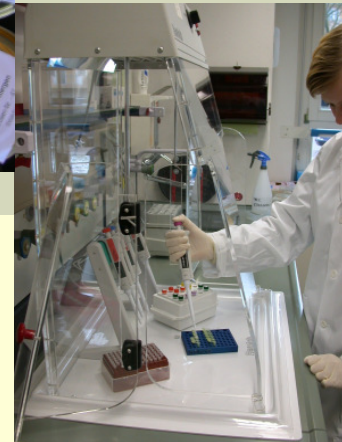


# Vergleichsmaterialien für die Allergenanalytik: unverzichtbar für die Validierung und die Routineanalytik



Hans-Ulrich Waiblinger

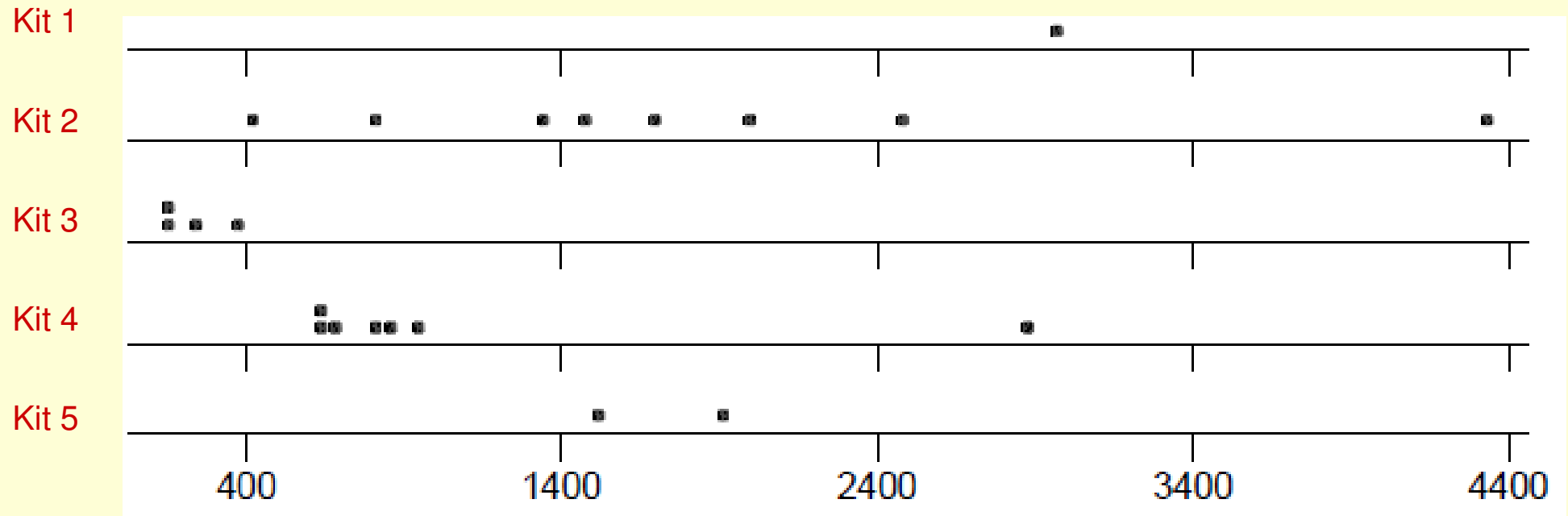
BfR Workshop Allergene in Lebensmitteln, Aktuelle Entwicklungen in der Analytik

08.-09.12.2010



# Ergebnisse eines Proficiency Tests

(FAPAS 2005, in mg Milchprotein pro kg Gebäckmischung)



#### 4.4 Soja [Gehaltsangaben in mg/kg]

Soll: 300 mg Soja/kg

Labor	Probe A	Gehalt [mg/kg]	Probe B	Gehalt [mg/kg]
1	negativ	< 32	positiv	>32
2	negativ		negativ	
3	negativ		negativ	
4	negativ	< 32	positiv	6
5	negativ	< 2,5	positiv	
6	negativ		positiv	3,7
7	negativ	< 2,50	negativ	< 2,50
8	negativ		positiv	
9	negativ	< 1,25	positiv	3,8
10	negativ	< 0,4	positiv	1
11	negativ		negativ	
12	negativ		negativ	
13	negativ		negativ	
14	negativ		positiv	
15	negativ		positiv	21100
16	positiv		positiv	
17	negativ		positiv	
18	negativ		positiv	
19	negativ		negativ	
20	negativ		positiv	353,8
21	negativ		positiv	

Ergebnisse von  
Proficiency Tests (2)  
(LVU 2010, Soja in  
Brühwürsten)

# Referenzmaterial – Definitionen

---

- Stoff oder Objekt mit definierten (bekannten) Eigenschaften, für den Einsatz als Maß oder Vergleichsgröße bei Messverfahren.
- Referenzmaterialien sind unverzichtbar bei chemischen Analysen sowie zur Qualitätskontrolle
- stellt den Bezug von Mess-Signal zu bekanntem Wert her



# Referenzmaterial, Anforderungen

---

- definierte Zusammensetzung
- Homogenität
- Rückführbarkeit



# Herstellung von Referenzmaterialien durch:

---

- Bundesanstalt für Materialforschung und Prüfung (D)
- Institute for Reference Materials and Measurements in Geel, B (EU)
- National Institute of Standards and Technology (NIST) (USA)
- CVUA Freiburg ??



# Herstellung von Vergleichsmaterialien – wie beginnen?

---

- Zielsetzung Forschungsvorhaben: molekularbiologische Analytik  
→ alle kennzeichnungspflichtigen Allergene einschließlich glutenhaltige Getreidearten, Ausnahme Milch und Ei
- Auswahl der dotierten Allergene:
  - Material, das auch im Rahmen anderer Projekte eingesetzt wird (FH Projekt)
  - Materialien aus der Lebensmittelindustrie, z.B. Krabbenpulver, Kabeljaupulver
  - Nüsse: wichtiger deutscher Lebensmittelhersteller, jeweilige Sorte bekannt



# Herstellung von Vergleichsmaterialien – wie beginnen?

---

- Kriterien für Auswahl der Matrices:
    - analytische Erfahrungen liegen schon vor
    - möglichst Verarbeitungsprozess einschließen (brühen, backen)
    - proteinhaltige bzw. kohlenhydrathaltige Matrix
    - DNA-arm vs. DNA-reich
    - Lagerfähigkeit
- Abstimmung zwischen den Projekten





