





Allergens: All Kits are Equal – but some are more Equal than Others

Bert Popping

bertpopping@eurofins.com

Which Validation Protocol to use? Which Reference Materials to use?

Internal Standard produced from ringtrial material.

Estimated concentration 10ppm

	Lot x	Lot y	Lot z
Vendor I Ø	8ppm	8ppm	12 ppm
Vendor II Ø	16ppm	4ppm	6ppm

**MHLW released the acceptance criteria
(validation protocol) for JSM on 22nd of June, 2006.**

**If other kits will be validated by the protocol, MHLW will
accept them as JSM-compliant.**

Validation Protocol

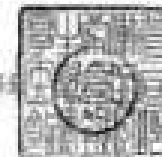
試験試料2gをポリプロピレン製遠沈管（50 mL容）に振り探心転。円底沈管にQC緩衝液*3 7.5 mLを加えてボルテックスミキサーで激しく混合し、混合後さらにQC緩衝液7.5 mL、並びに α -アミラーゼ*4（1mg/mL）200 μ Lを加え再びボルテックスミキサーで混合する。混合処理後、37℃で1時間加温する。この間、数回遠沈管を反転させ試料を攪拌する。加温処理後、Proteinase K*5 100 μ LならびにRNase A 20 μ Lを加えボルテックスミキサーで混合し、その後、60℃で2時間加温する。この間、数回遠沈管を反転させ試料を攪拌する。次いで、低温下（4℃）、3,000 \times g以上の条件で15分間遠心する。遠心終了後得られる上清をポリプロピレン製遠沈管（15 mL容）に移す。移し終えた後、溶液中に浮遊する残存物を除くためさらに軽く遠心する。この遠心操作の間にQIAGEN Genomic-Tip 20/GをQBT緩衝液*3 1 mLを用いて平衡化しておく。遠心操作終了後の上清を平衡化済みQIAGEN Genomic-Tip 20/Gに2 mLずつ数回に分けて負荷する。上清全量の負荷操作を終了した後、tipにQC緩衝液*3 2 mLを負荷し、洗浄する。同様の洗浄操作を合計3回繰り返した後、tipを新しいポリプロピレン製遠沈管（15 mL容）に移し変える。洗浄操作終了後のtipに予め50℃に温めておいたQC緩衝液*3 1 mLを加えDNAを溶出する。同tipに対し、もう1度同様の溶出操作を行う。得られた計2 mLの溶出液に対し、0.7倍量のイソプロピルアルコールを加えよく混合し、低温下（4℃）、10,000 \times g以上の条件で15分間遠心し、沈殿*6を除かないよう注意を払いつつ上清のみを除く。上清を除いた後の遠沈管に70 %エタノール 1 mLを加え、低温下（4℃）、10,000 \times g以上の条件で5分間遠心する。上清を捨て、残った沈殿を乾燥させるため、アスピレーターを用いて5分間程度の真空乾燥処理を行う。このとき完全に乾燥しないように注意する。沈殿が乾燥したことを確認した後、水100 μ Lを加え、65℃、5分間の条件での加温処理。ならびにピペティングによりDNAを溶解させ、DNA試料原液とする。

70

食安発第0627003号
平成18年6月22日

長 野

厚生労働省医薬食品局食品安全部



「物質を含む食品の検査方法について（一部改正）」

「含む食品の検査方法については、平成14年11月6日付け食と労働省医薬品食品保健部長通知（平成17年12月11日付け食与衛通知及び平成18年3月24日付け食安発第0334001号西職通）によって通知しているところであるが、今後の技術的進歩適時を下記のように改正することとしたので、検査を行う場所以より実施されたい。

記

I. Specificity

- Kits have never been used on such a number of complex matrices
- Not each matrix can be validated
- Not every cross reactivity can be excluded

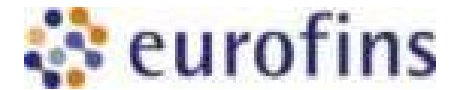
II. QA

- a) control Lot-to-Lot variability across several lots
- b) check kit insert 😊

...especially with some highly processed matrices, different ELISA kits can give greatly varying results...

What do we (the users) really need?

Facts...



The situation:

Production of ELISA kits is very competitive market

Each kit producer would like to see his kit(s) recognised

Validation is a necessary procedures for all kits

Time and financial constraints do not allow all kits to be validated in interlab study

Kits cannot be tested on every matrix

Kit Validation:

- Like at AOAC, different validation levels should be set that are equal for all kits / tests.
- These guidelines should be feasible, generic, pragmatic, internationally agreed and adhered to.
- The lower level should be time-limited, i.e. if a kit is on the market for longer than a year and only has the lowest level of validation, it should lose this level automatically (assuming this kit sells well, cost / benefit are such that further validation can be afforded)

Kit Validation:

Validation levels:

- first stage – basic validation: to get the kit with minimal but efficient validation out onto the market. **Validation timeframe** set to **3 months**. Valid for 1 year (similar to PTM)
- second stage – thorough validation: AOAC IUPAC protocol or similar agreed protocol. **Validation timeframe: 6months**. Valid **until kit components change** (to be defined if antibody batch triggers or if change of chemicals supplier is sufficient). Small trial if components change, This validation level can lead to internationally accepted standard (ISO, CEN etc.)

Kit Validation:

Besides all other relevant factors, the matrices tested (i.e. **cross-specificities**) should be the same for each kit targeting the same organisms (plant), e.g. „hazelnut allergen test kit”

There should be a **minimum requirement for a number of matrices to be tested.**

Manufactures can of course **exceed** this and test further matrices

Generally,

- a) **cross specificities** should **not** be seen as a **stigma** of certain kits
- b) The information of cross specificities **should be communicated** to a central place (e.g. AOAC Presidential Taskforce Newsroom or similar) where kit users can inform themselves (with information on why this is suspected and how this was verified)
- c) **verified cross specificities** should be **mentioned** in the updated **kit insert**
- d) Kits **cannot be tested on every matrix** but:
 - i) the **matrices** used in the validation study **should be stated**
 - ii) if **unexpected results** are obtained with certain matrices, this should be **communicated freely**

**Kits on the market do work for most samples!
But all kits have their limitations**

**open communication on these limitations and user-
feedback**

**are essential to achieve best possible results for
manufacturers and users**

**THANK YOU FOR YOUR
ATTENTION**



Dr. Bert Popping
Director Molecular Biology & Immunology
Eurofins Scientific Group

P: + 44 776 816 6673

F: + 44 870 168 8047

E: bertpopping@eurofins.com