv	

Methoden:

SFA = Sure Food ALLERGEN, R-Biopharm / Congen

div = keine genaue Angabe / andere Methode

Anmerkung:

Für die Dotierungsniveauprobe wurden 100% positive Ergebnisse erhalten.

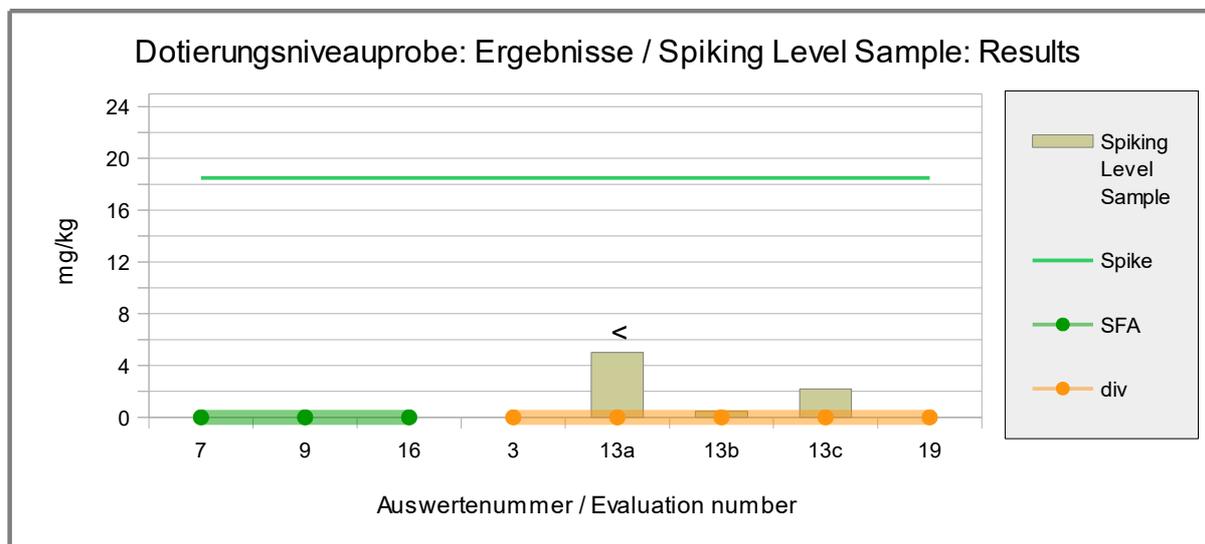


Abb./Fig. 10:

PCR-Ergebnisse Mandel

grüne Linie = Zusatzniveau (Spike)

runde Symbole = Zuordnung der Methoden (s. Legende)

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

Auswertenummer	Dotierungsniveauprobe			Probe A			Methode	Hinweis
	[mg/kg]	[%]	[Z _{RR}]	[mg/kg]	[%]	[Z _{RR}]		
7							SFA	
9							SFA	
16							SFA	
3							div	
13a	<5			<5			div	
13b	0,470	2,5	-3,9	0,360	1,9	-3,9	div	
13c	2,20	12	-3,5	2,00	10	-3,6	div	
19							div	

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

Methoden:

SFA = Sure Food ALLERGEN, R-Biopharm / Congen
div = keine genaue Angabe / andere Methode

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

** Akzeptanzbereich der AOAC für Allergen-ELISAs

Anmerkung:

Es wurden zwei quantitative PCR-Ergebnisse für Mandel angegeben. Die Wiederfindungsraten lagen sowohl für die Dotierungsniveauprobe als auch für die dotierte Lebensmittelmatrix-Probe A deutlich unter der AOAC-Anforderung von 50-150%.

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

4.2 Vergleichsuntersuchung Cashew

4.2.1 ELISA-Ergebnisse: Cashew

Qualitative Auswertung der Ergebnisse: Proben A und B

Auswertenummer	Probe A pos/neg	Probe A [mg/kg]	Probe B pos/neg	Probe B [mg/kg]	Qualitative Bewertung Übereinstimmungen mit Konsenswerten	Methode	Hinweis
20	positiv	12,3	negativ		2/2 (100%)	3M	
1	positiv	13,4	negativ	<0,2	2/2 (100%)	AQ	
22	positiv	13,7	negativ	<2	2/2 (100%)	BC	
17	positiv	8,90	negativ	<2.0	2/2 (100%)	BF	
21	positiv	11,2	negativ	<2.00	2/2 (100%)	BF	
5	positiv	19,4	negativ	<4,9	2/2 (100%)	ET	Ergebnis umgerechnet °
3	positiv	4,70	negativ	<2.5	2/2 (100%)	RS-F	
6	positiv	10,1	negativ	<2,5	2/2 (100%)	RS-F	
7	positiv	10,2	negativ		2/2 (100%)	RS-F	
8	positiv	13,0	negativ	<1	2/2 (100%)	RS-F	
10	positiv	8,80	negativ	<2,5	2/2 (100%)	RS-F	
12	positiv	16,2	negativ	-	2/2 (100%)	RS-F	
14	positiv	11,0	negativ	<2.5	2/2 (100%)	RS-F	
15	positiv	8,00	negativ	<2.50	2/2 (100%)	RS-F	
18	positiv	9,73	negativ	<2,5	2/2 (100%)	RS-F	
19	positiv		negativ		2/2 (100%)	RS-F	
4	positiv	11,0	negativ	0	2/2 (100%)	SP	
11	positiv	6,30	negativ	<2	2/2 (100%)	SP	

* Umrechnung S. 19

	Probe A	Probe B
Anzahl positiv	18	0
Anzahl negativ	0	18
Prozent positiv	100	0
Prozent negativ	0	100
Konsenswert	positiv	negativ

Methoden:

3M = 3M Protein ELISA Kit
 AQ = AgraQuant, RomerLabs
 BC = BioCheck ELISA
 BF = MonoTrace ELISA, BioFront Technologies
 ET = Elution Technologies ELISA Kit
 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	Cashew	z-Score X _{pt} ALL	z-Score X _{pt} RS-F	Methode	Hinweis
	[mg/kg]				
20	12,3	0,50		3M	
1	13,4	0,92		AQ	
22	13,7	1,0		BC	
17	8,90	-0,73		BF	
21	11,2	0,10		BF	
5	19,4	3,1		ET	Ergebnis umgerechnet *
3	4,70	-2,3	-2,1	RS-F	
6	10,1	-0,29	0,00	RS-F	
7	10,2	-0,25	0,04	RS-F	
8	13,0	0,77	1,1	RS-F	
10	8,80	-0,77	-0,52	RS-F	
12	16,2	2,0	2,4	RS-F	
14	11,0	0,04	0,35	RS-F	
15	8,00	-1,1	-0,84	RS-F	
18	9,73	-0,43	-0,15	RS-F	
4	11,0	0,04		SP	
11	6,30	-1,7		SP	

* Umrechnung S. 19

Methoden:

- 3M = 3M Protein ELISA Kit
- AQ = AgraQuant, RomerLabs
- BC = BioCheck ELISA
- BF = MonoTrace ELISA, BioFront Technologies
- ET = Elution Technologies ELISA Kit
- RS-F= Ridascreen® Fast, R-Biopharm
- SP = SensiSpec ELISA Kit, Eurofins

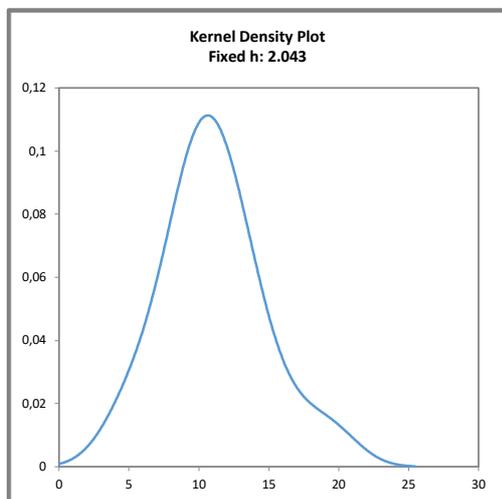


Abb. / Fig. 11:

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

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

Anmerkung:

Die Kerndichte-Schätzung zeigt annähernd eine symmetrische Verteilung der Ergebnisse mit einer Schulter bei ca. 20 mg/kg (Methode ET).

