

---

---

**Produits alimentaire — Analyse  
des biomarqueurs moléculaires —  
Méthodes immunochimiques pour  
la détection et la quantification des  
protéines**

*Foodstuffs — Molecular biomarker analysis — Immunochemical  
methods for the detection and quantification of proteins*

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

ISO 21572:2019

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/d4312497-31ce-4864-8644-34766459b25d/iso-21572-2019>



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

ISO 21572:2019

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/d4312497-31ce-4864-8644-34766459b25d/iso-21572-2019>



### DOCUMENT PROTÉGÉ PAR COPYRIGHT

© ISO 2019

Tous droits réservés. Sauf prescription différente ou nécessité dans le contexte de sa mise en œuvre, 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, ou la diffusion sur l'internet ou sur un intranet, sans autorisation écrite préalable. Une autorisation peut être demandée à l'ISO à l'adresse ci-après ou au comité membre de l'ISO dans le pays du demandeur.

ISO copyright office  
Case postale 401 • Ch. de Blandonnet 8  
CH-1214 Vernier, Genève  
Tél.: +41 22 749 01 11  
Fax: +41 22 749 09 47  
E-mail: [copyright@iso.org](mailto:copyright@iso.org)  
Web: [www.iso.org](http://www.iso.org)

Publié en Suisse

## Sommaire

Page

<b>Avant-propos</b> .....	<b>iv</b>
<b>Introduction</b> .....	<b>v</b>
<b>1</b> <b>Domaine d'application</b> .....	<b>1</b>
<b>2</b> <b>Références normatives</b> .....	<b>1</b>
<b>3</b> <b>Termes et définitions</b> .....	<b>1</b>
<b>4</b> <b>Principe</b> .....	<b>1</b>
<b>5</b> <b>Réactifs</b> .....	<b>2</b>
<b>6</b> <b>Matériel de laboratoire</b> .....	<b>2</b>
<b>7</b> <b>Échantillonnage</b> .....	<b>2</b>
<b>8</b> <b>Mode opératoire</b> .....	<b>2</b>
8.1    Généralités.....	2
8.2    Préparation de la solution d'échantillon.....	2
8.3    Extraction.....	3
8.4    Préparation des courbes d'étalonnage, des contrôles positifs et des matériaux de référence.....	3
8.5    Mode opératoire d'analyse.....	3
<b>9</b> <b>Interprétation et expression des résultats</b> .....	<b>3</b>
9.1    Généralités.....	3
9.2    Analyse quantitative et semi-quantitative.....	4
9.3    Analyse qualitative.....	4
<b>10</b> <b>Paramètres spécifiques pouvant influencer sur les résultats</b> .....	<b>4</b>
10.1   Généralités.....	4
10.2   Considérations particulières.....	5
10.2.1   Sélectivité.....	5
10.2.2   Efficacité de l'extraction.....	5
10.2.3   Effets de matrice.....	5
10.2.4   Applicabilité de l'analyse.....	6
10.2.5   Effet crochet.....	6
10.2.6   Parallélisme/Linéarité.....	6
10.2.7   Limites de détection.....	6
10.2.8   Limites de quantification.....	6
<b>11</b> <b>Méthode de confirmation</b> .....	<b>6</b>
<b>12</b> <b>Rapport d'essai</b> .....	<b>7</b>
<b>Annexe A (informative) Détection d'une protéine par ELISA</b> .....	<b>8</b>
<b>Annexe B (informative) Détection de protéine(s) à l'aide de dispositifs d'immunochromatographie</b> .....	<b>20</b>
<b>Bibliographie</b> .....	<b>28</b>

## 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 (IEC) en ce qui concerne la normalisation électrotechnique.

Les procédures utilisées pour élaborer le présent document et celles destinées à sa mise à jour sont décrites dans les Directives ISO/IEC, Partie 1. Il convient, en particulier, de prendre note des différents critères d'approbation requis pour les différents types de documents ISO. Le présent document a été rédigé conformément aux règles de rédaction données dans les Directives ISO/IEC, Partie 2 (voir [www.iso.org/directives](http://www.iso.org/directives)).