# Herstellung von Vergleichsmaterialien

## Modell Brühwurst

---

- allergene Bestandteile als feinpulvrige Materialien dotieren  
(Nüsse vor Feinmahlung entfetten)
- dotieren in Brät



# Herstellung von Vergleichsmaterialien Modell Brühwurst



- mixen im Kutter  
(„Allergenbrät“ , z.B. 1000 mg/kg)
- Mischungen mit Nullbrät im Kutter  
(verdünnen“)
- abfüllen
- brühen

# Hauptanforderung Homogenität

- Durchführung von Homogenitätstests nach

IUPAC 2006:

10 x 2 Teilproben =

20 Analysen pro Allergen und Dotierungsstufe

*Pure Appl. Chem.*, Vol. 78, No. 1, pp. 145–196, 2006.

doi:10.1351/pac200678010145

© 2006 IUPAC

INTERNATIONAL UNION OF PURE AND APPLIED CHEMISTRY

ANALYTICAL CHEMISTRY DIVISION\*

INTERDIVISIONAL WORKING PARTY FOR HARMONIZATION OF  
QUALITY ASSURANCE SCHEMES

**THE INTERNATIONAL HARMONIZED PROTOCOL  
FOR THE PROFICIENCY TESTING OF ANALYTICAL  
CHEMISTRY LABORATORIES**

**(IUPAC Technical Report)**

*Prepared for publication by*

MICHAEL THOMPSON<sup>1</sup>, STEPHEN L. R. ELLISON<sup>2,‡</sup>, AND ROGER WOOD<sup>3</sup>

# Homogenitätstests - Beispiel Proficiency Test FAPAS 2747 Gluten in Backmischung (ELISA)

FAPAS<sup>®</sup> 2747 Allergens Report  
**CERTIFIED DOCUMENT**

## APPENDIX I: Homogeneity Data for Gluten in Chocolate Cake Mix

sample identity	gluten			
	test material 2747-A mg/kg		test material 2747-B mg/kg	
	replicate 1	replicate 2	replicate 1	replicate 2
1	152.25	148.30	<10	
2	201.35	175.50	<10	
3	190.20	135.40	<10	
4	142.00	213.20	<10	
5	165.10	174.00	<10	
6	167.05	234.65		
7	175.30	276.60		
8	174.65	205.25		
9	245.45	178.15		
10	188.40	237.15		
mean	189		<10	
<i>n</i>	20		5	

# Homogenitätstests –

Vergleich FAPAS Gluten (ELISA) / Brühwurst Soja 100 mg/kg Tetraplex PCR

Proben-Nr.	ELISA Gluten (mg/kg)		Tetraplex real-time PCR Soja (Kopien/PCR)	
	Repl.1	Repl. 2	Repl. 1	Repl. 2
1	152	148	78	105
2	201	175	102	93
3	190	135	94	72
4	142	213	107	77
5	165	174	72	59
6	167	235	73	106
7	175	277	104	105
8	174	205	63	56
9	245	178	70	66
10	188	237	95	70
Mittel	189		83	
Cv	<b>20</b>		<b>21</b>	

2 Replika:

je separate Extraktion

+ Messung

# Homogenitätstests – Streuung der Daten ist Material- und Methoden-bedingt

	ELISA Gluten (mg/kg)	Tetraplex real- time PCR Soja (Kopien/PCR)
Mittel	189	83
Cv	<b>20</b>	<b>21</b>

Einfluss der Methode:

Extraktion + PCR

+

Einfluss des Materials:

Inhomogenitäten

# Homogenitätstests – Einfluss der Methode: analytische Standardabweichung

Proben-Nr.	ELISA Gluten (mg/kg)		Tetraplex real-time PCR Soja (Kopien/PCR)	
	Repl.1	Repl. 2	Repl. 1	Repl. 2
1	152	148	78	105
2	201	175	102	93
...				

$$s_{an} = \sqrt{\frac{\sum (\Delta x_1)^2}{2 \cdot n}}$$

$s_{an}$  = analytische Standardabweichung, berechnet aus den  
Varianzen der Differenzen der Einzelwerte  $X_1$

$s_{an}$	<b>39,7</b>	<b>14,5</b>
$s_{an}$ (rel %)	<b>21</b>	<b>17,5</b>

# Homogenitätstests – analytische Standardabweichung als Kriterium für Methodenauswahl

	ELISA Gluten (mg/kg)	Tetraplex real-time PCR Soja (Kopien/PCR)
$s_{an}$	<b>39,7</b>	<b>14,5</b>
$s_{an}$ (rel %)	<b>21</b>	<b>17,5</b>

Zielgröße:  $s_{an} < 0,5 \cdot s_{target}$

$s_{target}$  = Zielstandardabweichung, z.B. Erfahrungswert aus

Ringversuchen oder LVU, Annahme: **40 %**



# Homogenitätstests mittels real-time PCR, Vorüberlegungen

---

- Abschätzung des Methodeneinflusses auf Streuung der Daten:
  - nur PCR: Verdünnungsreihe aus einem DNA-Extrakt  
Verdünnungsstufen sollen die Dotierungen simulieren
  - DNA-Extraktion + PCR:  
eine Einwaage pro Dotierungsstufe, daraus Lysat herstellen und  
mehrere Aliquots aus Lysat präparieren



# Methodeneinfluss auf Streuung der Daten, Beispiel 1: DNA aus Brühwurst 1000 mg/kg, DNA-Verdünnungen

AllAll A Erdnuss						
Verdünnungsstufe entspricht (mg/kg)	CT-Wert	(c) pg/5µl	Mittelwert (ct-Wert)	Mittel (c) pg/5µl	relative STABW in %	VB (95%) rel., %
400	29,98	224,143				
400	29,99	223,117				
400	29,79	251,384				
400	30,09	210,283	29,96	227,23	7,61	12,11
100	31,84	72,434				
100	32,57	46,481				
100	31,85	71,901				
100	31,91	69,49	32,04	65,08	19,15	30,47
40	32,6	45,609				
40	33,35	28,942				
40	33,56	25,504				
40	33,34	29,046	33,21	32,28	28,01	44,56
20	34,12	18,111				
20	33,62	24,526				
20	34,17	17,581				
20	33,65	24,138	33,89	21,09	17,80	28,32
10	34,98	10,731				
10	35,99	5,799				
10	35,26	9,039				
10	35,94	5,99	35,54	7,89	30,50	48,53
5	36,06	5,574				
5	35,89	6,161				
5	39,67	0,619				
5	35,57	7,485	36,80	4,96	60,53	96,30