Kenndaten: Quantitative Auswertung ELISA Cashew

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	17	9
Anzahl der Ausreißer	0	0
Mittelwert	11,1	10,2
Median	11,0	10,1
Robuster Mittelwert (X_{pt})	10,9	10,1
Robuste Standardabweichung (S^*)	3,27	2,95
<i>Zielkenndaten:</i>		
Zielstandardabweichung σ_{pt}	2,72	2,53
Zielstandardabweichung (zur Information)	2,90	2,81
Untere Grenze des Zielbereichs	5,45	5,06
Obere Grenze des Zielbereichs	16,3	15,2
Quotient S^*/σ_{pt}	1,2	1,2
Standardunsicherheit $U(X_{pt})$	0,993	1,23
Ergebnisse im Zielbereich	15	7
Prozent im Zielbereich	88	78

Methoden:

RS-F = Ridascreen® Fast, R-Biopharm

Anmerkungen zu den Kenndaten und Vergleich der Bezugswerte:

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

Die Auswertungen der Ergebnisse aller Methoden und von Methode RS-F zeigten eine normale Variabilität der Ergebnisse. Der Quotient S^*/σ_{pt} lag jeweils unter 2,0. Die robuste Standardabweichung liegt 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 108% bzw. 100% vom Zusatzniveau von Cashew zu Probe A innerhalb der relevanten Anforderungen für die eingesetzten Methoden (s. 3.4.3 und S.43 "Wiederfindungsraten für Cashew").

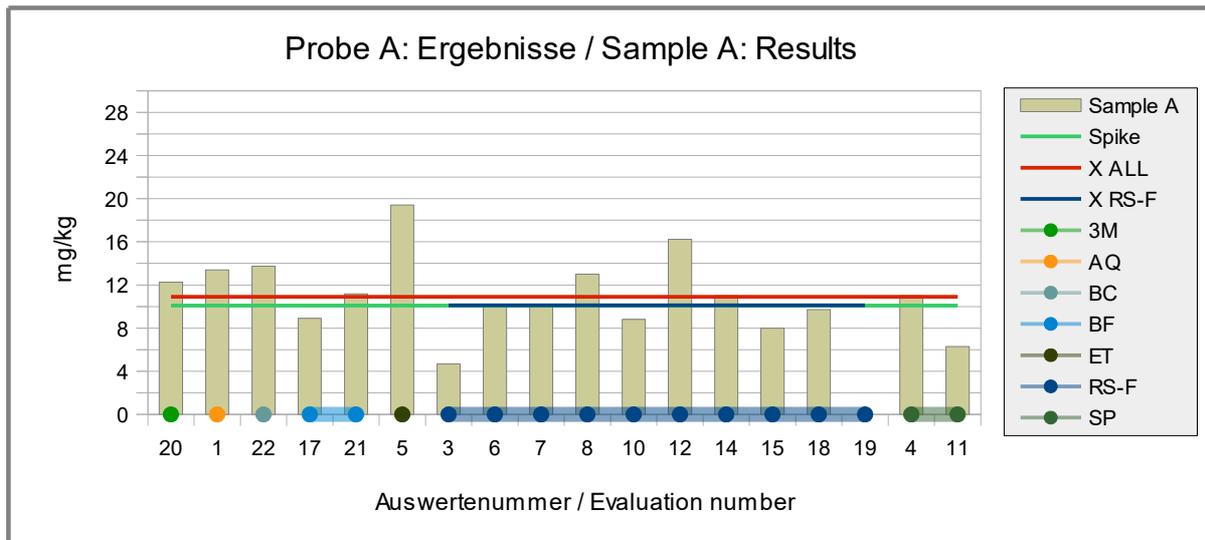


Abb./Fig. 12: ELISA-Ergebnisse Cashew
 grüne Linie = Zusatzniveau (Spike)
 rote Linie = robuster Mittelwert aller Ergebnisse
 blaue Linie = robuster Mittelwert Ergebnisse Methode RS
 runde Symbole = Zuordnung der Methoden (s. Legende)

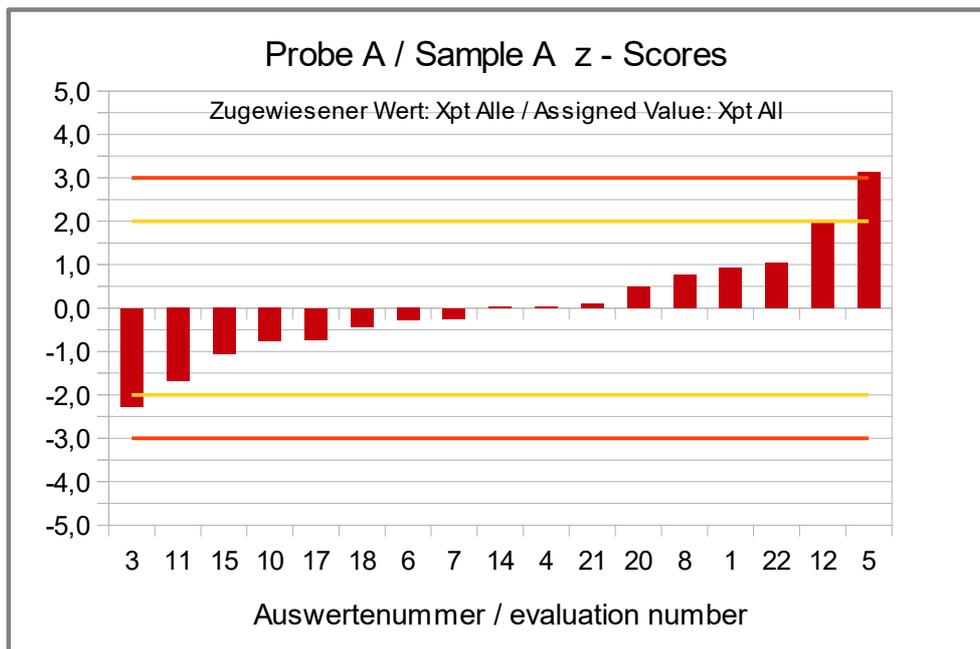


Abb./Fig. 13:
 z-Scores (ELISA-Ergebnisse Cashew)
 Zugewiesener Wert: robuster Mittelwert aller Ergebnisse

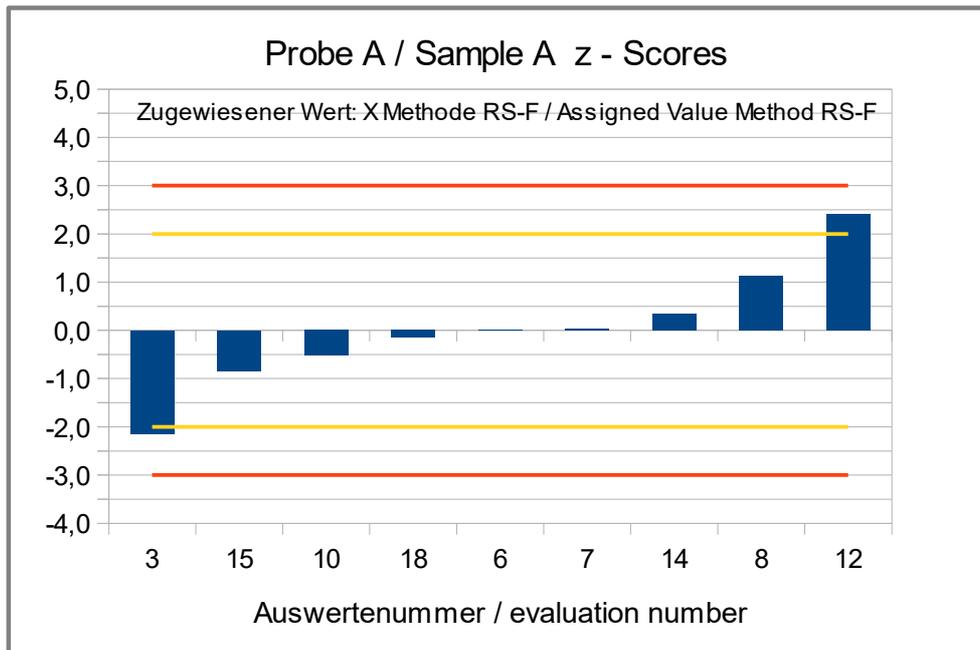


Abb./Fig. 14:

