



Auswertungs-Bericht

Laborvergleichsuntersuchung

DLA ptALR2 (2021)

Response PT Gluten:

**5 prozessierte Proben Weizenmehl, Brot,
Nudeln (Hartweizen), Bulgur (vorgekochter
Weizen) und Seitan (Glutenprotein)**

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

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

<i>EP-Anbieter</i> <i>PT-Provider</i>	DLA - Proficiency Tests GmbH Hauptstr. 80, 23845 Oering, Germany Geschäftsführer/CEO: Dr. Matthias Besler-Scharf Stellv. Leitung/Deputy Lead: Alexandra Scharf MSc. Tel. ++49-(0)4532-9183358 Mob. ++49(0)171-1954375 Fax. ++49(0)4102-9944976 eMail. proficiency-testing@dla-lvu.de
<i>EP-Nummer</i> <i>PT-Number</i>	DLA ptALR2 (2021)
<i>EP-Koordinator</i> <i>PT-Coordinator</i>	Dr. Matthias Besler-Scharf
<i>Status des EP-Bericht</i> <i>Status of PT-Report</i>	Abschlussbericht / Final report (16. Februar 2022) Gültig ist die jeweils letzte Version/Korrektur des Berichts. Sie ersetzt alle vorangegangenen Versionen. Only the latest version/correction of the report is valid. It replaces all preceding versions.
<i>EP-Bericht Freigabe</i> <i>PT-Report Authorization</i>	Dr. Matthias Besler-Scharf (Technischer Leiter / Technical Manager) - <i>gezeichnet / signed M. Besler-Scharf</i> Alexandra Scharf MSc. (QM-Beauftragte / Quality Manager) - <i>gezeichnet / signed A. Scharf</i> Datum / Date: 16. Februar 2022
<i>Unteraufträge</i> <i>Subcontractors</i>	Im Rahmen dieser Eignungsprüfung wurden nachstehende Leistungen im Unterauftrag vergeben: Proteinbestimmung As part of the present proficiency test the following services were subcontracted: protein determination
<i>Vertraulichkeit</i> <i>Confidentiality</i>	Die Teilnehmerergebnisse sind im EP-Bericht in anonymisierter Form mit Auswertenummern benannt. Daten einzelner Teilnehmer werden ausschließlich nach vorheriger Zustimmung des Teilnehmers an Dritte weitergegeben. Participant result are named anonymously with evaluation numbers in the PT report. Data of individual participants will be passed on to third parties only with prior consent of the participant.

Inhalt

1. Einleitung.....	4
2. Durchführung.....	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 Weizenprodukte.....	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.....	26
5.2.1 Mischungshomogenität vor der Abfüllung.....	26
5.3 Informationen zur Eignungsprüfung (EP).....	29
6. Verzeichnis der Teilnehmer in alphabetischer Reihenfolge.....	30
7. Verzeichnis relevanter Literatur.....	31

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 Gluten-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 Gluten in Weizenmehl, Brot, Nudeln (Hartweizen), Bulgur (vorgekochter Hartweizen) und Seitan (Glutenprotein) in Kartoffelpulver/Maltodextrin zur Verfügung gestellt.

Die jeweiligen Rohstoffe für die Probenreihe waren handelsübliche teils prozessierte Weizenprodukte. Pro PT-Probe wurden jeweils 5-21 Produkte unterschiedlicher Herkunft verarbeitet. Die Seitan-Zubereitung wurde nach dem Kochen vor der weiteren Verwendung gefriergetrocknet.

Es wurden Vormischungen mit Gehalten von ca. 6 - 10 % der betreffenden allergenen Zutaten als Gluten hergestellt (s. Tab. 1). Hierzu wurden die Produkte ggf. vorzerkleinert, gravimetrisch mit weiteren Zutaten gemischt, mittels 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 Gluten-Gehalte der PT-Probenreihe lagen im Bereich von ca. 30-44 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 Gluten.

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
	Nudeln	Brot	Bulgur	Weizenmehl	Seitan	„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: prozessierte Allergenprodukte (mit je ca. 6% - 10% Gluten) und Maltodextrin (nur Seitan)	0,042	0,046	0,040	0,041	0,045	-
Allergen-Gehalte	mg/kg	mg/kg	mg/kg	mg/kg	mg/kg	mg/kg
Nudeln* (Hartweizen) Zutaten: Hartweizengrieß, Wasser Protein 12,4% ** (5 Trockenprodukte aus Europa)	418	-	-	-	-	-
Weißbrot* (Weichweizen) Zutaten: Weizenmehl, Wasser, Hefe, Salz, Rapsöl, Säureregulator E262, Invertzuckersirup, Weizenmalzmehl, Antioxidationsmittel E300 Protein 11,1% ** (5 Produkte aus Deutschland)	-	456	-	-	-	-
Bulgur* (Hartweizen) Zutaten: Bulgur (Hartweizen, vorgekocht) Protein 11,8% ** (5 Trockenprodukte aus Europa)	-	-	402	-	-	-
Weizenmehl* (Weichweizen) Protein 10,1 % ** (21 Produkte aus Europa, Asien, USA)	-	-	-	414	-	-
Seitan* (Weizeneiweiß) (gekocht 100°C, 30 min, gefriergetrocknet) Zutaten: Seitan-Pulver (#), Wasser, Salz Protein 69,9% ** (# 5 Produkte aus Europa)	-	-	-	-	44,8	-
- als Gluten***	33,0	43,5	30,1	36,0	29,8	-
erweiterte kombinierte Unsicherheit (k=2) des Gluten-Gehalts (= ± 12 %)	± 3,96	± 5,22	± 3,61	± 4,32	± 3,58	-