AllAll A Soja						
Verdünnungsstufe entspricht (mg/kg)	CT-Wert	(c) pg/5µl	Mittelwert (ct-Wert)	Mittel (c) pg/5µl	relative STABW in %	VB (95%) rel., %
400	26,53	503,5				
400	26,63	472,813				
400	26,49	515,922				
400	26,51	510,117	26,54	500,59	3,84	6,10
100	28,92	103,534				
100	28,69	120,28				
100	28,78	113,122				
100	28,39	146,204	28,70	120,79	15,14	24,08
40	30,17	44,925				
40	30,02	49,698				
40	30,29	41,495				
40	30,01	50,089	30,12	46,55	8,82	14,04
20	30,65	32,719				
20	31,04	25,228				
20	31,14	23,654				
20	30,52	35,757	30,84	29,34	19,86	31,59
10	31,6	17,393				
10	31,78	15,492				
10	32,49	9,678				
10	31,95	13,832	31,96	14,10	23,31	37,09
5	32,99	6,957				
5	33,75	4,193				
5	32,42	10,148				
5	32,51	9,542	32,92	7,71	35,31	56,18

# Methodeneinfluss auf Streuung der Daten, Beispiel 2: DNA aus Reiskeksen 480 mg/kg, DNA-Verdünnungen

AllAll A Erdnuss						
Verdünnungsstufe entspricht (mg/kg)	CT-Wert	(c) cp/5µl	Mittelwert (ct-Wert)	Mittel (c) cp/5µl	relative STABW in %	VB (95%) rel, %
480	30,70	21,4				
480	30,56	23,5				
480	30,19	29,9				
480	30,61	22,7				
480	30,57	23,3	<b>30,53</b>	<b>24,16</b>	<b>13,65</b>	<b>16,95</b>
100	32,78	5,5				
100	32,35	7,3				
100	33,18	4,2				
100	32,58	6,2				
100	32,59	6,2	<b>32,70</b>	<b>5,87</b>	<b>19,21</b>	<b>23,85</b>
40	34,14	2,2				
40	34,06	2,4				
40	35,14	1,2				
40	33,95	2,5				
40	33,63	3,1	<b>34,18</b>	<b>2,28</b>	<b>31,14</b>	<b>38,66</b>
20	35,38	1,0				
20	35,10	1,2				
20	36,27	0,6				
20	35,74	0,8				
20	34,01	2,4	<b>35,30</b>	<b>1,19</b>	<b>62,02</b>	<b>76,99</b>
10	35,15	1,2				
10	36,42	0,5				
10	37,35	0,3				
10	39,09	0,1				
10	34,91	1,3	<b>36,58</b>	<b>0,67</b>	<b>82,18</b>	<b>102,02</b>

AllAll A Soja						
Verdünnungsstufe entspricht (mg/kg)	CT-Wert	(c) cp/5µl	Mittelwert (ct-Wert)	Mittel (c) cp/5µl	relative STABW in %	VB (95%) rel, %
480	28,56	63,8				
480	28,59	62,6				
480	28,54	64,4				
480	28,66	59,4				
480	28,56	63,6	<b>28,58</b>	<b>62,75</b>	<b>3,17</b>	<b>3,94</b>
100	31,00	12,6				
100	31,02	12,4				
100	31,23	10,8				
100	30,72	15,2				
100	30,86	13,8	<b>30,97</b>	<b>12,96</b>	<b>12,81</b>	<b>15,90</b>
40	32,14	5,9				
40	32,17	5,8				
40	32,15	5,9				
40	32,11	6,0				
40	32,14	5,9	<b>32,14</b>	<b>5,89</b>	<b>1,32</b>	<b>1,64</b>
20	32,91	3,5				
20	33,43	2,5				
20	33,57	2,3				
20	33,65	2,2				
20	33,21	2,9	<b>33,35</b>	<b>2,67</b>	<b>20,86</b>	<b>25,90</b>
10	33,88	1,9				
10	34,42	1,3				
10	34,46	1,3				
10	34,28	1,4				
10	34,41	1,3	<b>34,29</b>	<b>1,43</b>	<b>17,37</b>	<b>21,57</b>

# Einfluss der Einwaage

z.B. 32 ppm Dotierung - PCR: Lupine - Präparation: CTAB/QIA-Quick

Statistische Kenngrößen (1. Meßreihe: 2 g EINWAAGE)				Statistische Kenngrößen (2. Meßreihe: 250 mg EINWAAGE)			
• Signifikanzniveau		5.0 %		• Signifikanzniveau		5.0 %	
• Mittelwert		8,1510		• Mittelwert		8,5530	
• Standardabweichung (s)		0,4296		• Standardabweichung (s)		0,9555	
• Variationskoeffizient (VK)		5,27 %		• Variationskoeffizient (VK)		11,17 %	
• Vertrauensbereich (VBx)		0,3073		• Vertrauensbereich (VBx)		0,6835	
• T - Faktor (t)		2,2620		• T - Faktor (t)		2,2620	

20 Präparationen mit einer **Einwaage von 2 g** jeweils einfach in der PCR getestet.

10 Präparationen mit einer **Einwaage von 250 mg** jeweils einfach in der PCR getestet.



# Homogenitätstests mittels real-time PCR, Vorüberlegungen

---

- Bestimmung Streuung insgesamt:
  - Inhomogenität + DNA-Extraktion + PCR:  
mehrere Proben (bis zu 10) pro Dotierungsstufe präparieren



# Homogenitätstests – Vorabtests zur Streuung der Daten insgesamt

## Beispiel Brühwürste, Tetraplex real-time PCR

Dotierung ppm	Erdnuss			
	CT (1)	CT (2)	Mittel CT	VK
10	36,99	39,61	38,4	72,9%
10	37,23	39,58		
10	38,68	38,22		
20	36,38	37,96	37,9	70,3%
20	38,73	39,12		
20	37,46	37,56		
32	36,85	35,92	36,4	28,7%
32	36,6	36,67		
32	35,91	36,52		
100	34,45	34,63	34,8	25,2%
100	34,85	34,94		
100	34,28	35,35		
320	30,79*	33,18	32,8	30,4%
320	33,55	33,54		
320	32,9	32,56		

