
**Lait et produits laitiers — Lignes directrices
pour une description normalisée des tests
immuno-enzymatiques — Détermination de
la teneur en aflatoxine M₁**

*Milk and milk products — Guidelines for a standardized description of
competitive enzyme immunoassays — Determination of aflatoxin M₁
content*

iTeh STANDARD PREVIEW
(standards.iteh.ai)

ISO 14675:2003

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/474f68ab-87f6-4006-ad78-f10bc9bb02c1/iso-14675-2003>



Numéros de référence
ISO 14675:2003(F)
FIL 186:2003(F)

© ISO et FIL 2003

PDF – Exonération de responsabilité

Le présent fichier PDF peut contenir des polices de caractères intégrées. Conformément aux conditions de licence d'Adobe, ce fichier peut être imprimé ou visualisé, mais ne doit pas être modifié à moins que l'ordinateur employé à cet effet ne bénéficie d'une licence autorisant l'utilisation de ces polices et que celles-ci y soient installées. Lors du téléchargement de ce fichier, les parties concernées acceptent de fait la responsabilité de ne pas enfreindre les conditions de licence d'Adobe. Le Secrétariat central de l'ISO et la FIL déclinent toute responsabilité en la matière.

Adobe est une marque déposée d'Adobe Systems Incorporated.

Les détails relatifs aux produits logiciels utilisés pour la création du présent fichier PDF sont disponibles dans la rubrique General Info du fichier; les paramètres de création PDF ont été optimisés pour l'impression. Toutes les mesures ont été prises pour garantir l'exploitation de ce fichier par les comités membres de l'ISO et les comités nationaux de la FIL. Dans le cas peu probable où surviendrait un problème d'utilisation, veuillez en informer le Secrétariat central de l'ISO à l'adresse donnée ci-dessous.

iTeh STANDARD PREVIEW
(standards.iteh.ai)

[ISO 14675:2003](https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/474f68ab-87f6-4006-ad78-f10bc9bb02c1/iso-14675-2003)

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/474f68ab-87f6-4006-ad78-f10bc9bb02c1/iso-14675-2003>

© ISO et FIL 2003

Droits de reproduction réservés. Sauf prescription différente, aucune partie de cette publication ne peut être reproduite ni utilisée sous quelque forme que ce soit et par aucun procédé, électronique ou mécanique, y compris la photocopie et les microfilms, sans l'accord écrit soit de l'ISO soit de la FIL à l'adresse respective ci-après.

ISO copyright office
Case postale 56 • CH-1211 Geneva 20
Tel. + 41 22 749 01 11
Fax + 41 22 749 09 47
E-mail copyright@iso.org
Web www.iso.org

Fédération Internationale de Laiterie
Diamant Building • Boulevard Auguste Reyers 80 • B-1030 Bruxelles
Tel. + 32 2 733 98 88
Fax + 32 2 733 04 13
E-mail info@fil-idf.org
Web www.fil-idf.org

Imprimé en Suisse

Avant-propos

L'ISO (Organisation internationale de normalisation) est une fédération mondiale d'organismes nationaux de normalisation (comités membres de l'ISO). L'élaboration des Normes internationales est en général confiée aux comités techniques de l'ISO. Chaque comité membre intéressé par une étude a le droit de faire partie du comité technique créé à cet effet. Les organisations internationales, gouvernementales et non gouvernementales, en liaison avec l'ISO participent également aux travaux. L'ISO collabore étroitement avec la Commission électrotechnique internationale (CEI) en ce qui concerne la normalisation électrotechnique.

Les Normes internationales sont rédigées conformément aux règles données dans les Directives ISO/CEI, Partie 3.

La tâche principale des comités techniques est d'élaborer les Normes internationales. Les projets de Normes internationales adoptés par les comités techniques sont soumis aux comités membres pour vote. Leur publication comme Normes internationales requiert l'approbation de 75 % au moins des comités membres votants.

L'attention est appelée sur le fait que certains des éléments de la présente Norme internationale peuvent faire l'objet de droits de propriété intellectuelle ou de droits analogues. L'ISO ne saurait être tenue pour responsable de ne pas avoir identifié de tels droits de propriété et averti de leur existence.

