



**Auswertungs-Bericht**

Laborvergleichsuntersuchung

**DLA ptALR1 (2021)**

**Response PT Erdnuss:**

**5 prozessierte Proben Erdnuss (ungeröstet und geröstet), Erdnussbutter, Erdnusspaste und Extrudat (Erdnuss-Flips)**

**in Kartoffelpulver-Matrix**

***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*

**1. Korrektur 10.11.2021:**

Auf den Seiten 17 und 18 wurden die Abkürzungserklärungen für die PCR- und die ELISA-Methoden falsch angegeben. Dies wurde korrigiert.

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

<i>EP-Anbieter PT-Provider</i>	<p><b>DLA - Proficiency Tests GmbH</b> 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>
<i>EP-Nummer PT-Number</i>	DLA ptALR1 (2021)
<i>EP-Koordinator PT-Coordinator</i>	Dr. Matthias Besler-Scharf
<i>Status des EP-Bericht Status of PT-Report</i>	<p>Abschlussbericht / Final report (10. November 2021) 1. Korrektur / 1st Correction</p> <p>Gültig ist die jeweils letzte Version/Korrektur des Berichts. Sie ersetzt alle vorangegangenen Versionen. Only the latest version/correction of the report is valid. It replaces all preceding versions.</p>
<i>EP-Bericht Freigabe PT-Report Authorization</i>	<p>Dr. Matthias Besler-Scharf (Technischer Leiter / Technical Manager) - <i>gezeichnet / signed M. Besler-Scharf</i> Alexandra Scharf MSc. (QM-Beauftragte / Quality Manager) - <i>gezeichnet / signed A. Scharf</i> Datum / Date: 10. November 2021</p>
<i>Unteraufträge Subcontractors</i>	<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>
<i>Vertraulichkeit Confidentiality</i>	<p>Die Teilnehmerergebnisse sind im EP-Bericht in anonymisierter Form mit Auswertenummern benannt. Daten einzelner Teilnehmer werden ausschließlich nach vorheriger Zustimmung des Teilnehmers an Dritte weitergegeben. Participant result are named anonymously with evaluation numbers in the PT report. Data of individual participants will be passed on to third parties only with prior consent of the participant.</p>

## Inhalt

1. Einleitung.....	4
2. Durchführung.....	5
2.1 Untersuchungsmaterial.....	5
2.1.1 Homogenität.....	7
2.1.2 Stabilität.....	7
2.2 Probenversand und Informationen zur Untersuchung.....	8
2.3 Ergebnisübermittlung.....	8
3. Auswertung.....	9
3.1 Qualitativer Score.....	10
3.2 Wiederfindungs-Score (WFR-Score).....	10
3.2.1 Wiederfindungsraten eines Versuchs zur Präzision.....	11
3.2.2 Werte aus Erkenntnissen.....	13
3.3 z-Score (Dotierungsniveaus).....	14
3.4 z'-Score (Dotierungsniveaus).....	14
4. Ergebnisse.....	15
4.1 Vergleichsuntersuchung prozessierte Erdnussprodukte.....	16
4.1.1 Qualitative Scores: ELISA-Methoden.....	16
4.1.2 Qualitative Scores: PCR-Methoden.....	17
4.1.3 Quantitativ: ELISA-Methoden Wiederfindungs-Scores (WFR-Scores).....	18
4.1.4 Quantitativ: PCR-Methoden Wiederfindungs-Scores (WFR-Scores).....	19
4.2 z-Scores der Teilnehmer: Übersichtstabelle.....	22
5. Dokumentation.....	23
5.1 Angaben der Teilnehmer.....	23
5.1.1 ELISA-Methoden.....	23
5.1.2 PCR-Methoden.....	25
5.2 Homogenität.....	27
5.2.1 Mischungshomogenität vor der Abfüllung.....	27
5.3 Informationen zur Eignungsprüfung (EP).....	30
6. Verzeichnis der Teilnehmer in alphabetischer Reihenfolge.....	31
7. Verzeichnis relevanter Literatur.....	32

## 1. Einleitung

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

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

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

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

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

## 2. Durchführung

### 2.1 Untersuchungsmaterial

Zur Untersuchung wurden 6 LVU-Proben für den qualitativen Nachweis und ggf. die quantitative Bestimmung von Erdnuss (Erdnussprotein) in ungerösteten und gerösteten Erdnüssen, Erdnussbutter, Erdnusspaste und Extrudat (Erdnuss-Flips) in Kartoffelpulver/Maltodextrin zur Verfügung gestellt.

Die jeweiligen Rohstoffe für die Probenreihe waren handelsübliche teils prozessierte Erdnussprodukte. Pro PT-Probe wurden jeweils 4-18 Produkte unterschiedlicher Herkunft verarbeitet. Die Erdnusspasten-Mischung wurde vor der weiteren Verwendung bei 60°C getrocknet.

Es wurden Vormischungen mit Gehalten von ca. 1,6 - 5 % der betreffenden allergenen Zutaten hergestellt (s. Tab. 1). Hierzu wurden die Produkte ggf. vorzerkleinert, gravimetrisch mit weiteren Zutaten gemischt, mittels Kugelmühle zerkleinert oder Zentrifugalmühle zerkleinert und gesiebt (mesh 250 µm) und homogenisiert. Die Allergen-Vormischungen wurden anschließend zur Trägermatrix Kartoffelpulver / Maltodextrin (mesh <500 µm) gegeben und homogenisiert. Ein Aliquot der Trägermatrix wurde als „Null“-Probe abgenommen.

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

Die Erdnuss-Gehalte der PT-Probenreihe lagen im Bereich von ca. 20 mg/kg (s. Tabelle 1).

Jeder zugewiesene Wert, hier die dotierten Allergen-Gehalte, sind mit einer Standardunsicherheit behaftet. Als Unsicherheiten wurden u.a. folgende Faktoren berücksichtigt: Proteingehalt des Dotierungsmaterials, Mischungshomogenität, Homogenität und Stabilität von Erdnussprotein. Alle Unsicherheitsbeiträge wurden in Form von Standardabweichungen ausgedrückt und als Varianzen addiert. Die Wurzel aus der Summe der Gesamtvarianzen ergibt die kombinierte Unsicherheit "Uc", die mit dem Erweiterungsfaktor k=2 multipliziert die erweiterte Unsicherheit der zugewiesenen Werte " $U(X_{pt})$ " ergibt [3, 13, 16 - 17].

