

BREVET DE TECHNICIEN SUPÉRIEUR BIOANALYSES ET CONTRÔLES

Épreuve E5 - Unité U53

Techniques de biologie cellulaire et moléculaire

**Au cours de l'épreuve, le jury appréciera les qualités d'organisation,
le respect des règles d'hygiène et de sécurité en laboratoire.**

Documents interdits - Calculatrice autorisée

ÉPREUVE E5. UNITÉ U53
Techniques de biologie cellulaire et moléculaire

DOSAGE D'ENTÉROTOXINES DE *STAPHYLOCOCCUS AUREUS*
(40 points)

Les *Staphylococcus aureus* peuvent produire 8 types d'entérotoxines répertoriés : A, B, C1, C2, C3, D, E, F. L'entérotoxine A est responsable de plus de 70 % des cas d'intoxication alimentaire en France.

Les aliments en cause dans les intoxications staphylococciques renferment souvent moins de 10 ng de toxine par gramme d'aliment. Seuls les dosages par la méthode ELISA et les agglutinations passives inversées sont suffisamment sensibles pour détecter de si faibles quantités de toxines sans qu'il soit nécessaire d'avoir recours à des étapes complexes de concentration.

1 - L'extraction des entérotoxines. (déjà réalisée)

Elle est réalisée de la manière suivante :

- 20 mL de tampon d'extraction ont été ajoutés à 20 g d'aliment à tester. L'échantillon a été mélangé pour obtenir une suspension homogène.
- La suspension a été laissée au repos pendant environ 20 minutes afin de laisser diffuser la toxine éventuellement présente dans l'échantillon.
- La suspension a été filtrée sur papier Whatman et centrifugée pour éliminer les particules alimentaires.
- La phase aqueuse a été récupérée.
- Le pH de l'extrait a été contrôlé et ramené dans l'intervalle 7,0 – 7,5.
- Les dosages seront réalisés sur ce surnageant.

Deux surnageants sont fournis : « S 1 » pour le dosage par agglutination et « S 2 » pour le dosage ELISA.

2 - Dosage des entérotoxines de *Staphylococcus aureus* par une agglutination passive inversée. (18 points)

2.1 - Principe.

Des globules rouges sensibilisés avec des anticorps antitoxine sont mis en présence de l'aliment. On recherche 2 toxines : A et B.

2.2 - Matériel et réactifs :

- Gants.
- Microplaque à fond conique.
- Film autocollant.
- pipettes automatiques P₅₀ + cônes.
- Tube contenant 200 µL d'échantillon à tester : « S1 ».
- Tube contenant 250 µL de GR sensibilisés par des Ac anti-entérotoxine A : « GR anti-A ».
- Tube contenant 250 µL de GR sensibilisés par des Ac anti-entérotoxine B : « GR anti-B ».
- Tube contenant 250 µL de GR témoins : « GR T ».
- Tube contenant 2 mL de diluant : « D ».
- Bac de désinfectant.

2.3 - Protocole opératoire.

Tester le surnageant « S1 » dans une plaque de microtitration à fond conique sur 3 lignes de 8 puits de la façon suivante :

Répartir 25 μ L de diluant « D » dans les 8 premiers puits des 3 lignes utilisées.

Ajouter 25 μ L de surnageant « S1 » dans le premier puits des 3 lignes, effectuer des dilutions successives de raison $\frac{1}{2}$ dans chaque ligne à l'exception du dernier puits de chaque ligne qui ne doit contenir que 25 μ L de diluant « D ».

Ajouter ensuite :

Dans tous les puits de la première ligne (ligne A), 25 μ L de « GR anti A ».

Dans tous les puits de la deuxième ligne (ligne B), 25 μ L de « GR anti B ».

Dans tous les puits de la troisième ligne (ligne C), 25 μ L de « GR T ».

Mélanger le contenu de chaque puits par rotation (éviter le débordement des puits).

Recouvrir la plaque d'un film autocollant et incuber 1 heure à température ambiante à l'abri de tout vibration.

Effectuer la lecture.

2.4 - Compte rendu.

