



PT FAPAS 27187 “Qualitative and /or quantitative test for Soya Protein in Wheat Flour”

1. Introduction:

Le LNR allergène organise une fois par an un proficiency test (PT) pour la détection de trace d’allergènes dans des denrées alimentaires.

Les années précédentes, les allergènes gluten, caséine, arachide et œuf avaient été sélectionnés.

Vu le faible nombre de laboratoires participants, une analyse statistique avec un calcul de z-score était difficilement réalisable.

L’AFSCA, le CER Groupe et l’ILVO ont donc décidé de choisir un PT organisé par un fournisseur externe et de le rendre obligatoire pour les laboratoires agréés.

Fin 2015, les labos agréés en allergènes ont été contactés par le LNR. Le paramètre soja leur a été proposé ; l’intérêt d’un PT soja pour les labos a été sondé. Certains se sont montrés intéressés dont LFSAL, ECCA, SGS, ILVO et CER Groupe. L’allergène soja a donc été retenu.

Plusieurs PT étaient disponibles commercialement (tableau 1)

| Promoter | PT Ref. | test type | start date | Matrice | allergen type |
|----------|---------|--|------------|-----------------------|---------------------|
| FAPAS | 27187 | · Qualitative and/or Quantitative test | 28/09/2016 | Wheat Flour | -Soya -Soya Protein |
| DRRR | 2010218 | | May 2016 | Biscuit | -Soya -Soya Protein |
| DLA | 12/2016 | · Qualitative test | July 2016 | multi-allergen matrix | Soybean |

Tableau 1 : PT soja commercialement disponible

La matrice biscuit utilisée dans le PT DRRR semblait intéressante ; cependant, le LNR et l’AFSCA n’ayant pas d’expérience avec ce fournisseur, ce PT n’a pas été choisi.

Le LNR a pris contact avec DLA demandant des détails concernant la matrice utilisée, ci-dessous, la réponse fournie par DLA : "4 Samples with Allergens in a simple Carrier Matrix are provided. The evaluation of results is strictly qualitative with indication of the obtained agreements with the consensus values of the participants and the spiking of samples. For analysis ELISA (+ Lateral Flow) and PCR can be applied." Ne sachant pas exactement ce que représente la matrice décrite, le PT DLA n’a pas été sélectionné.

Le PT organisé par la FAPAS 27187 “Qualitative and /or quantitative test for Soya Protein in Wheat Flour” a finalement été retenu.

2. Invitation

Une invitation a été envoyée le 08/06/16 aux laboratoires suivants: CARAH, CER Groupe, ECCA, Eurofins Food Testing Belgium, ILVO, LFSAL, LOVAP, Nutrilab, Phytocontrol, Rikilt et SGS.

Les laboratoires agréés (CER Groupe, ILVO et LFSAL) pour le paramètre soja étaient obligés de participer. Le LNR a donc demandé à ces 3 laboratoires de confirmer leur inscription.

Deux labos non agréés, SGS et Ecce avaient répondu fin 2015 qu'ils étaient intéressés, ils n'ont finalement pas confirmé leur inscription.

3. Réception des échantillons

L'envoi des échantillons était initialement prévu le 28/09/16.

Suite à des difficultés techniques rencontrées par la FAPAS, les échantillons ont finalement été livrés aux laboratoires inscrits la semaine du 18/11/16, voir ci-dessous mail reçu de la FAPAS le 09/11/16.

*“Dear Participant,
I am writing to inform you that Fapas - Food Chemistry test 27187 that was delayed from the 28th of September 2016 will now be dispatched on the 18th of November 2016.
Please accept my apologies for any inconvenience caused.
Kind regards,
Fapas – Food Chemistry “*

4. Analyses

Les instructions du PT se trouvent en annexe de ce rapport.

Les résultats devaient être envoyés pour le 12/01/17 via le site de la FAPAS. Des résultats qualitatifs et/ou quantitatifs étaient attendus par échantillon.

Dans le cas d'un résultat qualitatif, il était demandé de répondre « detected » ou « not detected ».

Pour un résultat quantitatif, le résultat devait être donné en mg de protéine de soja par kg.

Les labos ont reçu deux échantillons à analyser, 27187 A et 27187 B.

4.1 Analyses réalisées par le laboratoire 1

Le labo 1 s'est inscrit deux fois à ce PT.

- La première analyse a été réalisée avec le kit R-Biopharm – Ridascreen Fast Soya (R 7102). La limite de détection est de 0.24 mg de protéines de soja par kg (ppm) et la limite de quantification est de 2.5 mg de protéine de soja par kg (ppm) pour cette méthode.
- Le deuxième lot d'échantillons a été analysé avec une méthode UHPLC-MS/MS ». Le standard NIST3234 a été utilisé pour la quantification. La limite de détection pour cette méthode est de 5 mg de protéine de soja par kg (ppm).

Les méthodes sont accréditées pour des méthodes qualitatives, des résultats quantitatifs ont cependant été envoyés.

4.2 Analyses réalisée au laboratoire 2

Ce laboratoire a utilisé un kit qPCR (FoodProof Soya Detection Kit vendu par Bioteccon Diagnostics).

Des résultats qualitatifs et quantitatifs ont été rendus à la FAPAS, voir tableau 2. La limite de détection pour la partie qualitative du test est estimée à 40 copies de soja dans 50 ng d'ADN total.

La limite de détection pour la partie quantitative est de 0,1 mg/kg in soya-spiked rice flour.

La quantification a été réalisée en utilisant un standard RM800, provenant de chez Bioteccon Diagnostics.