Tabelle 1: Zusammensetzung der DLA-Proben

PT-Probenreihe	Probe 1	Probe 2	Probe 3	Probe 4	Probe 5	Probe 6
	Erdnussbutter	Erdnüsse, geröstet	Erdnüsse, ungeröstet	Erdnusspaste	Erdnuss-Extrudat	„Null“
Zutaten	g/100 g	g/100g	g/100g	g/100g	g/100g	g/100g
Kartoffelpulver Zutaten: Kartoffeln, E471, E304, E223, E100 Nährwertangaben pro 100 g: Protein 8,3 g, Kohlenhydrate 76 g, Fett 0,6 g, Salz 0,15 g	75	75	75	75	75	75
Maltodextrin	25	25	25	25	25	25
Allergen-Vormischungen Zutaten: Maltodextrin (75% - 90%), Natriumsulfat (< 5%), Siliciumdioxid (< 2,5%), prozessierte Allergenprodukte (je 1,6% - 5% Erdnuss Trockengewicht)	0,047	0,040	0,041	0,11	0,13	-
Allergen-Gehalte	mg/kg	mg/kg	mg/kg	mg/kg	mg/kg	mg/kg
<i>Erdnussbutter*</i> (90% Erdnuss und weitere Zutaten) Protein 21,7 % ** (6 Produkte aus USA oder amerikanischer Art)	23,4	-	-	-	-	-
<i>Erdnüsse, geröstet*</i> Protein 23,2% ** (18 Produkte aus USA, Asien, Afrika, Südamerika)	-	19,9	-	-	-	-
<i>Erdnüsse, ungeröstet*</i> Protein 23,1 % ** (9 Produkte aus Afrika, Asien, Südamerika)	-	-	20,5	-	-	-
<i>Erdnusspaste*</i> (36% Erdnuss und weitere Zutaten) Gesamtprotein 11,0 % ** (5 Produkte Würzsaucen aus Asien oder asiatischer Art)	-	-	-	55,8	-	-
<i>Erdnuss-Extrudat*</i> (32% Erdnuss und weitere Zutaten) Gesamtprotein 11,2 % ** (7 Produkte Erdnuss-Flips aus Europa und USA)	-	-	-	-	65,9	-
- als Erdnuss	21,1	19,9	20,5	20,1	21,1	-
erweiterte kombinierte Unsicherheit (k=2) des Erdnuss-Gehalts (= ± 12 %)	± 2,53	± 2,34	± 2,46	± 2,41	± 2,53	-

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

\*\* Proteingehalt gemäß Laboranalyse der Rohstoffmischungen (Gesamtstickstoff nach Kjeldahl mit F=5,46 für Erdnussprotein)

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

### 2.1.1 Homogenität

Die **Mischungshomogenität vor der Abfüllung** wurde in 8-fach Bestimmung mittels **Microtracer-Analyse** untersucht. Es handelt sich um eine normierte Methode, die Bestandteil des internationalen GMP-Zertifizierungssystems für Futtermittel ist [14]. Vor der Mischung werden mit Farbstoff beschichtete Eisenpartikel in  $\mu\text{m}$ -Größe zur Probe gegeben und die Partikelzahl wird nach der Homogenisierung in entnommenen Aliquoten bestimmt. Die Bewertung der Mischungshomogenität erfolgt auf Grundlage der Poissonverteilung anhand des chi-Quadrat-Tests. Eine Wahrscheinlichkeit von  $\geq 5\%$  ist gleichzusetzen mit einer guten homogenen Mischung und von  $\geq 25\%$  mit einer exzellenten Mischung [14, 15]. Die Microtracer-Analyse der vorliegenden LVU-Proben 1-5 hat eine Wahrscheinlichkeit von 98%, 75%, 81%, 95% bzw. 81% ergeben. Die Partikel-Ergebnisse wurden zusätzlich in Konzentrationen umgerechnet, statistisch als Normalverteilung ausgewertet und mit der Standardabweichung nach Horwitz verglichen. Für die Beurteilung sind HorRat-Werte zwischen 0,3 und 1,3 unter Wiederholbedingungen (Messungen innerhalb des Labors) zu akzeptieren [17]. Es wurden HorRat-Werte von 0,55, 0,93, 1,1, 0,68 bzw. 0,97 erhalten. Die Ergebnisse der Microtracer-Analyse sind in der Dokumentation angegeben.

### 2.1.2 Stabilität

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

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

Der  $a_w$ -Wert der EP-Proben lag bei ca. 0,24 – 0,25 (20 – 23°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 15. Kalenderwoche 2021 je eine Portion der Untersuchungsmaterialien 1 bis 6 verschickt. Die Untersuchungsverfahren wurden freigestellt. Die Untersuchungen waren durchzuführen bis spätestens 11. Juni 2021.

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

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

- Die Proben 1-5 sind in zufälliger Reihenfolge nummeriert und enthalten Erdnuss (ungeröstet), Erdnuss (geröstet), Erdnussbutter, Erdnusspaste ("asiatische" Würzsaucen) und Extrudat (Erdnuss-Flips).
- Bitte geben Sie alle quantitativen Ergebnisse als Gesamt-Erdnuss, soweit möglich unter Angabe des zugrundeliegenden Gehalts an Gesamt-Protein in Erdnuss an.  
Mögliche Umrechnungsfaktoren auf die prozessierten Erdnussprodukte werden separat in der Ergebnisabgabedatei abgefragt.

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

## **2.3 Ergebnisübermittlung**

Die Ergebnisabgabe erfolgte einheitlich 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 9 Teilnehmer haben mindestens für eine Methode 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]. Darüber hinaus können Matrix- und/oder Prozessierung die Nachweisbarkeit von Allergenen sowohl mittels ELISA- als auch mittels PCR-Verfahren stark beeinflussen.

In der vorliegenden LVU wurden von dem Allergen Erdnuss fünf verschiedenartig prozessierte Produkte, Erdnüsse (geröstet), Erdnüsse (ungeröstet), Erdnussbutter, Erdnusspaste und Erdnuss-Extrudat zur Verfügung gestellt, um die qualitative Nachweisbarkeit und die Response in der quantitativen Bestimmung der eingesetzten Methoden ermitteln zu können.

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

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

### 3.1 Qualitativer Score

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

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

Tabelle 2: Bewertung der Ergebnisse anhand von qualitativen Scores

Probe 1	Probe 2	Probe 3	Probe 4	Probe 5	Probe 6	Score	Eignung
Erdnussbutter	Erdnüsse geröstet	Erdnüsse ungeröstet	Erdnusspaste	Erdnuss-Extrudat	„Null“	qualitativ	qualitativ
pos/neg	pos/neg	pos/neg	pos/neg	pos/neg	pos/neg	Anzahl erfasster Proben 1 - 5	
negativ	negativ	negativ	negativ	negativ	negativ	0 (0%)	nicht erfolgreich
negativ	negativ	negativ	negativ	positiv	negativ	1 (20%)	1 Produktgruppe
negativ	negativ	negativ	positiv	positiv	negativ	2 (40%)	2 Produktgruppen
negativ	negativ	positiv	positiv	positiv	negativ	3 (60%)	3 Produktgruppen
negativ	positiv	positiv	positiv	positiv	negativ	4 (80%)	4 Produktgruppen
positiv	positiv	positiv	positiv	positiv	negativ	5 (100%)	5 Produktgruppen

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

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

Die Wiederfindungsraten werden in Bezug auf das jeweilige zugesetzte prozessierte Allergen (Zusatzniveau) berechnet. Die Bezugswerte ergeben sich aus den unter 2.1 Untersuchungsmaterial in Tabelle 1 angegebenen Gehalten der Proben 1 bis 5. Als Akzeptanzbereich AB für die Bewertung der Teilnehmerergebnisse wird der von der AOAC vorgeschlagene Bereich von 50 - 150% für die Wiederfindungsraten von Allergen-ELISAs herangezogen [23]. Für quantitative PCR-Bestimmungen sowie LC/MS wird ebenfalls dieser Akzeptanzbereich herangezogen.

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

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

### 3.2.1 Wiederfindungsraten eines Versuchs zur Präzision

In Ringversuchen der ASU §64 Methoden wurden abhängig von Matrix bzw. Prozessierung und Konzentrationsbereich Wiederfindungsraten im Bereich von 57 – 119% für die ELISA-Methoden und 39 – 113% für die PCR-Methoden erhalten (s. Tab. 3a und 3b). Die angegebenen Zielstandardabweichungen  $\sigma_{pt}$  wurden für eine Anzahl von  $m = 2$  Wiederholmessungen berechnet.

