# RESOLUTION OIV/OENO 427/2010

# CRITÈRES POUR LES MÉTHODES DE QUANTIFICATION DES RESIDUS POTENTIELLEMENT ALLERGENIQUES DE PROTÉINES DE COLLAGE DANS LE VIN

L'ASSEMBLÉE GÉNÉRALE

VU l'article 2 paragraphe 2 iv de l'accord portant création de l'Organisation internationale de la vigne et du vin,

SUR PROPOSITION de la Sous-Commission des méthodes d'analyse et d'appréciation des vins,

CONSIDÉRANT que les activités de l'OIV conduisent à participer à la protection de la santé des consommateurs et à contribuer à la sécurité sanitaire des aliments

PRÉCISE que ces critères devraient être réexaminés en tenant compte des décisions d'autres organismes internationaux,

RECONNAIT qu'il n'est pas prescrit de méthodes spécifiques de détermination des protéines de collage dans le vin et que plusieurs méthodes ELISA sont déjà disponibles et peuvent être appliquées

DÉCIDE d'adopter les critères ci-dessous pour les méthodes de quantification des résidus potentiellement allergéniques des protéines de collage dans le vin :

# CRITÈRES POUR LES MÉTHODES DE QUANTIFICATION DES RESIDUS POTENTIELLEMENT ALLERGENIQUES DE PROTÉINES DE COLLAGE DANS LE VIN

## 1. Définitions des critères des méthodes

Justesse= Étroitesse de l'accord entre la valeur moyenne obtenue à partir d'une grande série de résultats d'essais et la valeur de référence acceptée

r = Limite de répétabilité : valeur en dessous de laquelle on peut estimer que se situe la différence absolue entre deux résultats d'essais uniques, obtenus dans des conditions de répétabilité (c.-à-d. même échantillon, même opérateur, même appareillage, même laboratoire, et court intervalle de temps) avec une probabilité spécifique (en général 95%), d'où r = 2,8 x $s_r$.

$S_r$ = Écart type calculé à partir des résultats produits dans des conditions de



Exemplaire certifié conforme Tbilisi, 25 juin 2010
Le Directeur Général de l'OIV
Secrétaire de l'Assemblée Générale
Frederico CASTELLUCCI

© OIV 2010

répétabilité.

$RSD_r$= Écart type relatif calculé à partir des résultats produits dans des conditions de répétabilité [($S_r/\bar{x}$) x 100], où est la moyenne des résultats de tous les laboratoires et échantillons.

R = Limite de reproductibilité : valeur en dessous de laquelle on peut estimer que se situe la différence absolue entre des résultats d'essais uniques obtenus dans des conditions de reproductibilité (c.-à-d. sur un matériel identique, par des opérateurs travaillant dans des laboratoires différents et utilisant la méthode d'essai normalisée) avec une certaine probabilité (en général 95%) ; R = 2,8 x $s_R$.

$S_R$ = Écart type calculé à partir des résultats produits dans des conditions de reproductibilité.

$RSD_R$= Écart type relatif calculé à partir des résultats produits dans des conditions de reproductibilité [(SR/ $\bar{x}$ x 100]

$H_{OR}$= Valeur HORRAT : valeur $RSD_R$ observée, divisée par la valeur $RSD_R$ calculée à l'aide de l'équation de Horwitz [1].

$B_0$ = Moyenne du Blanc

LOD = Limite de detection, calculée en tant que LOD = $B_0$ + 3*Sr($B_0$)

LOQ = Limite de quantification, calculée en tant que LOD = $B_0$+ 10*Sr($B_0$)

## 2. Aspects généraux

**Exigences**

La méthode d'analyse doit être associée aux pratiques œnologiques spécifiques

**Additifs ou auxiliaires technologiques contenant des protéines allergéniques**

Chaque produit doit être caractérisé du point de vue chimique et le contrôle qualité est strictement nécessaire

**Classe des méthodes analytiques**

D'une manière générale, les méthodes immunoenzymatiques sont considérées comme les plus appropriées et les plus faciles à mettre en œuvre pour le contrôle de routine des allergènes.

