

Dosage immunoenzymatique d'une entérotoxine staphylococcique

Staphylococcus aureus est responsable d'intoxications : intoxications alimentaires provoquées par l'ingestion de toxines préformées dans l'aliment. Ces entérotoxines staphylococciques sont émétiques et diarrhéiques. Des doses minimales de 20 ng sont nécessaires pour provoquer des troubles digestifs. On souhaite réaliser le dosage d'une entérotoxine staphylococcique de type A dans un aliment pour évaluer le risque alimentaire lié à ce dernier. Une technique immunoenzymatique (ELISA) est utilisée.

1 - Matériel et réactifs

- Barrette vierge 2 X 8 cupules à fond plat avec support
- Tampon d'extraction : « **TE** »
- Tampon de sensibilisation (Tp hydrogénocarbonate pH 9,6) : « **TS** »
- Ac sensibilisant anti-entérotoxine A : « **AcS** »
- Solution de lavage : « **PBS-Tween** »
- Solution de saturation : « **PBS-SAB** »
- Solution-mère étalon à 10 ng/mL d'entérotoxine A : « **Sol Et** »
- Echantillon provenant du surnageant d'extraction d'un aliment à tester : « **S** »
- Echantillon provenant du surnageant d'extraction d'un aliment non contaminé : « **CQ-** »
- Tampon de dilution : « **PBS** »
- Conjugué : Ac anti-entérotoxine A marqué à la phosphatase alcaline PAL : « **Conjugué** »
- Solution de PNPP (paranitrophénylphosphate) en tampon glycine pH 10,5 : « **PNPP** »
- NaOH à 1 mol.L⁻¹ : « **NaOH** ».



2 - Mode opératoire

2.1 - **Protocole d'extraction des entérotoxines**

- Peser 20 g d'aliment à tester et mixer.
- Ajouter 40 mL de tampon TE.
- Mélanger pour obtenir une suspension homogène.
- Laisser au repos 30 minutes pour permettre la diffusion de la toxine éventuellement présente dans l'échantillon.
- Centrifuger 15 min à 3000 g.
- Prélever le surnageant et ajuster son pH entre 7,0 et 7,5.

2.2 - **Sensibilisation du support (coating)**

- Introduire 200 µL de tampon TS dans le puits A1 d'une barrette 2 X 8 cupules à fond plat.
- Distribuer 200 µL d'AcS dans les autres puits : B1 à H2.
- Recouvrir la barrette avec un film autocollant.
- Incuber 2 h à 37°C.

2.3 - **Saturation (surcoating)**

- Réaliser 3 lavages successifs des puits au PBS-Tween.
- Ajouter 200 µL de PBS-SAB dans chaque puits.
- Couvrir d'un film autocollant.
- Incuber 15 min à 37°C.
- Réaliser 3 lavages successifs des puits au PBS-Tween.

Dosage immunoenzymatique d'une entérotoxine staphylococcique

2.4 – Gamme d'étalonnage et dépôts de l'Ag

- Réaliser, en tubes, une gamme de 7 concentrations décroissantes à partir de la solution étalon SolEt par dilutions successives de raison 1/2 en tampon PBS sous un volume final de 200 µL.
- Réaliser une dilution au 1/2 de l'échantillon S en tampon PBS.
- Déposer dans les cupules sous un volume de 100 µL selon le schéma de distribution suivant :

	1	2
A	Sol Et	Sol Et
B	PBS	Gamme de dilutions
C	Sol Et	
D	CQ-	
E	S	
F	S	
G	S 1/2	
H	S 1/2	

- Couvrir la barrette d'un film autocollant.
- Incuber 1 h à 37°C.
- Réaliser 3 lavages successifs des puits au PBS-Tween.

2.5 - Addition du conjugué

- Déposer 200 µL tampon PBS dans le puits C1 et 200 µL de Conjugué dans toutes les autres cupules.
- Couvrir d'un film autocollant.
- Incuber 20 minutes à 37°C.
- Réaliser 3 lavages successifs des puits.

2.6 - Révélation et lecture

- Déposer, dans tous les puits, 200 µL de PNPP.
- Couvrir d'un film autocollant.
- Incuber 30 min à 37°C.
- Ajouter à tous les puits 50 µL de solution de NaOH.
- Agiter manuellement en tapotant.
- Essuyer le dessous de la barrette et lire les absorbances du contenu des puits à 405 nm contre l'air.

3 – Analyse des résultats

- ✎ Calculer les absorbances nettes par soustraction de la valeur d'absorbance du témoin le plus élevé aux valeurs de gamme et d'échantillons.
- ✎ Analyser les résultats des témoins et contrôles qualité.
Si ces témoins sont correctement réalisés, l'absorbance ne doit pas dépasser 0,040.
- ✎ Tracer la droite d'étalonnage : $A_{405 \text{ nm}} = f(\rho_{\text{entérotoxine A}} \text{ en ng.mL}^{-1})$.
- ✎ Déterminer la concentration en entérotoxine A dans le surnageant S et dans 1 g d'aliment.