

Concours du second degré

Rapport de jury

Concours :

CAPET INTERNE

Section :

BIOTECHNOLOGIES

Option :

BIOCHIMIE GENIE BIOLOGIQUE

Session 2015

Rapport de jury présenté par : Mme Isabelle FALLER
Présidente de jury

**Les rapports des jurys des concours sont établis sous la responsabilité des
présidents de jury**

Sommaire

Composition du jury	Page 3
1. Renseignements statistiques	Page 4
2. Epreuve d'admissibilité	Page 5
3. Epreuve d'admission	Page 7
Conclusion générale	Page 10
Annexes : exemple de sujet d'admission	Page 11

Composition du jury

Présidente :

Isabelle FALLER – IA-IPR , académies de Strasbourg, Besançon, Nancy-Metz

Vice présidente :

Caroline BONNEFOY – IA-IPR Académies de Versailles, Rouen, la Guadeloupe

Secrétaire Générale: Christine SCHNEIDER – Chef de travaux Académie de Strasbourg

Membres du jury :

NOM Prénom	Académie
<i>BARBIERI Eric</i>	STRASBOURG
<i>BLANCHET Sébastien</i>	MARSEILLE
<i>DAHM-DUPOUIS Catherine</i>	STRASBOURG
<i>DESFARGES Laurent</i>	BORDEAUX
<i>DIMANCHE-LAURENTI Pascale</i>	STRASBOURG
<i>DOUCET Christophe</i>	BORDEAUX
<i>GOMEL Frédéric, IA IPR</i>	CAEN
<i>NARBONNE Pierre, IA-IPR</i>	NANTES, RENNES
<i>PFLIEGER Nathalie</i>	STRASBOURG
<i>SCHUSTER Claudine, IA-IPR</i>	CRETEIL, DIJON
<i>TRUCCHI Jean-François</i>	MARSEILLE

1. RENSEIGNEMENTS STATISTIQUES :

Concours : CAPET interne

Nombre de candidats inscrits	114
Nombre de candidats présents et non éliminés	43 (38 % des inscrits)
Nombre de candidats admissibles	15 (35 % des présents)
Nombre de candidats présents à l'épreuve orale d'admission	13
Nombre de candidats proposés pour l'admission	6
Rappel : Nombre de postes	6

Epreuve d'admissibilité

- Note la plus élevée	15/20
- Moyenne des notes des candidats admissibles	12,53 /20
- Barre d'admissibilité	10/20

Epreuve d'admission

- Note la plus élevée	13,87/20
- Moyenne des notes des candidats admis	12,43/20

Concours : CAER (concours d'accès à l'échelle de rémunération des professeurs certifiés)

Nombre de candidats inscrits	39
Nombre de candidats présents et non éliminés	21 (54 % des inscrits)
Nombre de candidats admissibles	9 (43 % des présents)
Nombre de candidats présents à l'épreuve orale d'admission	8
Nombre de candidats proposés pour l'admission	3
Rappel : Nombre de postes	9

Epreuve d'admissibilité

- Note la meilleure	15 /20
- Moyenne des notes des candidats admissibles	11,67/20
- Barre d'admissibilité	10/20

Epreuve d'admission

- Note la meilleure	14,27/20
- Moyenne des notes des candidats admis	12,44/20

2. ÉPREUVE D'ADMISSIBILITE : RAPPORT DE L'ÉPREUVE

2.1. Attendus de l'épreuve

Le jury rappelle que les épreuves du concours interne du CAPET ont été définies dans l'arrêté du 28 décembre 2009 fixant les sections et les modalités d'organisation des concours du certificat d'aptitude au professorat de l'enseignement technique (paru au journal officiel du 6 janvier 2010) et complété par l'arrêté du 27 avril 2011.

Par ailleurs, afin de préciser aux candidats les limites de la maîtrise disciplinaire attendue à ce niveau, il est rappelé que le programme, identique à celui du CAPET externe, est consultable dans le Bulletin Officiel de l'Education nationale spécial n° 7 du 8 juillet 2010.