Tabelle 3a: ELISA-Methoden – Wiederfindungsraten und Präzisionsdaten ausgewählter Auswertungen von Versuchen zur Präzision [30-31]

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

Die Working Group on Prolamin Analysis and Toxicity (WGPAT) hat Ringversuche zur Validierung von zwei kommerziellen ELISA-Test-Kits zur Gluten-Bestimmung mittels monoklonalem R5 Antikörper durchgeführt [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 3b: PCR-Methoden – Wiederfindungsraten und Präzisionsdaten ausgewählter Auswertungen von Versuchen zur Präzision [32-35]

Parameter	Matrix	Mittelwerte [mg/kg]	Wiederfindung	rob RSD	RSD <sub>r</sub>	RSD <sub>R</sub>	opt	Methode / Literatur
Erdnuss	Reiskekse	23,4 5,19	113 % 99,7 %	15,6% 15,0%	11,6% 14,7%	14,4% 18,1%	11,8% 14,8%	rt-PCR ASU 00.00-169
Erdnuss	Weizenkekse (DLA)	1,97	39,3 %	16,2%	16,0%	19,5%	15,8%	rt-PCR ASU 00.00-169
Erdnuss	Milchpulver Brühwurst	3,66 2,44	73,2 % 49,4 %	15,8% 15,6%	12,8% 11,9%	14,8% 15,9%	11,7% 13,5%	rt-PCR ASU 00.00-169
Mandel	Reiskekse	105,2 18,0 10,5	105 % 90 % 105 %	-	19,3% 44,0% 32,0%	27,5% 49,1% 38,8%	23,9% 38,0% 31,5%	rt-PCR ASU 18.00-20
Mandel	Weizenkekse Soßenpulver	114,3 88,1	94,6 % 88,1 %	-	22,1% 43,9%	41,8% 43,1%	38,8% - %	rt-PCR ASU 18.00-20
Mandel	Reiskekse	109 21,3 12,3	109 % 107 % 121 %	-	17,6% 35,8% 32,0%	32,8% 45,0% 47,8%	30,3% 37,2% 42,1%	rt-PCR multiplex ASU 18.00-22
Mandel	Weizenkekse Soßenpulver	120,7 112	98,2 % 94,1 %	-	15,7% 36,2%	32,5% 42,8%	30,5% 34,3%	rt-PCR multiplex ASU 18.00-22
Paranuss	Reiskekse	89,1 17,3 9,8	89,1 % 86,5 % 98 %	-	34,1% 36,2% 40,2%	34,4% 38,2% 41,8%	24,5% 28,4% 30,6%	rt-PCR ASU 18.00-21
Paranuss	Weizenkekse Soßenpulver	80,8 42,6	65,7 % 42,6 %	-	25,6% 27,5%	36,4% 39,7%	31,6% 34,6%	rt-PCR ASU 18.00-21
Paranuss	Reiskekse	96,6 14,2	96,6 % 71 %	-	16,8% 54,2%	31,8% 56,5%	29,5% 41,5%	rt-PCR multiplex ASU 18.00-22
Paranuss	Weizenkekse Soßenpulver	76,5 48,4	62,2 % 48,4 %	-	15,6% 34,4%	35,8% 37,5%	34,1% 28,5%	rt-PCR multiplex ASU 18.00-22

### 3.2.2 Werte aus Erkenntnissen

Anforderungen an die Leistungsfähigkeit der Analysemethoden zur quantitativen Bestimmung von Allergenen in Lebensmitteln sind u.a. vom Ministry of Health and Welfare (MHLW) in Japan [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 4 und 5 angegeben.

Tabelle 4: ELISA-Validierungskriterien

<b>Literatur</b> [18-24]	<b>Wiederfindungsrate</b>	<b>Wiederholstandard- abweichung</b>	<b>Vergleichsstandard- abweichung</b>
MHLW 2006	50 - 150%		≤ 25%
CEN 2009		≤ 20%	
AOAC 2010	50 - 150%	6,9 - 34,4% <sup>(a)</sup>	19,5 - 57,2% <sup>(a)</sup>
CAC 2010	70 - 120%	≤ 25%	≤ 35%

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

Tabelle 5: PCR-Validierungskriterien

<b>Literatur</b> [18]	<b>Wiederfindungsrate</b>	<b>Wiederholstandard- abweichung</b>	<b>Vergleichsstandard- abweichung</b>
CAC 2010	± 25% <sup>(a)</sup>	≤ 25%	≤ 35%

(a) = Trueness / Richtigkeit

Aufgrund der derzeitigen Leistungsfähigkeiten von ELISA- bzw. PCR-Methoden zur quantitativen Bestimmung von Allergenen in Lebensmitteln, die sich aus den Präzisionsdaten von Versuchen und aus den o.g. Validierungsanforderungen ableiten lassen, legen wir für die relative Zielstandardabweichung  $\sigma_{pt}$  einen Wert von 25% und für die Wiederfindungsrate entsprechend 50-150% fest.

### 3.3 z-Score (Dotierungsniveaus)

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

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

Die Berechnung der z-Scores zu den Wiederfindungen erfolgte mit der Zielstandardabweichung von 25% (s. 3.2.2).

### 3.4 z'-Score (Dotierungsniveaus)

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

Die Berechnung erfolgt nach:

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

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

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

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

## 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- (Lateral Flow) und PCR-Methoden. Die Ergebnisse wurden in den entsprechenden Kapiteln nach durchgeführten Methoden (Testkits) zusammengefasst und die Auswertenummern innerhalb der Gruppen aufsteigend sortiert.

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

In der vorliegenden LVU wurde ein Ergebnis als Erdnussprotein angegeben und mit dem experimentell bestimmten Proteingehalt der Rohstoffe für geröstete und ungeröstete Erdnüsse von 23% in das Gesamtlebensmittel Erdnuss umgerechnet (vgl. Tab. 1, S.6). Alle anderen ELISA- und PCR-Ergebnisse wurden als Erdnuss abgegeben, sodass keine Umrechnungen erforderlich waren.

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

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

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

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

\* Wiederfindungsrate

### 4.1 Vergleichsuntersuchung prozessierte Erdnussprodukte

#### 4.1.1 Qualitative Scores: ELISA-Methoden

Auswertenummer	Probe 1 Erdnussbutter	Probe 2 Erdnüsse geröstet	Probe 3 Erdnüsse ungeröstet	Probe 4 Erdnusspaste	Probe 5 Erdnuss-Extrudat	Probe 6 „Null“	Score qualitativ	Methode	Hinweis
	pos/neg	pos/neg	pos/neg	pos/neg	pos/neg	pos/neg	Anzahl erfasster Proben 1-5		
3	positiv	positiv	positiv	positiv	positiv	negativ	5 (100%)	BK	
4	positiv	positiv	positiv	positiv	positiv	negativ	5 (100%)	MI-II	
2a	positiv	positiv	positiv	positiv	positiv	negativ	5 (100%)	RS	
2b	positiv	positiv	positiv	positiv	positiv	negativ	5 (100%)	RS-F	
6	positiv	positiv	positiv	positiv	positiv	negativ	5 (100%)	RS-F	
8	positiv	positiv	positiv	positiv	positiv	negativ	5 (100%)	RS-F	
7	positiv	positiv	positiv	positiv	positiv	negativ	5 (100%)	SP	
1	positiv	positiv	positiv	positiv	positiv	negativ	5 (100%)	VT	

	Probe 1	Probe 2	Probe 3	Probe 4	Probe 5	Probe 6
Anzahl positiv	8	8	8	8	8	0
Anzahl negativ	0	0	0	0	0	8
Prozent positiv	100	100	100	100	100	0
Prozent negativ	0	0	0	0	0	100
Konsenswert	positiv	positiv	positiv	positiv	positiv	negativ
Dotierung	positiv	positiv	positiv	positiv	positiv	negativ

**Methoden:**

- BK = BioKits, Neogen
- MI-II = Morinaga Institute ELISA Kit II
- RS = Ridascreeen®, R-Biopharm
- RS-F= Ridascreeen® Fast, R-Biopharm
- SP = SensiSpec ELISA Kit, Eurofins
- VT = Veratox, Neogen

Anmerkung:

Für alle prozessierten Produkte (Proben 1 bis 5) wurden mittels ELISA-Methoden Konsenswerte von 100% positiven Ergebnissen erhalten.