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

Quantitative Auswertung ELISA: Dotierungsniveauprobe

Auswertenummer	Cashew [mg/kg]	z-Score X _{pt} ^{ALL}	z-Score X _{pt} ^{RS-F}	Methode	Hinweis
20	24,8	2,1		3M	
1	26,0	2,4		AQ	
22	20,9	1,1		BC	
17	14,3	-0,5		BF	
21	10,2	-1,5		BF	
5	21,5	1,3		ET	Ergebnis umgerechnet °
3	7,70	-2,1	-1,95	RS-F	
6	15,2	-0,29	0,03	RS-F	
7	15,5	-0,20	0,13	RS-F	
8	19,0	0,65	1,05	RS-F	
10	15,5	-0,21	0,12	RS-F	
12	19,0	0,65	1,1	RS-F	
14	16,0	-0,09	0,26	RS-F	
15	12,0	-1,1	-0,81	RS-F	
18	13,2	-0,8	-0,50	RS-F	
4	13,0	-0,8		SP	
11	16,0	-0,1		SP	

° Umrechnung S. 19

Methoden:

- 3M = 3M Protein ELISA Kit
- AQ = AgraQuant, RomerLabs
- BC = BioCheck ELISA
- BF = MonoTrace ELISA, BioFront Technologies
- ET = Elution Technologies ELISA Kit
- RS-F= Ridascree® Fast, R-Biopharm
- SP = SensiSpec ELISA Kit, Eurofins

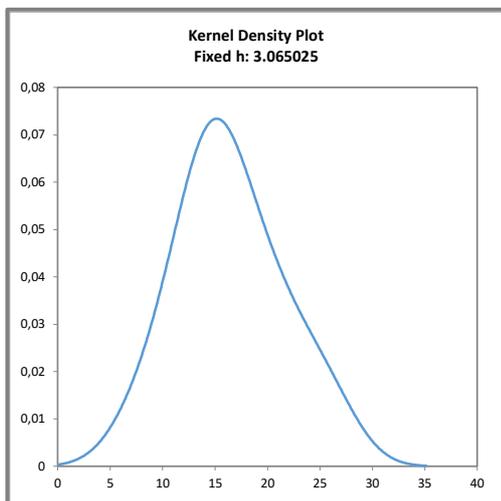


Abb. / Fig. 15:

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.

Kenndaten: Quantitative Auswertung ELISA Cashew

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	17	9
Anzahl der Ausreißer	0	0
Mittelwert	16,5	14,8
Median	15,5	15,5
Robuster Mittelwert (X_{pt})	16,3	15,0
Robuste Standardabweichung (S^*)	5,07	3,39
<i>Zielkenndaten:</i>		
Zielstandardabweichung σ_{pt}	4,09	3,76
Untere Grenze des Zielbereichs	8,17	7,52
Obere Grenze des Zielbereichs	24,5	23
<i>Quotient S^*/σ_{pt}</i>	<i>1,2</i>	<i>0,90</i>
<i>Standardunsicherheit $U(X_{pt})$</i>	<i>1,54</i>	<i>1,41</i>
<i>Ergebnisse im Zielbereich</i>	<i>14</i>	<i>9</i>
<i>Prozent im Zielbereich</i>	<i>82</i>	<i>100</i>

Methoden:

RS-F = R-Biopharm, Ridascreen® Fast

Anmerkungen zu den Kenndaten und Vergleich der Bezugswerte:

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

Die Verteilung der Ergebnisse aller Methoden sowie für Methode RS-F zeigte jeweils eine normale bis niedrige 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 133% bzw. 122% vom Zusatzniveau von Cashew zur Dotierungsniveauprobe innerhalb der relevanten Anforderungen für die eingesetzten Methoden (s. 3.4.3 und S.43 "Wiederfindungsraten für Cashew").

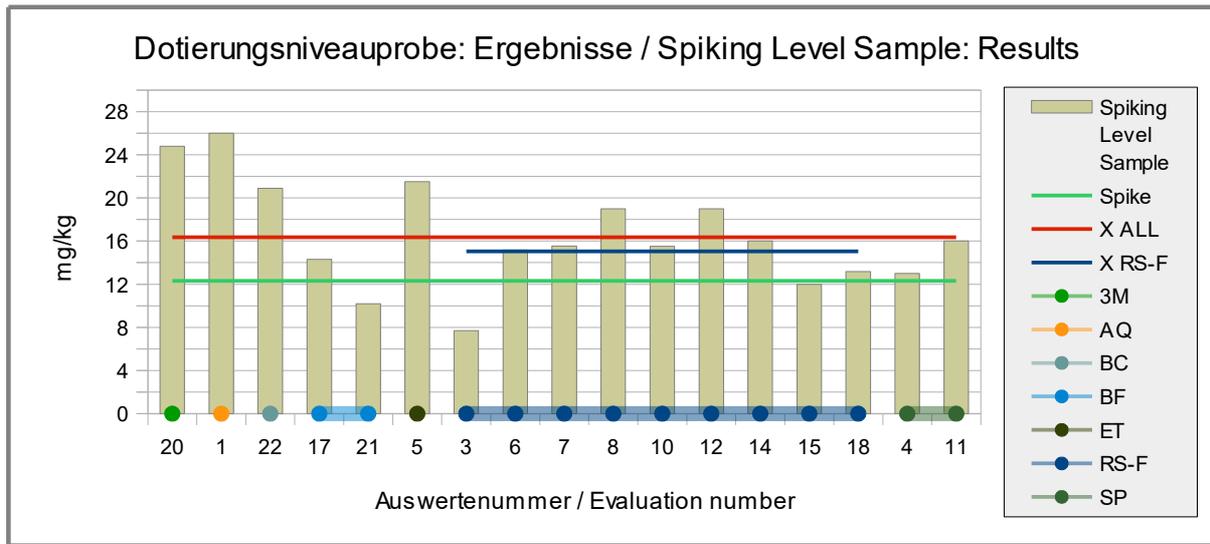


Abb./Fig. 16: ELISA-Ergebnisse Cashew
 grüne Linie = Zusatzniveau (Spike)
 rote Linie = robuster Mittelwert aller Ergebnisse
 blaue Linie = robuster Mittelwert Ergebnisse Methode RS-F
 runde Symbole = Zuordnung der Methoden (s. Legende)

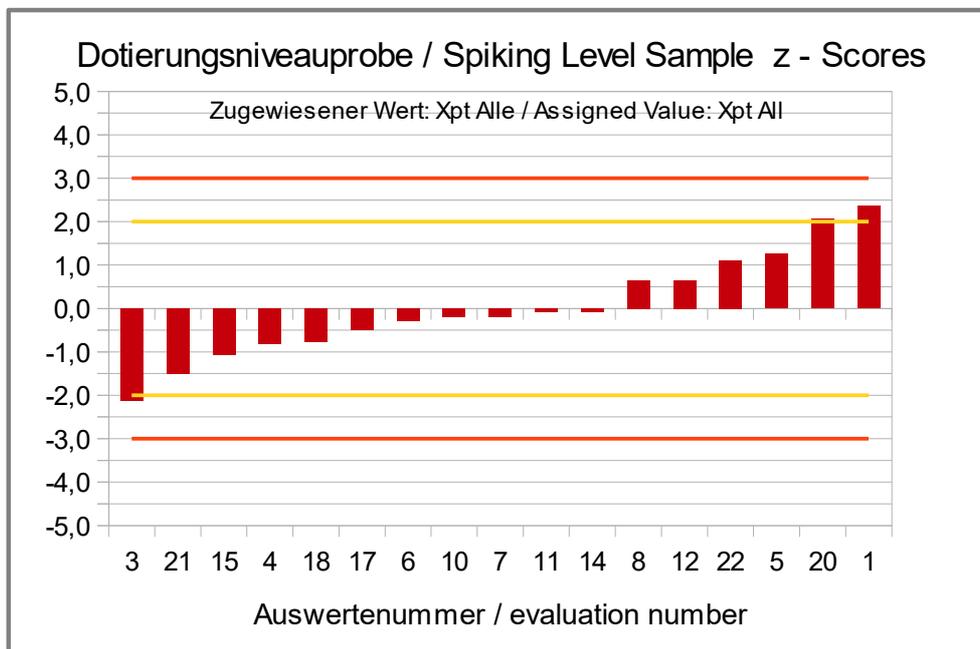


Abb./Fig. 17:
 z-Scores (ELISA-Ergebnisse Cashew)
 Zugewiesener Wert: robuster Mittelwert aller Ergebnisse