L'attention est attirée sur le fait que certains des éléments du présent document 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. Les détails concernant les références aux droits de propriété intellectuelle ou autres droits analogues identifiés lors de l'élaboration du document sont indiqués dans l'Introduction et/ou dans la liste des déclarations de brevets reçues par l'ISO (voir [www.iso.org/brevets](http://www.iso.org/brevets)).

Les appellations commerciales éventuellement mentionnées dans le présent document sont données pour information, par souci de commodité, à l'intention des utilisateurs et ne sauraient constituer un engagement.

Pour une explication de la nature volontaire des normes, la signification des termes et expressions spécifiques de l'ISO liés à l'évaluation de la conformité, ou pour toute information au sujet de l'adhésion de l'ISO aux principes de l'Organisation mondiale du commerce (OMC) concernant les obstacles techniques au commerce (OTC), voir [www.iso.org/avant-propos](http://www.iso.org/avant-propos).

Le présent document a été élaboré par le comité technique ISO/TC 34, *Produits alimentaires*, sous-comité SC 16, *Méthodes horizontales pour l'analyse moléculaire de biomarqueurs*.

Cette troisième édition annule et remplace la deuxième édition (ISO 21572:2013) qui a fait l'objet d'une révision technique. Les principales modifications par rapport à l'édition précédente sont les suivantes:

- le titre a été modifié pour spécifier que le présent document concerne les méthodes immunochimiques de détection des protéines;
- une introduction a été ajoutée;
- les termes, définitions et références ont été mis à jour;
- le texte a été modifié pour améliorer l'applicabilité du présent document aux applications générales d'analyse des protéines.

Il convient que l'utilisateur adresse tout retour d'information ou toute question concernant le présent document à l'organisme national de normalisation de son pays. Une liste exhaustive desdits organismes se trouve à l'adresse [www.iso.org/fr/members.html](http://www.iso.org/fr/members.html).

## Introduction

Les techniques analytiques reposant sur les interactions des liaisons immunochimiques hautement spécifiques sont devenues des outils indispensables pour analyser de nombreux analytes chimiques et macromoléculaires différents, notamment les protéines. Les méthodes utilisant ces techniques sont communément reconnues dans les communautés scientifique et réglementaire. Les méthodes d'analyse immunochimique sont couramment utilisées pour détecter (présence ou absence) et/ou quantifier les analytes protéiques spécifiques tels que les protéines allergènes, les protéines marqueurs de maladies ou les protéines nouvellement exprimées dans les cultures biotechnologiques.

Avant l'analyse, les échantillons nécessitent généralement d'être broyés ou transformés de manière à faciliter l'extraction de l'analyte hors de la matrice des échantillons. Lors du développement de la méthode analytique, il est donc essentiel de choisir un tampon d'extraction approprié qui n'interfère pas avec le bon déroulement de la méthode analytique et qui assure un niveau approprié de stabilité des analytes pendant l'analyse.

L'analyse immunochimique comprend généralement au moins deux étapes:

- la liaison ou capture de l'analyte d'intérêt présent dans les échantillons avec un anticorps ciblant spécifiquement l'analyte;
- la détection du complexe anticorps-analyte à l'aide d'une technique qui signale l'interaction spécifique.

Une fois la méthode analytique développée et optimisée, il convient de la valider pour démontrer que ses performances sont fiables et adaptées à l'usage prévu et pour caractériser ses limites. Cela implique d'effectuer plusieurs expériences sur des échantillons réels pour évaluer certains paramètres tels que l'exactitude, la fidélité, la sensibilité, la sélectivité et les limites de détection ou de quantification. La validation permet également d'établir les critères de performance de la méthode en fonction desquels les performances analytiques de routine peuvent être comparées pour l'obtention systématique de résultats analytiques acceptables.