4.2 Analyses réalisée au laboratoire 3

Le laboratoire 3 a utilisé le kit R-Biopharm – Ridascreen Fast Soya (R 7102) pour l'analyse. Des résultats quantitatifs ont été rendus

5. Résultats et rapport FAPAS

Le rapport de la FAPAS a été envoyé le 31/01/17 aux laboratoires participants. Le rapport de la FAPAS se trouve en annexe. Les codes des laboratoires ont été demandés par le LNR et repris dans le tableau 2. Un résumé de l'interprétation des résultats de ce PT est expliqué ci-dessous :

1/ Evaluation quantitative pour résultats quantitatifs

Pour les kits dont le nombre de données expérimentales étaient suffisantes ($n > 8$) pour évaluer de manière significative les résultats, une valeur assignée a été attribuée pour chaque échantillon en fonction du kit. Un Z-score a été calculé également. Pour les deux Tests Materials de ce PT, les kits ELISA suivants se sont vus attribuer une valeur assignée par échantillon (tableau 2): Neogen – Veratox for soy (8410), R-Biopharm – Ridascreen Fast Soya (R7102), ELISA Systems – Soy (ESSOYPRD 48). Un résultat est considéré comme satisfaisant si le z-score est compris entre -2 et 2. Un z-score entre (-)2 et (-)3 est considéré comme questionnable. Un z-score $> (-) 3$ est considéré comme insatisfaisant et demande alors de la part du laboratoire des investigations. Dans ce cas, une des rôles du LNR est de s'assurer du suivi du mauvais résultat au sein du laboratoire.

2/ Evaluation qualitative pour résultats quantitatifs

Pour les kits utilisés dont le nombre de données expérimentales étaient insuffisantes ($n \leq 8$), aucun z-score n'a pu être calculé. Les laboratoires ayant analysés les échantillons avec une méthode PCR et LC-MS/MS n'ont donc pas reçu de z-scores.

3/ Résultats qualitatifs

Les laboratoires devaient spécifier si le soja était détecté ou non dans l'échantillon analysé. Etant donné que les deux Test Materials (27187A et 27187B) étaient positifs en soja, la FAPAS accorde un satisfaisant si le résultat était détecté et non satisfaisant si le résultat était non détecté.

Les résultats obtenus par les trois laboratoires agréés pour le paramètre de soja sont présentés dans le tableau 2.

| | | | | Echantillons | | |
|------|-----------|---|-------------------------------------|--|---------------|---------------|
| | | | | 27187 A | 27187 B | |
| | | | | Valeur assignée en soja (mg/kg) - Neogen – Veratox for soy (8410) | | |
| | | | | Valeur assignée en protéines de soja (mg/kg) - ELISA Systems – Soy (ESSOYPRD 48) | | |
| | | | | Valeur assignée en protéines de soja (mg/kg) -R-Biopharm, Ridascreen Fast Soja (R 7102) | | |
| Labo | Code Labo | méthode utilisée | Limite de détection | Résultat des laboratoires agréés | | |
| 1 | 68 | Détection et quantification par ELISA, R-Biopharm, Ridascreen Fast Soja (R 7102) | 2,5 mg/kg (protéines soja) | Concentration retrouvée (mg/kg de protéines soja) | 25,3 | 13,3 |
| | | | | Z-score | -0,6 | -0,1 |
| | 67 | Détection, identification et quantification par LC-MS/MS | 5 mg/kg (protéines soja) | Concentration retrouvée (mg/kg de protéines soja) | 25,4 | 9 |
| | | | | Evaluation de la FAPAS | aucun z-score | aucun z-score |
| 2 | 113 | Détection par FoodProof Soya qPCR detection kit | 40 copies soya in 50 ng total DNA | Résultat répondu | Déecté | Déecté |
| | | | | Evaluation de la FAPAS | Satisfaisant | Satisfaisant |
| | | Quantification par FoodProof Soya qPCR detection kit | 0,1 mg/kg in soya-spiked rice flour | Concentration retrouvée (mg/kg de soja) | 97,9 | 56,9 |
| | | | | Evaluation de la FAPAS | aucun z-score | aucun z-score |
| 3 | 50 | Détection et quantification par ELISA, R-Biopharm, Ridascreen Fast Soja (R 7102) | 0,31 mg/kg (protéines soja) | Concentration retrouvée (mg/kg de protéines soja) | 31 | 12 |
| | | | | Z-score | 0,2 | -0,5 |

Tableau 2: résultats des laboratoires agréés

Deux laboratoires agréés belges ont utilisé le même kit ELISA Ridascreen Fast Soja (R 7102). Les z-scores obtenus avec ce kit sont bons : respectivement, -0.6 et 0.2 pour l'échantillon A et -0.1 et -0.5 pour l'échantillon B. Les limites de détection reprises dans le rapport de la FAPAS pour ces deux laboratoires ne sont pas identiques. Le labo 3 a indiqué une limite de détection de 0.31 mg de protéine de soja par kg, la limite de détection encodée pour le labo 1 pour cette méthode est de 2.5 mg de protéines de soja par kg. Après vérification, les deux limites de détection encodées pour les analyses réalisées avec le kit Ridascreen FAST Soya sont erronées. R-Biopharm annonce dans sa procédure une limite de détection de 0.24 mg de protéines de soja par Kg et une limite de quantification de 2.5 mg de protéine de soja par Kg.

Le labo 2 a utilisé un kit qPCR, les résultats qualitatifs rendus avec ce kit ont été jugés satisfaisants par la FAPAS puisque du soja a été détecté dans les deux échantillons. Concernant les résultats quantitatifs, les données disponibles étant insuffisantes pour cette méthode qPCR, une interprétation avec calcul de z-score n'a pas été possible. Le laboratoire ayant analysé les échantillons par spectrométrie de masse n'a pas reçu de z-scores.

Nous pouvons conclure que les résultats obtenus par les laboratoires agréés pour ce PT soja sont tous satisfaisants.