Dotierung ppm	Soja			
	CT (1)	CT (2)	Mittel CT	VK
10	33,1	32,38	32,7	22,1%
10	32,36	32,92		
10	32,51	32,74		
20	31,55	32,63	32,3	40,6%
20	31,96	33,04		
20	32,4	32,37		
32	31,03	31,18	31,4	23,9%
32	31,56	32,02		
32	31,4	31,36		
100	29,65	29,88	30,0	21,8%
100	29,95	30,4		
100	30,03	30,36		
320	27,86	28,35	28,6	29,1%
320	28,46	29,95		
320	28,7	28,37		

VK = Variationskoeffizient, bezogen auf Messgröße: Kopienzahl

# Homogenitätstests –

## Heterogenitäts-Standardabweichung zur Abschätzung von Inhomogenitäten

Proben-Nr.	Tetraplex real-time PCR Soja (Kopien/PCR)		
	Mittel	Repl. 1	Repl. 2
1	91	78	105
2	98	102	93
...	...	$\phi = 83$	

$$s_{heterogen} = \sqrt{\frac{\sum (\Delta x_2)^2}{n-1} - 0,25 \cdot \frac{\sum (\Delta x_1)^2}{n}}$$

$s_{het}$	<b>10,5</b>
$s_{het}$ (rel %)	<b>12,6</b>

Zielgröße:  $s_{het} < 0,3 \cdot s_{target}$

mit  $s_{target} = 40 \%$

→  $s_{het} < 12 \%$

Ansätze zur Quantifizierung:  
Kalibrator = DNA-Verdünnungsreihe aus *einem*  
dotierten Material

---

- Kalibrator: „Brühwurst CVUA FR“, je 1000 mg/kg  
DNA auf 250 ng/μl eingestellt,  
verdünnt auf Stufen äquivalent zu  
320, 100, 32, 20 und 10 mg/kg
- Proben:  
durch Mischung aus Brühwurst mit Nullmaterial  
hergestellte Brühwürste (Stufen: s.o.)  
DNA je auf 250 ng/μl eingestellt





# Ansätze zur Quantifizierung - Methode

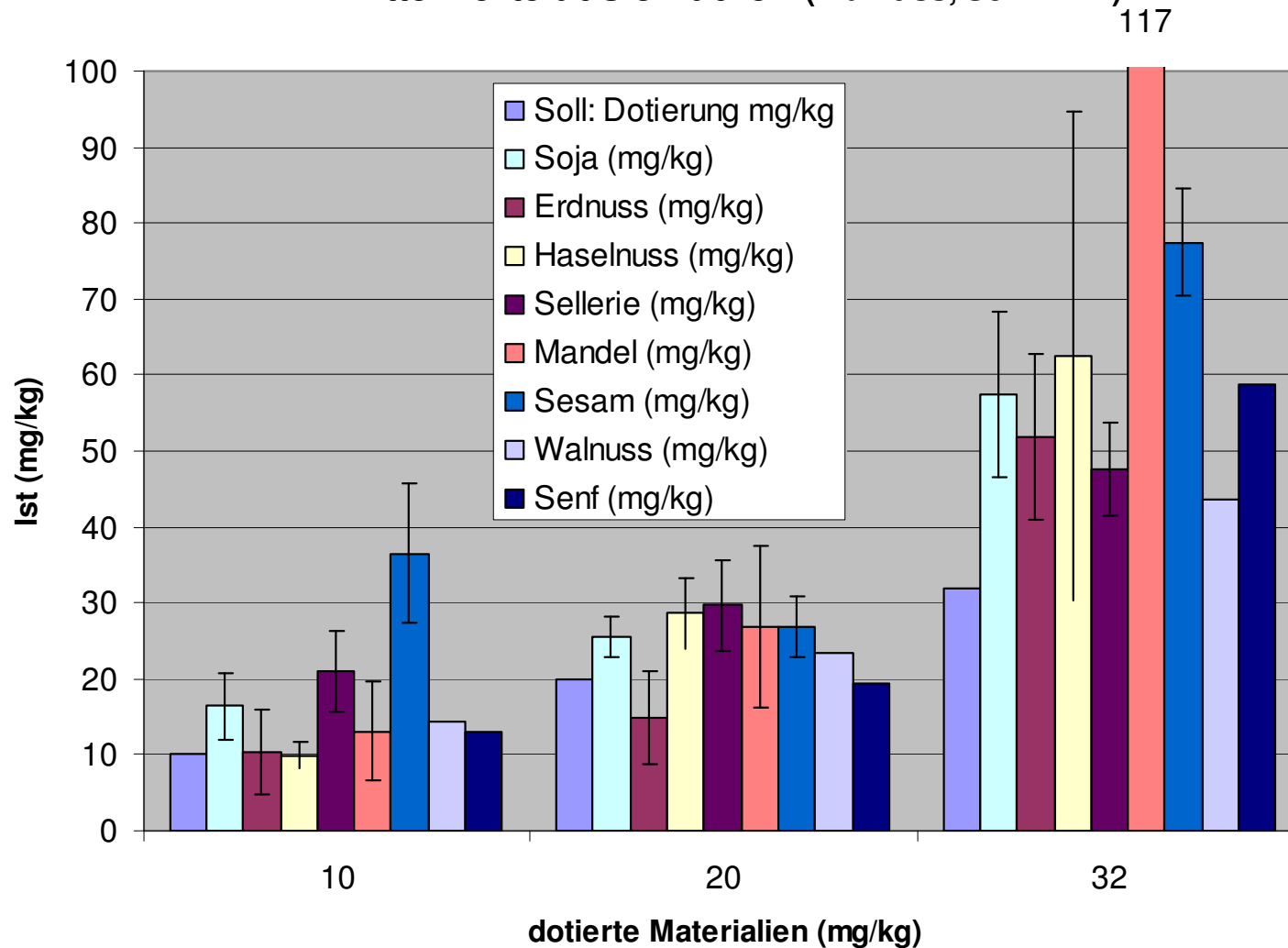
---

- DNA- Extraktion  
CTAB/QIAQuick; eingestellt auf 250 ng/μl
- je 2 Präparationen pro Probe, jede Präparation einfach mittels PCR untersucht
- PCR: Tetraplex Kantonales Labor ZH  
(AllAll A, B, E)
- je 3 separate Läufe