Les deux pages de présentation du parcours.

La présentation doit donner une vision globale de la formation initiale du candidat et de son expérience professionnelle.

De plus, certains éléments choisis dans le parcours doivent montrer l'adéquation entre l'expérience acquise et la construction des compétences indispensables à l'exercice du métier d'enseignant en biotechnologie option biochimie génie biologique.

Les 6 pages : « Construction / Réalisation / Analyse / Projection »

La situation d'apprentissage développée dans cette partie doit être en adéquation avec la discipline du concours, incluant la dimension technologique.

Le choix de la situation d'enseignement est déterminant pour faire valoir des compétences didactiques et pédagogiques au travers d'une situation authentique, réellement vécue par le candidat, et pour permettre une analyse personnelle.

Des situations pédagogiques un peu plus éloignées des biotechnologies de laboratoire peuvent cependant se révéler porteuses pour autant que le candidat montre clairement sa capacité à transposer l'activité professionnelle choisie dans un des enseignements en section technologique pré-bac ou post-bac. Lors de cette session, certaines situations professionnelles présentées ne répondaient pas aux attentes de l'épreuve : encadrement de stagiaire, projet d'aide à l'orientation dans la cadre de la liaison bac pro/BTS, tâches complexes en SVT, activités de biologie dans le premier degré, développement de compétences langagières en Langues Vivantes.

Les parcours exclusivement SVT se révèlent peu adaptés aux exigences du concours, en particulier pour ce qui concerne leur dimension technologique au laboratoire.

2.2. Observations du jury

Le jury a pu constater une hétérogénéité importante des rapports ; il a apprécié l'analyse approfondie et la réflexion personnelle des candidats, qui s'engagent dans leurs choix, révélant également une réflexion éthique et déontologique par rapport à la fonction d'enseignant.

Les aspects suivants ne sont pas développés ou sont absents dans un nombre important de dossiers :

- analyse réflexive a posteriori de la séance,
- évaluation formative, informative pour l'élève, mais également pour l'enseignant afin d'améliorer sa pratique.

Certaines présentations suscitent l'inquiétude du jury vis à vis de candidats ayant une expérience de plusieurs années d'enseignement.

Le jury a également pu déceler, pour certains candidats, un regard stigmatisant sur les élèves avec des *a priori* et une vision stéréotypée qui ne préjugent pas d'une posture adaptée à l'enseignement.

L'activité choisie doit permettre au candidat de montrer son niveau de réflexion sur les enjeux éthiques du métier. Il est donc amené à rechercher un équilibre entre les aspects technologiques et/ou scientifiques d'une part, leur exploitation didactique et pédagogique d'autre part, cet équilibre enrichissant notablement les dossiers.

Pourtant, de trop nombreux dossiers ont développé à l'excès une des deux composantes.

Ce déséquilibre peut être pressenti comme une forme d'évitement stratégique de la part du candidat cherchant à masquer un aspect moins maîtrisé.

Parfois, l'activité détaillée proposée manque d'ambition par rapport au niveau de classe choisi et ne valorise pas efficacement les compétences scientifiques du candidat. *A contrario*, un contenu scientifique solide peut souffrir d'imprécision sur le plan didactique se traduisant par un manque d'indications fournies quant au déroulement de la séance exploitée dans le rapport.

La dimension technologique ne peut se limiter à une description d'un protocole ou d'une séance qui semble plus occupationnelle que réellement formative. Le candidat doit, au contraire, réaliser une analyse *a priori* des objectifs et des activités mises en jeu pour leur apprentissage, mener une analyse *a posteriori* en prenant en compte les réactions des élèves observées pendant la séance et vérifier l'atteinte des objectifs.

La justification des choix pédagogiques et la prise de recul dans l'analyse de la situation exposée sont valorisées par les membres du jury. De trop nombreux candidats n'ont pas effectué ce travail d'analyse de leur propre pratique, se bornant parfois à se positionner en modèle.