**La détermination des résidus de protéines de collage allergéniques dans les vins peut utiliser des méthodes ELISA sandwich, Compétitives, Directes ou Indirectes.**

**Si aucun anticorps enzymatique n'est disponible, un mélange d'anticorps biotinylés et un conjugué avidine-HRP peut être utilisé pour la détection**

**Anticorps**



Exemplaire certifié conforme Tbilisi, 25 juin 2010
Le Directeur Général de l'OIV
Secrétaire de l'Assemblée Générale
Frederico CASTELLUCCI

© OIV 2010

- Caractérisation des anticorps (évaluation de la détection des allergènes reconnus à forte ou faible affinité)
- Spécificité élevée pour les auxiliaires technologiques du commerce (caractérisés comme indiqué ci-dessus)
- Caractérisation de l'activité croisée en tenant compte des protéines généralement utilisées dans les pratiques œnologiques
- Capacité de détecter des dérivés d'allergènes résultant de traitements œnologiques (protéolyse ou molécules modifiées)

**Méthode**

- Les anticorps doivent avoir des propriétés de liaison optimales dans des échantillons de vin
- Les méthodes doivent avoir des performances optimales dans des échantillons de vin ayant des caractéristiques chimiques différentes (pH et extrait sec, vin rouge et vin blanc, etc.)
- Les résultats avec des vins provenant de zones géographiques différentes (même en cas d'application de pratiques œnologiques différentes) doivent être comparables
- Les propriétés de liaison des anticorps doivent être optimales par rapport à différentes conditions de maturation du vin (temps, températures, changements de couleur, etc.)

# 3. Type de méthodes

Il n'est pas encore prescrit de méthodes spécifiques de détermination des protéines de collage dans le vin. Plusieurs méthodes ELISA sont déjà disponibles et peuvent être appliquées.

Les laboratoires devront utiliser une méthode validée en fonction des exigences de l'OIV et répondant aux critères de performance énoncés dans le tableau 1. Dans la mesure du possible, la validation comprendra un matériau de référence certifié parmi les matériaux de l'essai collaboratif. Dans le cas contraire, une évaluation alternative de la justesse devra être effectuée.



Exemplaire certifié conforme Tbilisi, 25 juin 2010
Le Directeur Général de l'OIV
Secrétaire de l'Assemblée Générale
Frederico CASTELLUCCI

© OIV 2010

**Protocole général de la méthode ELISA Directe et Indirecte**

La méthode directe, en une étape, utilise uniquement un anticorps conjugué qui est soumis à incubation avec l'antigène contenu dans l'échantillon/la référence et lié à la surface,

La méthode indirecte en deux étapes utilise un anticorps secondaire conjugué pour la détection. En premier lieu, l'anticorps primaire est incubé avec l'antigène contenu dans l'échantillon/la référence et lié au puits. Cette opération est suivie d'une incubation avec l'anticorps secondaire conjugué qui reconnaît l'anticorps primaire.

**Direct**

1. Préparer une surface sur laquelle est lié l'antigène de l'échantillon
2. Bloquer tous les sites de liaison non spécifiques sur la surface.
3. Appliquer les anticorps liés à des enzymes qui se lient spécifiquement à l'antigène.
4. Rincer la plaque de façon à éliminer les anticorps en excès (non liés à l'antigène).
5. Ajouter une substance chimique qui sera convertie par l'enzyme en couleur, fluorescence ou en signal électrochimique
6. Mesurer l'absorbance, la fluorescence ou le signal électrochimique (le courant) des puits de la plaque, afin de déterminer la présence et la quantité d'antigène

Avant l'analyse, les préparations d'anticorps doivent être purifiées et conjuguées.

**Indirect**

1. Préparer une surface sur laquelle est lié l'antigène de l'échantillon
2. Bloquer tous les sites de liaison non spécifiques sur la surface.
3. Appliquer les anticorps primaires liés à des enzymes qui se lient spécifiquement à l'antigène.
4. Rincer la plaque de façon à éliminer les anticorps primaires en excès (non liés à l'antigène).
5. Appliquer les anticorps secondaires liés à l'enzyme qui sont spécifiques des anticorps primaires.
6. Rincer la plaque, de façon à éliminer les anticorps conjugués à l'enzyme en excès (non liés).



Exemplaire certifié conforme Tbilisi, 25 juin 2010
Le Directeur Général de l'OIV
Secrétaire de l'Assemblée Générale
Frederico CASTELLUCCI

© OIV 2010

7. Ajouter une substance chimique qui sera convertie par l'enzyme en couleur, fluorescence ou en signal électrochimique
8. Mesurer l'absorbance, la fluorescence ou le signal électrochimique (le courant) des puits de la plaque, afin de déterminer la présence et la quantité d'antigène

Avant l'analyse, les deux préparations d'anticorps doivent être purifiées et l'une d'elle conjuguée.