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

** Proteingehalt gemäß Laboranalyse der Rohstoffmischungen (Gesamtstickstoff nach Kjeldahl mit F=5,7 für Weizenprotein)

*** Glutengehalte gemäß Literaturangaben berechnet (für Weichweizen ca. 8,7% Gluten in Weizenmehlen (von DLA bezogen auf 10,1% Gesamt-Protein) [39]; für Hartweizen ca. 7,7% Gluten und 12,1% Gesamt-Protein in Hartweizenmehlen) [40]); für Seitan ca. 79,9% Gluten und 83,5% Gesamt-Protein in Weizenkleber-Produkten (Vital Gluten) [41])

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 1-5 hat eine Wahrscheinlichkeit von 44%, 47%, 72%, 79% bzw. 78% ergeben. Die Partikel-Ergebnisse wurden zusätzlich in Konzentrationen umgerechnet, statistisch als Normalverteilung ausgewertet und mit der Standardabweichung nach Horwitz verglichen. Für die Beurteilung sind HorRat-Werte zwischen 0,3 und 1,3 unter Wiederholbedingungen (Messungen innerhalb des Labors) zu akzeptieren [17]. Es wurden HorRat-Werte von 1,2, 1,2, 0,95, 1,1 bzw. 0,92 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. 0,36 - 0,46 (20,5 - 21,4°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 39. Kalenderwoche 2021 je eine Portion der Untersuchungsmaterialien 1 bis 6 verschickt. Die Untersuchungsverfahren wurden freigestellt. Die Untersuchungen waren durchzuführen bis spätestens 26. November 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 Gluten (Weizen) in einfacher Trägermatrix sowie eine „Null“-Probe (Trägermatrix).

- *Die Proben 1-5 sind in zufälliger Reihenfolge nummeriert und enthalten Weizenmehl, Brot, Nudeln (Hartweizen), Bulgur (vorgekochter Weizen) und Seitan (Glutenprotein).*
- *Bitte geben Sie alle quantitativen Ergebnisse als Gluten oder Weizen/glutenhaltige Getreide an.*
Mögliche Umrechnungsfaktoren auf die verschiedenen prozessierten Produkte 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.

12 von 13 Teilnehmern haben mindestens für eine Methode Ergebnisse abgegeben. Ein Teilnehmer hat keine Ergebnisse übermittelt.

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 Gluten fünf verschiedenartig prozessierte Produkte, Weizenmehl, Brot, Nudeln (Hartweizen), Bulgur (vorgekochter Hartweizen) und Seitan (Glutenprotein) 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 Nudeln	Probe 2 Brot	Probe 3 Bulgur	Probe 4 Weizenmehl	Probe 5 Seitan	Probe 6 „Null“	Score qualitativ	Eignung 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 11 – 120% für die PCR-Methoden (Weizen und Roggen / Gluten) erhalten (s. Tab. 3a und 3b). Die angegebenen Zielstandardabweichungen σ_{pt} wurden für eine Anzahl von $m = 2$ Wiederholmessungen berechnet.

Tabelle 3a: ELISA-Methoden – Wiederfindungsraten und Präzisionsdaten ausgewählter Auswertungen von Versuchen zur Präzision [31-32]

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%	

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 [31]. 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 [31].

Das IRMM (Institute for Reference Materials and Measurements) hat in einem Ringversuch die Eignung fünf verschiedener ELISA-Test-Kits zur Bestimmung von Erdnuss getestet [34]. 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 - Relative Wiederholstandardabweichungen (RSD_r) und relative Vergleichsstandardabweichungen (RSD_R) gemäß ausgewählter Auswertungen von Versuchen zur Präzision und die resultierende Zielstandardabweichung σ_{pt} [32-36]

Parameter	Matrix	Mittelwerte [mg/kg]	Wiederfindung	rob RSD_r	RSD_r	RSD_R	σ_{pt}	Methode / Literatur
Mandel	Reiskekse	105,2 18,0 10,5	105 % 90 % 105 %	-	19,3% 44,0% 32,0%	27,5% 49,1% 38,8%	23,9% 38,0% 31,5%	rt-PCR ASU 18.00-20
Mandel	Weizenkekse Soßenpulver	114,3 88,1	94,6 % 88,1 %	-	22,1% 43,9%	41,8% 43,1%	38,8% - %	rt-PCR ASU 18.00-20
Mandel	Reiskekse	109 21,3 12,3	109 % 107 % 121 %	-	17,6% 35,8% 32,0%	32,8% 45,0% 47,8%	30,3% 37,2% 42,1%	rt-PCR 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 ASU 18.00-22
Sesam	Reiskekse	94,6 15,7 9,8	95 % 79 % 98 %	-	22,5% 26,0% 20,9%	27,5% 39,5% 33,5%	22,4% 35,0% 30,0%	rt-PCR ASU 18.00-19
Sesam	Weizenkekse Soßenpulver	96,9 59,8	79 % 60 %	-	21,8% 22,2%	33,0% 43,2%	29,2% 40,2%	rt-PCR ASU 18.00-19
Sesam	Reiskekse	88,9 17,8 9,8	89 % 89 % 98 %	-	18,2% 34,2% 26,2%	30,5% 37,8% 37,0%	27,7% 29,1% 32,0%	rt-PCR ASU 18.00-22
Sesam	Weizenkekse Soßenpulver	115 58,5	93 % 59 %	-	16,7% 30,8%	41,1% 44,4%	39,4% 38,7%	rt-PCR ASU 18.00-22
Soja	Weizenmehl Maismehl	107 145	107 % 145 %	63 % 34 %	- -	31 % 24 %	- -	rt-PCR ASU 16.01-9
Weizen + Roggen	Brühwurst (100°C, 60 min)	96,1	120 %	-	21,3%	35,4%	32,0%	rt-PCR ASU 08.00-66
Weizen + Roggen	Wurst, autoklaviert	74,9	11,0 %	-	24,6%	32,7%	27,7%	rt-PCR ASU 08.00-66

3.2.2 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

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

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

Tabelle 5: PCR-Validierungskriterien

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

(a) = Trueness / Richtigkeit

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

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

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.