Le présent document fournit un ensemble de modes opératoires généraux et de considérations analytiques applicables à l'utilisation de techniques immunochimiques pour analyser les protéines cibles. Il donne des informations sur le traitement des échantillons, l'extraction, la configuration de l'analyse, l'interprétation et le compte-rendu des résultats, ainsi que sur les paramètres de performance d'analyse. Il comprend deux annexes qui contiennent des exemples de modes opératoires qui peuvent être suivies lors de l'analyse d'une protéine d'intérêt (POI) dans plusieurs matrices de référence en utilisant des méthodes reposant sur des essais immuno-enzymatiques (ELISA) et des dispositifs d'immunochromatographie (LFD).

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

ISO 21572:2019

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/d4312497-31ce-4864-8644-34766459b25d/iso-21572-2019>

# Produits alimentaire — Analyse des biomarqueurs moléculaires — Méthodes immunochimiques pour la détection et la quantification des protéines

## 1 Domaine d'application

Le présent document énonce des critères de performances pour les méthodes immunochimiques de détection et/ou de quantification d'une protéine spécifique ou de protéine(s) d'intérêt (POI) dans une matrice donnée.

Les méthodes décrites sont applicables à l'analyse de protéines provenant de divers types d'échantillons. Certaines utilisations de ces méthodes comprennent, entre autres, l'analyse des protéines impliquées dans la production végétale et agroalimentaire, la transformation des aliments, la commercialisation des produits alimentaires, la sécurité des aliments, les biotechnologies ou l'indexation des maladies.

## 2 Références normatives

Les documents suivants sont cités dans le texte de sorte qu'ils constituent, pour tout ou partie de leur contenu, des exigences du présent document. Pour les références datées, seule l'édition citée s'applique. Pour les références non datées, la dernière édition du document de référence s'applique (y compris les éventuels amendements).

ISO 16577, *Analyse moléculaire de biomarqueurs — Termes et définitions*

ISO 21572:2019

[https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/d4312497-31ce-4864-8644-](https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/d4312497-31ce-4864-8644-34766459b25d/iso-21572-2019)

3 Termes et définitions [34766459b25d/iso-21572-2019](https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/d4312497-31ce-4864-8644-34766459b25d/iso-21572-2019)

Pour les besoins du présent document, les termes et définitions de l'ISO 16577, ainsi que les suivants, s'appliquent.

L'ISO et l'IEC tiennent à jour des bases de données terminologiques destinées à être utilisées en normalisation, consultables aux adresses suivantes:

- ISO Online browsing platform: disponible à l'adresse <https://www.iso.org/obp>
- IEC Electropedia: disponible à l'adresse <http://www.electropedia.org/>

### 3.1

#### conjugué

matériel produit en liant deux substances ou plus par liaison covalente par l'intermédiaire de groupes chimiques

Note 1 à l'article: Les conjugués d'anticorps couplés à des fluorochromes (par exemple entité chimique telle qu'une molécule ou un groupe, qui émet de la lumière en réponse à une excitation par absorption de lumière incidente), des substances radiomarquées, de l'or ou des enzymes sont souvent utilisés dans les immunoanalyses.

## 4 Principe

La protéine cible est extraite selon le mode opératoire décrit pour cette matrice spécifique et un anticorps spécifique est utilisé pour détecter ou mesurer la concentration de la POI présente dans l'échantillon. La détection de protéines spécifiques dans les ingrédients selon une méthode fondée sur les protéines repose sur les principes de base suivants:

- prélèvement d'un échantillon représentatif de la matrice;

- extraction des protéines;
- détection et/ou quantification de la protéine spécifique dérivée de la matrice étudiée.

## 5 Réactifs

Au cours de l'analyse, utiliser uniquement des réactifs de qualité analytique reconnue et de l'eau désionisée, distillée, purifiée ou ayant subi un traitement équivalent, sauf indication contraire du fabricant des réactifs ou du kit.

