



## **Positionspapier: Messunsicherheit in der Allergen-Analytik**

### **Problemstellung**

Die Ermittlung einer Messunsicherheit nach den in der analytischen Chemie üblichen Verfahren (EURACHEM/CITAC Guide CG 4) unter Berücksichtigung von systematischen und zufälligen Fehlern ist bei der routinemäßigen Allergen-Analytik in der Regel mit großen Schwierigkeiten verbunden.

Zertifizierte Referenzmaterialien, die aus dem allergenen Lebensmittel oder dessen Protein bestehen, gibt es für die Allergen-Analytik nicht. Bestenfalls existieren allgemein anerkannte Referenzmaterialien, die jedoch nicht alle Kriterien für eine Zertifizierung erfüllen, wie z.B. NIST RM 8445 Spray-Dried Whole Egg for Allergen Detection oder der PWG-Gliadin-Standard der Working Group on Prolamin Analysis and Toxicity.

Auch matrixhaltige zertifizierte Referenzmaterialien (Sekundärnormale), die den Analyten (allergenes Lebensmittel) in ähnlichem chemischem Zustand und in einer Matrix enthalten, die der Matrix in der Untersuchungsprobe ähnelt, und die speziell für die Allergen-Analytik konzipiert wurden, sind derzeit nicht verfügbar.

Im Falle kommerzieller Kits entscheidet letztlich der Kit-Hersteller, was er z. B. unter Erdnuss bzw. Erdnussprotein versteht, d. h. worauf bzw. womit er das Kit kalibriert (Sorte, Mischung verschiedener Sorten, Proteingehalt, Verhältnis der Proteine, Röstgrad, Art und Weise der sonstigen Verarbeitung wie Entfettung, Trocknung etc.) und – im Falle von ELISAs – welche Proteinfraction(en) von den mono- oder polyklonalen Antikörpern detektiert wird bzw. werden. Bei Laborvergleichsuntersuchungen (LVUs, Proficiency tests) erfolgt deshalb häufig die Ermittlung eines „zugewiesenen Wertes“ („assigned value“, Owen (2009)) nach den jeweils verwendeten ELISA-Test-Kits getrennt, sofern eine genügende Anzahl von Ergebnissen mit dem Kit desselben Herstellers eingereicht wurde. Bei dem „zugewiesenen Wert“ handelt es sich je nach Umständen und LVU-Anbieter i. d. R. um den robusten Mittelwert oder Median.

Im Nachgang zu LVUs sind LVU-Materialien häufig kommerziell zur Verwendung als Qualitätskontrollstandards erhältlich. Allerdings mit einer vom Anbieter angegebenen zulässigen Abweichung vom „zugewiesenen Wert“ von i. d. R.  $\pm 50\%$ . Dieser zugewiesene Wert kann vom dotierten Gehalt deutlich abweichen, insbesondere, wenn nach der Dotierung eine Prozessierung wie z. B. Backen oder Sterilisieren erfolgte („incurred samples“).

Durch Prozessierung (z. B. Denaturierung durch Erhitzen, Extrusion, pH-Änderung, chemische Reaktionen wie die Maillard-Reaktion oder Ausbildung von Disulfidbrücken) kann die Extrahierbarkeit und Erfassbarkeit der Zielproteine durch die Antikörper des ELISA erheblich verändert – meist verringert – werden, und damit zu deutlichen Unterbefunden oder in selteneren Fällen auch zu Überbefunden führen. Dies gilt analog auch für die DNA-Analytik; insbesondere niedrige pH-Werte sowie starke Erhitzung wie Rösten können auch hier die Wiederfindung deutlich reduzieren.

LVI-Materialien weisen nur eine begrenzte Homogenität auf, insbesondere, wenn die Dotierung in Form von Pulvern des allergenen Lebensmittels erfolgte. Da auch die Extraktionspuffer in vielen Kits enthalten und im Volumen begrenzt sind, kann die vom Kit-Hersteller vorgegebene Einwaage geringer sein als die für die Untersuchung eines LVI-Materials (Qualitätskontrollstandards) empfohlene Mindesteinwaage.

Anstelle eines zertifizierten Referenzmaterials mit einem zertifizierten Allergen-Gehalt sind somit bestenfalls Referenzmaterialien mit „akzeptiertem Bezugswert“ verfügbar. In Abschnitt 3.1.17 und 3.1.18 der DIN EN 15842:2019-12 wird im Zusammenhang mit der Definition der Begriffe „Richtigkeit“ und „Genauigkeit“ darauf hingewiesen, dass in der Praxis der „wahre Wert“ durch den „akzeptierten Bezugswert“ ersetzt wird. Der Begriff „Bezugswert“ wird in Abschnitt 3.2.15 der genannten Norm definiert als „Wert, der als vereinbarte Vergleichsgrundlage gilt“.