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.

In der vorliegenden LVU wurden alle Ergebnisse als Gluten abgegeben, so dass 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 „Null“	Score qualitativ	Methode	Hinweis
	pos/neg	pos/neg	pos/neg	pos/neg	pos/neg	pos/neg	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 Weizenprodukte

4.1.1 Qualitative Scores: ELISA-Methoden

Auswertenummer	Probe 1 Nudeln	Probe 2 Brot	Probe 3 Bulgur	Probe 4 Weizenmehl	Probe 5 Seitan	Probe 6 „Null“	Score qualitativ	Methode	Hinweis
	pos/neg	pos/neg	pos/neg	pos/neg	pos/neg	pos/neg	Anzahl erfasster Proben 1-5		
11	positiv	positiv	positiv	positiv	positiv	negativ	5 (100%)	PB	
1	positiv	positiv	positiv	positiv	positiv	negativ	5 (100%)	RS	
3	positiv	positiv	positiv	positiv	positiv	negativ	5 (100%)	RS	
7	positiv	positiv	positiv	positiv	positiv	negativ	5 (100%)	RS	
8	positiv	positiv	positiv	positiv	positiv	negativ	5 (100%)	RS	
10	positiv	positiv	positiv	positiv	positiv	negativ	5 (100%)	RS	
12	positiv	positiv	positiv	positiv	positiv	negativ	5 (100%)	RS	
2a	positiv	positiv	positiv	positiv	positiv	negativ	5 (100%)	RS-F	
4	positiv	positiv	positiv	positiv	positiv	negativ	5 (100%)	RS-F	
6	positiv	positiv	positiv	positiv	positiv	negativ	5 (100%)	RS-F	
9	positiv	positiv	positiv	positiv	positiv	negativ	5 (100%)	RS-F	
2b	positiv	positiv	positiv	positiv	positiv	negativ	5 (100%)	SP-R5	

	Probe 1	Probe 2	Probe 3	Probe 4	Probe 5	Probe 6
Anzahl positiv	12	12	12	12	12	0
Anzahl negativ	0	0	0	0	0	12
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:

PB = Allergen-Shield ELISA, ProGnosis Biotech
 RS = Ridascreen®, R-Biopharm
 RS-F= Ridascreen® Fast, R-Biopharm
 SP-R5 = SensiSpec Ingezim Gluten R5, Eurofins

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 Nudeln	Probe 2 Brot	Probe 3 Bulgur	Probe 4 Weizenmehl	Probe 5 Seitan	Probe 6 „Null“	Score qualitativ	Methode	Hinweis
	pos/neg	pos/neg	pos/neg	pos/neg	pos/neg	pos/neg	Anzahl erfasster Proben 1-5		
5	positiv	positiv	positiv	positiv	positiv	negativ	5 (100%)	SFA	
10	positiv	positiv	positiv	positiv	positiv	negativ	5 (100%)	SFA-Q	
2	positiv	positiv	positiv	positiv	positiv	negativ	5 (100%)	div	

	Probe 1	Probe 2	Probe 3	Probe 4	Probe 5	Probe 6
Anzahl positiv	3	3	3	3	3	0
Anzahl negativ	0	0	0	0	0	3
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:

SFA = Sure Food ALLERGEN, R-Biopharm / Congen
 SFA-Q = Sure Food Allergen Quant, R-Biopharm / Congen
 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.

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

Auswertenummer	Probe 1 Nudeln			Probe 2 Brot			Probe 3 Bulgur			Probe 4 Weizenmehl			Probe 5 Seitan			WFR-Score	Methode	Hinweis	
	Ergebnis		WFR *	Ergebnis		WFR *	Ergebnis		WFR *	Ergebnis		WFR *	Ergebnis		WFR *	WFR *			
	[mg/kg]	[%]	[Z _{WFR}]	[mg/kg]	[%]	[Z _{WFR}]	[mg/kg]	[%]	[Z _{WFR}]	[mg/kg]	[%]	[Z _{WFR}]	[mg/kg]	[%]	[Z _{WFR}]	Anzahl in AB**			
11	34,2	104	0,15	80,0	184	3,4	20,2	67	-1,3	58,6	163	2,5	58,2	195	3,8	2/5 (40%)	PB		
1	17,8	54	-1,8	58,1	134	1,3	12,3	41	-2,4	51,9	144	1,8	43,2	145	1,8	4/5 (80%)	RS		
3																	RS		
7	21,5	65	-1,4	58,6	135	1,4	16,9	56	-1,8	32,8	91	-0,35	32,8	110	0,40	5/5 (100%)	RS		
8	19,7	60	-1,6	52,0	120	0,78	14,8	49	-2,0	44,8	124	0,98	36,8	123	0,94	5/5 (100%)	RS		
10	18,1	55	-1,8	63,3	146	1,8	19,2	64	-1,4	43,6	121	0,84	34,3	115	0,60	5/5 (100%)	RS		
12	25,8	78	-0,87	66,6	153	2,1	13,0	43	-2,3	35,6	99	-0,04	42,8	144	1,7	3/5 (60%)	RS		
2a	34,0	103	0,12	61,0	140	1,6	23,0	76	-0,94	55,0	153	2,1	49,0	164	2,6	3/5 (60%)	RS-F		
4	20,9	63	-1,5	61,0	140	1,6	17,9	59	-1,6	47,9	133	1,3	33,3	112	0,47	5/5 (100%)	RS-F		
6	34,0	103	0,12	62,0	143	1,7	18,0	60	-1,6	56,0	156	2,2	60,0	201	4,1	3/5 (60%)	RS-F		
9	20,7	63	-1,5	45,5	105	0,19	15,3	51	-2,0	36,8	102	0,09	36,7	123	0,93	5/5 (100%)	RS-F		
2b	33,0	100	0,00	41,0	94	-0,23	9,20	31	-2,8	44,0	122	0,89	29,0	97	-0,11	4/5 (80%)	SP-R5		
AB**		50-150 %		AB**		50-150 %		AB**		50-150 %		AB**		50-150 %					
Anzahl in AB		11		Anzahl in AB		9		Anzahl in AB		8		Anzahl in AB		8					
Prozent in AB		100		Prozent in AB		82		Prozent in AB		73		Prozent in AB		73					