Au-delà de son contenu, le RAEP met en évidence les qualités de communication écrite du candidat. Il peut ainsi montrer la structuration de son propos, la qualité de l'argumentation et la présence d'une démarche. L'attention apportée à la rédaction, à la ponctuation, à la vérification de l'orthographe, est indispensable pour un concours de recrutement d'enseignant. Si le lexique des sciences de l'éducation peut être convoqué, il doit être employé en lien avec des situations réelles et ne doit pas être un jargon « plaqué artificiellement » et vide de sens, une construction théorique avec une dimension factice.

Le jury encourage les candidats à faire évoluer leur RAEP lorsqu'ils représentent le concours et de montrer leur qualités d'analyse réflexive, ils peuvent pour cela se former auprès d'un collègue expérimenté s'il n'y a pas de formation académique proposée. La formation ne doit pas se réduire à une préparation qui s'apparenterait à un « bachotage ». Le jury apprécie la dimension personnelle et engagée des candidats postulant pour un métier de conviction.

3. ÉPREUVE D'ADMISSION : RAPPORT DE L'ÉPREUVE

3.1. Caractéristiques de l'épreuve

Les candidats ont travaillé sur deux sujets différents (un exemple est joint en annexe), tous les deux portant sur le programme de biotechnologies de la classe de terminale STL. L'un avait pour contexte la réaction inflammatoire ; pour l'autre la thématique de projet se situait dans le cadre des contrôles en industrie pharmaceutique.

Tout au long de l'épreuve, les candidats disposaient, en plus du sujet, d'un dossier numérique sous la forme d'une clé USB personnelle contenant différentes ressources numériques : le programme de l'enseignement de biotechnologies au niveau visé, des fiches techniques en lien avec le sujet, des fiches de données de sécurité, le site 3RB (réseau ressources risques biologiques : <http://www.esst-inrs.fr/3rb/>), des logiciels nécessaires à l'exploitation des résultats et à la présentation de l'exposé.

L'épreuve se déroule en deux temps :

- Cinq heures de préparation qui se tiennent au laboratoire de biotechnologies et pendant lesquels les candidats peuvent également consulter des ouvrages mis à leur disposition et dont la liste figure dans le rapport du jury de la session 2014 du concours.

Au cours de quatre premières heures, les candidats s'approprient le sujet, réalisent plusieurs manipulations présentées en vue de l'exposé à présenter au jury. Ils préparent la séquence de formation en lien avec les travaux pratiques et une séance détaillée et mobilisent les ressources qui leur sont utiles. Ils effectuent une démonstration technique de leur choix devant les examinateurs et la commentent tel qu'ils le feraient avec des élèves.

La dernière heure de préparation permet de finaliser la préparation de l'exposé avec la possibilité d'utiliser les outils à leur disposition : traitement de texte, tableur/graphueur, diaporama.

- Une partie orale d'une heure face aux membres du jury, composée d'un exposé et d'un entretien, dans une salle équipée d'un tableau et d'un dispositif de vidéo-projection.

L'exposé de 30 minutes a pour objectifs de décrire une séquence de formation, de présenter de façon détaillée une des séances constitutive de la séquence en y incluant les investigations menées lors des manipulations réalisées au laboratoire.

L'entretien avec le jury permet au candidat de préciser certains points de sa présentation et mettre en avant ses qualités pédagogiques, didactiques et sa maîtrise des contenus notamment les aspects technologiques.

Comme précisé dans l'arrêté du 27 avril 2011, un temps d'entretien (maximum 10 minutes) peut être réservé à un échange sur le dossier de RAEP.

3.2. Observations du jury

Pour cette épreuve, le jury évalue à la fois les qualités pédagogiques, les connaissances scientifiques et techniques relatives aux techniques mises en œuvre ainsi que les savoir-faire et attitudes des candidats.

Temps de préparation de l'épreuve

Pendant le temps de préparation de l'épreuve, le jury a apprécié :

- qu'un nombre plus important de candidats se soit préparé techniquement aux manipulations avec un niveau de compétences attendu pour ce concours ;
- le respect par les candidats du nombre minimal de manipulations à réaliser ;
- pour certains candidats, des efforts d'intégration des concepts liés à métrologie dans l'exploitation et la restitution des résultats ;
- une recherche de croisement et intégration des manipulations dans la transposition pédagogique.