D'autres réactifs, tels que les anticorps, les conjugués, les substrats, les solutions de blocage et les tampons sont propres à la méthode. Pour des cas spécifiques de réactifs, tels que des étalons protéiniques ou des matériaux de référence, des anticorps libres ou sensibilisés sur une surface solide, des contrôles et des échantillons, se référer à la méthode concernée.

Les réactifs sont spécifiés en [A.4.2](#), [A.4.3](#), [B.4.2](#) et [B.4.3](#).

## 6 Matériel de laboratoire

Le matériel de laboratoire est spécifié en [A.5](#) et [B.5](#).

## 7 Échantillonnage

L'échantillonnage ne fait pas partie de la méthode spécifiée dans le présent document, bien que l'[Annexe A](#) et l'[Annexe B](#) donnent des instructions d'échantillonnage conformément aux méthodes appropriées. Il est recommandé que les parties concernées se mettent d'accord à ce sujet.

## 8 Mode opératoire

ISO 21572:2019  
<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/d4312497-31ce-4864-8644-34766459b25d/iso-21572-2019>

### 8.1 Généralités

Les conditions de stockage et la durée de conservation des dispositifs d'immunochromatographie, des anticorps, du conjugué, du substrat, etc., doivent être clairement spécifiées par le fournisseur.

Utiliser un matériel de laboratoire approprié ayant une faible capacité de liaison des protéines (par exemple tubes en polypropylène) afin d'empêcher l'adsorption des protéines pendant toute la durée du mode opératoire.

Dans le cadre de l'utilisation du présent document, les exigences générales relatives à l'assurance qualité des laboratoires doivent être respectées (par exemple étalonnage de l'appareillage, dosage en double, essais à blanc, utilisation de matériaux de référence, préparation de courbes d'étalonnage). Nettoyer avec soin l'ensemble de l'équipement se trouvant en contact direct avec l'échantillon afin d'éviter toute contamination. Voir l'ISO/IEC 17025 pour plus d'informations.

### 8.2 Préparation de la solution d'échantillon

Une fois qu'un échantillon représentatif est obtenu, préparer la solution d'échantillon. Les modes opératoires de préparation de l'échantillon sont décrits dans les [Annexes A](#) et [B](#).

Si nécessaire, broyer les échantillons tel que spécifié dans la méthode avant de prélever les prises d'essai. Les poudres et la farine peuvent présenter des propriétés de gonflement et sont susceptibles de requérir un volume de solution d'extraction plus élevé si la méthode du fabricant ne précise pas cette information. Si l'échantillon n'est pas utilisé immédiatement, respecter le mode opératoire de stockage de votre laboratoire (par exemple  $-20\text{ °C}$  ou inférieur).



Peser une quantité appropriée (telle que spécifiée en [A.6.6.1](#) et [B.6.2.1](#)) d'un échantillon pour essai représentatif pour analyse en vue d'obtenir une prise d'essai pour extraction. Ajouter la solution d'extraction, puis homogénéiser ou mélanger.

Les échantillons pour laboratoire renfermant d'importantes quantités de matières grasses peuvent ne pas s'avérer suffisamment homogènes; il convient, par conséquent, d'extraire une prise d'essai plus importante pour garantir sa représentativité. Le cas échéant, des instructions peuvent être trouvées dans les sections relatives à la préparation des échantillons des [Annexes A](#) et [B](#).

### 8.3 Extraction

Suivre un mode opératoire d'extraction adapté à la matrice. Les détails des conditions requises pour l'extraction ou la dilution des prises d'essai, des contrôles et des matériaux de référence sont indiqués à l'[Annexe A](#) pour la méthode ELISA et à l'[Annexe B](#) pour les dispositifs d'immunochromatographie. Il convient de suivre soigneusement les modes opératoires d'extraction validés pour la matrice. Il convient d'utiliser immédiatement les échantillons extraits ou de les traiter conformément au mode opératoire de stockage.