Methoden:
 PB = Allergen-Shield ELISA, ProGnosis Biotech
 RS = Ridascreen®, R-Biopharm
 RS-F= Ridascreen® Fast, R-Biopharm
 SP-R5 = SensiSpec INgezim Gluten R5, Eurofins

* Wiederfindungsrate 100% Bezugsgröße: Gluten, s. Seite 5
 ** Akzeptanzbereich der AOAC für Allergen-ELISAs

Anmerkung:

Für die Proben 1-5 lagen 73 - 100% der Wiederfindungsraten der Teilnehmerergebnisse im Akzeptanzbereich von 50-150%. Dabei lagen die Mittelwerte der Wiederfindungsraten für die Produkte aus Weichweizen mit 136% (Brot), 128% (Weizenmehl) und 139% (Seitan) über 100%. Demgegenüber lagen die Wiederfindungsraten für die Produkte aus Hartweizen mit 77% (Nudeln) und 54% (Bulgur) unter 100%.

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

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

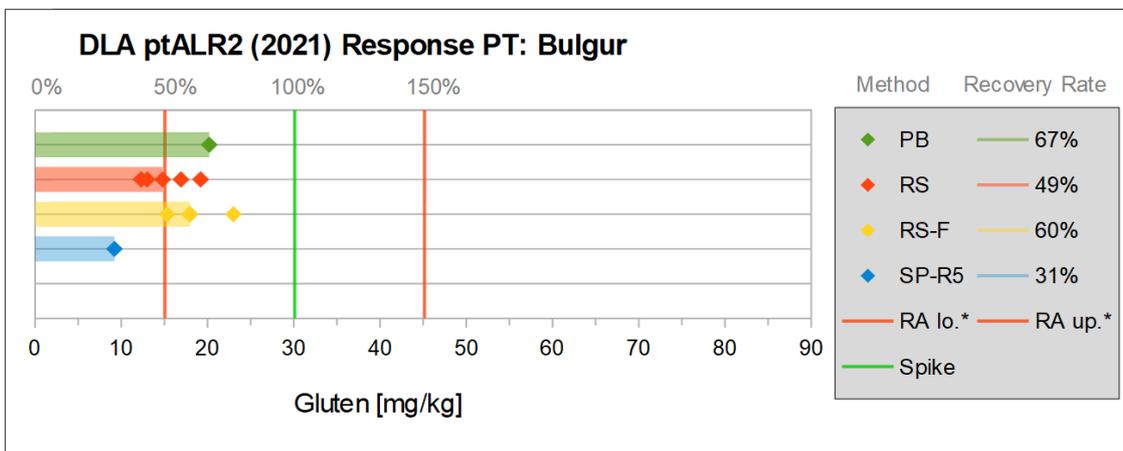
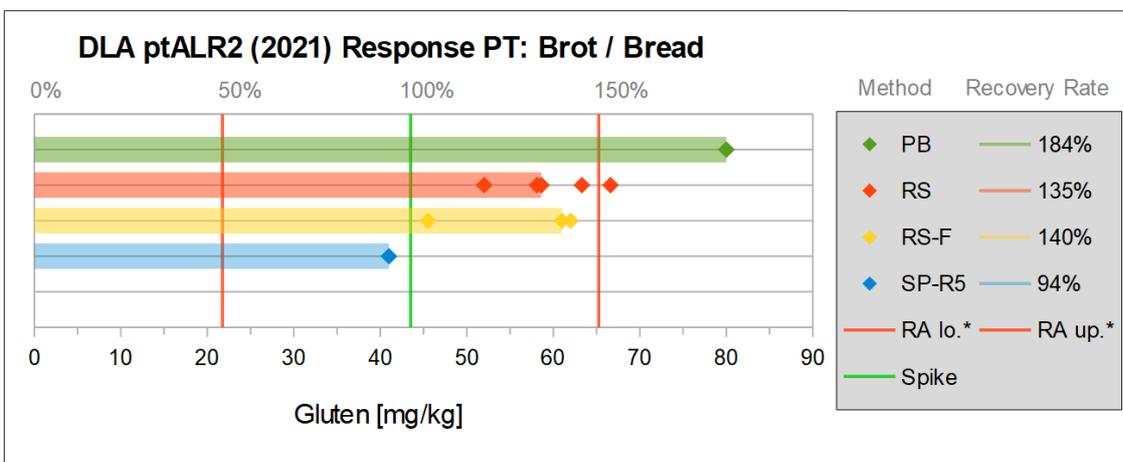
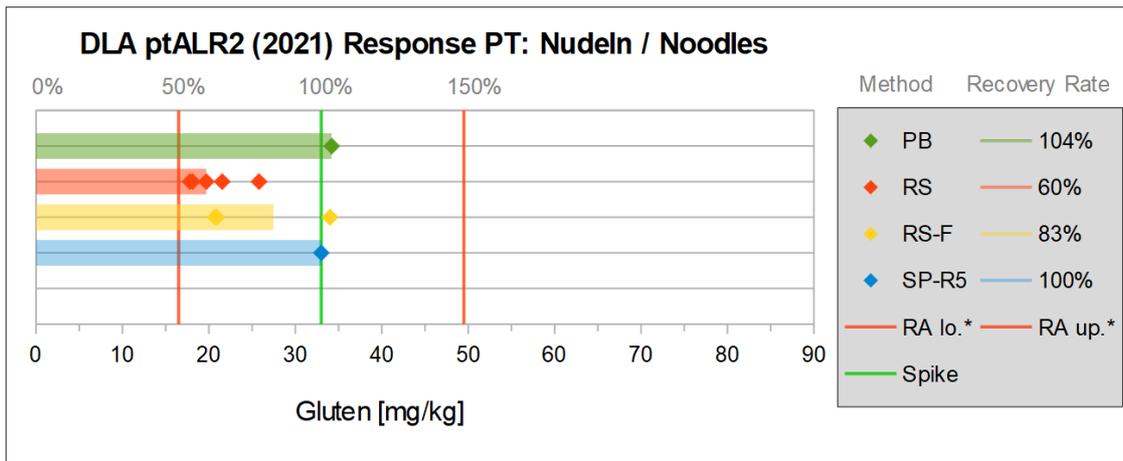