DIN EN 15633-1:2019-12 listet in Abschnitt 6.2 auf, zu welchen Rohdaten und Validierungsparametern *Anbieter von Testkits* Informationen bereitstellen sollen. Laut dieser Norm sollte bei allen Ergebnismitteilungen die vorher festgelegte Messunsicherheit (ausgedrückt als RSD = Relative Standardabweichung = Variationskoeffizient) angegeben werden. Gemeint ist offenbar, dass die im Rahmen der Validierung durch den Anbieter von Testkits ermittelte Messunsicherheit einen vorher festgelegten Wert nicht überschreiten soll. In der zitierten DIN EN 15633-1:2019-12 wird dazu ein durchschnittlicher Variationskoeffizient von kleiner 10 % als wünschenswert erachtet.

Eine Empfehlung zur Angabe einer Messunsicherheit *durch den Anwender* von ELISA-Kits ist in Abschnitt 6.2 der DIN EN 15633-1:2019-12 ebenfalls enthalten, auch wenn dort der Begriff „Messunsicherheit“ nicht verwendet wird: „Die quantitativen Ergebnisse der Proben sollten als Gesamtmasse des allergenen Protein-Inhaltsstoffs je Lebensmittelmasse *einschließlich des jeweiligen %CV* ausgedrückt werden.“ Der Beitrag des systematischen Fehlers (Bias) zur Messunsicherheit wird in dieser Empfehlung entgegen den Vorgaben des GUM (EURACHEM/CITAC Guide CG 4) nicht berücksichtigt.

Nach Abschnitt 8.2 DIN EN 15842: 2019-12 sollten vom Anwender alle Endergebnisse „einschließlich der *vorher festgelegten* Messunsicherheit angegeben werden, sofern erforderlich“. Eine für jede konkrete Probe ermittelte individuelle Messunsicherheit ist somit nicht vorgesehen. Eine Konkretisierung des Begriffs „Messunsicherheit“ erfolgt in der genannten Norm nicht.

Weder in DIN EN 15633-1:2019-12, noch in DIN EN 15842: 2019-12 ist der Begriff „Messunsicherheit“ aufgeführt.

In DIN EN 15634-1: 2019-12 wird im Hinblick auf Messunsicherheit lediglich in Abschnitt 8.2.2 darauf hingewiesen, dass die Qualität der Kalibrierung die Messunsicherheit beeinflusst.

Von DIN EN 17254: 2019-12 wird das Thema Messunsicherheit vollständig ausgeklammert.

**Die einschlägigen Normen zur Allergenanalytik geben somit nur sehr rudimentäre Empfehlungen zur Angabe einer Messunsicherheit, die als nicht ausreichend einzustufen sind, insbesondere, da der Bias nicht berücksichtigt ist.**

Letztendlich kann mit der Angabe einer Messunsicherheit eines Analyseergebnisses bei einem kommerziellen Allergen-ELISA- oder PCR-Kit nur diejenige Unsicherheit charakterisiert werden, die sich aus der im Rahmen der analytischen Möglichkeiten korrekten Anwendung eines Kits eines bestimmten Herstellers (mit einer bestimmten

Charge) ergibt, und muss sich auf das vom Kit-Hersteller verwendete Kalibriermaterial beziehen. Deshalb ist das verwendete PCR- oder ELISA-Kit bei einer Ergebnis-Mitteilung stets anzugeben.

Dies gilt auch für nicht Kit-basierte Methoden. Auch hier ist sowohl das verwendete Material für die Kalibrierung (Matrix) als auch das dotierte allergene Material zu charakterisieren.

Der Unsicherheitsbeitrag, der sich durch Schwankungen der Kalibrierstandards zwischen verschiedenen Chargen eines Kits eines Herstellers oder durch Veränderungen der Kalibrierstandards eines Kits im Verlauf der Haltbarkeitsfrist ergibt, wird vom Hersteller in der Regel nicht angegeben.

In Ermangelung von zertifiziertem Referenzmaterial gelten diese Einschränkungen auch für Quantifizierungen mittels PCR. Auch hier kann sich das Quantifizierungsergebnis nur auf das aktuell zur Kalibrierung verwendete Material beziehen. Zumeist sind dies in LVU oder Ringversuchen getestete Qualitätskontroll-Standards (s.o.).

Bis auf als "glutenfrei" ausgelobte Lebensmittel existieren in Deutschland für Allergene keine Höchstgehalte. Auch in Fällen, in denen die Überschreitung der allergologisch relevanten Referenzdosis für ein allergenes Protein betrachtet werden muss, kann die Berücksichtigung einer Messunsicherheit relevant sein. Ansonsten genügt für die Beurteilung und Auslösung weiterer Maßnahmen in der Regel die ungefähre Größenordnung des Allergengehaltes, so dass die Angabe einer Messunsicherheit nicht erforderlich ist.