4.1.2 Qualitative Scores: PCR-Methoden

Auswertenummer	Probe 1 Erdnussbutter	Probe 2 Erdnüsse geröstet	Probe 3 Erdnüsse ungeröstet	Probe 4 Erdnusspaste	Probe 5 Erdnuss-Extrudat	Probe 6 „Null“	Score qualitativ	Methode	Hinweis
	pos/neg	pos/neg	pos/neg	pos/neg	pos/neg	pos/neg	Anzahl erfasster Proben 1-5		
2	positiv	positiv	positiv	positiv	positiv	negativ	5 (100%)	ASU	
4	positiv	positiv	positiv	positiv	positiv	negativ	5 (100%)	ASU	Probe 4: Spuren an NWG
9	positiv	positiv	positiv	positiv	positiv	negativ	5 (100%)	ASU	
3	positiv	positiv	positiv	positiv	positiv	negativ	5 (100%)	SFA	
5	positiv	positiv	positiv	positiv	positiv	negativ	5 (100%)	SFA	
8	positiv	positiv	positiv	positiv	positiv	negativ	5 (100%)	div	Probe 4+5 schwach positiv

	Probe 1	Probe 2	Probe 3	Probe 4	Probe 5	Probe 6
Anzahl positiv	6	6	6	6	6	0
Anzahl negativ	0	0	0	0	0	6
Prozent positiv	100	100	100	100	100	0
Prozent negativ	0	0	0	0	0	100
Konsenswert	positiv	positiv	positiv	positiv	positiv	negativ
Dotierung	positiv	positiv	positiv	positiv	positiv	negativ

**Methoden:**

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

Anmerkung:

Für alle Proben 1-5 wurden mittels PCR-Methoden Konsenswerte von 100% positiven Ergebnissen erhalten. Zwei Teilnehmer haben für die Proben 4 bzw. 4 und 5 (Erdnusspaste und Erdnuss-Extrudat) eine qualitativ geringere Response beschrieben („an der NWG“ bzw. „schwach positiv“).

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

Auswertenummer	Probe 1 Erdnussbutter			Probe 2 Erdnüsse geröstet			Probe 3 Erdnüsse ungeröstet			Probe 4 Erdnusspaste			Probe 5 Erdnuss-Extrudat			WFR-Score	Methode	Hinweis	
	Ergebnis		WFR *	Ergebnis		WFR *	Ergebnis		WFR *	Ergebnis		WFR *	Ergebnis		WFR *	WFR *			
	[mg/kg]	[%]	[Z <sub>WFR</sub> ]	[mg/kg]	[%]	[Z <sub>WFR</sub> ]	[mg/kg]	[%]	[Z <sub>WFR</sub> ]	[mg/kg]	[%]	[Z <sub>WFR</sub> ]	[mg/kg]	[%]	[Z <sub>WFR</sub> ]	Anzahl in AB**			
3	37,4	177	3,1	42,1	212	4,5	82,5	402	12	9,43	47	-2,1	9,21	44	-2,3	0/5 (0%)	BK		
4	29,0	<b>137</b>	<b>1,5</b>	37,4	188	3,5	33,9	165	2,6	13,9	<b>69</b>	<b>-1,2</b>	20,9	<b>99</b>	<b>-0,04</b>	3/5 (60%)	MI-II	Ergebnis umgerechnet °	
2a	34,7	164	2,6	38,4	193	3,7	84,9	414	13	11,5	<b>57</b>	<b>-1,7</b>	9,50	45	-2,2	1/5 (20%)	RS		
2b	46,2	219	4,8	52,3	263	6,5	98,5	480	15	16,7	<b>83</b>	<b>-0,68</b>	13,1	<b>62</b>	<b>-1,5</b>	2/5 (40%)	RS-F		
6	67,4	319	8,8	65,7	330	9,2	151	737	25	19,8	<b>99</b>	<b>-0,06</b>	12,1	<b>57</b>	<b>-1,7</b>	2/5 (40%)	RS-F		
8	47,0	223	4,9	52,3	263	6,5	59,3	289	7,6	11,6	<b>58</b>	<b>-1,7</b>	12,2	<b>58</b>	<b>-1,7</b>	2/5 (40%)	RS-F		
7	40,8	193	3,7	42,3	213	4,5	74,4	363	11	11,6	<b>58</b>	<b>-1,7</b>	12,7	<b>60</b>	<b>-1,6</b>	2/5 (40%)	SP		
1	34,5	164	2,5	40,0	201	4,0	69,6	339	10	7,36	37	-2,5	8,99	43	-2,3	0/5 (0%)	VT		
° Umrechnung S. 15																			
<b>AB**</b>		<b>50-150 %</b>		<b>AB**</b>		<b>50-150 %</b>		<b>AB**</b>		<b>50-150 %</b>		<b>AB**</b>		<b>50-150 %</b>		<b>AB**</b>		<b>50-150 %</b>	
Anzahl in AB		<b>1</b>		Anzahl in AB		<b>0</b>		Anzahl in AB		<b>0</b>		Anzahl in AB		<b>6</b>		Anzahl in AB		<b>5</b>	
Prozent in AB		<b>13</b>		Prozent in AB		<b>0</b>		Prozent in AB		<b>0</b>		Prozent in AB		<b>75</b>		Prozent in AB		<b>63</b>	