Abb./Fig. 1: Darstellung der Einzelergebnisse (Proben 1-3) getrennt nach Methoden mit Angabe der durchschnittlichen Wiederfindungsrate (Recovery Rate), untere Skala Gluten in mg/kg, obere Skala Wiederfindungsrate in %, mit * Akzeptanzbereich von 50% - 150% (* range of acceptance: RA lower limit bis RA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

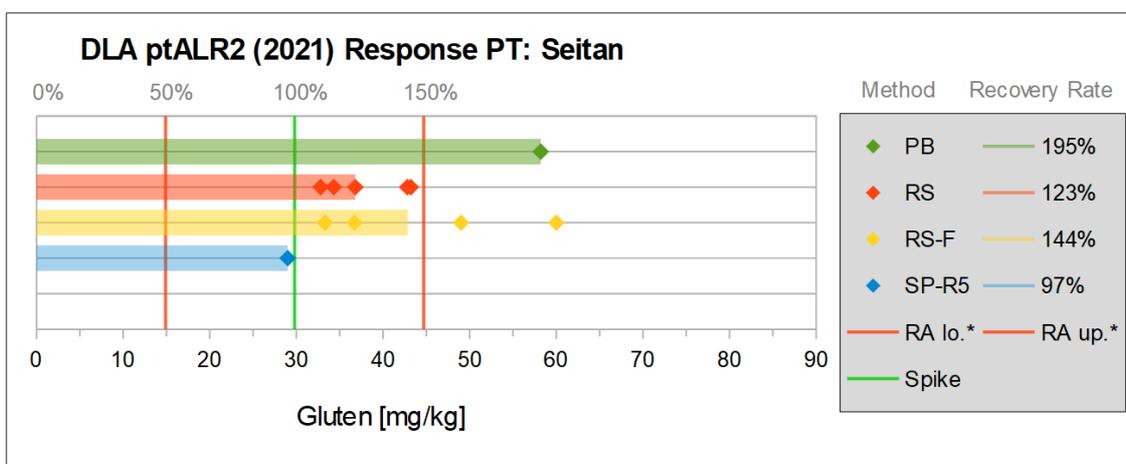
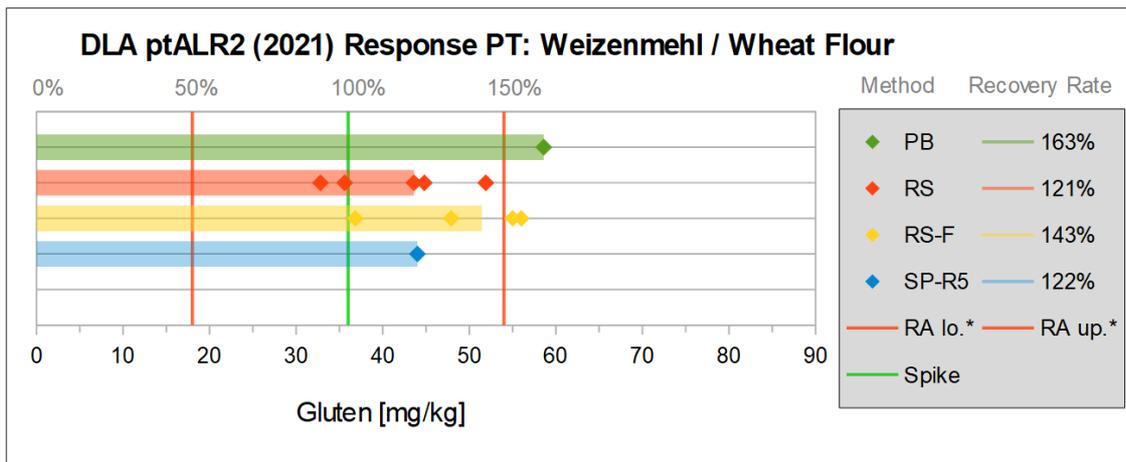


Abb./Fig. 2: Darstellung der Einzelergebnisse (Proben 4 und 5) getrennt nach Methoden mit Angabe der durchschnittlichen Wiederfindungsrate (Recovery Rate), untere Skala Gluten in mg/kg, obere Skala Wiederfindungsrate in %, mit * Akzeptanzbereich von 50% - 150% (* range of acceptance: RA lower limit bis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

4.2 z-Scores der Teilnehmer: Übersichtstabelle

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

Auswertenummer	ELISA Gluten					PCR Gluten-haltige Getreide				
	Probe 1	Probe 2	Probe 3	Probe 4	Probe 5	Probe 1	Probe 2	Probe 3	Probe 4	Probe 5
1	-1,8	1,3	-2,4	1,8	1,8					
2a	0,12	1,6	-0,94	2,1	2,6					
2b	0,00	-0,2	-2,8	0,89	-0,11					
3										
4	-1,5	1,6	-1,6	1,3	0,47					
5										
6	0,12	1,7	-1,6	2,2	4,1					
7	-1,4	1,4	-1,8	-0,35	0,40					
8	-1,6	0,8	-2,0	0,98	0,94					
9	-1,5	0,2	-2,0	0,09	0,93					
10	-1,8	1,8	-1,4	0,84	0,60					
11	0,15	3,4	-1,3	2,5	3,8					
12	-0,87	2,1	-2,3	-0,04	1,7					