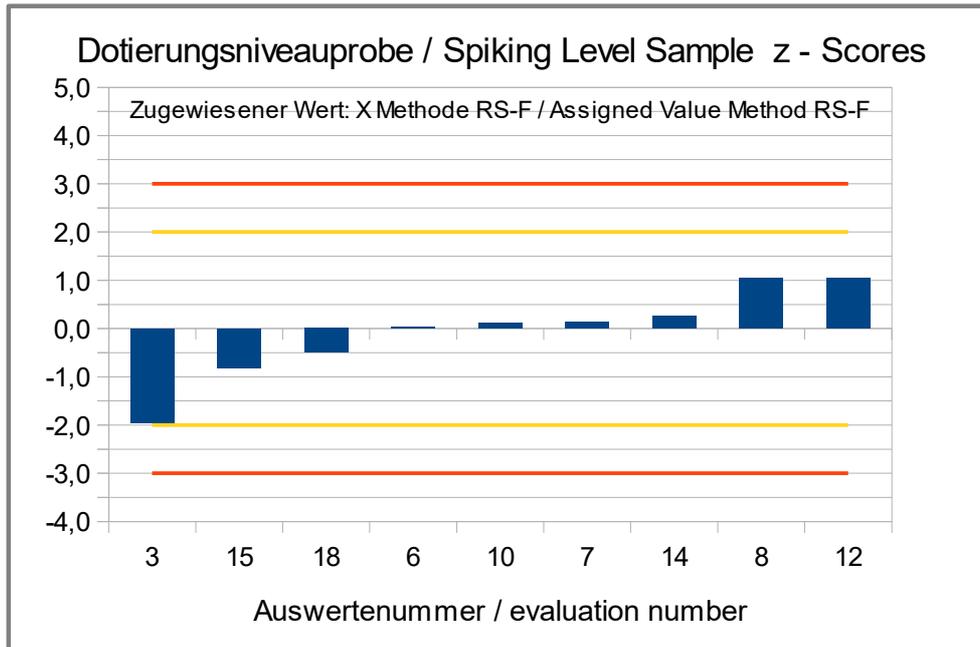


Abb./Fig. 18:

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

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

Auswertenummer	Dotierungsniveauprobe	Wiederfindungsrate*		Probe A	Wiederfindungsrate*		Methode	Hinweis
	[mg/kg]	[%]	[Z _{RR}]	[mg/kg]	[%]	[Z _{RR}]		
20	24,8	201	4,1	12,3	121	0,85	3M	
1	26,0	211	4,5	13,4	133	1,3	AQ	
22	20,9	170	2,8	13,7	136	1,4	BC	
17	14,3	116	0,65	8,90	88	-0,48	BF	
21	10,2	83	-0,69	11,2	111	0,43	BF	
5	21,5	175	3,0	19,4	192	3,7	ET	Ergebnis umgerechnet °
3	7,70	63	-1,5	4,70	47	-2,1	RS-F	
6	15,2	123	0,93	10,1	100	0,01	RS-F	
7	15,5	126	1,1	10,2	101	0,05	RS-F	
8	19,0	154	2,2	13,0	129	1,1	RS-F	
10	15,5	126	1,0	8,80	87	-0,51	RS-F	
12	19,0	154	2,2	16,2	161	2,4	RS-F	
14	16,0	130	1,2	11,0	109	0,36	RS-F	
15	12,0	98	-0,10	8,00	79	-0,83	RS-F	
18	13,2	107	0,28	9,73	96	-0,15	RS-F	
4	13,0	106	0,23	11,0	109	0,36	SP	
11	16,0	130	1,2	6,30	62	-1,5	SP	

° Umrechnung S. 19

AB**	50-150 %	AB**	50-150 %
Anzahl im AB	11	Anzahl im AB	14
Prozent im AB	65	Prozent im AB	82

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

** Akzeptanzbereich der AOAC für Allergen-ELISAs

Methoden:

- 3M = 3M Protein ELISA Kit
- AQ = AgraQuant, RomerLabs
- BC = BioCheck ELISA
- BF = MonoTrace ELISA, BioFront Technologies
- ET = Elution Technologies ELISA Kit
- RS-F= Ridascreen® Fast, R-Biopharm
- SP = SensiSpec ELISA Kit, Eurofins

Anmerkung:

65% (11) der Teilnehmer haben mit der Dotierungsniveauprobe mittels ELISA eine Wiederfindungsrate im Bereich der AOAC-Anforderung von 50-150% erhalten. Für die dotierte Lebensmittelmatrix-Probe A lagen 82% (14) der Wiederfindungsraten in diesem Akzeptanzbereich. Die zugehörigen z-Scores basieren auf der Zielstandardabweichung von 25%.

4.2.2 PCR-Ergebnisse: Cashew

Qualitative Auswertung der Ergebnisse: Proben A und B

Auswertenummer	Probe A	Probe A	Probe B	Probe B	Qualitative Bewertung	Methode	Hinweis
	pos/neg	[mg/kg]	pos/neg	[mg/kg]	Übereinstimmungen mit Konsenswerten		
9	positiv		negativ		2/2 (100%)	SFA	
22	positiv	25,3	negativ	<1	2/2 (100%)	SFA	
16	positiv		negativ		2/2 (100%)	SFA-Q	
3	negativ		negativ		1/2 (50%)	div	
7	positiv		negativ		2/2 (100%)	div	
13a	positiv	2,60	negativ		2/2 (100%)	div	
13b	positiv	2,70	negativ		2/2 (100%)	div	
13c	positiv	2,40	negativ		2/2 (100%)	div	
19	positiv		negativ		2/2 (100%)	div	

	Probe A	Probe B
Anzahl positiv	8	0
Anzahl negativ	1	9
Prozent positiv	89	0
Prozent negativ	11	100
Konsenswert	positiv	negativ

Methoden:

SFA = Sure Food ALLERGEN, R-Biopharm / Congen
 SFA-Q = Sure Food Allergen Quant, R-Biopharm / Congen
 div = keine genaue Angabe / andere Methode

Anmerkung:

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

Quantitative Auswertung PCR: Probe A

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

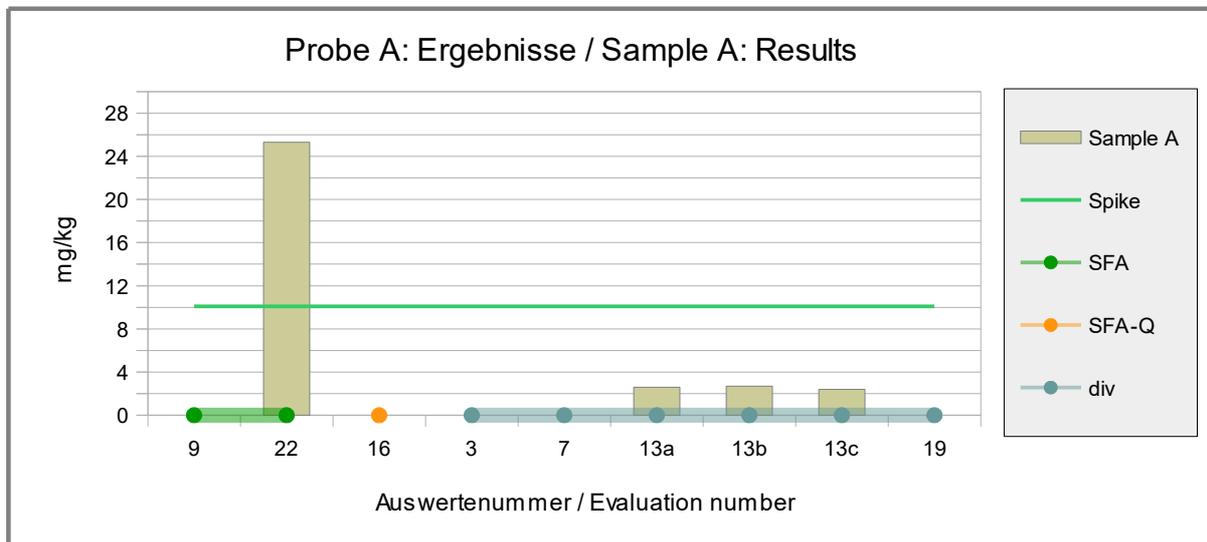


Abb./Fig. 19: PCR-Ergebnisse Cashew
grüne Linie = Zusatzniveau (Spike)
runde Symbole = Zuordnung der Methoden (s. Legende)

