



Détection des allergènes dans le vin

18/08/2012



Détection des allergènes dans le vin



- Trois allergènes
 - Caséine
 - Ovalbumine
 - Lysozyme

- Deux techniques mises en œuvre
 - ELISA
 - LC-MS/MS

Détection des allergènes dans le vin ELISA

- 4 kits commerciaux mis en œuvre
 - Protocole extraction adapté
 - Protocole optimisé des cinétiques
 - Caséine
 - A
 - B
 - Ovalbumine
 - Lysozyme

Détection des allergènes dans le vin

ELISA - Caséine

Généralités

- Caséine : 80% des protéines du lait de vache
- Agent de collage utilisé pour traitement des oxydations des vins (*codex OIV Oeno 12/2003*) :
 - Poudre obtenue par coagulation du lait écrémé
 - Utilisation pur et/ou en mélange avec carbonate de potassium (maximum 25 %) ou hydrogénocarbonate de potassium.
- Contaminant testé par Phylogene
 - Mélange caséine (Sigma C7078) et carbonate de potassium (Sigma 209619)

Détection des allergènes dans le vin ELISA - Caséine

Données fabricant

	Cas A	Cas B
Spécificité des Anticorps	α -S1 Casein	α -, β - et κ - Caséinates
Réactivité croisée	Caséines d'autres mammifères	Caséines d'autres mammifères
LD	0.5ppm de poudre de lait <i>(soit 0,13ppm de caséine)</i>	<u>Pour le vin blanc :</u> 0.26ppm de Caséine soit 0.26mg de caséine /L de vin
LQ	1ppm de poudre de lait <i>(soit 0,26ppm de caséine)</i>	<u>Pour le vin blanc :</u> 0.5ppm de Caséine soit 0.5mg de caséine /L de vin
Taux de recouvrement	Entre 68 et 72% pour le vin rouge	Entre 78% et 117,1% pour les vins

Détection des allergènes dans le vin ELISA - Caséine

Test 1: Détermination de la LOD et la LOQ théoriques

- Matrices testées: Vin blanc et vin rouge
- Protocole: 6 extractions par matrice
- Kits utilisés :
 - A et B
- Principe du test :
 - Calcul DO LOD théorique: $DO + 3 \cdot \text{Ecart type}$
 - Calcul DO LOQ théorique: $DO + 10 \cdot \text{Ecart type}$
 - > Les concentrations théoriques sont déterminées à partir de l'équation de la courbe de la gamme du kit.

Détection des allergènes dans le vin ELISA – Caséine

- Résultats: Cas A

	Vin blanc	Vin rouge
<i>Moyenne des DO</i>	0,063	0.073
<i>Ecart type des DO</i>	0,029	0,040
DO LOD théorique	0,149	0,193
DO LOQ théorique	0,349	0,473
LOD théorique	0,06mg de caséine/L de vin* (soit 0.24ppm de poudre de lait écrémé)	0,10mg de caséine/L de vin* (soit 0.37ppm de poudre de lait écrémé)
LOQ théorique	0,20mg de caséine/L de vin* (soit 0.76ppm de poudre de lait écrémé)	0,27mg de caséine/L de vin* (soit 1.03ppm de poudre de lait écrémé)

* Valeurs calculées en utilisant un rapport de 26% entre la caséine et la poudre de lait écrémé

Détection des allergènes dans le vin ELISA – Caséine

- Résultats: Cas B

	Vin blanc	Vin rouge
<i>Moyenne des DO</i>	0.078	0.092
<i>Ecart type des DO</i>	0,017	0,051
DO LOD théorique	0,129	0,138
DO LOQ théorique	0,248	0,289
LOD théorique	0,16mg de caséine/L de vin* (soit 0.62ppm de poudre de lait écrémé)	0,19mg de caséine/L de vin* (soit 0.73ppm de poudre de lait écrémé)
LOQ théorique	0,49mg de caséine/L de vin* (soit 1.88ppm de poudre de lait écrémé)	0.60mg de caséine/L de vin* (soit 2.30ppm de poudre de lait écrémé)

* Valeurs calculées en utilisant un rapport de 26% entre la caséine et la poudre de lait écrémé

Détection des allergènes dans le vin ELISA - Caséine

Test 2: Vérification des seuils visés par OIV-COMEX 502-2012

- Matrices testées: Vin blanc et vin rouge
- Contaminant: Mélange Caséine (Sigma C7078) et carbonate de potassium (Sigma 209619)
- Kits utilisés:
 - Cas A
 - Cas B
- Protocole: Contamination des matrices aux niveaux 0.25mg et 0.5mg de Caséine/L de vin avant extraction.