Préciser la nature des globules rouges témoins « GR T ».

Schématiser le principe de la réaction ayant lieu dans le cas de la recherche de l'entérotoxine A.

Expliquer et justifier le terme « d'agglutination passive inversée ».

Valider la technique utilisée.

Schématiser les résultats obtenus dans le tableau de la feuille de résultats.

Conclure sur la présence des différentes entérotoxines.

Déterminer le titre de(s) entérotoxine(s) présente(s).

Donnée : le titre est le facteur de dilution le plus élevé donnant encore une agglutination.

Différentes solutions étalons d'entérotoxines à une concentration de 10 ng/mL ont été testées dans les mêmes conditions opératoires que celles décrites précédemment. On a obtenu les résultats suivants :

	Puits 1	Puits 2	Puits 3	Puits 4	Puits 5	Puits 6	Puits 7	Puits 8
Solution étalon toxine A + GR antiA	+	+	+	+	+/-	-	-	-
Solution étalon toxine B+ GR antiB	+	+	+	+	-	-	-	-
Solution étalon toxine A + GR T	-	-	-	-	-	-	-	-
Solution étalon toxine B + GR T	-	-	-	-	-	-	-	-

- : absence d'agglutination, + : agglutination totale, +/- : agglutination partielle

Utiliser ces résultats pour en déduire la concentration de la ou des entérotoxines présentes dans « S1 » en ng/mL.

3 - Dosage immunoenzymatique des entérotoxines de *Staphylococcus aureus*. (22 points)

Un surnageant « S2 » a été testé selon la technique d'agglutination passive inversée. On a mis en évidence la présence d'entérotoxine A à une concentration de 2,5 ng/g d'aliment.

On souhaite vérifier le titre par une technique ELISA.

3.1.- Matériel et réactifs :

- Gants.
- 8 tubes à hémolyse + portoir.
- Pipettes automatiques P₂₀₀ et P₁₀₀₀ + cônes.
- Film autocollant.
- Agitateur de microplaques.
- Étuve à 37°C.
- Lecteur de microplaques.
- Flacon contenant 50 mL de tampon de lavage : « PBS-Tween ».
- Tube contenant 2,5 mL de tampon de dilution pH = 7,2 : « Tp ».
- Tube contenant 1 mL de solution étalon d'entérotoxine A à 10 ng/mL : « Étalon ».
- Tube contenant 3,5 mL de conjugué = anticorps anti-entérotoxine A couplé à la phosphatase alcaline : « Conjugué ».
- Tube contenant 500 µL de surnageant à doser : « S2 ».
- Tube contenant 3,5 mL de substrat : solution de paranitrophénylphosphate (PNPP) à 1 mg/mL en tampon Tris-HCl à 1 mol/L, pH = 9,8 : « PNPP ».
- Tube contenant 1 mL de « NaOH » : solution de NaOH à 3 mol/L.
- Bac de désinfectant.
- Barrette sensibilisée.

3.2.- Protocole opératoire.

- Sensibilisation de la barette (**déjà réalisée**)
Toutes les cupules des colonnes 1 et 2, sauf A1, ont été sensibilisées de la manière suivante :
 - Dépôt de 200 µL d'anticorps anti-entérotoxine A.
 - Incubation de 2 heures à 37°C.
 - Lavage avec du PBS-Tween.
- Saturation avec de la Sérumalbumine bovine (SAB) (**déjà réalisée**).
Toutes les cupules ont été saturées de la manière suivante :
 - Dépôt de 200 µL de PBS-Tween-SAB.
 - Incubation de 2 heures à 37 °C.
- Préparation des étalons.
En tubes à hémolyse, préparer, en tampon de dilution « Tp », une gamme de 7 solutions étalon filles d'entérotoxine A à partir de la solution « Étalon », par des dilutions successives de raison 1/2.
Le volume final est 200 µL.
- Dilution de l'échantillon « S2 ».
En tube à hémolyse, préparer, en tampon « Tp », une dilution, au 1/2 du surnageant « S2 ».
- Dosage de l'entérotoxine A.
Les essais, étalons et témoins, seront distribués selon le protocole ci-dessous :