En revanche, des difficultés demeurent pour certains candidats, dans la réalisation des calculs préliminaires aux manipulations biochimiques (ex : dilutions préalables de l'échantillon, réalisation de la gamme en spectrophotométrie ...). La démonstration en direction du jury, a également mis certains candidats en difficulté dans le choix et la pertinence de la présentation : technique non maîtrisée, commentaire manquant de concision ou de pertinence, démonstration d'un geste unique et trop simple (pipetage ...).

Bien souvent, la démarche de prévention n'est pas appliquée de façon réfléchie (ex : usage des gants en volumétrie). Enfin, la gestion globale du temps n'est pas toujours bien maîtrisée.

Compte tenu de ces constats, les membres du jury conseillent aux futurs candidats :

- de prendre un temps de lecture du sujet et d'établir un plan d'organisation tenant compte des temps d'attente pour optimiser la gestion des manipulations et pouvoir se consacrer également à la préparation de l'exposé ;
- de se préparer à l'appropriation de documents techniques (ex : fiches de dosage ...) ou à des manipulations que le candidat n'a pas l'habitude de mettre en œuvre dans l'année scolaire, quitte à observer ce type de séance réalisée chez un collègue;
- de prendre en compte les attentes de l'enseignement de mesures et instrumentation (ex : fondamentaux technologiques et métrologie ...);
- d'anticiper et de préparer la démonstration commentée en cherchant à faire apparaître le ou les points critiques de la manipulation.

Partie orale : 30 min d'exposé + 30 min d'entretien

Le jury rappelle que la définition de l'épreuve impose l'exploitation des manipulations (principes des méthodes, points critiques ou résultats ...) réalisées dans la transposition pédagogique. Elle doit être exposée au cours de celle-ci.

Le jury a apprécié :

- une utilisation plus adaptée des auxiliaires pédagogiques (ex : tableau, outils numériques) ;
- l'intégration d'un vocabulaire plus rigoureux de métrologie et une exploitation plus pertinente des résultats ;
- pour de trop rares candidats, des situations pédagogiques variées mettant systématiquement les élèves en activités, prenant en compte l'esprit de la réforme ou faisant preuve de créativité ou innovation ;
- une meilleure maîtrise du temps d'exposé.

Des difficultés demeurent cependant à différents niveaux.

La séquence et la séance pédagogique ne doivent pas se limiter à une simple suite des manipulations non reliées. Une prise de recul est nécessaire concernant la partie manipulative afin de dégager un sens pédagogique et didactique. Adossés au programme officiel, les objectifs de formation sont à associer aux activités choisies car elles permettent de développer des compétences.

Lorsqu'ils sont mal intégrés, les concepts sont difficiles à exprimer et exposer avec rigueur et précision ; il en est de même pour les savoirs fondamentaux scientifiques et technologiques qui parfois ne sont pas suffisamment maîtrisés.

Le jury conseille aux candidats :

- de s'approprier les grandes lignes des différents programmes des enseignements technologiques des formations du domaine ;
- de maîtriser les démarches liées aux enseignements technologiques, notamment la démarche d'analyses de risques, l'exploitation et la validation de résultats conformément aux règles de métrologie ;
- de relire les anciens sujets et rapports de jury pour s'exercer à construire des séquences et séances cohérentes.

CONCLUSION GENERALE

La session 2015 des concours CAPET a admis 9 candidats pour les 15 postes offerts par le Ministère de l'Education nationale. Si tous les 6 postes du CAPET interne ont été pourvus, en revanche, seuls 3 candidats ont été admis pour 9 postes ouverts au CAER.

L'ensemble du jury tient à féliciter les lauréats. Leur succès au concours de recrutement d'enseignants conduit, dès la rentrée scolaire, à leur nomination en qualité de stagiaire.