### 8.4 Préparation des courbes d'étalonnage, des contrôles positifs et des matériaux de référence

Pour la préparation des courbes d'étalonnage, des contrôles positifs et des matériaux de référence pour l'[Annexe A](#), il est recommandé d'utiliser des matériaux de référence adaptés à la matrice ou des matériaux de référence qui ont été validés pour la matrice. Des courbes d'étalonnage ne sont pas requises pour une application qualitative telle que les dispositifs d'immunochromatographie. Toutefois, des contrôles positifs et négatifs peuvent être préparés à la discrétion de l'analyste.

### 8.5 Mode opératoire d'analyse

Pour un essai quantitatif, sélectionner le nombre de puits requis (par exemple dans la méthode ELISA) pour la (ou les) prise(s) d'essai à analyser, y compris les blancs, les contrôles positifs et les contrôles négatifs, et ajouter chacun d'entre eux au moins en double, en les diluant correctement pour qu'ils se situent dans la gamme de l'analyse.

Pour un essai qualitatif ou semi-quantitatif, sélectionner le nombre requis d'essais (par exemple dispositifs d'immunochromatographie ou méthode ELISA) nécessaires pour les prises d'essai à analyser, y compris les blancs, les contrôles positifs et les contrôles négatifs. La stabilité du signal final peut varier. Relever les résultats aux intervalles de temps spécifiés dans les [Annexes A](#) et [B](#).

Selon la méthode choisie, respecter les instructions de chaque méthode pour l'analyse des échantillons, y compris pour les blancs, les matériaux de référence et/ou les étalons de mesure (si nécessaire). Laisser la réaction se dérouler pendant le laps de temps et dans la plage de température indiqués. Si nécessaire, terminer la réaction selon la méthode décrite en [A.6.6.2.7](#) et [B.6.4.2](#). Par exemple, si la méthode ELISA requiert l'acquisition de données sur un spectrophotomètre, effectuer cette étape. En cas d'essais qualitatifs, respecter les instructions fournies avec le kit. Ces essais sont généralement interprétés visuellement.

## 9 Interprétation et expression des résultats

### 9.1 Généralités

Les paramètres à interpréter varient selon que l'analyse est qualitative, semi-quantitative ou quantitative.

Pour les méthodes quantitatives, il convient que le coefficient de variation ( $C_v$ ) des valeurs de densité optique résultant de mesures en double d'une solution d'essai d'échantillon ne dépasse pas, en général,

15 %. De manière générale, il convient que le coefficient de variation des concentrations calculées résultant de mesures en double d'une solution d'essai d'échantillon ne dépasse pas 20 %.

Si la limite du CV est dépassée, il convient de répéter les analyses avec une solution d'essai d'échantillon fraîchement préparée. Dans ce cas, trois dosages au moins doivent être réalisés pour établir un CV (par exemple les valeurs de trois puits de microtitration).

Les résultats négatifs doivent être rapportés comme « négatifs à la limite de détection » et la limite de détection doit être rapportée.

Les résultats positifs situés sous la limite de quantification doivent être rapportés comme étant « positifs au-dessus de la limite de détection, mais en deçà de la limite de quantification ». Les limites de quantification et de détection doivent être rapportées.

### 9.2 Analyse quantitative et semi-quantitative

Les paramètres suivants doivent être évalués pour les analyses quantitatives et semi-quantitatives:

- données brutes obtenues sur la solution d'essai d'échantillon;
- blancs;
- matériaux de référence ou étalons de mesure;
- contrôles négatifs;
- %  $C_V$  entre les réplicats;
- %  $C_V$  des étalons;
- %  $C_V$  des échantillons de contrôle.

Conformément à l'ISO/IEC 17025, il convient, le cas échéant, de consigner l'incertitude de mesure.

Les résultats quantitatifs ne doivent pas être rapportés en extrapolant les chiffres au-delà du point le plus haut ou en deçà du point le plus bas de la courbe d'étalonnage.

### 9.3 Analyse qualitative

Pour les essais qualitatifs et toutes les applications s'y rapportant, les paramètres correspondants sont décrits dans les [Annexes A](#) et [B](#). La limite de détection doit être rapportée. Les résultats négatifs doivent être rapportés comme étant « négatifs à la limite de détection ».