Détection des allergènes dans le vin ELISA - Caséine

- Résultats: Cas A

Contaminant utilisé	Niveau de contamination	Vin Blanc			Vin rouge		
		Moyenne DO	Concentration obtenue en mg de caséine/l	TR	Moyenne DO	Concentration obtenue en mg de caséine/l	TR
Aucun	0ppm	0.049	0	/	0.062	0	/
Caséine	0,25ppm	0.442	0.14*	55%*	0.211	0.06*	43%*
	0,5ppm	0.411	0.12*	24%*	0.708	0.32*	65%*

* Hors gamme, extrapolation de la teneur en caséine

Détection des allergènes dans le vin ELISA - Caséine

- Résultats: Cas B

Contaminant utilisé	Niveau de contamination	Vin Blanc			Vin rouge		
		Moyenne DO	Concentration obtenue en mg de caséine/l	TR	Moyenne DO	Concentration obtenue en mg de caséine/l	TR
Aucun	0ppm	0.052	0	/	0.051	0	/
Caséine	0,25ppm	0.059	NA	NA	0.061	NA	NA
	0,5ppm	0.187	0.32*	64%*	0.243	0.45*	90%*

* Hors gamme, extrapolation de la teneur en caséine

Détection des allergènes dans le vin

ELISA - Ovalbumine

Généralités

- Ovalbumine 14.2% des protéines de l'œuf
(soit 54% des protéines du blanc d'œuf)
- Agent de collage utilisé pour la clarification des vins
(selon codex OIV Oeno 32/2000) :
 - Poudre obtenue par dessiccation de blanc d'œuf frais
 - Blanc d'œuf frais ou stérilisé
- Contaminants testés par Phylogene
 - Poudre d'ovalbumine (Calbiochem 32467)
 - Poudre de blanc d'œuf (réf. interne)

Détection des allergènes dans le vin ELISA - Ovalbumine

Données fabricant

	Ova
Calibration du kit	NIST Reference Material 8445 (poudre d'œuf entier)
Spécificité des Anticorps	Ovalbumine et Ovomucoïd
Réactivité croisée	Pas de réaction croisée avec la viande de poulet, de dinde de porc et de bœuf (cru ou cuit)
LD	<p><u>Pour le vin blanc :</u> 0,263ppm poudre d'œuf entier Soit 0.04mg d'ovalbumine/L de vin**</p> <p><u>Pour le vin rouge :</u> 0,280ppm poudre d'œuf entier Soit 0.04mg d'ovalbumine/L de vin**</p>
LQ	0,5ppm de poudre d'œuf entier (Soit 0.07mg d'ovalbumine/l)
Taux de recouvrement	Entre 82 et 112% pour le vin rouge

** Valeurs calculées en utilisant le rapport de 14.2% entre l'ovalbumine et la poudre d'œuf entie

Détection des allergènes dans le vin ELISA - Ovalbumine

Test 1: Détermination de la LOD et la LOQ théoriques

- Matrices testées: Vin blanc et vin rouge
- Protocole: 10 extractions par matrice
- Kit utilisé: Ova
- Principe du test :
 - Calcul DO LOD théorique: $DO + 3 \cdot \text{Ecart type}$
 - Calcul DO LOQ théorique: $DO + 10 \cdot \text{Ecart type}$

-> Les concentrations théoriques sont déterminées à partir de l'équation de la courbe de la gamme du kit.

Détection des allergènes dans le vin ELISA - Ovalbumine

- Résultats

	Vin blanc	Vin rouge
<i>Moyenne des DO</i>	0,048	0,056
<i>Ecart type des DO</i>	0,004	0,003
DO LOD théorique	0,058	0,066
DO LOQ théorique	0,083	0,090
LOD théorique	0,04mg d'ovalbumine/L de vin* (soit 0.32ppm de poudre d'œuf entière)	0,05mg d'ovalbumine/L de vin* (soit 0.32ppm de poudre d'œuf entière)
LOQ théorique	0,06mg d'ovalbumine/L de vin* (soit 0.43ppm de poudre d'œuf entière)	0,07mg d'ovalbumine/L de vin* (soit 0.32ppm de poudre d'œuf entière)

* Valeurs calculées en utilisant le rapport de 14.2% entre l'ovalbumine et la poudre d'œuf entière

Détection des allergènes dans le vin ELISA - Ovalbumine

Test 2: Vérification des seuils visés par OIV-COMEX 502-2012 et détermination du Taux de recouvrement

- Matrices testées: Vin blanc et vin rouge
- Contaminants:
 - Poudre d'ovalbumine (Calbiochem 32467)
 - Poudre de blanc d'œuf (réf. interne)
- Kit utilisé: Ova
- Protocole: Contamination des matrices aux niveaux 0.25mg et 0.5mg d'ovalbumine/l de vin avant extraction