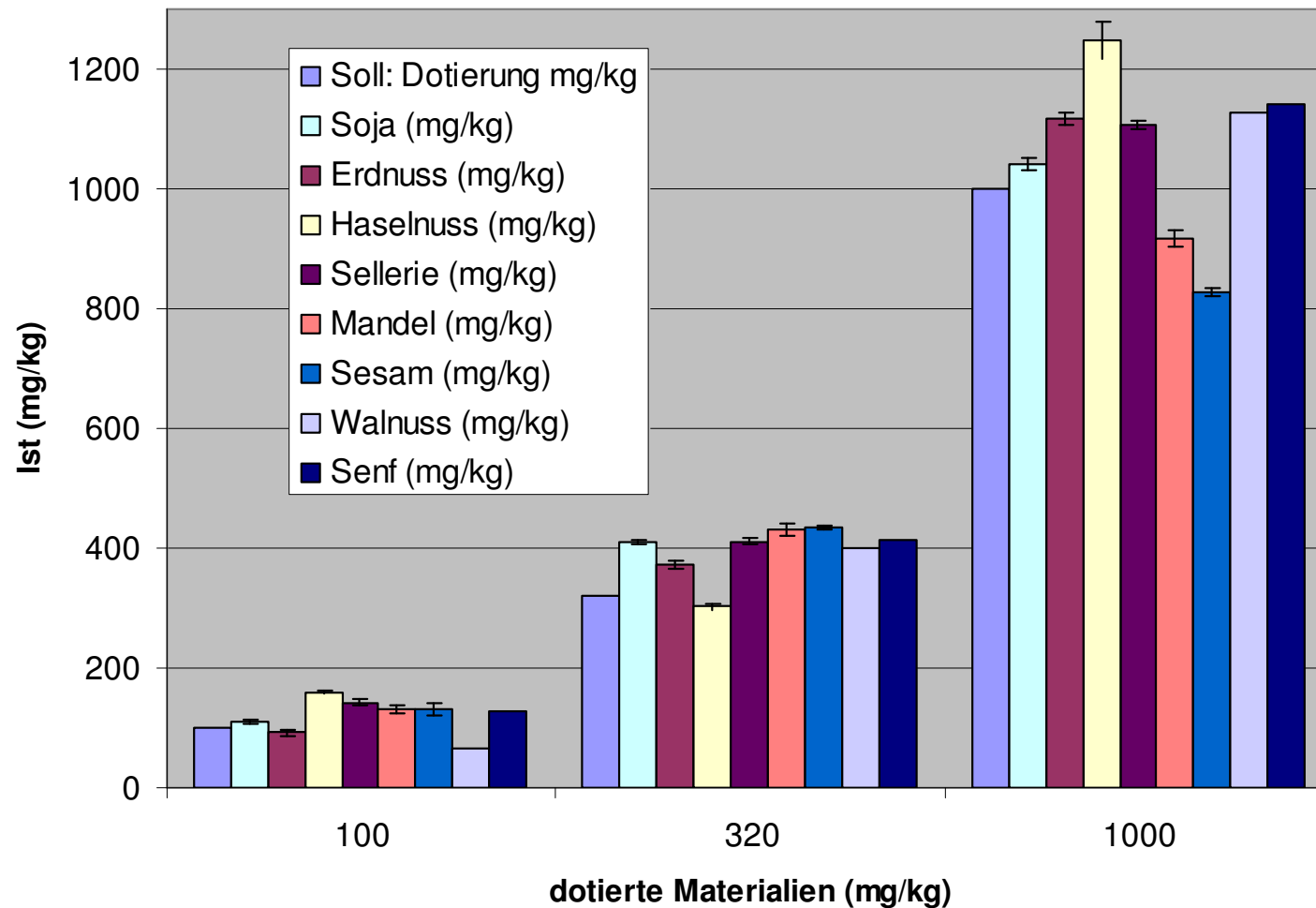
# Ansätze zur Quantifizierung: Kalibrator = DNA-Verdünnungsreihe aus **einem** dotiertem Material

**Tetraplex PCR AllAll A , B und E**  
**dotierte Brühwürste, Kalibrator: DNA aus Level 1000 mg/kg**  
**Mittelwerte aus 3 Läufen (Walnuss, Senf: n=1)**



# Ansätze zur Quantifizierung: Kalibrator = DNA-Verdünnungsreihe aus **einem** dotiertem Material

**Tetraplex PCR AllAll A , B und E**  
**dotierte Brühwürste, Kalibrator: DNA aus Level 1000 mg/kg**  
**Mittelwerte aus 3 Läufen (Walnuss, Senf: n=1)**





# Hauptanforderung Richtigkeit

## Vergleich von bisher verfügbaren Materialien

---

- Brühwurst CVUA FR – Brüh-/Rohwürste KL AG/ZH
- Kalibrator: Brühwurst CVUA FR, je 1000 mg/kg  
DNA auf 250 ng/μl eingestellt,  
verdünnt auf Stufen: 320, 100, 32, 20, 10
- Proben = Würste CH:
  - Kalibrierwürste: Brühwürste und Rohwürste
  - je 32-3160 mg/kg
  - Proben: B = Landjäger, C = Salami