Quantitative Auswertung PCR: Dotierungsniveauprobe

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

Auswertenummer	Cashew pos/neg	Cashew [mg/kg]	z-Score X _{pt} ALL	Methode	Hinweis
22	positiv	23,8		SFA	
13a	positiv	2,90		div	
13b	positiv	3,20		div	
13c	positiv	3,10		div	

Anzahl positiv	4
Anzahl negativ	0
Prozent positiv	100
Prozent negativ	0
Konsenswert	positiv

Methoden:

SFA = Sure Food ALLERGEN, R-Biopharm / Congen

div = keine genaue Angabe / andere Methode

Anmerkung:

Für die Dotierungsniveauprobe wurden 100% positive Ergebnisse erhalten.

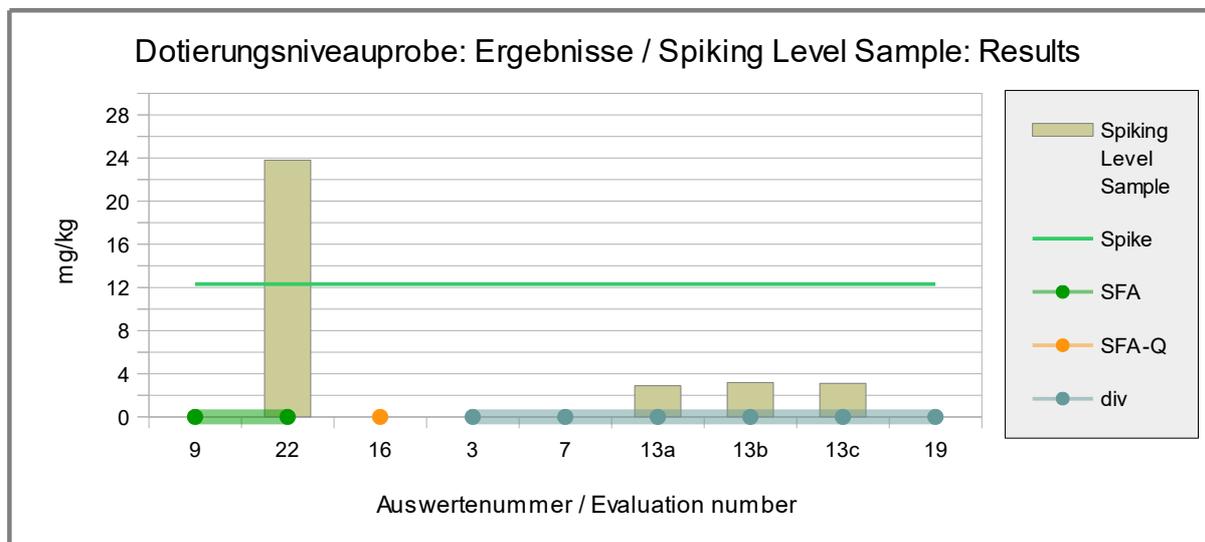


Abb./Fig. 20:

PCR-Ergebnisse Cashew

grüne Linie = Zusatzniveau (Spike)

runde Symbole = Zuordnung der Methoden (s. Legende)

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

Auswertenummer	Dotierungsniveauprobe	Wiederfindungsrate*		Probe A	Wiederfindungsrate*		Methode	Hinweis
	[mg/kg]	[%]	[Z _{RR}]	[mg/kg]	[%]	[Z _{RR}]		
22	23,8	193	3,7	25,3	250	6,0	SFA	
13a	2,90	24	-3,1	2,60	26	-3,0	div	
13b	3,20	26	-3,0	2,70	27	-2,9	div	
13c	3,10	25	-3,0	2,40	24	-3,0	div	

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

Methoden:

SFA = Sure Food ALLERGEN, R-Biopharm / Congen
div = keine genaue Angabe / andere Methode

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

** Akzeptanzbereich der AOAC für Allergen-ELISAs

Anmerkung:

Es wurden vier quantitative PCR-Ergebnisse für Cashew angegeben. Die Wiederfindungsraten lagen sowohl für die Dotierungsniveauprobe als auch für die dotierte Lebensmittelmatrix-Probe A entweder deutlich unter (3 Ergebnisse) oder deutlich über (1 Ergebnis) der AOAC-Anforderung von 50-150%.

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

4.3 z-Scores der Teilnehmer: Übersichtstabelle

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

Auswertenummer	ELISA Mandel: Xpt (div. Methoden)		ELISA Mandel: Xpt (Methode: RS-F)		ELISA Cashew: Xpt (div. Methoden)		ELISA Cashew: Xpt (Methode: RS-F)	
	Probe A*	Dot. Probe	Probe A	Dot. Probe	Probe A	Dot. Probe	Probe A	Dot. Probe
1		0,95	-0,26	0,45	0,92	2,40		
2		8,3						
3		0,95	0,09	0,45	-2,3	-2,1	-2,1	-2,0
4	1,1	-0,70			0,04	-0,82		
5	-0,12	-0,19			3,1	1,3		
6		0,14	-0,19	-0,27	-0,29	-0,29	0,00	0,03
7	-0,13	-1,0			-0,25	-0,20	0,04	0,13
8	0,66	-1,2			0,77	0,65	1,1	1,1
9								
10		0,38	-0,10	-0,06	-0,77	-0,21	-0,52	0,12
11	-0,06	-1,2			-1,7	-0,09		
12					2,0	0,65	2,4	1,1
13	-0,5	-0,94						
14		0,01	0,13	-0,39	0,04	-0,09	0,35	0,26
15		-0,70	-1,0	-1,0	-1,1	-1,1	-0,84	-0,81
16		1,1	0,09	0,58				
17	-0,53	0,12			-0,73	-0,50		
18			0,36		-0,43	-0,78	-0,15	-0,50
19								
20	-0,19	-0,44			0,50	2,1		
21		-0,19	-0,12	-0,57	0,10	-1,5		
22		1,4	1,4	0,83	1,0	1,1		

Methoden: RS-F = Ridascreen® Fast, R-Biopharm
 * Methoden von „Peak10“ (vgl. Abschnitt 4.1.1, Seite 21ff).

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 Mandel: Xpt (Zusatzniveau)		ELISA Cashew: Xpt (Zusatzniveau)		PCR Mandel: Xpt (Zusatzniveau)		PCR Cashew: Xpt (Zusatzniveau)	
	Probe A	Dot. Probe	Probe A	Dot. Probe	Probe A	Dot. Probe	Probe A	Dot. Probe
1	-0,61	0,54	1,3	4,5				
2	3,3	7,3						
3	-0,29	0,54	-2,1	-1,5				
4	-1,5	-1,0	0,36	0,23				
5	-2,1	-0,50	3,7	3,0				
6	-0,54	-0,19	0,01	0,93				
7	-2,1	-1,2	0,05	1,1				
8	-1,7	-1,4	1,1	2,2				
9								
10	-0,46	0,02	-0,51	1,0				
11	-2,1	-1,4	-1,5	1,2				
12			2,4	2,2				
13/13a	-2,3	-1,2					-3,0	-3,1
13b					-3,9	-3,9	-2,9	-3,0
13c					-3,6	-3,5	-3,0	-3,0
14	-0,25	-0,32	0,36	1,2				
15	-1,3	-1,0	-0,83	-0,10				
16	-0,29	0,67						
17	-2,3	-0,21	-0,48	0,65				
18			-0,15	0,28				
19			0,00	0,00				
20	-2,1	-0,73	0,85	4,1				
21	-0,49	-0,50	0,43	-0,69				
22	0,86	0,93	1,4	2,8			6,0	3,7