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

\*\* Akzeptanzbereich der AOAC für Allergen-ELISAs

**Methoden:**

BK = BioKits, Neogen

MI-II = Morinaga Institute ELISA Kit II

RS = Ridascreeen®, R-Biopharm

RS-F= Ridascreeen® Fast, R-Biopharm

SP = SensiSpec ELISA Kit, Eurofins

VT = Veratox, Neogen

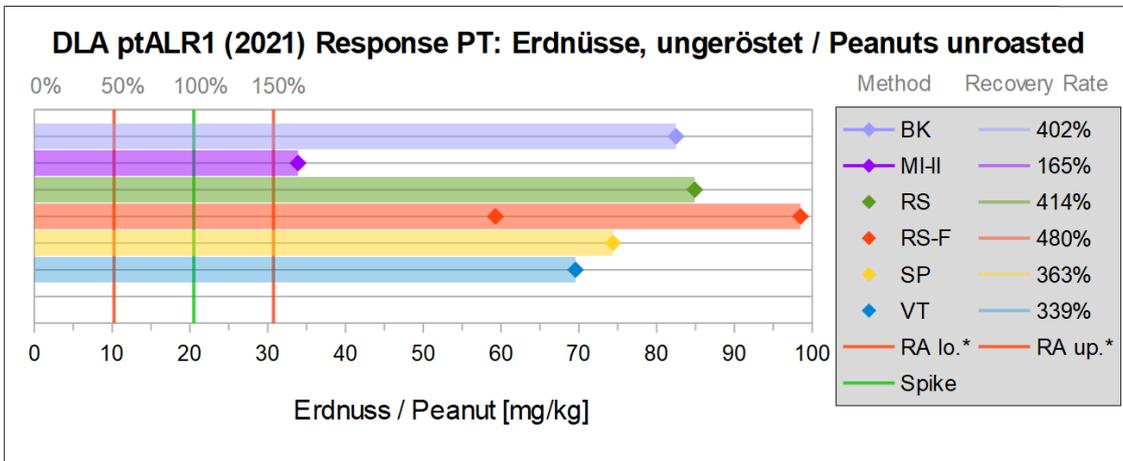
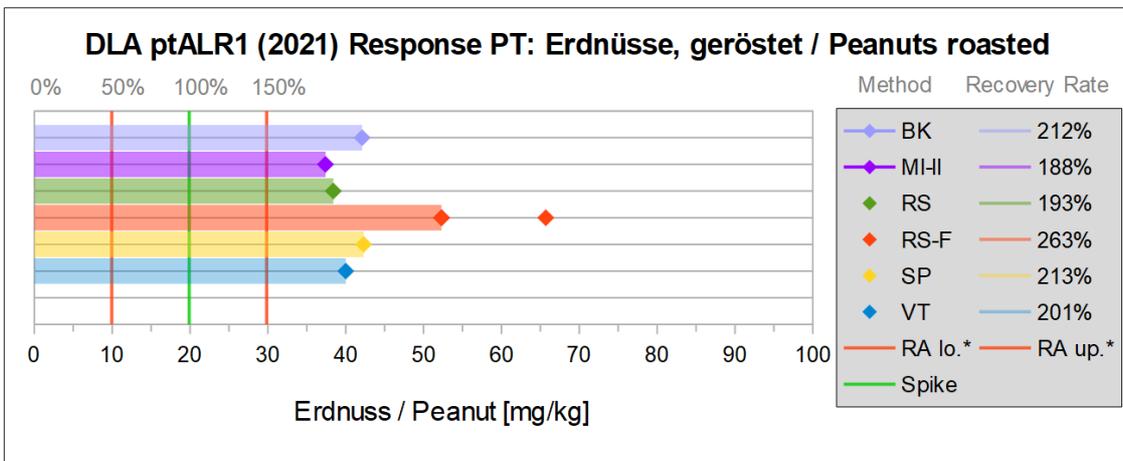
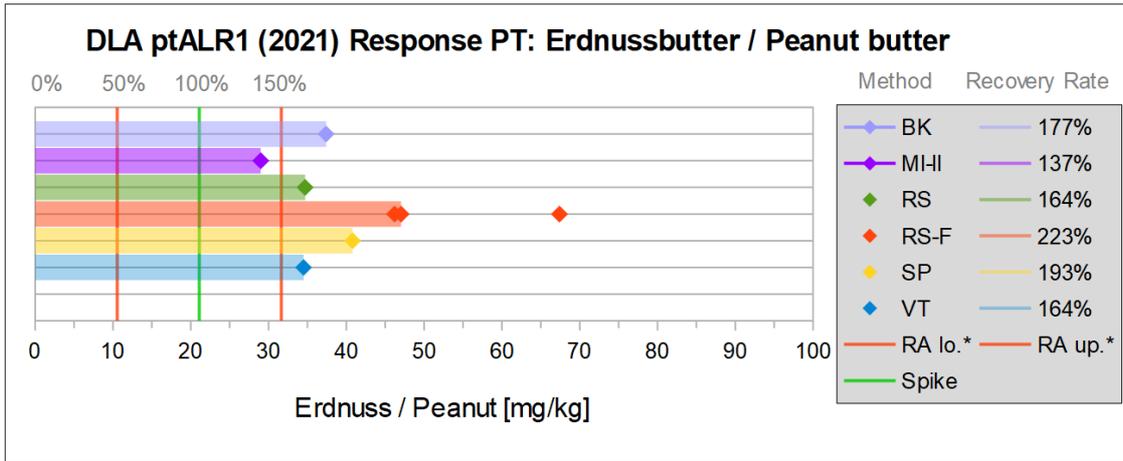
Anmerkung:

Für die Proben 1 (Erdnussbutter), 2 (Erdnüsse, geröstet) und 3 (Erdnüsse, ungeröstet) lag mit einer Ausnahme keine der Wiederfindungsraten der Teilnehmerergebnisse im Akzeptanzbereich von 50-150%. Es wurden überwiegend deutlich höhere Werte erhalten. Die Wiederfindungsrate der Methode MI für Probe 1 lag innerhalb des Akzeptanzbereichs.

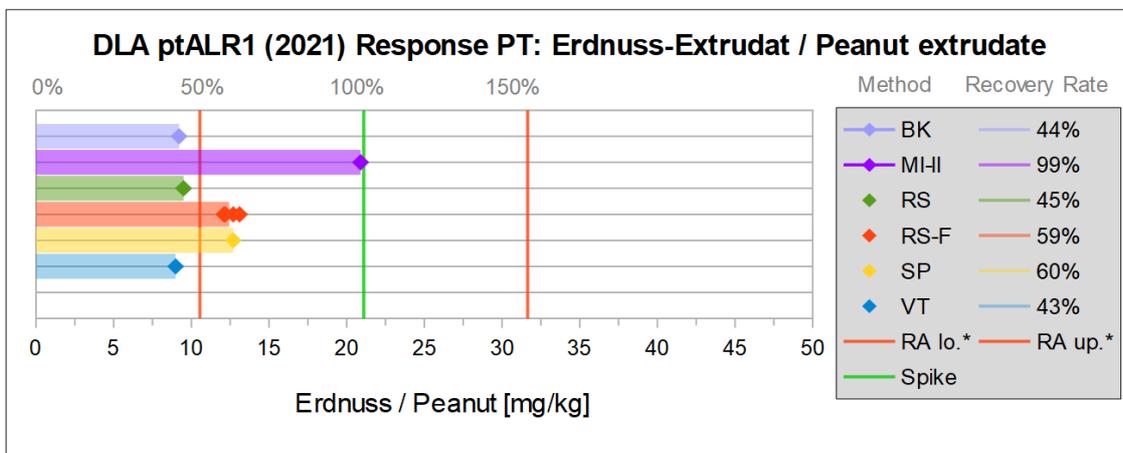
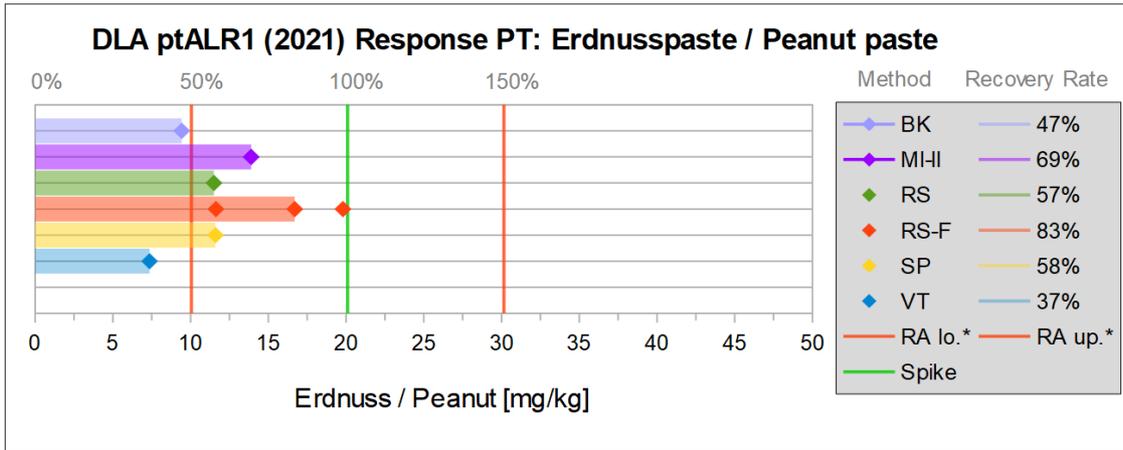
Für die Proben 4 (Erdnusspaste) und 5 (Erdnuss-Extrudat) lagen 75% und 63% der Wiederfindungsraten der Teilnehmerergebnisse im Akzeptanzbereich von 50-150%. Die übrigen Wiederfindungen lagen unterhalb von 50%.