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-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
			Tag/Monat	qualitativ	mg/kg	qualitativ												
PB	11	05.11.2021	positiv	34,2	positiv	80,0	positiv	20,2	positiv	58,6	positiv	58,2	negativ	<LOQ	2,5	5	30%	Gluten
RS	1	09.11.21	positiv	17,8	positiv	58,1	positiv	12,3	positiv	51,9	positiv	43,2	negativ		5	5		Gluten
RS	3	10.01.2022	positiv		negativ		0,5											
RS	7	08.11.21	positiv	21,54	positiv	58,61	positiv	16,91	positiv	32,81	positiv	32,8	negativ	<5	1	5		Gluten
RS	8	25.10.	positiv	19,7	positiv	52	positiv	14,8	positiv	44,8	positiv	36,8	negativ	< 5,00	1	< 5,00		Gluten
RS	10	22.10.21	positiv	18,1	positiv	63,3	positiv	19,2	positiv	43,6	positiv	34,3	negativ		5	5	33,8	Gluten
RS	12		positiv	25,8	positiv	66,6	positiv	13	positiv	35,6	positiv	42,8	negativ	<5				Gluten
RS-F	2a	12.10.	positiv	34	positiv	61	positiv	23	positiv	55	positiv	49	negativ	<5	<3	<5		Gluten
RS-F	4	02.11.21	positiv	20,9	positiv	61	positiv	17,9	positiv	47,9	positiv	33,3	negativ		5	5	50%	Gluten
RS-F	6	16.11.21	positiv	34	positiv	62	positiv	18	positiv	56	positiv	60	negativ		0,5	5	50%	Gluten
RS-F	9	11/26/21	-	20,69	-	45,52	-	15,3	-	36,84	-	36,7	-	< 10	1	10	-	Gluten
SP-R5	2b	12.10.	positiv	33	positiv	41	positiv	9,2	positiv	44	positiv	29	negativ	<3,12	3,12	3,12		Gluten

* 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	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	
PB	11	andere: prognosis biotech	peroxidase-konjugierter Antikörper gegen Gliadin	-	2.5ml Cocktail-Lösung bei 50°C für 40min, 7.5ml 80%EtOH schütteln für 1h, Verdünnung 2.3ml PBS & 200ul extrahierte Probe	nein	
RS	1	Ridascreen® Gliadin R7001, R-Biopharm			gemäß Handbuch	ja	
RS	3	Ridascreen®, R-Biopharm	Monoklonaler Antikörper R5		cocktail solution (50°C 40 min), ethanol 80% (60 min)	ja	
RS	7	Ridascreen® Gliadin R7001, R-Biopharm	Gliadin/Prolamine		lt. Testkit-Beschreibung	ja	
RS	8	Ridascreen® Gliadin R7001, R-Biopharm			nach Herstelleranleitung	ja	
RS	10	Ridascreen® Gliadin R7001, R-Biopharm				ja	
RS	12	Ridascreen® Gliadin R7001, R-Biopharm					
RS-F	2a	Ridascreen® FAST Gliadin R7002, R-Biopharm	R5 Mendez, erkennt Prolamine (Gliadine) aus Weizen, Roggen und Gerste		lt. Herstellerangaben	ja	
RS-F	4	Ridascreen® Gliadin R7001, R-Biopharm			Extraktion mit Cocktaillösung	ja	
RS-F	6	Ridascreen® FAST Gliadin R7002, R-Biopharm	R5 Antikörper		Kit-Hersteller, mittels Cocktail-Lsg	ja	
RS-F	9	Ridascreen® FAST Gliadin R7002, R-Biopharm			Probe: 0,25g-Extraktion: 2,5 ml Extr.Lsg.(15 min-60°C)+7,5 ml 80% Ethanol (10 min-60°C)		
SP-R5	2b	SENSISpec Ingezim Gluten R5 30.GLU.K2, Eurofins	R5 Mendez, erkennt Prolamine (Gliadine) aus Weizen, Roggen und Gerste		lt. Herstellerangaben	ja	

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
			qualitativ	mg/kg														
SFA	5		positiv		positiv		positiv		positiv		positiv		negativ		0,4	1		bevorzugt als Erdnuss
SFA-Q	10	06.10.21	positiv		negativ		0,4			Glutenhaltige Getreide								
div	2	19.10.	positiv		negativ		5			Weizen-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	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	
SFA	5	Sure Food ALLERGEN, R-Biopharm / Congen			CTAB-Extraktion+ QIAquick Purification/ RealTime PCR nach Kit-Anweisung CTAB-Extraktion+ QIAquick Purification/ RealTime PCR nach Kit-Anweisung	nein	
SFA-Q	10	Sure Food Allergen Quant, R-Biopharm / Congen				ja	
div	2	interne Methode			/ Realtime PCR / 45 Zyclen	ja	

5.2 Homogenität

5.2.1 Mischungshomogenität vor der Abfüllung

Microtracer Homogenitätstest

DLA ptALR2 (2021) Sample 1

Gewicht Gesamtprobe	1,00	kg
Microtracer	FSS-rot lake	
Teilchengröße	75 – 300	µm
Gewicht pro Partikel	2,0	µg
Tracerzugabe	33,5	mg/kg

Analysenergebnisse:

Probe	Einwaage [g]	Partikel Anzahl	Partikel [mg/kg]
1	4,98	71	28,5
2	5,03	81	32,2
3	5,00	93	37,2
4	4,97	80	32,2
5	4,97	92	37,0
6	4,99	79	31,7
7	5,04	88	34,9
8	5,02	69	27,5