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: Mandel

Meth. Abk.	Auswertenummer	Datum der Analyse	Ergebnis Probe A		Ergebnis Probe B		Ergebnis Dotierungsprobe		NWG / LOD *	BG / LOQ *	MU*	Quantitatives Ergebnis als	Methode
			qualitativ	mg/kg	qualitativ	mg/kg	qualitativ	mg/kg	mg/kg	mg/kg			
		Tag/Monat											Test-Kit + Anbieter
AQ	7	05.01.21	positiv	9,145	negativ		positiv	12,73	0,4			Mandel	AgraQuant ELISA Almond COKAL0748, RomerLabs
IL	2	11.12.20	positiv	7,4	negativ	0,2	positiv	11	0,2	0,4	6,24	Mandelprotein	Immunolab Almond ELISA
NL	8	08.12.20	positiv	11	negativ	<1	positiv	12	1	5	34	Mandel	nutriLinia® Almond-E ELISA
NL	13	26.01.21	positiv	8,3	negativ	<0,2	positiv	13	0,2	0,5	30	Mandel	nutriLinia® Almond-E ELISA
RS-F	1	10.12.	positiv	16,3	negativ	<0,1	positiv	21	0,1	2,5		Mandel	Ridascreen® FAST Almond R6901, R-Biopharm
RS-F	3	08.12.20	-	17,8	-	<2,5	-	21	0,1	2,5		Mandel	Ridascreen® FAST Almond R6901, R-Biopharm
RS-F	6	13.01.21	positiv	16,6	negativ	<2,5	positiv	17,59		2,5	40	Mandel	Ridascreen® FAST Almond R6901, R-Biopharm
RS-F	10	08.01.21	positiv	17	negativ	<2,5	positiv	18,6		2,5	37	Mandel	Ridascreen® FAST Almond R6901, R-Biopharm
RS-F	14	19.01.21	positiv	18	negativ	<2,5	positiv	17	0,3	1		Mandel	Ridascreen® FAST Almond R6901, R-Biopharm
RS-F	15	01.02.21	positiv	13	negativ	<2,50	positiv	14	0,3	1		Mandel	Ridascreen® FAST Almond R6901, R-Biopharm
RS-F	16	10.02.21	positiv	17,8	negativ		positiv	21,6	2,5	2,5	31,3	Mandel	Ridascreen® FAST Almond R6901, R-Biopharm
RS-F	18		positiv	19,005	negativ	<2,5	positiv	>20,00	0,1	2,5		Mandel	Ridascreen® FAST Almond R6901, R-Biopharm
RS-F	19		positiv		negativ		positiv		1,2	2,5		Mandel	Ridascreen® FAST Almond R6901, R-Biopharm
RS-F	21	11.01.21	-	16,88	-	<2,50	-	16,18	0,1	2,5		Mandel	Ridascreen® FAST Almond R6901, R-Biopharm
RS-F	22	11.02.20	positiv	23,32	negativ	<2,5	positiv	22,79	2,5	2,5	25,99	Mandel	Ridascreen® FAST Almond R6901, R-Biopharm
SP	4	18.12.20	positiv	12	negativ	0	positiv	14	0,2	0,4		Mandel	Eurofins SensiSpec Almond ELISA Kit
SP	11	28.12.20	positiv	9,3	negativ	<0,4	positiv	12	0,4	0,4		Mandel	Eurofins SensiSpec Almond ELISA Kit
VT	5	08.01.21	positiv	9,16	negativ	<2,5	positiv	16,19		2,5		Mandel	Veratox Almond, Neogen
VT	17	02.10.21	detektiert	8,2	nicht detektiert	<2,5	detektiert	17,5		2,5		Lebensmittel	Veratox, Neogen
VT	20	09.02.21	positiv	9,0	negativ		positiv	15,1		2,5		Mandel	Veratox Almond, Neogen

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

Fortsetzung ELISA Mandel:

Meth. Abk.	Auswertenummer	Spezifität	Hinweise zur Methode (Extraktion und Bestimmung)	Methode akkreditiert ISO/IEC 17025	Sonstige Hinweise
		Antikörper	z.B. Extraktionslösung / Zeit / Temperatur	ja/nein	
AQ	7			ja	
IL	2	Mandelprotein	Extraktion: 1 g homogenisierte Mischung suspendiert in 20 mL vorverdünntem Extraktions- und Probenverdünnungspuffer/ 15 Minuten Probeninkubation bei 60°C/10 Minuten Zentrifugation mit 2000 x g Bestimmung: 100 µL partikelfreie Lösung, gebrauchsfertige Standards pro Vertiefung aufgetragen/ 20 Minuten Inkubation bei Raumtemperatur/ x3 Plattenwaschung mit 300 µL vorverdünnter Waschlösung/ 100 µL Konjugat in jede Vertiefung zugeben/ 20 Minuten Inkubation bei Raumtemperatur/ x3 Plattenwaschung mit 300 µL vorverdünnter Waschlösung/ 100 µL Substratlösung in jede Vertiefung zugeben/ 20 Minuten Inkubation im Dunkeln, bei Raumtemperatur/ 100 µL Enzymstopplösung in jede Vertiefung zugeben/ Extinktion bei 450 nm messen (Referenz 620 nm)	nein	
NL	8		wie im Kit beschrieben	ja	
NL	13		laut Manual	ja	
RS-F	1	Mandelproteine	Allergenextraktionspuffer (Kit), 10 min, 60°C	ja	
RS-F	3			ja	
RS-F	6				
RS-F	10			ja	
RS-F	14		s. Anleitung	ja	
RS-F	15		s. Anleitung	ja	
RS-F	16	s. Testkit	s. Testkit	ja	
RS-F	18				
RS-F	19			ja	
RS-F	21			nein	
RS-F	22	lt. Kit-Herstellerangaben	lt. Kit-Herstellerangaben	ja	
SP	4				
SP	11	erkennt Mandelproteine	lt. Herstellerangaben	ja	
VT	5		lt. Kit-Herstellerangaben	ja	
VT	17			ja	
VT	20		PBS / 15 mins/ 60 Grad	ja	

5.1.2 ELISA: Cashew

Meth. Abk.	Auswertenummer	Datum der Analyse	Ergebnis Probe A		Ergebnis Probe B		Ergebnis Dotierungsprobe		NWG / LOD *	BG / LOQ *	MU*	Quantitatives Ergebnis als	Methode
			qualitativ	mg/kg	qualitativ	mg/kg	qualitativ	mg/kg					
		Tag/Monat									%		Test-Kit + Anbieter
3M	20	04.02.21	positiv	12,25	negativ		positiv	24,77		0,9		Gesamt-Lebensmittel	3M (Method no. E96CHW)
AQ	1	10.12.	positiv	13,4	negativ	<0,2	positiv	26	0,2	2		Cashew	RomerLabs , AgraQuant 10002094
BC	22	11.12.20	positiv	13,74	negativ	<2	positiv	20,89	2	2	30,43	Cashew	BioCheck ELISA Cashew-Check
BF	17	26/01	detektiert	8,9	nicht detektiert	<2.0	detektiert	14,3		2		Lebensmittel	Monotrace, BioFront
BF	21	17/12	-	11,18	-	<2.00	-	10,19	0,12	2		Cashew	MonoTrace Cashew ELISA kit, BioFront Technologies
ET	5	06.01.21	positiv	3,59	negativ	<0,90	positiv	3,98		0,9		Cashewprotein	Elution Technologies ELISA Kit Cashew Protein E-75CSH
RS-F	3	17.12.20	-	4,7	-	<2.5	-	7,7	0,2	2,5		Cashew	andere: bitte eingeben!
RS-F	6	12.01.21	positiv	10,12	negativ	<2,5	positiv	15,16		2,5	40	Cashew	Ridascreen® FAST Cashew R7862, R-Biopharm
RS-F	7	22.01.21	positiv	10,215	negativ		positiv	15,536	5			Cashew	Ridascreen® FAST Cashew R7862, R-Biopharm
RS-F	8	14.12.20	positiv	13	negativ	<1	positiv	19	1	5	22	Cashew	Ridascreen® FAST Cashew R6872, R-Biopharm
RS-F	10	12.01.21	positiv	8,8	negative	<2,5	positiv	15,5		2,5		Cashew	Ridascreen® FAST Cashew R7862, R-Biopharm
RS-F	12		positiv	16,22	negative	-	positiv	19	0,2	2,5		Cashew	Ridascreen® FAST Cashew R7862, R-Biopharm
RS-F	14	19.01.21	positiv	11	negativ	<2.5	positiv	16	0,13	2,5		Cashew	Ridascreen® FAST Cashew R7862, R-Biopharm
RS-F	15	01.02.21	positiv	8	negativ	<2.50	positiv	12	0,1	2,5		Cashew	Ridascreen® FAST Cashew R7862, R-Biopharm
RS-F	18		positiv	9,73	negativ	<2,5	positiv	13,17	0,13	2,5		Cashew	Ridascreen® FAST Cashew R7862, R-Biopharm
RS-F	19		positiv		negativ		positiv		1,2	2,5			Ridascreen® FAST Cashew R7862, R-Biopharm
SP	4	18.12.20	positiv	11	negativ	0	positiv	13	0,2	2		Cashew	Eurofins SensiSpec Cashew ELISA Kit
SP	11	13.01.21	positiv	6,3	negativ	<2	positiv	16	1,5	2		Cashew	Eurofins SensiSpec Cashew ELISA Kit