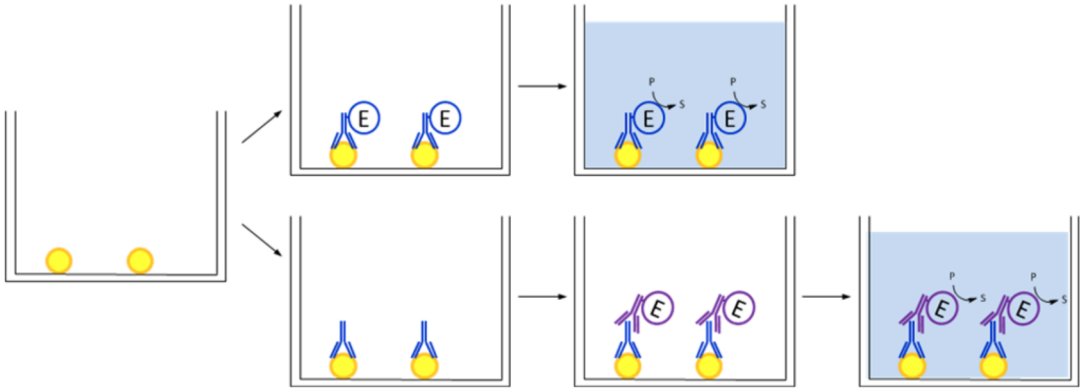

**Figure 1:** ELISA direct et indirect

Pour la plupart des applications, une plaque microtitre en polystyrène à hautes capacités de liaison convient parfaitement ; consulter cependant les instructions du fabricant pour déterminer le type de plaque le plus approprié pour la liaison de l'antigène donné.

Le principal avantage de la méthode ELISA directe et indirecte est sa grande sensibilité obtenue par la mise en place par un procédé relativement simple avec des chances réduites de liaisons non-spécifiques. Toutefois, elle ne s'applique que dans les cas de figures qui contiennent des niveaux peu élevés de protéine non-antigène.

**Protocole général de la méthode ELISA Compétitive**

Le terme compétitif décrit des essais où la mesure implique la quantification d'une substance selon sa capacité à interférer avec un système établi. La détection peut se faire directement, selon la méthode en une étape, ou indirectement, selon la méthode en deux étapes.

**Direct**



Exemplaire certifié conforme Tbilisi, 25 juin 2010
Le Directeur Général de l'OIV
Secrétaire de l'Assemblée Générale
Frederico CASTELLUCCI

© OIV 2010

1. Préparer une surface à laquelle est liée une quantité connue de l'antigène voulu
2. Bloquer tous les sites de liaison non spécifiques sur la surface
3. Appliquer l'échantillon (antigène) ou la référence et les anticorps liés à des enzymes qui se lient spécifiquement à l'antigène sur une microplaque revêtue. Les antigènes immobilisés à la surface et les antigènes en solution entrent en compétition pour les anticorps. Ainsi, plus il y aura d'antigène dans l'échantillon, moins l'anticorps pourra se lier à l'antigène immobilisé
4. Rincer la plaque de façon à éliminer les anticorps en excès (non liés) et les complexes anticorps-antigènes non liés
5. Ajouter une substance chimique qui sera convertie par l'enzyme en couleur, fluorescence ou en signal électrochimique
6. Mesurer l'absorbance, la fluorescence ou le signal électrochimique (le courant) des puits de la plaque, afin de déterminer la présence et la quantité d'antigène

Avant l'analyse, les préparations d'anticorps doivent être purifiées et doivent être conjuguées..

**Indirect**

1. Préparer une surface à laquelle est liée une quantité connue d'antigène
2. Bloquer tous les sites de liaison non spécifiques sur la surface
3. Appliquer l'échantillon (antigène) ou la référence et les anticorps liés à des enzymes qui se lient spécifiquement à l'antigène sur une microplaque revêtue. Les antigènes immobilisés à la surface et les antigènes en solution entrent en compétition pour les anticorps. Ainsi plus il y aura d'antigène dans l'échantillon, moins l'anticorps pourra se lier à l'antigène immobilisé.
4. Rincer la plaque de façon à éliminer les anticorps en excès (non liés) et les complexes anticorps-antigènes non liés
5. Ajouter un anticorps secondaire, spécifique à l'anticorps primaire, conjugué avec une enzyme
6. Rincer la plaque de façon à éliminer les anticorps conjugués en excès (non liés)
7. Ajouter une substance chimique qui sera convertie par l'enzyme en couleur, fluorescence ou en signal électrochimique



Exemplaire certifié conforme Tbilisi, 25 juin 2010
Le Directeur Général de l'OIV
Secrétaire de l'Assemblée Générale
Frederico CASTELLUCCI

© OIV 2010

8. Mesurer l'absorbance, la fluorescence ou le signal électrochimique (le courant) des puits de la plaque, afin de déterminer la présence et la quantité d'antigène

Avant l'analyse, les deux préparations d'anticorps doivent être purifiées et l'une d'elle doit être conjuguée..