## Richtigkeit: Vergleich von dotierten Materialien

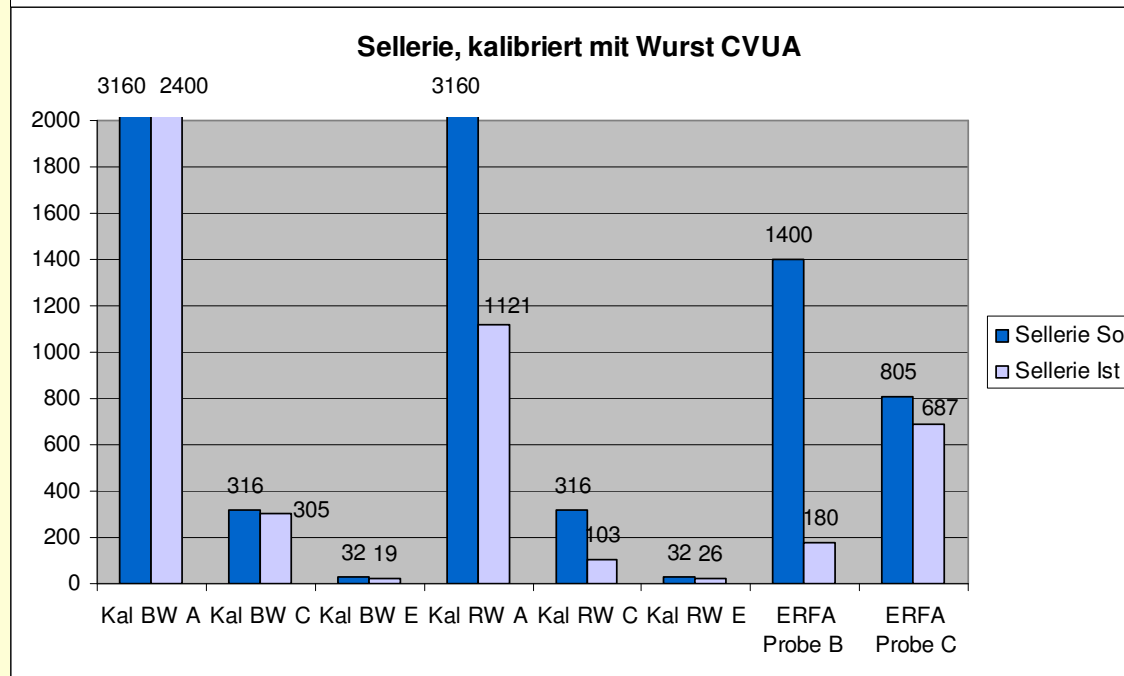
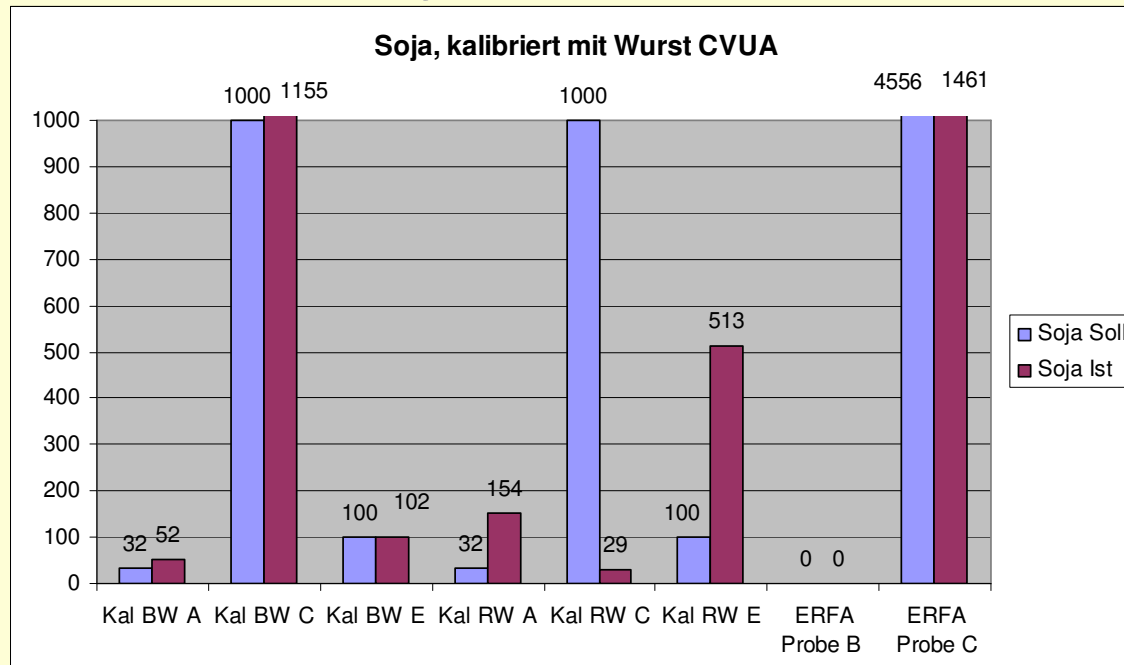
---

- DNA- Extraktion Würste CH:  
CTAB/QIAQuick; eingestellt auf 250 ng/ $\mu$ l
- je 2 Präparationen, jede Präparation einfach  
mittels PCR untersucht
- PCR: Tetraplex KL CH (AllAll A, B, E)