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

Fortsetzung ELISA Cashew:

Meth. Abk.	Auswertenummer	Spezifität	Hinweise zur Methode (Extraktion und Bestimmung)	Methode akkreditiert ISO/IEC 17025	Sonstige Hinweise
		Antikörper	z.B. Extraktionslösung / Zeit / Temperatur	ja/nein	
3M	20		3M Extraktionspuffer/25 mins/ 60 Grad	ja	19.1% Proteingehalt
AQ	1	Cashew proteine	Allergenextraktionspuffer (Kit), 15 min, 60°C	ja	
BC	22	lt. Kit-Herstellerangaben	lt. Kit-Herstellerangaben	ja	
BF	17			ja	
BF	21			nein	
ET	5		lt. Kit-Herstellerangaben	ja	
RS-F	3		Ridascreen FAST Cashew R 6872 (Falsche Nummer in Pulldown-Liste?)	ja	Ridascreen FAST Cashew R 6872
RS-F	6				
RS-F	7			ja	
RS-F	8		wie im Kit beschrieben, ohne Milcheiweiß	ja	
RS-F	10			ja	korrekte Methode: Ridascreen FAST Cashew R6872, Rbiopharm
RS-F	12			ja	verwendete Losnummer: 23300
RS-F	14		s. Anleitung	ja	
RS-F	15		s. Anleitung	ja	
RS-F	18				
RS-F	19			ja	
SP	4				
SP	11	erkennt Cashew proteine	lt. Herstellerangaben	ja	

5.1.3 PCR: Mandel

Meth. Abk.	Auswertenummer	Datum der Analyse	Ergebnis Probe A		Ergebnis Probe B		Ergebnis Dotierungsprobe		NWG / LOD *	BG / LOQ *	MU*	Quantitatives Ergebnis als	Methode
			qualitativ	mg/kg	qualitativ	mg/kg	qualitativ	mg/kg	mg/kg	mg/kg	%		
		Tag/Monat											Test-Kit + Anbieter
SFA	7	14.12.20	positiv		negativ		positiv					Mandel-DNA	Sure Food ALLERGEN, R-Biopharm / Congen
SFA	9		positiv		negativ		positiv		0,4			Mandel	Sure Food ALLERGEN, R-Biopharm / Congen
SFA	16	18.01.21	positiv		negativ		positiv		0,4				Sure Food Allergen Quant, R-Biopharm / Congen
div	3	16.12.20	-	neg.	-	neg.	-	pos.				Mandel-DNA	andere: bitte eingeben!
div	13a	27.01.21	positiv	<5 (2)	negativ		positiv	<5 (1,4)	5		40	Mandel	Real Time PCR
div	13b	27.01.21	positiv	0,36	negativ		positiv	0,47	0,05		40	Mandel	Real Time PCR
div	13c	27.01.21	positiv	2	negativ		positiv	2,2	0,05		40	Mandel	Real Time PCR
div	19		negativ		negativ		positiv		0,008	0,08			Methode interne

* 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 ISO/IEC 17025	Sonstige Hinweise
		Target-Sequenz / -DNA	z.B. Extraktion / Enzyme / Clean-Up / Real Time PCR / Gelelektrophorese / Cyclen	ja/nein	
SFA	7		Macherey & Nagel NucleoSpin Food Kit, 2 g Einw aage	ja	
SFA	9			nein	
SFA	16	s. Testkit	SureFood® PREP Advanced, Congen / R-Biopharm	ja	
div	3	PRU AV1	Eigene Methode. 3-plex RT-qPCR	ja	Screeningmethode
div	13a	nsLTP	Standard 1 (Quantard 40)	ja	semiquantitativ (Einpunktkalibrierung)
div	13b	Chloroplast	Standard 1 (Quantard 40)	ja	semiquantitativ (Einpunktkalibrierung)
div	13c	Chloroplast	Standard 2 (Reiskeks)	ja	semiquantitativ (Einpunktkalibrierung)
div	19			ja	

5.1.4 PCR: Cashew

Meth. Abk.	Auswertenummer	Datum der Analyse	Ergebnis Probe A		Ergebnis Probe B		Ergebnis Dotierungsprobe		NWG / LOD *	BG / LOQ *	MU*	Quantitatives Ergebnis als	Methode
			qualitativ	mg/kg	qualitativ	mg/kg	qualitativ	mg/kg	mg/kg	mg/kg	%		
		Tag/Monat											Test-Kit + Anbieter
SFA	9		positiv		negativ		positiv		0,4			Cashew	Sure Food ALLERGEN, R-Biopharm / Congen
SFA	22	04.01.21	positiv	25,3	negativ	<1	positiv	23,8	1	1	40	Cashew	Sure Food ALLERGEN, R-Biopharm / Congen
SFA-Q	16	05.01.21	positiv		negativ		positiv		0,4				Sure Food Allergen Quant, R-Biopharm / Congen
div	3	16.12.20	-	neg.	-	neg.	-	pos.				Cashew-DNA	andere: bitte eingeben!
div	7	14.12.20	positiv		negativ		positiv					Cashew-DNA	Köppel et al, „Two quantitative hexaplex real-time PCR systems for the detection and quantification of DNA from twelve allergens in food“, Eur Food Res Technol, 2012
div	13a	27.01.21	positiv	2,6	negativ		positiv	2,9	2,5		40	Cashew	Real Time PCR
div	13b	27.01.21	positiv	2,7	negativ		positiv	3,2	0,05		40	Cashew	Real Time PCR
div	13c	27.01.21	positiv	2,4	negativ		positiv	3,1	0,05		40	Cashew	Real Time PCR
div	19		positiv		negativ		positiv		0,008	0,08			Methode interne

* 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 ISO/IEC 17025	Sonstige Hinweise
		Target-Sequenz / -DNA	z.B. Extraktion / Enzyme / Clean-Up / Real Time PCR / Gelelektrophorese / Cyclen	ja/nein	
SFA	9			nein	
SFA	22	lt. Kit-Herstellerangaben	lt. Kit-Herstellerangaben	nein	
SFA-Q	16	s. Testkit	SureFood® PREP Advanced, Congen / R-Biopharm	ja	
div	3	Ana o3	Eigene Methode. 3-plex RT-qPCR	ja	Screeningmethode
div	7		Macherey & Nagel NucleoSpin Food Kit, 2 g Einw aage	ja	
div	13a	Ana o3 (von der 2S Albumin-Fraktion)	Standard 1 (Quantard 40)	ja	semiquantitativ (Einpunktkalibrierung)
div	13b	ITS2	Standard 1 (Quantard 40)	ja	semiquantitativ (Einpunktkalibrierung)
div	13c	ITS2	Standard 2 (Reiskeks)	ja	semiquantitativ (Einpunktkalibrierung)
div	19			ja	

5.2 Homogenität

5.2.1 Mischungshomogenität vor der Abfüllung

Microtracer Homogenitätstest

DLA-ptAL08 Probe A

Gewicht Gesamtprobe	2,80	kg
Microtracer	FSS-rot lake	
Teilchengröße	75 – 300	µm
Gewicht pro Partikel	2,0	µg
Tracerzugabe	17,9	mg/kg