4.1.4 Quantitativ: PCR-Methoden Wiederfindungs-Scores (WFR-Scores)

*Es lagen keine quantitativen Ergebnisse für die PCR-Methoden vor.*



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



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

**4.2 z-Scores der Teilnehmer: Übersichtstabelle**

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

Auswertenummer	ELISA Erdnuss					PCR Erdnuss				
	Probe 1	Probe 2	Probe 3	Probe 4	Probe 5	Probe 1	Probe 2	Probe 3	Probe 4	Probe 5
1	2,5	4,0	10	-2,5	-2,3					
2a	2,6	3,7	13	-1,7	-2,2					
2b	4,8	6,5	15	-0,68	-1,5					
3	3,1	4,5	12	-2,1	-2,3					
4	1,5	3,5	2,6	-1,2	-0,04					
5										
6	8,8	9,2	25	-0,06	-1,7					
7	3,7	4,5	11	-1,7	-1,6					
8	4,9	6,5	7,6	-1,7	-1,7					
9										

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-Methoden

Meth. Abk.	Auswertenummer	Datum der Analyse	Ergebnis Probe 1		Ergebnis Probe 2		Ergebnis Probe 3		Ergebnis Probe 4		Ergebnis Probe 5		Ergebnis Probe 6		NWG / LOD *	BG / LOQ *	MU*	Angabe quantitatives Ergebnis als
			qualitativ	mg/kg														
		Tag/Monat																bevorzugt als Erdnuss
BK	3	04.05.21	-	37,41	-	42,14	-	82,49	-	9,43	-	9,21	-	< 1		1		Erdnuss
MI-II	4	07.05.21	positiv	6,7	positiv	8,6	positiv	7,8	positiv	3,2	positiv	4,8	negativ	<0,2	0,2	0,2		Erdnussprotein
RS	2a	02.06.21	positiv	34,7	positiv	38,4	positiv	84,9	positiv	11,5	positiv	9,5	negativ		-	-		Erdnuss
RS-F	2b	22.04.21	positiv	46,2	positiv	52,3	positiv	98,5	positiv	16,7	positiv	13,1	negativ		2,5	2,5		Erdnuss
RS-F	6	01.06.	positiv	67,4	positiv	65,7	positiv	151	positiv	19,8	positiv	12,1	negativ	< 2,5	0,13	2,5		Erdnuss
RS-F	8	07.05.21	positiv	47,03	positiv	52,31	positiv	59,28	positiv	11,63	positiv	12,19	negativ	<2,5	0,13	2,5		Erdnuss
SP	7	20.04.21	positiv	40,8	positiv	42,3	positiv	74,4	positiv	11,6	positiv	12,7	negativ	0	0,1	1		Erdnuss
VT	1	03.05.2021	positiv	34,5	positiv	40	positiv	69,58	positiv	7,36	positiv	8,99	negativ	0	N/A	2,5	N/A	Erdnuss

\* NWG Nachweisgrenze / BG Bestimmungsgrenze

\* LOD limit of detection / LOQ limit of quantitation

\* MU Messunsicherheit / MU measurement uncertainty

## Weitere Angaben zu den Methoden

Meth. Abk.	Auswertenummer	Methode	Spezifität	Gehalt Gesamt-Protein in Erdnuss (Gemäß Methodenvorschrift)	Umrechnungsfaktoren für prozessierte Produkte (z.B.: Response gemäß Methodenvorschrift)	Hinweise zur Methode (Extraktion und Bestimmung)	Methode akkreditiert nach ISO/IEC 17025	Sonstige Hinweise
		Test-Kit + Anbieter	Antikörper	%	Umrechnung von X in Y (Faktor oder %)	z.B. Extraktionslösung / Zeit / Temperatur	ja/nein	
BK	3	BioKits Peanut Assay Kit, Neogen	Conarachin (Ara h1)			nach Testanleitung	ja	
MI-II	4	Peanut ELISA Kit-II, Morinaga	erkennt Erdnussproteinen	ca. 25		lt. Herstellerangaben	ja	M2120
RS	2a	Ridascreen Peanut (R6811), r-biopharm					nein	Neue RB Kit ref Nr. 6811. nicht validiert
RS-F	2b	Ridascreen Fast Peanut (R6202), r-Biopharm					ja	
RS-F	6	Ridascreen Fast Peanut (R6202), r-Biopharm				nach Herstelleranweisung mit Magermilchpulver	ja	
RS-F	8	Ridascreen Fast Peanut (R6202), r-Biopharm	Ara h1 Ara h2	25		lt. Testanweisung	ja	
SP	7	Eurofins SensiSpec Peanut ELISA Kit						
VT	1	Veratox Peanut, Neogen	N/A	25,8	N/A	nach Testanleitung	ja	Wiederfindung Probe 6 (111%)

5.1.2 PCR-Methoden

Meth. Abk.	Auswertenummer	Datum der Analyse	Ergebnis Probe 1		Ergebnis Probe 2		Ergebnis Probe 3		Ergebnis Probe 4		Ergebnis Probe 5		Ergebnis Probe 6		NWG / LOD *	BG / LOQ *	MU*	Angabe quantitatives Ergebnis als bevorzugt als Erdnuss
			qualitativ	mg/kg														
ASU	2		positiv		positiv		positiv		positiv		positiv		negativ		2			Erdnuss-DNA
ASU	4	28.05.21	positiv		positiv		positiv		positiv*		positiv		negativ		5			Erdnuss-DNA
ASU	9	02.06.21	positiv		negativ		0,1 pg			Erdnuss-DNA								
SFA	3	10./12./18.05.21	positiv		negativ					Erdnuss-DNA								
SFA	5	07.05.21	positiv		negativ		0,4	1	30%	Erdnuss								
div	8	04.05.21	positiv		negativ					Erdnuss-DNA								