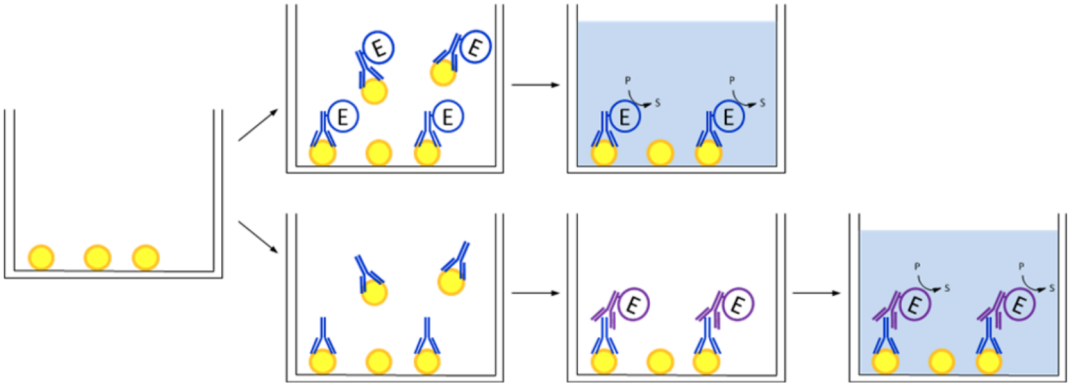

**Figure 2:** ELISA Competitive direct et indirect

Pour l'ELISA compétitive, plus la concentration initiale d'antigène est élevée, plus le signal éventuel est faible.

Pour la plupart des applications, une microplaque à haute capacité de liaison est ce qu'il y a de mieux, toutefois, consulter les directives du fabricant pour déterminer quel type de plaque convient le mieux pour lier l'antigène considéré

**Protocole général pour la méthode ELISA Sandwich**

La méthode ELISA sandwich mesure la quantité d'antigènes entre deux couches d'anticorps (c'est-à-dire les anticorps de capture et de détection). L'antigène à mesurer doit contenir au moins deux sites antigéniques (épitopes) différents pour lier deux anticorps différents. Les anticorps monoclonaux et polyclonaux peuvent être utilisés.

**Direct**

1. Préparer une surface sur laquelle est liée l'anticorps de capture
2. Bloquer tous les sites de liaison non spécifiques sur la surface
3. Appliquer le standard ou l'échantillon contenant l'antigène



Exemplaire certifié conforme Tbilisi, 25 juin 2010
Le Directeur Général de l'OIV
Secrétaire de l'Assemblée Générale
Frederico CASTELLUCCI

© OIV 2010

4. Laver la plaque afin d'éliminer les molécules non reconnues par l'anticorps de capture
5. Ajouter des anticorps liés à l'enzyme (anticorps de détection) qui se lient spécifiquement à l'antigène
6. Rincer la plaque de façon à éliminer les anticorps liés à l'enzyme en excès (non liés)
7. Ajouter une substance chimique qui sera convertie par l'enzyme en couleur, fluorescence ou en signal électrochimique
8. Mesurer l'absorbance, la fluorescence ou le signal électrochimique (le courant) des puits de la plaque, afin de déterminer la présence et la quantité d'antigène

Avant l'analyse, les deux préparations d'anticorps doivent être purifiées et l'une d'elle doit être conjuguée..

**Indirect**

1. Préparer une surface à laquelle est liée l'anticorps de capture
2. Bloquer tous les sites de liaison non spécifiques sur la surface
3. Appliquer l'échantillon contenant l'antigène
4. Laver la plaque afin d'éliminer les molécules non reconnues par l'anticorps de capture
5. Ajouter les anticorps primaires qui se lient spécifiquement à l'antigène
6. Rincer la plaque de façon à éliminer les anticorps primaires en excès (non liés)
7. Ajouter des anticorps liés à l'enzyme (anticorps secondaires) qui se lient spécifiquement à l'anticorps primaire.
8. Rincer la plaque de façon à éliminer les anticorps liés à l'enzyme en excès (non liés)
9. Ajouter une substance chimique qui sera convertie par l'enzyme en couleur, fluorescence ou en signal électrochimique
10. Mesurer l'absorbance, la fluorescence ou le signal électrochimique (le courant) des puits de la plaque, afin de déterminer la présence et la quantité d'antigène

Avant l'analyse, les deux préparations d'anticorps doivent être purifiées et l'une d'elle doit être conjuguée..