L'ISO 14675|FIL 186 a été élaborée par le comité technique ISO/TC 34, *Produits alimentaires*, sous-comité SC 5, *Lait et produits laitiers*, et la Fédération internationale de laiterie (FIL), en collaboration avec l'AOAC International. Elle est publiée conjointement par l'ISO et la FIL, et séparément par l'AOAC International.

ISO 14675:2003
<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/474f68ab-87f6-4006-ad78-f10bc9bb02c1/iso-14675-2003>

Avant-propos

La **FIL (Fédération internationale de laiterie)** est une fédération mondiale du secteur laitier avec un Comité National dans chacun de ses pays membres. Chaque Comité National a le droit de faire partie des Comités permanents de la FIL auxquels sont confiés les travaux techniques. La FIL collabore avec l'ISO et avec l'AOAC International pour l'élaboration de méthodes normalisées d'analyse et d'échantillonnage pour le lait et les produits laitiers.

Les projets de Normes internationales adoptés par les Équipes d'Action et les Comités permanents sont soumis aux Comités Nationaux pour vote. Leur publication comme Normes internationales requiert l'approbation de 50 % au moins des Comités Nationaux votants.

L'ISO 14675|FIL 186 a été élaborée par le comité technique ISO/TC 34, *Produits alimentaires*, sous-comité SC 5, *Lait et produits laitiers*, et la Fédération internationale de laiterie (FIL), en collaboration avec l'AOAC International. Elle est publiée conjointement par l'ISO et la FIL, et séparément par l'AOAC International.

L'ensemble des travaux a été confié à l'Équipe d'Action mixte ISO/FIL/AOAC, *Contaminants organiques*, du Comité permanent sur les *Méthodes d'analyse pour les additifs et les contaminants*, sous la conduite de son chef de projet, Dr. E. Märklbauer (DE).

iTeh STANDARD PREVIEW (standards.iteh.ai)

[ISO 14675:2003](https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/474f68ab-87f6-4006-ad78-f10bc9bb02c1/iso-14675-2003)

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/474f68ab-87f6-4006-ad78-f10bc9bb02c1/iso-14675-2003>

Introduction

Les méthodes spécifiques, comme les méthodes ELISA, ne peuvent pas être décrites dans des Normes internationales distinctes. Par conséquent, la présente Norme internationale a pour objet de fournir des lignes directrices concernant les paramètres fondamentaux requis pour l'évaluation/la validation des tests immuno-enzymatiques pour le dosage quantitatif de l'aflatoxine M₁ dans le lait et les produits laitiers.

Actuellement, plusieurs types de tests immuno-chimiques quantitatifs sont commercialisés; tous sont basés sur le principe du dosage immuno-enzymatique. Cependant, comme le principe de l'essai microplaque de 96 puits est le plus couramment utilisé pour les mesurages quantitatifs, les paramètres donnés dans la présente Norme internationale sont spécifiquement adaptés à ce principe et ne sont pas nécessairement applicables à d'autres tests.

iTeh STANDARD PREVIEW (standards.iteh.ai)

[ISO 14675:2003](https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/474f68ab-87f6-4006-ad78-f10bc9bb02c1/iso-14675-2003)

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/474f68ab-87f6-4006-ad78-f10bc9bb02c1/iso-14675-2003>

iTeh STANDARD PREVIEW **(standards.iteh.ai)**

ISO 14675:2003

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/474f68ab-87f6-4006-ad78-f10bc9bb02c1/iso-14675-2003>

Lait et produits laitiers — Lignes directrices pour une description normalisée des tests immuno-enzymatiques — Détermination de la teneur en aflatoxine M₁

1 Domaine d'application

La présente Norme internationale donne des lignes directrices concernant l'utilisation des méthodes de criblage pour le dosage de l'aflatoxine M₁ dans le lait et les produits laitiers, basées sur des tests immuno-enzymatiques.

Pour des raisons légales, les résultats de tests immuno-enzymatiques positifs nécessitent une confirmation par une méthode de référence généralement admise. Cependant, dans la mesure où ils répondent aux spécifications indiquées ci-après, les tests immuno-enzymatiques peuvent être utilisés pour des contrôles qualité de routine, surtout si l'absence d'aflatoxine M₁ au-delà de la limite réglementaire doit être confirmée.