Analysenergebnisse:

Probe	Einwaage [g]	Partikel Anzahl	Partikel [mg/kg]
1	5,01	33	13,2
2	5,00	35	14,0
3	5,01	38	15,2
4	5,03	49	19,5
5	5,03	41	16,3
6	5,01	45	18,0
7	5,01	37	14,8
8	4,98	38	15,3

Poisson-Verteilung

Probenanzahl	8	
Freiheitsgrad	7	
Mittelwert	39,5	Partikel
Standardabweichung	5,22	Partikel
χ^2 (CHI-Quadrat)	4,83	
Wahrscheinlichkeit	68	%
Wiederfindungsrate	88	%

Normalverteilung

Probenanzahl	8	
Mittelwert	15,8	mg/kg
Standardabweichung	2,08	mg/kg
rel. Standardabweichung	13,2	%
Horwitz Standardabweichung	10,6	%
HorRat-Wert	1,3	
Wiederfindungsrate	88	%

Microtracer Homogenitätstest

DLA-ptAL08 Dotierungsniveauprobe

Gewicht Gesamtprobe	1,50	kg
Microtracer	FSS-rot lake	
Teilchengröße	75 – 300	µm
Gewicht pro Partikel	2,0	µg
Tracerzugabe	13,3	mg/kg

Analysenergebnisse:

Probe	Einwaage [g]	Partikel Anzahl	Partikel [mg/kg]
1	5,00	35	14,0
2	4,97	34	13,7
3	5,02	37	14,7
4	4,99	37	14,8
5	5,00	38	15,2
6	4,98	34	13,7
7	5,01	35	14,0
8	5,03	34	13,5

Poisson-Verteilung

Probenanzahl	8	
Freiheitsgrad	7	
Mittelwert	35,5	Partikel
Standardabweichung	1,58	Partikel
χ^2 (CHI-Quadrat)	0,49	
Wahrscheinlichkeit	100	%
Wiederfindungsrate	107	%

Normalverteilung

Probenanzahl	8	
Mittelwert	14,2	mg/kg
Standardabweichung	0,63	mg/kg
rel. Standardabweichung	4,5	%
Horwitz Standardabweichung	10,7	%
HorRat-Wert	0,42	
Wiederfindungsrate	107	%

5.3 Informationen zur Eignungsprüfung (EP)

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

EP-Nummer	ptAL08 - 2020
EP-Name	Allergene VIII: Mandel und Cashew in Bratlingmischung
Probenmatrix (Prozessierung)	Proben A + B: Bratlingmischung (Pulver) / Zutaten: Hafervollkornflocken, Dinkelvollkorn Grieß, Dinkelvollkornflocken, Cornflakes (Maismehl, Rohrohrzucker, Meersalz), Zwiebeln, Lauch, Karotten, Sonnenblumenöl, Meersalz, Tomatenpulver, Zucchini, Knoblauch, Gewürze (Pfeffer, Macis, Kurkuma), Kräuter (Liebstöckelblätter, Oregano) weitere Zusatzstoffe und Allergene Lebensmittel (eine der beiden Proben) Dotierungsniveauprobe: Kartoffelpulver, weitere Zusatzstoffe und Allergene Lebensmittel
Probenzahl und Probenmenge	2 unterschiedliche Proben A + B: je 25 g + 1 Dotierungsniveauprobe: 15 g
Lagerungsinformation	Proben A, B + Dotierungsniveauprobe: Raumtemperatur (EP-Zeitraum), gekühlt 2 - 10 °C (Langzeit)
Verwendungszweck	Ausschließlich für Laboruntersuchungen (Qualitätskontrollproben)
Parameter	qualitativ + quantitativ: Mandel (Mandelprotein, DNA), Cashew (Cashewprotein, DNA) Proben A + B: < 500 mg/kg Dotierungsniveauprobe: < 500 mg/kg
Untersuchungsmethoden	Methode ist freigestellt
Hinweis zur Analyse	Die Untersuchung der Eignungsprüfung soll entsprechend einer laborüblichen Routineanalyse vorgenommen werden. Generell empfehlen wir vor der Analyse, insbesondere bei kleinen Analyseeinwaagen, eine repräsentative Probenmenge entsprechend guter Laborpraxis zu homogenisieren. Vorzugsweise wird jeweils die gesamte Probenmenge homogenisiert.
Ergebnisangabe	Es werden für jede Probe A, B und Dotierungsniveauprobe je ein Ergebnis ermittelt. Die Einzelergebnisse sind in die Ergebnisabgabe-Datei einzutragen.
Einheiten	mg/kg
Anzahl von Stellen	mindestens 2 signifikante Stellen
Ergebnisabgabe	Die Ergebnisabgabe-Datei wird per eMail übermittelt an: pt@dla-lvu.de
Letzter Abgabetermin	spätestens 12. Februar 2021
Auswertebereich	Der Auswertebereich wird voraussichtlich 6 Wochen nach Abgabetermin der Ergebnisse fertiggestellt und per eMail als PDF-Datei zugesandt.
Koordinator und Ansprechpartner der EP	Dr. Matthias Besler-Scharf

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

6. Verzeichnis der Teilnehmer in alphabetischer Reihenfolge

Teilnehmer / Participant	Ort / Town	Land / Country
		SPANIEN/SPAIN
		SPANIEN/SPAIN
		KANADA/CANADA
		KANADA/CANADA
		Deutschland/Germany
		Deutschland/Germany
		FRANKREICH/FRANCE
		POLEN/POLAND
		Deutschland/Germany
		Deutschland/Germany
		SCHWEIZ/SWITZERLAND
		SCHWEIZ/SWITZERLAND
		SCHWEIZ/SWITZERLAND
		Deutschland/Germany
		Deutschland/Germany
		KANADA/CANADA
		GROSSBRITANNIEN/GREAT BRITAIN
		Deutschland/Germany
		FRANKREICH/FRANCE
		USA
		VIETNAM
		Deutschland/Germany

[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 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 00.00-169 Untersuchung von Lebensmitteln - Nachweis und Bestimmung von Erdnuss in Lebensmitteln mittels real-time PCR (2019) [Foodstuffs, detection and determination of peanut in foods by real-time PCR]
 33. ASU §64 LFGB L 18.00-20 Untersuchung von Lebensmitteln - Nachweis und Bestimmung von Mandel (Prunus dulcis) in Reis- und Weizenkeksen sowie in Soßenpulver mittels real-time PCR (2014) [Foodstuffs, detection and determination of almond (Prunus dulcis) in rice and wheat cookies and sauce powders by PCR]
 34. ASU §64 LFGB L 18.00-21 Untersuchung von Lebensmitteln - Nachweis und Bestimmung von Paranuss (Bertholletia exceisa) in Reis- und Weizenkeksen sowie in Soßenpulver mittels real-time PCR (2014) [Foodstuffs, detection and determination of brazil nut (Bertholletia exceisa) in rice and wheat cookies and sauce powders by PCR]
 35. ASU §64 LFGB L 18.00-22 Untersuchung von Lebensmitteln - Simultaner Nachweis und Bestimmung von Lupine, Mandel, Paranuss und Sesam in Reis- und Weizenkeksen sowie Soßenpulver mittels real-time PCR (2014) [Foodstuffs, simultaneous detection and determination of lupin, almond, brazil nut and sesame in rice and wheat cookies and sauce powders by PCR]

DLA ptAL08/2020 - Allergene VIII

Alle 22 Teilnehmer haben mindestens ein Ergebnis eingereicht. Die Auswertung erfolgte hinsichtlich der Parameter Mandel und Cashew für ELISA- (qualitativ und quantitativ) und PCR-Methoden (qualitativ). Zusätzlich wurden für jeden Teilnehmer Wiederfindungsraten für die Dotierungsmaterialprobe und die dotierte Probe ermittelt. Details zu den einzelnen Parametern inklusive separater Auswertung nach Testkit-Herstellern sind dem Auswertebereicht zu entnehmen.

10 Teilnehmer hatten ihren Sitz im Europäischen Ausland (Frankreich, Großbritannien, Italien, Polen, Schweiz, Spanien), sowie vier Teilnehmer in Kanada, Vietnam und den den USA.