Poisson-Verteilung		
Probenanzahl	8	
Freiheitsgrad	7	
Mittelwert	81,6	Partikel
Standardabweichung	8,97	Partikel
χ^2 (CHI-Quadrat)	6,90	
Wahrscheinlichkeit	44	%
Wiederfindungsrate	97	%

Normalverteilung		
Probenanzahl	8	
Mittelwert	32,7	mg/kg
Standardabweichung	3,59	mg/kg
rel. Standardabweichung	11,0	%
Horwitz Standardabweichung	9,5	%
HorRat-Wert	1,2	
Wiederfindungsrate	97	%

Microtracer Homogenitätstest

DLA ptALR2 (2021) Sample 2

Gewicht Gesamtprobe	1,00	kg
Microtracer	FSS-rot lake	
Teilchengröße	75 – 300	µm
Gewicht pro Partikel	2,0	µg
Tracerzugabe	29,6	mg/kg

Analysenergebnisse:

Probe	Einwaage [g]	Partikel Anzahl	Partikel [mg/kg]
1	5,00	79	31,6
4	5,01	62	24,8
5	4,97	63	25,4
6	5,00	59	23,6
7	4,98	75	30,1
8	5,00	70	28,0
9	5,00	67	26,8
10	5,03	81	32,2

Poisson-Verteilung		
Probenanzahl	8	
Freiheitsgrad	7	
Mittelwert	69,5	Partikel
Standardabweichung	8,08	Partikel
χ^2 (CHI-Quadrat)	6,58	
Wahrscheinlichkeit	47	%
Wiederfindungsrate	94	%

Normalverteilung		
Probenanzahl	8	
Mittelwert	27,8	mg/kg
Standardabweichung	3,23	mg/kg
rel. Standardabweichung	11,6	%
Horwitz Standardabweichung	9,7	%
HorRat-Wert	1,2	
Wiederfindungsrate	94	%

Microtracer Homogenitätstest

DLA ptALR2 (2021) Sample 3

Gewicht Gesamtprobe	1,00	kg
Microtracer	FSS-rot lake	
Teilchengröße	75 – 300	µm
Gewicht pro Partikel	2,0	µg
Tracerzugabe	31,3	mg/kg

Analysenergebnisse:

Probe	Einwaage [g]	Partikel Anzahl	Partikel [mg/kg]
1	4,99	83	33,3
2	5,05	89	35,2
3	5,02	68	27,1
4	4,97	76	30,6
5	5,04	75	29,8
6	5,00	71	28,4
7	5,05	86	34,1
8	5,01	77	30,7

Poisson-Verteilung		
Probenanzahl	8	
Freiheitsgrad	7	
Mittelwert	78,1	Partikel
Standardabweichung	7,11	Partikel
χ^2 (CHI-Quadrat)	4,52	
Wahrscheinlichkeit	72	%
Wiederfindungsrate	100	%

Normalverteilung		
Probenanzahl	8	
Mittelwert	31,1	mg/kg
Standardabweichung	2,83	mg/kg
rel. Standardabweichung	9,10	%
Horwitz Standardabweichung	9,54	%
HorRat-Wert	0,95	
Wiederfindungsrate	100	%

Microtracer Homogenitätstest

DLA ptALR2 (2021) Sample 4

Gewicht Gesamtprobe	1,00	kg
Microtracer	FSS-rot lake	
Teilchengröße	75 – 300	µm
Gewicht pro Partikel	2,0	µg
Tracerzugabe	20,8	mg/kg

Analysenergebnisse:

Probe	Einwaage [g]	Partikel Anzahl	Partikel [mg/kg]
1	5,01	42	16,8
2	5,01	47	18,8
3	5,04	41	16,3
4	4,97	34	13,7
5	5,02	35	13,9
6	5,00	36	14,4
7	5,01	45	18,0
8	5,01	38	15,2

Poisson-Verteilung		
Probenanzahl	8	
Freiheitsgrad	7	
Mittelwert	39,7	Partikel
Standardabweichung	4,72	Partikel
χ^2 (CHI-Quadrat)	3,92	
Wahrscheinlichkeit	79	%
Wiederfindungsrate	76	%

Normalverteilung		
Probenanzahl	8	
Mittelwert	15,9	mg/kg
Standardabweichung	1,88	mg/kg
rel. Standardabweichung	11,9	%
Horwitz Standardabweichung	10,6	%
HorRat-Wert	1,1	
Wiederfindungsrate	76	%

Microtracer Homogenitätstest

DLA ptALR2 (2021) Sample 5

Gewicht Gesamtprobe	1,01	kg
Microtracer	FSS-rot lake	
Teilchengröße	75 – 300	µm
Gewicht pro Partikel	2,0	µg
Tracerzugabe	23,3	mg/kg

Analysenergebnisse:

Probe	Einwaage [g]	Partikel Anzahl	Partikel [mg/kg]
1	5,04	78	31,0
2	5,03	78	31,0
3	5,05	72	28,5
4	5,05	74	29,3
5	4,97	81	32,6
6	5,01	67	26,7
7	5,03	62	24,7
8	5,01	70	27,9

Poisson-Verteilung		
Probenanzahl	8	
Freiheitsgrad	7	
Mittelwert	72,8	Partikel
Standardabweichung	6,45	Partikel
χ^2 (CHI-Quadrat)	4,01	
Wahrscheinlichkeit	78	%
Wiederfindungsrate	124	%

Normalverteilung		
Probenanzahl	8	
Mittelwert	29,0	mg/kg
Standardabweichung	2,57	mg/kg
rel. Standardabweichung	8,87	%
Horwitz Standardabweichung	9,64	%
HorRat-Wert	0,92	
Wiederfindungsrate	124	%