## **Empfehlung**

In Prüfberichten wird die Messunsicherheit bei quantitativen Allergen-ELISA- oder Allergen-PCR-Verfahren i. d. R. mit  $\pm 50\%$  des berichteten Allergen-Gehaltes (als relativer Wert) angegeben. Diese Messunsicherheit ergibt sich aus der Zielstandardabweichung von 25 % und dem Erweiterungsfaktor  $k = 2$ . Die Zielstandardabweichung von 25 % hat sich bei Laborvergleichsuntersuchungen als realistisch und der Leistungsfähigkeit der Verfahren entsprechend erwiesen und umfasst die aus Wiederholbestimmungen resultierende Unsicherheit (zufällige Abweichung) sowie die systematische Abweichung vom „akzeptierten Bezugswert“ (anstelle der Abweichung vom „wahren Wert“).

Voraussetzung ist, dass bei der Methodenverifizierung im eigenen Labor die Vorgaben der einschlägigen Normen eingehalten werden (z.B. DIN EN 15633-1: 2019-12). Ferner soll durch die erfolgreiche Teilnahme an Laborvergleichsuntersuchungen belegt werden, dass diese Messunsicherheit realistisch ist, was i. d. R. durch das Erreichen eines z-Scores  $\leq 2$  erfolgen kann.

## **Begründung**

Eine Abweichung von maximal  $\pm 50\%$  vom robusten Mittelwert wird von vielen LVU-Anbietern als Kriterium zum Bestehen festgelegt, da diese die „best practice“ widerspiegeln, und entspricht dann einem z-Score von 2.

Bei der Ermittlung von Wiederfindungsraten wird gemäß Abschnitt 5.3 bzw. 7.4 der DIN EN 15633-1:2019-12 eine Wiederfindungsrate von 50 – 150 % als akzeptabel angesehen, sofern sie konsistent ist. Auch in einer Publikation internationaler Experten auf dem Gebiet der Allergen-Analytik wird eine zu erreichende Wiederfindungsrate von 50 – 150 % für Methodvalidierungsstudien vorgegeben (Abbott et al. 2010).

Gemäß Anmerkung 2 in Abschnitt 7.2.2.1 der DIN EN ISO / IEC 17025:2018-03 können die für die Validierung des Verfahrens genutzten Techniken u. a. die folgenden oder eine Kombination daraus sein:

„e) Vergleiche zwischen Laboratorien;

f) Ermittlung der Messunsicherheit der Ergebnisse auf der Grundlage des Verständnisses der theoretischen Grundlagen des Verfahrens und der praktischen Erfahrung mit der Durchführung des Probenahme- oder Prüfverfahrens.“

In Abschnitt 7.6.3 führt die genannte Norm aus „Wenn die Art des Probenahme- oder Prüfverfahrens eine präzise Bestimmung der Messunsicherheit ausschließt, muss eine Schätzung erfolgen, basierend auf dem Verständnis der theoretischen Grundlagen oder der praktischen Erfahrung mit der Durchführung des Verfahrens.“

Die hier beschriebene Art und Weise der Abschätzung der Messunsicherheit basiert auf diesen Techniken.

### **Literatur:**

Abbott, M., Hayward, St., Ross, W. et al. (2010): Validation Procedures for Quantitative Food Allergen ELISA Methods: Community Guidance and Best Practices. J. AOAC Int. 93, 442–450.

DIN EN 15633-1:2019-12 – Lebensmittel – Nachweis von Lebensmittelallergenen mit immunologischen Verfahren – Teil 1: Allgemeine Betrachtungen; Deutsche Fassung EN 15633-1:2019.

DIN EN 15634-1: 2019-12 – Lebensmittel – Nachweis von Lebensmittelallergenen mit molekularbiologischen Verfahren – Teil 1: Allgemeine Betrachtungen; Deutsche Fassung EN 15634-1:2019 ( $\cong$  ASU L 00.00-151).

DIN EN 15842: 2019-12 – Lebensmittel – Nachweis von Lebensmittelallergenen – Allgemeine Betrachtungen und Validierung von Verfahren; Deutsche Fassung EN 15842:2019.

DIN EN ISO / IEC 17025:2018-03 – Allgemeine Anforderungen an die Kompetenz von Prüf- und Kalibrierlaboratorien (ISO/IEC 17025:2017); Deutsche und Englische Fassung EN ISO/IEC 17025:2017.

DIN EN 17254: 2019-12 – Mindestleistungsanforderungen für die Glutenbestimmung mit ELISA; Deutsche Fassung EN 17254:2019.

EURACHEM/CITAC Guide CG 4: Quantifying Uncertainty in Analytical Measurement; Third Edition.

Owen, L., Gilbert J. (2009): Proficiency Testing for Quality Assurance of Allergens Methods. Anal. Bioanal. Chem. 395, 147–153.

Scharf, A., Kasel, U., Wichmann, G., Besler, M. (2013): 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.). J. Agric. Food Chem. 61, 10261–10272.