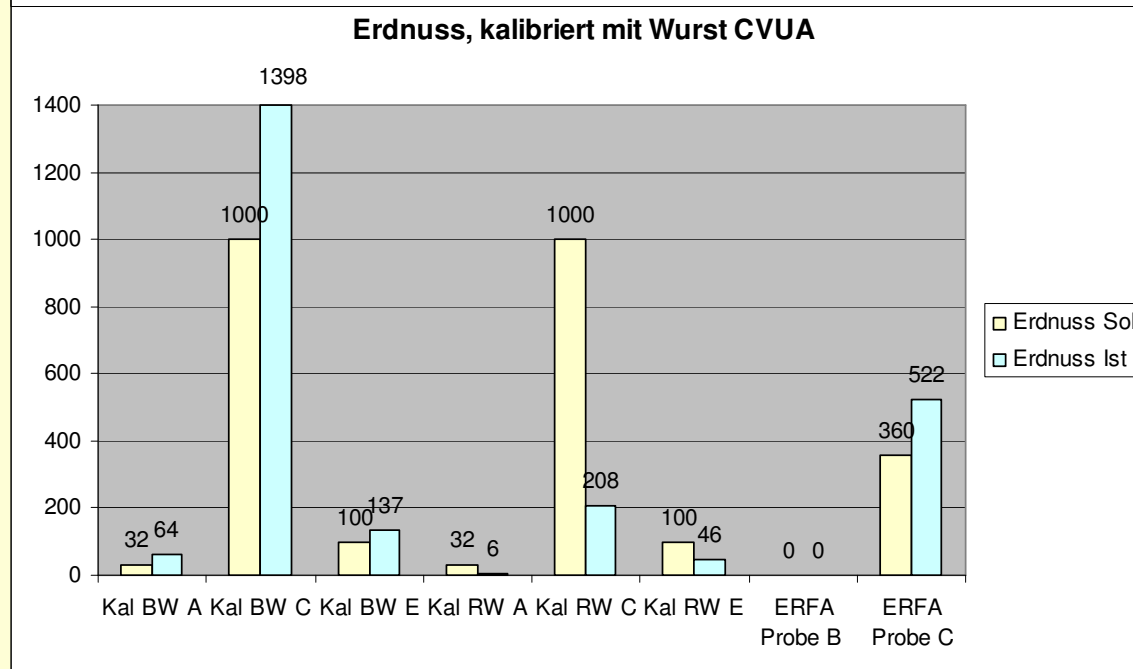
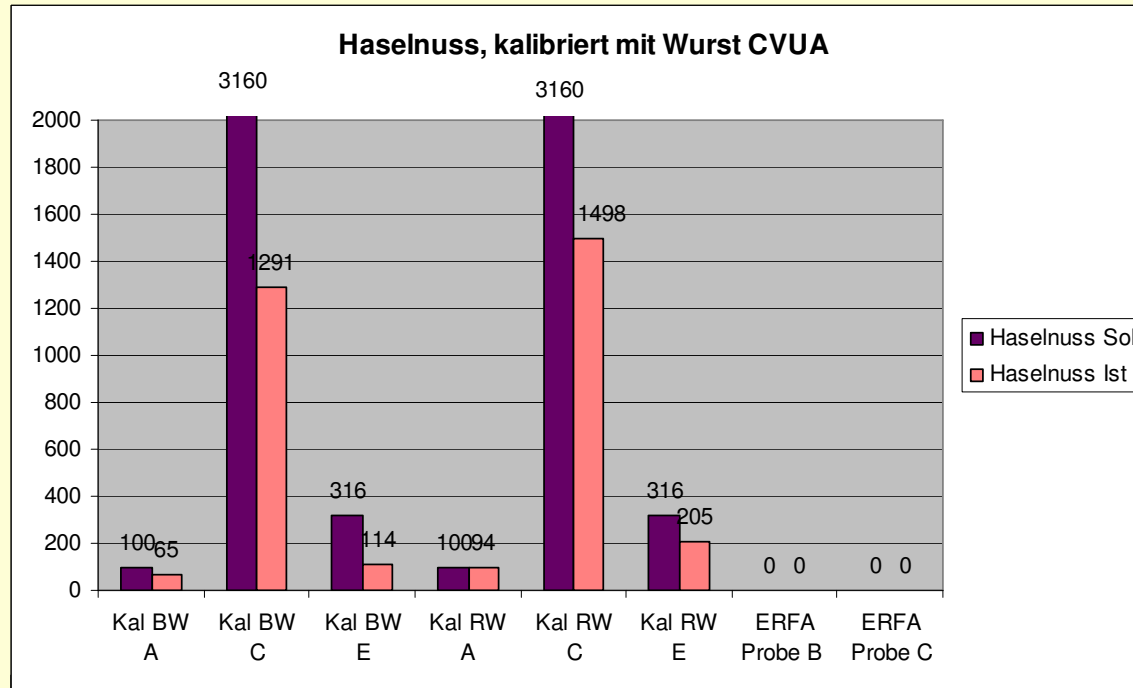


# Soja, Sellerie



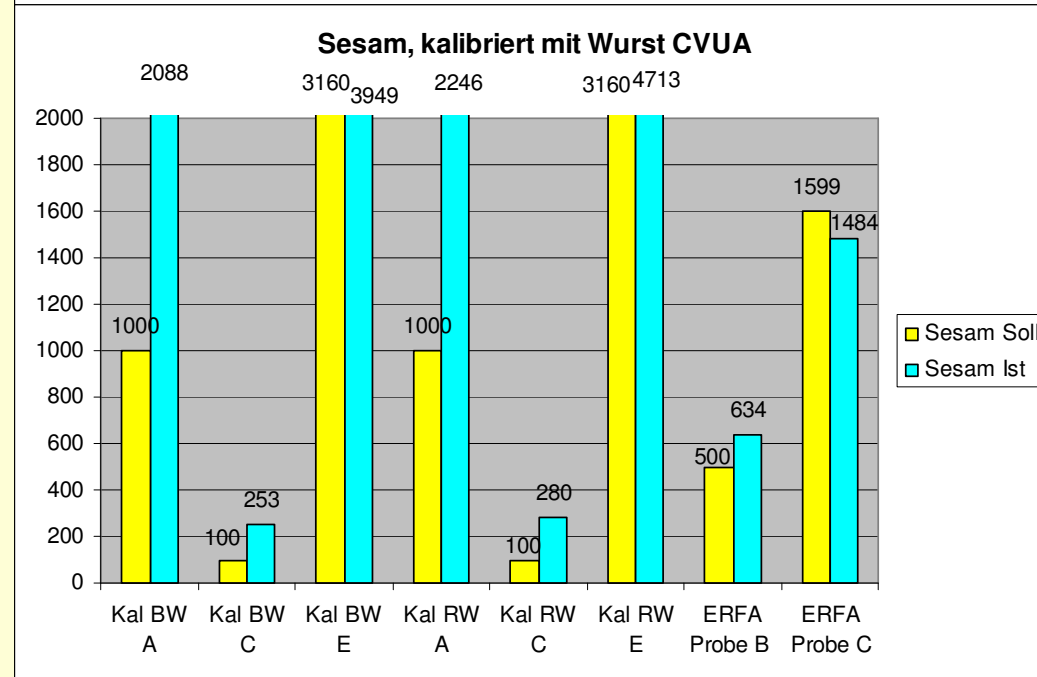
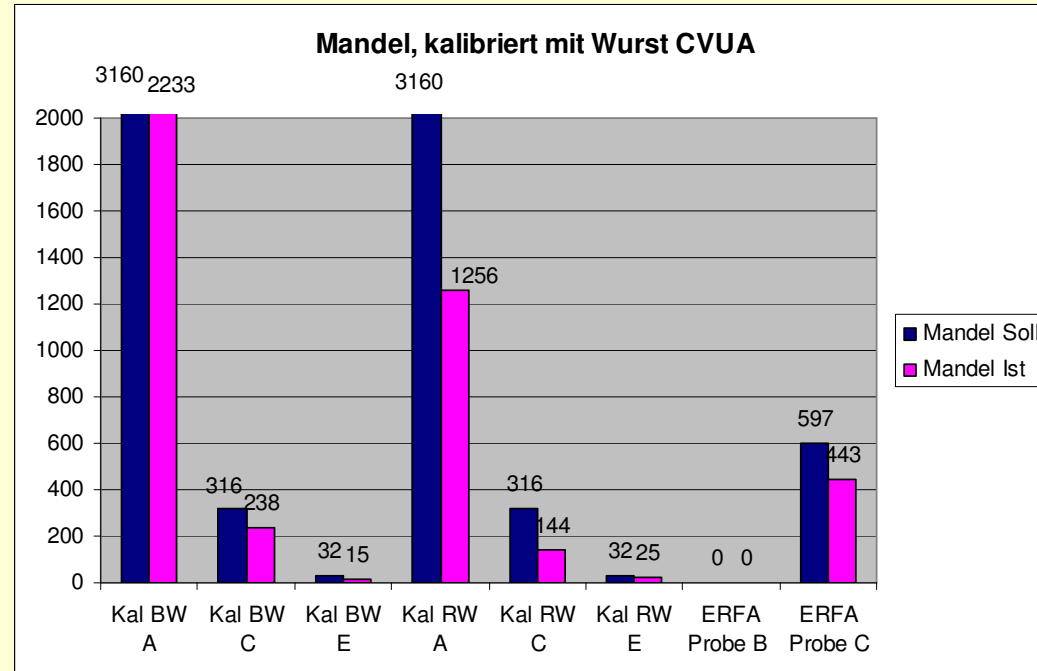