2 Principe

Les méthodes immuno-chimiques sont basées sur la capacité des anticorps à se lier à des substances spécifiques. L'association réversible entre des anticorps et leurs antigènes est appelée réaction immunologique. Les forces de liaison mises en jeu sont des interactions moléculaires faibles, comme les forces de Coulomb et de Van der Waals, ainsi que des liaisons hydrogène et des liaisons hydrophobes.

La réaction antigène-anticorps obéit à la loi d'action de masse, et la quantité d'antigène ou d'anticorps présents dans le mélange réactionnel peut être déduite de l'importance de la réaction.

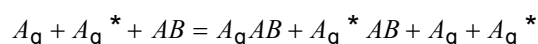
La «qualité» d'un test immuno-enzymatique est fonction du principe immuno-chimique de la méthode, des propriétés des réactifs, du type d'essai et des erreurs expérimentales. Ces principes fondamentaux déterminent la sensibilité, la spécificité, la fidélité et l'exactitude de l'essai.

Concernant le principe de la méthode, il existe une distinction entre les méthodes compétitives et les méthodes non compétitives.

Pour des raisons pratiques, ces méthodes nécessitent un antigène marqué ou un anticorps marqué pour permettre d'observer la réaction antigène-anticorps.

Les méthodes compétitives sont basées sur la compétition de l'antigène libre (A_g) et de l'antigène marqué (A_g^*) pour un nombre limité de sites combinant des anticorps (AB).

Ce principe immuno-chimique peut être présenté schématiquement selon la formule suivante:



Dans la plupart des cas, la réponse du test représente la liaison avec l'antigène marqué, mais toute mesure de la distribution de l'antigène marqué est en principe possible.

Pour la détection des composés de faible poids moléculaire, comme les mycotoxines, qui possèdent seulement un site de liaison d'anticorps (épitope), le test compétitif s'impose. Pour permettre de distinguer les réactifs non complexés des réactifs complexés, la plupart des tests utilisent soit des anticorps (test compétitif direct), soit des antigènes (test compétitif indirect) liés à une phase solide utilisée comme immuno-adsorbant. Ainsi, tous les réactifs qui ne sont pas liés par l'anticorps peuvent facilement être éliminés par «lavage» de la phase solide.

3 Test immuno-enzymatique de l'aflatoxine M₁

D'après les informations données dans les principes généraux des tests immuno-enzymatiques (voir article 2), il est recommandé qu'une méthode ELISA pour l'aflatoxine M₁ réponde aux spécifications données au Tableau 1.

Tableau 1 — Spécification des paramètres du test

Paramètre	Spécification
Anticorps Type	Polyclonal ou monoclonal
Antigène marqué Marqueur enzymatique Type	Peroxydase du raifort Peroxydase du raifort aflatoxine B ₁ ou M ₁ -oxime
Principe de l'essai Principe immuno-chimique Type Durée	Test immuno-enzymatique compétitif Test microplaque de 96 puits 3 h à 4 h
Sensibilité de l'essai Concentration d'AFM ₁ donnant une absorbance relative ^a de: 80 % 50 %	< 20 ng/l < 50 ng/l
Spécificité de l'essai Réaction croisée avec l'aflatoxine M ₁ Réaction croisée avec d'autres aflatoxines (présentes dans le lait)	100 % < 20 %
Étude statistique Étalons — répliquats — dilutions — plage de concentrations (ng/ml) Échantillons — répliquats — dilutions	2 ou plus 6 ou plus, y compris l'étalon zéro entre 5 ng/l et 50 ng/l ou plus 2 ou plus si nécessaire
Calcul Courbe étalon	Approximation d'un spline cubique, modèle logistique à quatre paramètres, régression linéaire (seulement sur la partie linéaire de la courbe étalon) ^b
Fidélité Étalons — coefficient de variation de répétabilité de l'absorbance relative — coefficient de variation de reproductibilité de l'absorbance relative Échantillons — limite de répétabilité (ng/kg) — limite de reproductibilité (ng/kg) — limite de détection (ng/kg) — limite de quantification (ng/kg)	< 10 % < 20 % < 100 ng/kg pour un niveau de 200 ng/kg (poudre de lait) < 150 ng/kg pour un niveau de 200 ng/kg (poudre de lait) < 5 ng/kg (lait) < 10 ng/kg (lait)
Préparation des échantillons	Écrémage par centrifugation; le lait doit être reconstitué à partir de la poudre de lait (mise en solution)
Taux de récupération	> 80 % pour la plage de 10 ng/kg à 50 ng/kg (lait) ^c
^a Absorbance de l'étalon ou de l'échantillon/absorbance de l'étalon zéro × 100.	
^b Voir paramètres statistiques en 6.3.	
^c La correction des résultats pour le taux de récupération n'est généralement pas nécessaire.	