Les résultats positifs doivent également inclure la limite de détection.

## 10 Paramètres spécifiques pouvant influencer sur les résultats

### 10.1 Généralités

Les critères de performances répertoriés dans la méthode figurant à l'[Annexe A](#) constituent un ensemble de spécifications de performances établies pour chaque méthode au cours du développement, de la validation et de l'utilisation en routine de la méthode. Ces paramètres doivent être estimés et évalués pour chaque méthode pour s'assurer qu'ils sont fiables et toujours de grande qualité. À chaque exécution d'une méthode, évaluer les données générées, puis les comparer avec les critères de performance définis pour la méthode.

Lorsqu'une valeur (par exemple, le coefficient de variation entre des mesures en double) ne répond pas aux spécifications d'analyse, le résultat est indiqué comme atypique et une évaluation plus fine des données est engagée. La liste des spécifications doit être considérée globalement, car si des paramètres, dans certains cas, peuvent ne pas répondre aux spécifications, les données peuvent néanmoins

demeurer parfaitement acceptables. Lorsqu'un critère quelconque n'est pas satisfait, il convient de le noter par écrit et d'évaluer les données afin de déterminer s'il convient d'ajuster l'analyse des résultats ou s'il convient de soumettre à un nouvel essai un échantillon particulier ou un ensemble d'échantillons. Il convient que de telles décisions dépendent du jugement de l'expert technique interprétant l'ensemble des critères.

Contrairement à la méthode décrite à l'[Annexe A](#), les critères de performance des essais d'immunochromatographie tels que décrits à l'[Annexe B](#) sont évalués au cours du développement de la méthode par le fabricant du kit. Il convient d'évaluer la répétabilité de la méthode dans le laboratoire avant de l'utiliser sur des échantillons pour essai. Les kits donnant de mauvais résultats ne doivent pas être utilisés.

## 10.2 Considérations particulières

### 10.2.1 Sélectivité

L'adéquation de la sélectivité de l'analyse pour un analyte particulier doit être prouvée pour chaque POI ou analyte (protéine) à mesurer dans chaque matrice soumise à essai. Le cas échéant, il convient d'évaluer la réactivité croisée lorsqu'il existe des analogues (protéines ayant une séquence ou une structure similaire). Pour détecter l'absence de POI dans un échantillon n'en contenant pas, analyser l'échantillon ne contenant pas de POI et un échantillon en contenant selon les dilutions appropriées, puis comparer les résultats.

Cela est généralement fait au cours du développement et de la validation de la méthode et ne s'avère pas nécessaire pendant l'analyse de routine d'échantillons pour lesquels la méthode a été préalablement validée. Il convient que le fabricant du kit fasse état de la sélectivité des kits d'essai, qu'ils utilisent la méthode ELISA ou l'immunochromatographie (par exemple dans les notices d'utilisation des produits du fabricant).

### 10.2.2 Efficacité de l'extraction

Un soin particulier doit être apporté à l'évaluation de l'impact des paramètres du processus appliqué à la production d'un échantillon pour laboratoire donné.

Pour garantir la sensibilité optimale de l'immunoanalyse, il convient que l'efficacité de l'extraction soit optimale, en particulier pour les méthodes quantitatives. Les performances de l'analyse dépendent de la matrice. Il convient de déterminer et de documenter l'efficacité de l'extraction pour chaque matrice.

La preuve de la reproductibilité du mode opératoire d'extraction doit être apportée et il convient que la méthode d'étalonnage (le cas échéant) tienne compte d'une extraction incomplète.

### 10.2.3 Effets de matrice

Le domaine d'application définit avec clarté et exactitude les matrices auxquelles l'immunoanalyse s'applique. L'utilisation de matériaux de référence adaptés à la matrice permet une comparaison directe entre les matériaux de référence et les échantillons. Toutefois, si les échantillons à analyser sont comparés à des matériaux de référence présentant une autre matrice, les effets de matrice devront être évalués.