\* NWG Nachweisgrenze / BG Bestimmungsgrenze

\* LOD limit of detection / LOQ limit of quantitation

\* MU Messunsicherheit / MU measurement uncertainty

## Weitere Angaben zu den Methoden

Meth. Abk.	Auswertenummer	Methode	Spezifität	Gehalt Gesamt-Protein in Erdnuss (Gemäß Methodenvorschrift)	Umrechnungsfaktoren für prozessierte Produkte (z.B.: Response gemäß Methodenvorschrift)	Hinweise zur Methode (Extraktion und Bestimmung)	Methode akkreditiert nach ISO/IEC 17025	Sonstige Hinweise
		Test-Kit + Anbieter	Target-Sequenz / -DNA			z.B. Extraktion / Enzyme / Clean-Up / Real Time PCR / Gelelektrophorese / Cyclen	ja/nein	
ASU	2	ASU §64 Methode/method				Macherey & Nagel NucleoSpin Food Kit	ja	ASU L 00.00-169 (2019-07)
ASU	4	ASU §64 Methode/method				CTAB / Proteinase K / Rnase A / Promega Maxwell / Real Time PCR / 45 Zyklen	ja	§ 64 LFGB L 00.00-169:2019-07, Probe 4: Spuren an der NWG
ASU	9	ASU §64 Methode/method	apt6			DNeasy mericon Food Kit (Qiagen)		
SFA	3	Sure Food ALLERGEN, R-Biopharm / Congen	charakteristischer Sequenzabschnitt der Erdnuss-DNA			SureFood Prep Advanced r-biopharm/ Proteinase K/ Real Time PCR/ 45 Zyklen	ja	
SFA	5	Sure Food ALLERGEN, R-Biopharm / Congen	Arachis hypogae			Sure Food Prep Advanced Protokoll 2 zzgl. 200 µl LB	nein	Artikelnr. S3603, K01
div	8	Literaturmethode nach Hird et al. (2003) Eur. Food Res technol 217:265-268, modifiziert	Arah2 Gen			Extraktion nach ASU § 64 LFGB L 15.05-1 (SDS/Guanidiniumchlorid-Puffer mit Proteinase K, Aufreinigung mittels Wizard-Kit der Fa. Promega); Real-time PCR mit 50 Zyklen Extraktion nach ASU § 64 LFGB L 15.05-1 (SDS/Guanidiniumchlorid-Puffer mit Proteinase K, Aufreinigung mittels Wizard-Kit der Fa. Promega); Real-time PCR mit 50 Zyklen	ja	Probe 4 und 5 schwach positiv

## 5.2 Homogenität

### 5.2.1 Mischungshomogenität vor der Abfüllung

#### Microtracer Homogenitätstest

##### DLA ptALR1 (2021) Probe 1

Gewicht Gesamtprobe	1,00	kg
Microtracer	FSS-rot lake	
Teilchengröße	75 – 300	µm
Gewicht pro Partikel	2,0	µg
Tracerzugabe	33,4	mg/kg

#### Analysenergebnisse:

Probe	Einwaage [g]	Partikel Anzahl	Partikel [mg/kg]
1	5,00	75	30,0
2	5,00	75	30,0
3	4,97	74	29,8
4	5,01	70	27,9
5	5,03	75	29,8
6	5,02	77	30,7
7	4,98	66	26,5
8	5,03	79	31,4

#### Poisson-Verteilung

Probenanzahl	8	
Freiheitsgrad	7	
Mittelwert	73,9	Partikel
Standardabweichung	3,91	Partikel
$\chi^2$ (CHI-Quadrat)	1,45	
<b>Wahrscheinlichkeit</b>	<b>98</b>	%
Wiederfindungsrate	88	%

#### Normalverteilung

Probenanzahl	8	
Mittelwert	29,5	mg/kg
Standardabweichung	1,56	mg/kg
rel. Standardabweichung	5,30	%
Horwitz Standardabweichung	9,61	%
<b>HorRat-Wert</b>	<b>0,55</b>	
Wiederfindungsrate	88	%

#### Microtracer Homogenitätstest

##### DLA ptALR1 (2021) Probe 2

Gewicht Gesamtprobe	1,00	kg
Microtracer	FSS-rot lake	
Teilchengröße	75 – 300	µm
Gewicht pro Partikel	2,0	µg
Tracerzugabe	33,6	mg/kg

#### Analysenergebnisse:

Probe	Einwaage [g]	Partikel Anzahl	Partikel [mg/kg]
1	4,98	77	30,9
2	5,01	80	31,9
3	5,00	68	27,2
4	5,01	76	30,3
5	5,02	84	33,5
6	5,03	69	27,4
7	4,99	72	28,9
8	5,01	87	34,7

#### Poisson-Verteilung

Probenanzahl	8	
Freiheitsgrad	7	
Mittelwert	76,6	Partikel
Standardabweichung	6,81	Partikel
$\chi^2$ (CHI-Quadrat)	4,24	
<b>Wahrscheinlichkeit</b>	<b>75</b>	%
Wiederfindungsrate	91	%

#### Normalverteilung

Probenanzahl	8	
Mittelwert	30,6	mg/kg
Standardabweichung	2,72	mg/kg
rel. Standardabweichung	8,89	%
Horwitz Standardabweichung	9,56	%
<b>HorRat-Wert</b>	<b>0,93</b>	
Wiederfindungsrate	91	%

**Microtracer Homogenitätstest****DLA ptALR1 (2021) Probe 3**

Gewicht Gesamtprobe	1,00	kg
Microtracer	FSS-rot lake	
Teilchengröße	75 – 300	µm
Gewicht pro Partikel	2,0	µg
Tracerzugabe	22,4	mg/kg

**Analysenergebnisse:**

Probe	Einwaage [g]	Partikel Anzahl	Partikel [mg/kg]
1	4,99	39	15,6
2	5,02	46	18,3
3	4,98	39	15,7
4	5,02	52	20,7
5	5,01	42	16,8
6	4,98	50	20,1
7	5,01	49	19,6
8	5,01	44	17,6

**Poisson-Verteilung**

Probenanzahl	8	
Freiheitsgrad	7	
Mittelwert	45,1	Partikel
Standardabweichung	4,91	Partikel
$\chi^2$ (CHI-Quadrat)	3,75	
<b>Wahrscheinlichkeit</b>	<b>81</b>	%
Wiederfindungsrate	81	%

**Normalverteilung**

Probenanzahl	8	
Mittelwert	18,0	mg/kg
Standardabweichung	1,96	mg/kg
rel. Standardabweichung	10,9	%
Horwitz Standardabweichung	10,4	%
<b>HorRat-Wert</b>	<b>1,1</b>	
Wiederfindungsrate	81	%

**Microtracer Homogenitätstest****DLA ptALR1 (2021) Probe 4**

Gewicht Gesamtprobe	1,00	kg
Microtracer	FSS-rot lake	
Teilchengröße	75 – 300	µm
Gewicht pro Partikel	2,0	µg
Tracerzugabe	30,6	mg/kg

**Analysenergebnisse:**

Probe	Einwaage [g]	Partikel Anzahl	Partikel [mg/kg]
1	5,00	73	29,2
2	4,99	62	24,8
3	4,98	71	28,5
4	5,02	76	30,3
5	5,00	72	28,8
6	5,00	64	25,6
7	4,98	68	27,3
8	4,98	68	27,3

**Poisson-Verteilung**

Probenanzahl	8	
Freiheitsgrad	7	
Mittelwert	69,2	Partikel
Standardabweichung	4,59	Partikel
$\chi^2$ (CHI-Quadrat)	2,13	
<b>Wahrscheinlichkeit</b>	<b>95</b>	%
Wiederfindungsrate	91	%

**Normalverteilung**

Probenanzahl	8	
Mittelwert	27,7	mg/kg
Standardabweichung	1,84	mg/kg
rel. Standardabweichung	6,62	%
Horwitz Standardabweichung	9,70	%
<b>HorRat-Wert</b>	<b>0,68</b>	
Wiederfindungsrate	91	%

**Microtracer Homogenitätstest****DLA ptALR1 (2021) Probe 5**

Gewicht Gesamtprobe	1,01	kg
Microtracer	FSS-rot lake	
Teilchengröße	75 – 300	µm
Gewicht pro Partikel	2,0	µg
Tracerzugabe	22,2	mg/kg