5.3 Informationen zur Eignungsprüfung (EP)

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

EP-Nummer	DLA ptALR2 - 2021
EP-Name	Response PT Gluten: Prozessierte Proben Weizenmehl, Brot, Nudeln (Hartweizen), Bulgur (vorgekochter Weizen) und Seitan (Glutenprotein) in Kartoffelpulver-Matrix
Probenmatrix*	Proben 1-6: 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: Gluten / Weizen / glutenhaltige Getreide Proben 1-5: ca. 25 - 150 mg/kg (als Gluten)
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: pt@dla-lvu.de
Letzter Abgabetermin	Spätestens 26. November 2021
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
		SCHWEIZ
		Deutschland
		USA
		Deutschland
		GRIECHENLAND
		ITALIEN
		Deutschland
		Deutschland
		ITALIEN

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

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

7. Verzeichnis relevanter Literatur

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

- collaborative trial to investigate the performance of the R5 enzyme linked immunoassay to determine gliadin in gluten-free food. Eur J Gastroenterol Hepatol. 17:1053-63 (2005)
25. DLA Publikation: Performance of ELISA and PCR methods for the determination of allergens in food: an evaluation of six years of proficiency testing for soy (Glycine max L.) and wheat gluten (Triticum aestivum L.); Scharf et al.; J Agric Food Chem. 61(43):10261-72 (2013)
 26. EFSA (2014) Scientific Opinion on the evaluation of allergenic foods and food ingredients for labelling purposes¹, EFSA Panel on Dietetic Products, Nutrition and Allergies (NDA), European Food Safety Authority (EFSA), Parma, Italy, EFSA Journal 2014;12(11):3894
 27. IRMM, Poms et al.; Inter-laboratory validation study of five different commercial ELISA test kits for determination of peanut residues in cookie and dark chocolate; European Commission, Joint Research Centre, Belgium; GE/R/FSQ/D08/05/2004
 28. Jayasena et al. (2015) Comparison of six commercial ELISA kits for their specificity and sensitivity in detecting different major peanut allergens. J Agric Food Chem. 2015 Feb 18;63(6):1849-55
 29. ASU §64 LFGB L 06.00-56 Bestimmung von Sojaprotein in Fleisch und Fleischerzeugnissen Enzymimmunologisches Verfahren (2007) [Determination of soyprotein in meat and meat products by enzyme immunoassay]
 30. ASU §64 LFGB L 00.00-69 Bestimmung von Erdnuss-Kontaminationen in Lebensmitteln mittels ELISA im Mikrotiterplattensystem (2003) [Foodstuffs, determination of peanut contaminations in foodstuffs by ELISA in microtiterplates]
 31. ASU §64 LFGB L 44.00-7 Bestimmung von Haselnuss-Kontaminationen in Schokolade und Schokoladenwaren mittels ELISA im Mikrotiterplattensystem (2006) [Foodstuffs, determination of hazelnut contaminations in chocolate and chocolate products by ELISA in microtiterplates]
 32. ASU §64 LFGB L 16.01-9 Untersuchung von Lebensmitteln - Bestimmung von Soja (Glycine max) in Getreidemehl mittels real-time PCR (2016) [Foodstuffs, determination of soya (Glycine max) in cereal flour by real-time PCR]
 33. ASU §64 LFGB L 18.00-19 Untersuchung von Lebensmitteln - Nachweis und Bestimmung von Sesam (Sesamum indicum) in Reis- und Weizenkeksen sowie in Soßenpulver mittels real-time PCR (2014) [Foodstuffs, detection and determination of sesame (Sesamum indicum) in rice and wheat cookies and sauce powders by PCR]
 34. 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]
 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]
 36. ASU §64 LFGB L 08.00-66 Untersuchung von Lebensmitteln - Nachweis und Bestimmung von Weizen (Triticum L.) und Roggen (Secale cereale) in Brühwurst mittels real-time PCR (2016) [Foodstuffs, detection and determination of wheat (Triticum L.) and rye (Secale cereale) in boiled sausages by real-time PCR]
 37. Durchführungsverordnung der Kommission/ Commission Implementing Regulation EU 828/2014; über die Anforderungen an die Bereitstellung von Informationen für Verbraucher über das Nichtvorhandensein oder das reduzierte Vorhandensein von Gluten in Lebensmitteln / on the requirements for the provision of information to consumers on the absence or reduced presence of gluten in food
 38. Bruins-Slot et al. (2015) Evaluating the performance of gluten ELISA test kits: The numbers do not tell the tale, Cereal Chem 92(5):513-521
 39. Köhler & Andersen (2014) Analyse von Glutengehalten in Getreide und getreidehaltigen Produkten, Tabellenwerk zum Nährstoffgehalt von Lebensmitteln 3.1.5.1, Deutsche Forschungsanstalt für Lebensmittelchemie Leibniz Institut Jahresbericht 2014 [Analysis of gluten contents in cereals and cereal products, nutrient tables of foods]
 40. Geisslitz et al. (2019) Comparative Study on Gluten Protein Composition of Ancient (Einkorn, Emmer and Spelt) and Modern Wheat Species (Durum and Common Wheat), Foods 2019 (8): 409 (1-14)
 41. Schopf & Scherf (2021) Water Absorption Capacity Determines the Functionality of Vital Gluten Related to Specific Bread, Foods 2021 (10): 228 (1-13)

DLA ptALR2 (2021) - Response PT Gluten

12 von 13 Teilnehmern haben Ergebnisse eingereicht. Es wurden 6 LVU-Proben für den qualitativen Nachweis und die quantitative Bestimmung von Gluten in Weizenmehl, Brot, Nudeln (Hartweizen), Bulgur (vorgekochter Hartweizen) und Seitan (Glutenprotein) 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 Auswertebereicht zu entnehmen. Vier Teilnehmer hatten ihren Sitz im europäischen Ausland (Griechenland, Italien, Schweiz) sowie ein Teilnehmer in den USA.