# Haselnuss, Erdnuss





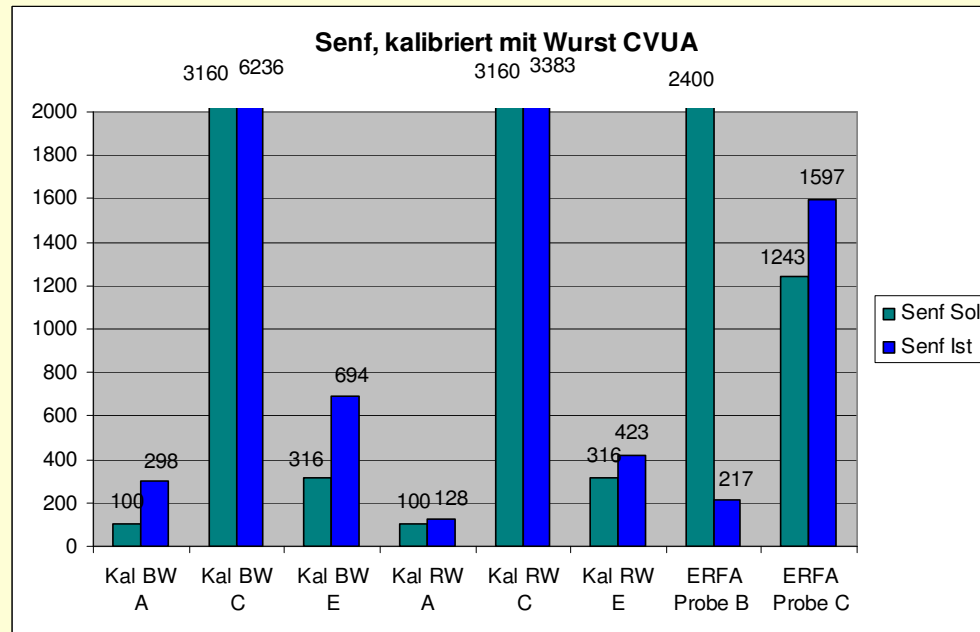
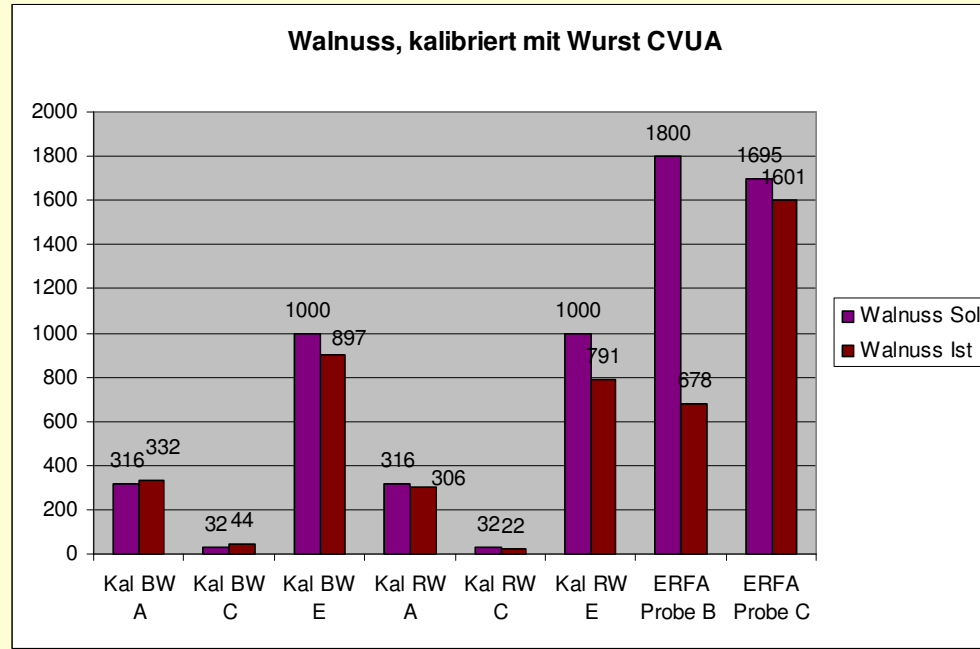
# Mandel, Sesam







# Walnuss, Senf



Anmerkung zu Proben CH:  
dotiert wurde Mischung aus  
schwarzem und  
wenig weißem Senf



# Richtigkeit: Vergleich von dotierten Materialien

---

## Fazit:

- gute Übereinstimmung (Wiederfindung 50 –150%) bei:
  - alle Brühwurstmaterialien  
Soja, Sellerie, Erdnuss, Mandel, Walnuss
    - Kal BW Haselnuss Wf ca. 30 %, Sesam ca. 200%
  - bei Rohwürsten schlechtere Wiederfindung als bei Brühwurst
  - Ausnahme: Senf





# Herstellung von Vergleichsmaterialien für die Allergenanalytik – eine Herculesaufgabe ?

- *für jedes zu dotierende Allergen theoretisch Vielzahl von Materialien (Sorten, Verarbeitungszustände), die in Frage kommen*

→ beliebiges Material, z.B. aus Lebensmittelindustrie für Dotierung auswählen, mit Responseverhalten anderer Dotierungsmaterialien/ Sorten vergleichen

- *unterschiedlichste Matrices sollten berücksichtigt werden*

→ zunächst wenige wichtige Matrices herstellen, ggf. genügt eine Dotierungsstufe

**→ Aktivitäten koordinieren !!**