	1	2
A	Témoin	Etalon 10 ng/mL
B	Témoin	} Gamme de dilution de l'étalon
C	Témoin	
D	Témoin	
E	Surnageant S 2	
F	Surnageant S 2	
G	S 2 au 1/2	
H	S 2 au 1/2	

- Réaliser les étapes suivantes :
Vider les cupules de la barrette.
Réaliser trois lavages en PBS-Tween.
Dans la cupule A2, introduire 100 μL d' « Étalon » entérotoxine A.
Dans les cupules B2 et H2, introduire respectivement chacune des solutions étalons filles.
Dans les cupules témoins A1, C1 et D1, répartir 100 μL de la solution d'entérotoxine « Étalon » et dans la cupule B1, distribuer 100 μL de tampon de dilution « Tp ».
Dans les cupules essais E1 et F1, distribuer 100 μL de la solution « S2 ».
Dans les cupules essais G1 et H1, introduire 100 μL de la solution « S2 » au 1/2.
Couvrir la plaque avec un film autocollant et incuber 30 minutes à 37°C.
Réaliser 3 lavages successifs en PBS-Tween dans chaque cupule.
Dans toutes les cupules sauf C1, ajouter 200 μL de « Conjugué ».
Dans la cupule C1, distribuer 200 μL de tampon de dilution « Tp ».
Couvrir d'un film autocollant et incuber 30 minutes à environ 37°C.
Réaliser 3 lavages successifs en PBS-Tween dans chaque cupule.
Dans toutes les cupules sauf D1, ajouter 200 μL de substrat « PNPP ».
Dans la cupule D1, distribuer 200 μL de tampon de dilution « Tp ».
Couvrir d'un film autocollant et incuber environ 5 minutes à environ 37°C en surveillant l'apparition de la coloration.
Arrêter la réaction en ajoutant dans toutes les cupules 50 μL de solution « NaOH ».
Agiter.
Lire les absorbances à 405 nm contre l'air.

3.3.- Compte rendu.

À quel type de réaction ELISA appartient la technique mise en œuvre dans ce dosage ? Justifier par un schéma.

Préciser le rôle des témoins. Interpréter.

Compléter le tableau de résultats.

À l'aide de l'outil informatique, tracer la courbe $A_{405\text{nm}} = f(\text{concentration entérotoxine A})$.

Déterminer la concentration en entérotoxine A dans le surnageant « S2 ». En déduire la teneur en entérotoxine A dans l'aliment en ng par g d'aliment.

Donnée : incertitude relative = 2 CV = 10 %.

Comparer le résultat obtenu dans l'échantillon d'aliment par rapport à la concentration mesurée selon la technique d'agglutination passive inversée (2,5 ng/g).

Conclure.

Académie : _____ Session : _____

Examen ou Concours _____ Série* : _____

Spécialité/option* : _____ Repère de l'épreuve : _____

Épreuve/sous-épreuve : _____

NOM : _____

(en majuscules, suivi s'il y a lieu, du nom d'épouse)

Prénoms : _____ N° du candidat

Né(e) le : _____

(le numéro est celui qui figure sur la convocation ou la liste d'appel)

DANS CE CADRE

NE RIEN ÉCRIRE

* Uniquement s'il s'agit d'un examen.

Repère : BAE5BCM/3 SESSION 2006 Durée : 3 H

Page : 5/5 FEUILLE DE RÉSULTATS Coefficient : 2

À RENDRE AVEC LA COPIE POSTE N° _____

Tableau de lecture du dosage par agglutination

	1	2	3	4	5	6	7	8
Facteur de dilution initiale								
A								
B								
C								

Légende :

Tableau de résultat du dosage immunoenzymatique

	A1	B1	C1	D1	E1	F1	G1	H1
A _{405nm}								
C _{Centérotoxine A (ng/mL)}								

	A2	B2	C2	D2	E2	F2	G2	H2
A _{405nm}								
C _{Centérotoxine A (ng/mL)}								