Détection des allergènes dans le vin

ELISA - Ovalbumine

- Résultats

Contaminant utilisé	Niveau de contamination	Vin Blanc			Vin rouge		
		Moyenne DO	Concentration obtenue en mg d'ovalbumine/l	TR	Moyenne DO	Concentration obtenue en mg d'ovalbumine/l	TR
Aucun	0ppm	0.056	0	/	0.057	0	/
Ovalbumine	0,25ppm	0,205	0,14	58%	0,405	0,29	116%
	0,5ppm	0,448	0,32	64%	0,707	0,51	101%
Poudre de blanc d'œuf	0,25ppm	0,290	0,21	82%	0,508	0,36	146%
	0,5ppm	0,918	0,43	85%	0,582	0,65	131%

Détection des allergènes dans le vin

ELISA - Lysozyme

Généralités

- Lysozyme 0.9% des protéines de l'œuf
(soit 3.49% des protéines du blanc d'œuf)
- Agent d'inhibition de croissance des bactéries des vi
(selon codex OIV Oeno 15/2001 modifiée par Oeno 4/2007):
 - Poudre extraite du blanc d'œuf de poule
- Contaminant testé par Phylogene
 - Poudre de Lysozyme (Sigma)

Détection des allergènes dans le vin

ELISA - Lysozyme

Données fabricant

	Lyso
Spécificité des Anticorps	Lysozyme
LD	0.02ppm de Lysozyme
LQ	<u>Pour les vins :</u> 0,05ppm de lysozyme (Soit <i>0.05mg de lysozyme/L de vin</i>)
Taux de recouvrement	<u>Pour le vin blanc :</u> Entre <i>105%</i> et <i>111%</i> <u>Pour le vin rouge :</u> Entre <i>108%</i> et <i>101%</i>

* D'après protocole R6452 11-04-18k et le rapport de validation 08/2010 de R-biopharm et d'après Lacorn & al. 2010, Bulletin OIV, vol. 83, octobre-novembre-décembre 2010, n°956- 957, 958 p507-512.

Détection des allergènes dans le vin ELISA - Lysozyme

Test : Vérification des seuils visés par OIV-COMEX 502-2012 et détermination du Taux de recouvrement

- Matrices testées: Vin blanc et vin rouge
- Contaminant:
 - Lysozyme purifié
- Kit utilisé: Lyso
- Protocole: Contamination des matrices aux niveaux 0.25mg et 0.5mg de lysozyme de vin avant extraction

Détection des allergènes dans le vin

ELISA - Lysozyme

- Résultats:

Contaminant utilisé	Niveau de contamination	Vin Blanc			Vin rouge		
		Moyenne DO	Concentration obtenue en mg de lysozyme/l	TR	Moyenne DO	Concentration obtenue en mg de lysozyme/l	TR
Aucun	0ppm	0.075	0	/	0.106	0	/
Lysozyme	0,25ppm	2.476	0.34	136 %	1.623	0.16	64%
	0,50ppm	>2.600	>0.4	NA	>2.600	>0.4	NA

Détection des allergènes dans le vin ELISA

Conclusion

Caséine

- Les LOD et LOQ théoriques mesurées sont inférieures ou égales aux seuils 0.25mg/l et 0.50mg/l, mais les seuils de recouvrement sont inférieurs aux données fabricants. Ceci traduit soit une calibration surdosée soit un effet matrice inhibiteur des vins testés. Le kit CasB ne détecte pas 0,25mg/l et a fortiori en tenant compte du % de recouvrement
- **-> Un protocole associé à un kit peut être utilisé pour détecter la caséine dans du vin sous réserve d'un test de recouvrement**

Détection des allergènes dans le vin ELISA

Conclusion

Ovalbumine

- Les LOD et LOQ mesurées sont inférieures aux seuils 0.25mg/l et 0.50mg/l, et similaires aux données fabricant. Il en est de même pour les seuils de recouvrement. Un risque de faux positif existe dans le vin rouge avec un taux de recouvrement de 130 à 150%. On retrouve ici potentiellement un effet des polyphénols.
- **-> Un protocole associé au kit peut être utilisé pour détecter l'ovalbumine dans du vin sous réserve d'un test de recouvrement**

Détection des allergènes dans le vin ELISA

Conclusion

Lysozyme

- Kit annoncé avec un surdosage dans le vin de 100 à 110%, ce qui est vérifié pour les vins blancs et non pour les vins rouges. Un risque de faux positif existe pour le vin blanc
- **-> Un protocole associé au kit peut être utilisé pour détecter le lysozyme dans du vin sous réserve d'un test de recouvrement**