**Analysenergebnisse:**

Probe	Einwaage [g]	Partikel Anzahl	Partikel [mg/kg]
1	4,99	54	21,6
2	5,03	52	20,7
3	5,02	55	21,9
4	5,01	70	27,9
5	5,00	55	22,0
6	5,02	58	23,1
7	4,99	57	22,8
8	5,00	56	22,4

**Poisson-Verteilung**

Probenanzahl	8	
Freiheitsgrad	7	
Mittelwert	57,1	Partikel
Standardabweichung	5,52	Partikel
$\chi^2$ (CHI-Quadrat)	3,73	
<b>Wahrscheinlichkeit</b>	<b>81</b>	%
Wiederfindungsrate	103	%

**Normalverteilung**

Probenanzahl	8	
Mittelwert	22,8	mg/kg
Standardabweichung	2,20	mg/kg
rel. Standardabweichung	9,66	%
Horwitz Standardabweichung	10,0	%
<b>HorRat-Wert</b>	<b>0,97</b>	
Wiederfindungsrate	103	%

### 5.3 Informationen zur Eignungsprüfung (EP)

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

EP-Nummer	<b>DLA ptALR1-2021</b>
EP-Name	<b>Response PT Erdnuss: rozessierte Proben Erdnuss (ungeröstet), Erdnuss (geröstet), Erdnussbutter, Erdnusspaste und Extrudat (Erdnuss-Flips) in Kartoffelpulver-Matrix</b>
Probenmatrix*	<b>Proben 1-6:</b> Trägermatrix / Zutaten: Kartoffelpulver (ca. 75%), Maltodextrin (ca. 25%) sowie weitere Zusatzstoffe und Allergene Lebensmittel (nur in Proben 1-5)
Probenzahl und Probenmenge	5 unterschiedliche Proben je 20 g + 1 „Null-Probe“ 20 g
Lagerungsinformation	Proben 1 bis 6: Raumtemperatur (EP-Zeitraum), gekühlt 2 - 10 °C (Langzeit)
Verwendungszweck	Ausschließlich für Laboruntersuchungen (Qualitätskontrollproben)
Parameter	qualitativ + quantitativ: Erdnuss / Erdnussprotein/ Erdnuss-DNA aus Erdnuss (ungeröstet), Erdnuss (geröstet), Erdnussbutter, Erdnusspaste und Extrudat (Erdnuss-Flips) in Proben 1-5: ca. 15 - 150 mg/kg (als Gesamt-Erdnuss)
Untersuchungsmethoden	Methode ist freigestellt
Hinweise zur Analyse	Die Untersuchung der Eignungsprüfung soll entsprechend einer laborüblichen Routineanalyse vorgenommen werden. Generell empfehlen wir vor der Analyse, insbesondere bei kleinen Analyseneinwaagen, eine repräsentative Probenmenge entsprechend guter Laborpraxis zu homogenisieren. Vorzugsweise ist die Gesamtmenge zu homogenisieren.
Ergebnisangabe	Es werden für jede Probe 1 - 6 je ein Ergebnis ermittelt. Die Einzelergebnisse sind in die Ergebnisabgabe-Datei einzutragen, bei Mehrfachbestimmungen der Mittelwert.
Einheiten	mg/kg
Anzahl von signifikanten Stellen	mindestens 2 signifikante Stellen
Ergebnisabgabe	Die Ergebnisabgabe-Datei wird per eMail übermittelt an: <b>pt@dla-lvu.de</b>
Letzter Abgabetermin	<b>Spätestens 11.Juni 2021.</b>
Auswertebericht	Der Auswertebericht wird voraussichtlich 6 Wochen nach Abgabetermin der Ergebnisse fertiggestellt und per eMail als PDF-Datei zugesandt.
Koordinator und Ansprechpartner der EP	Dr. Matthias Besler-Scharf

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

## 6. Verzeichnis der Teilnehmer in alphabetischer Reihenfolge

Teilnehmer / Participant	Ort / Town	Land / Country
		Deutschland
		Deutschland
		CANADA
		Deutschland

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

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

## 7. Verzeichnis relevanter Literatur

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

- Quantitative Food Allergen ELISA Methods: Community Guidance and Best Practices  
JAOAC Int. 93:442-50 (2010)
24. Working Group on Prolamin Analysis and Toxicity (WGPAT): Méndez et al. Report of a collaborative trial to investigate the performance of the R5 enzyme linked immunoassay to determine gliadin in gluten-free food. Eur J Gastroenterol Hepatol. 17:1053-63 (2005)
  25. DLA Publikation: Performance of ELISA and PCR methods for the determination of allergens in food: an evaluation of six years of proficiency testing for soy (Glycine max L.) and wheat gluten (Triticum aestivum L.); Scharf et al.; J Agric Food Chem. 61(43):10261-72 (2013)
  26. EFSA (2014) Scientific Opinion on the evaluation of allergenic foods and food ingredients for labelling purposes<sup>1</sup>, EFSA Panel on Dietetic Products, Nutrition and Allergies (NDA), European Food Safety Authority (EFSA), Parma, Italy, EFSA Journal 2014;12(11):3894
  27. IRMM, Poms et al.; Inter-laboratory validation study of five different commercial ELISA test kits for determination of peanut residues in cookie and dark chocolate; European Commission, Joint Research Centre, Belgium; GE/R/FSQ/D08/05/2004
  28. Jayasena et al. (2015) Comparison of six commercial ELISA kits for their specificity and sensitivity in detecting different major peanut allergens. J Agric Food Chem. 2015 Feb 18;63(6):1849-55
  29. ASU §64 LFGB L 06.00-56 Bestimmung von Sojaprotein in Fleisch und Fleischerzeugnissen Enzymimmunologisches Verfahren (2007) [Determination of soyprotein in meat and meat products by enzyme immunoassay]
  30. ASU §64 LFGB L 00.00-69 Bestimmung von Erdnuss-Kontaminationen in Lebensmitteln mittels ELISA im Mikrotiterplattensystem (2003) [Foodstuffs, determination of peanut contaminations in foodstuffs by ELISA in microtiterplates]
  31. ASU §64 LFGB L 44.00-7 Bestimmung von Haselnuss-Kontaminationen in Schokolade und Schokoladenwaren mittels ELISA im Mikrotiterplattensystem (2006) [Foodstuffs, determination of hazelnut contaminations in chocolate and chocolate products by ELISA in microtiterplates]
  32. ASU §64 LFGB L 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 ptALR1 (2021) – Response PT Erdnuss**

Alle 9 Teilnehmer haben Ergebnisse eingereicht. Es wurden 6 LVU-Proben für den qualitativen Nachweis und die quantitative Bestimmung von Erdnuss (geröstet und ungeröstet), Erdnussbutter, Erdnusspaste und Erdnuss-Extrudat (Erdnussflips) in einer Trägermatrix sowie eine „Null“-Probe zur Verfügung gestellt. Die Teilnehmer-Ergebnisse wurden *qualitativ* mit einem Score von 1-5 bewertet, der angibt wie viele prozessierte Produkte erfolgreich erfasst wurden. Die quantitativen Ergebnisse wurden mit einem Wiederfindungs-Score (*WFR-Score*) bewertet, der angibt wie viele Ergebnisse im Bereich einer Wiederfindungsrate von 50 - 150% des Dotierungs-Levels liegen. Die Auswertung erfolgte getrennt nach ELISA- und PCR-Methoden. Details sind dem Auswertebereich zu entnehmen. Ein Teilnehmer hatte seinen Sitz in Kanada in den USA.