Par exemple, préparer un extrait négatif pour chaque échantillon (matrice) à analyser par la méthode et un extrait d'un contrôle positif de concentration connue. Préparer une série de dilutions du contrôle positif dans l'extrait négatif et comparer la courbe dose-réponse obtenue avec la courbe d'étalonnage issue de la méthode. Si les deux courbes sont différentes, alors il existe un effet de matrice. Utiliser une matrice représentant au mieux les échantillons réels qui seront soumis à essai. Il convient également d'inclure, en tant que référence, une courbe de dilution d'un contrôle positif de concentration connue. Il convient que l'aspect de la courbe d'étalonnage ne soit pas modifié par les effets de matrice.

#### 10.2.4 Applicabilité de l'analyse

La transformation des aliments entraîne en général une dégradation ou une dénaturation de la POI, qui est susceptible de provoquer une variation substantielle de l'immunoréactivité. Il convient d'évaluer l'applicabilité des immunoanalyses à la POI dans les produits transformés.

#### 10.2.5 Effet crochet

Lors de l'analyse avec dispositif d'immunochromatographie basé sur les anticorps dans un format plaque, un effet crochet (saturation) pourrait produire un résultat faux négatif. Il est nécessaire de démontrer que la plage de concentration de travail couvre parfaitement le besoin pratique des échantillons pour essai de POI.

#### 10.2.6 Parallélisme/Linéarité

Pour les analyses quantitatives, il convient que la plage dynamique attendue pour l'immunoanalyse soit indiquée de manière explicite dans le domaine d'application de l'ensemble des matrices concernées. La relation entre la réponse de l'instrument et la concentration en POI connue peut ne pas être linéaire et doit être établie, pour chaque méthode d'immunoanalyse quantitative, par le fabricant. Cette relation est généralement de type hyperbolique si la concentration en POI est représentée avec une échelle linéaire, ou de type sigmoïdal avec une échelle de concentration logarithmique. Un modèle de régression logistique à 4 paramètres ou à 5 paramètres est la meilleure option pour une courbe d'étalonnage de type ELISA, la partie linéaire située au centre de la courbe sigmoïdale représentant la zone optimale pour l'analyse quantitative. D'autres modèles de régression (par exemple linéaire, quadratique, logit-log, spline, polynomial du troisième ordre) peuvent également convenir pour des parties limitées de la courbe d'étalonnage.

Un minimum de quatre points d'étalonnage, reflétant la partie utilisable de la courbe, doit être évalué à des fins de quantification, même si un ajustement logistique à 4 paramètres requiert au moins cinq points et qu'un ajustement logistique à 5 paramètres requiert au moins six points.

#### 10.2.7 Limites de détection

Il convient de ne pas interpréter les résultats en deçà de la limite de détection. Dans ce cas, les résultats doivent être rapportés conformément à une méthode applicable telle que décrite en [9.1](#) à [9.3](#).

#### 10.2.8 Limites de quantification

Les limites de quantification de chaque série d'étalons (ou de dilutions) doivent être indiquées de manière explicite.

La concentration estimée de solutions d'essai d'échantillon inconnues doit être interpolée et non extrapolée.

Les résultats situés en deçà de la limite de quantification ou au-delà ou en deçà des points d'étalonnage supérieurs et inférieurs ne doivent pas être extrapolés.

### 11 Méthode de confirmation

La crédibilité des analyses peut être établie via d'autres méthodes, telles que la technique par western blot, la chromatographie en phase liquide à haute performance (CLHP), la spectrométrie de masse (SM), ou via une analyse fonctionnelle, afin de mesurer des fractions d'échantillons de concentration connue. Comparer ensuite les résultats des deux méthodes sur les plans qualitatif et/ou quantitatif. Cet aspect revêt une importance particulière pour les immunoanalyses, car les anticorps sont susceptibles de réagir de façon croisée avec les autres analytes présents dans la matrice.