4 Sensibilité

La sensibilité potentielle d'un test immuno-enzymatique est directement liée à l'affinité de l'anticorps, et peut être calculée si la constante d'équilibre est connue (voir référence[2]). Comme la réaction antigène-anticorps peut être décrite à l'aide des cinétiques de réaction et des équations thermodynamiques, le temps et la température ont également une influence sur la sensibilité de l'essai.

5 Spécificité

Outre la sensibilité, la spécificité d'une méthode immuno-chimique est importante pour l'efficacité de l'essai. En principe, une réaction spécifique en immunologie peut être définie comme suit: *En présence de différentes molécules, les anticorps spécifiques ne doivent complexer qu'un seul type de molécules.*

La probabilité de former un «mauvais» complexe détermine la spécificité de la réaction. En d'autres termes, la spécificité est déterminée par la correspondance stérique (en trois dimensions) de l'antigène et de l'anticorps et par le nombre d'interactions moléculaires se produisant entre les deux molécules. Pour évaluer la spécificité, il convient de prendre en considération d'une part la structure de l'antigène et d'autre part l'homogénéité ou l'hétérogénéité des anticorps.

Une préparation d'anticorps est homogène si tous les anticorps se lient à un seul et même épitope, quel que soit le degré d'affinité. Cette condition est remplie par les anticorps monoclonaux, mais également par les antisérums contre les composés de faible poids moléculaire (haptènes). À l'inverse, une préparation d'anticorps est hétérogène si elle contient différentes populations d'anticorps, spécifiques à différents épitopes.

Sur le plan moléculaire, la réaction croisée «vraie» décrit le cas où au moins deux antigènes différents sont en compétition pour le même épitope de liaison d'anticorps. On observe presque exclusivement une réactivité croisée vraie dans les tests compétitifs utilisant des anticorps monoclonaux ou des antisérums contre des composés de faible poids moléculaire. En pratique, cela signifie qu'une concentration suffisamment élevée d'une substance donnant une réaction croisée vraie donne les mêmes résultats que les «bonnes» substances dans un essai compétitif.

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/474f68ab-87f6-4006-ad78-f10bc9bb02c1/iso-14675-2003>

Il est important de mentionner qu'il est souvent impossible d'effectuer une distinction entre une influence non spécifique sur le test (par exemple les effets de matrice) et l'influence spécifique des substances provoquant une réaction croisée. Dans les deux cas, la réponse de l'essai est la même, et l'on obtient un résultat faux positif ou faux négatif. Cependant, compte tenu du principe du test immuno-enzymatique, les résultats faux négatifs sont improbables dans les tests compétitifs.

6 Paramètres statistiques

6.1 Généralités

Pour discuter des paramètres statistiques influant sur la «qualité» des tests immuno-enzymatiques, il convient de noter que les méthodes statistiques générales permettant de définir la limite de détection, la limite de quantification, la reproductibilité, etc. devraient également être appliquées à ces tests. Cependant, certains paramètres influent sur la fidélité de l'essai (répétabilité) et sur l'exactitude des résultats de l'essai, qui sont typiques pour les tests immuno-enzymatiques microplaques de 96 puits.

Pour les analyses de routine, ces méthodes spécifient généralement un nombre de puits pour la préparation de la courbe étalon, et un nombre fixe de répliquats pour les étalons et les échantillons, ainsi qu'un nombre de dilutions pour chaque échantillon.

6.2 Fidélité

Dans le processus décrit en 6.1, deux facteurs affectent largement la fidélité de l'estimation. Le premier est l'emplacement des valeurs d'absorbance observées sur la courbe d'étalonnage. Le deuxième est le nombre de répliquats par échantillon.