Exemplaire certifié conforme Tbilisi, 25 juin 2010
Le Directeur Général de l'OIV
Secrétaire de l'Assemblée Générale
Frederico CASTELLUCCI

© OIV 2010

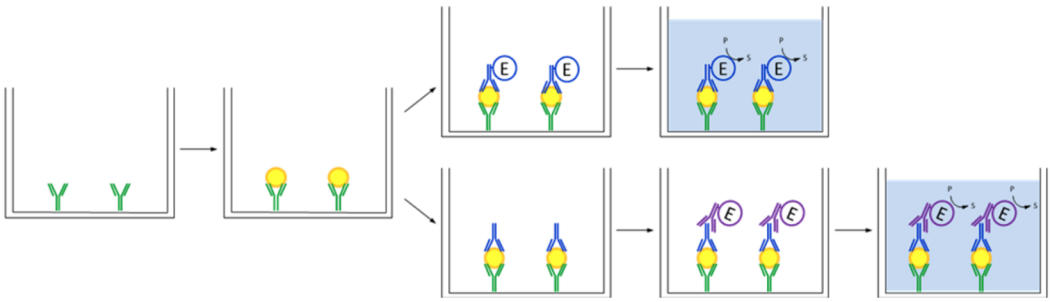

**Figure 3:** ELISA Sandwich direct et indirect

Pour la méthode ELISA Sandwich indirecte, il est nécessaire que les anticorps de capture et de détection soient cultivées au sein d'espèces différentes (par exemple souris et lapin) pour que les anticorps secondaires attachés à des enzymes spécifiques à la détection d'anticorps ne se lient pas également aux anticorps de capture.

Pour la plupart des applications, une microplaque à haute capacité de liaison est ce qu'il y a de mieux, toutefois, consulter les directives du fabricant pour déterminer quel type de plaque convient le mieux pour lier l'antigène considéré

Pour la méthode ELISA Sandwich, la mesure est proportionnelle à la quantité d'antigènes contenue dans les échantillons.

L'avantage de la méthode ELISA Sandwich est que les échantillons d'origine n'ont pas besoin d'être purifiés avant l'analyse, et la méthode peut être très sensible

**Tableau 1 : Critères de performance des méthodes d'analyse relatives aux résidus potentiellement allergénique de protéines de collage du vin**

| Paramètre | Valeur/Commentaire |
|---|---|
| Applicabilité | Convient pour déterminer les agents de collage dans le vin à des fins officielles. |
| Limite de détection | (exprimée en mg/L)<br>Caséine : au moins 0,5<br>Ovalbumine : au moins 0,5<br>Ichtyocolle : au moins 0,5<br>Lysozyme : au moins 0,5 |



Exemplaire certifié conforme Tbilisi, 25 juin 2010
Le Directeur Général de l'OIV
Secrétaire de l'Assemblée Générale
Frederico CASTELLUCCI

© OIV 2010

| | |
|---|---|
| Limite de quantification | (exprimée en mg/L)<br>Caséine : au moins 1 mg/L<br>Ichtyocolle : au moins 1 mg/L<br>Lysozyme : au moins 1 mg/L<br>Ovalbumine : au moins 1 mg/L |
| Fidélité | Valeurs HORRAT inférieures ou égales à 2 dans l'essai collaboratif de validation |
| Recouvrement | 80% - 105% (comme indiqué dans l'essai collaboratif) |
| Spécificité | Pas d'interférences de la matrice |
| Justesse | $\lvert\bar{x} - m\rvert < 1{,}96 * \sqrt{S_{R(lab)^2 - S_{r(lab)^2}} * (1 - 1/n)}$<br>où m est la valeur certifiée du matériau de référence vin et $\bar{x}$ est la moyenne de $n$ mesures de la concentration en protéines de ce vin, dans le même laboratoire.<br>$S_{r(lab)}$ représentent les écarts-types calculés à partir des résultats obtenus dans un même laboratoire dans des conditions de répétabilité<br>$S_{R(lab)}$ représentent les écarts-types calculés à partir des résultats obtenus dans différents laboratoires dans des conditions de reproductibilité. |



Exemplaire certifié conforme Tbilisi, 25 juin 2010
Le Directeur Général de l'OIV
Secrétaire de l'Assemblée Générale
Frederico CASTELLUCCI

© OIV 2010