Pour l'épreuve d'admissibilité, la plupart des dossiers de RAEP respectait la définition d'épreuve, notamment en termes de forme. Le jury a apprécié les dossiers de RAEP dont la structuration et les contenus personnalisés mettent en valeur les compétences professionnelles développées au cours des années d'exercice des candidats.

Une demi-heure avant le début de l'épreuve d'admission, les candidats ont été accueillis par la présidente et la secrétaire générale. L'objectif était de préciser aux candidats, les caractéristiques de l'épreuve, son organisation dans le temps, la configuration des locaux mobilisés pendant l'épreuve.

Les candidats admis ont révélé des compétences attendues de la part d'un enseignant : analyse et exploitation efficace des documents, maîtrise des techniques de laboratoire, présentation synthétique, rigoureuse et convaincante des argumentations, maîtrise des contenus et enfin qualités d'écoute et de communication certaines.

Si ce concours ne peut être exclusivement réservé aux candidats ayant une expérience d'enseignement en biochimie génie biologique, il est cependant indispensable que les candidats aient pris connaissance de la diversité des enseignements et niveaux de formation auxquels ils seront confrontés en adéquation avec la définition des épreuves.

Pour répondre aux objectifs de l'épreuve d'admission, le candidat doit avoir une réelle maîtrise de notions fondamentales caractéristiques du champ disciplinaire visé par le concours du CAPET CAER de biotechnologies, option biochimie génie biologique. Les supports documentaires de l'épreuve d'admission peuvent aussi bien s'adosser aux programmes des sections technologiques préparant aux baccalauréats scientifiques et technologiques qu'aux référentiels des sections de technicien supérieur de la filière.

L'expérience d'enseignement se doit d'être doublée d'une préparation sérieuse et rigoureuse pour conduire les candidats à la réussite. Les observations des jurys figurant dans ce rapport ainsi que les rapports précédent, ont vocation à guider les candidats en ce sens.

Le jury tient à remercier, monsieur le Proviseur, madame le chef de travaux et l'ensemble des personnels du lycée Jean Rostand de Strasbourg pour l'accueil et l'aide efficace apportés afin que ce concours se déroule dans de bonnes conditions.

**CAPET INTERNE
ET CAER**

**Section : BIOTECHNOLOGIES
Option : BIOCHIMIE – GENIE BIOLOGIQUE**

Épreuve pratique d'admission :
Leçon portant sur les programmes des lycées
et des classes post-baccalauréat

**Durée : 6 heures
Coefficient : 2**

*Travaux pratiques : 4 heures
Préparation de l'exposé : 1 heure
Exposé : 30 minutes
Entretien : 30 minutes*

Le sujet comporte 245 pages.

Le candidat doit s'assurer de disposer d'un exemplaire complet dès le début de l'épreuve.

La séquence et la séance détaillée à construire concernent **l'enseignement de biotechnologies** en classe de **terminale STL, spécialité biotechnologies**.

Dans le **contexte médical de la réaction inflammatoire**, les activités technologiques proposées doivent permettre de développer des compétences du programme.

Le candidat effectue un choix raisonné des compétences à développer chez les élèves ou étudiants tout en veillant à la cohérence globale de la séquence bâtie. La présentation orale permettra au candidat d'argumenter les choix effectués. Les objectifs pédagogiques concernent essentiellement la séance détaillée.

Le jury valorise le caractère pluridisciplinaire de la séquence ou de la séance envisagée. Trois protocoles au minimum devront être mis en œuvre par le candidat au laboratoire. Lors de la soutenance, ces réalisations pratiques sont exploitées, en tout ou partie, dans le cadre de la séquence ou de la séance détaillée.

Ressources documentaires proposées dans le sujet

Documents d'aide à la contextualisation

Fiche documentaire 1 : le processus inflammatoire
Fiche documentaire 2 : la protéine C-réactive
Fiche documentaire 3 : l'électrophorèse des protéines sériques
Fiche documentaire 4 : la lyse cellulaire par le complément

Fiches techniques et modes opératoires

Protocole 1 : mesure de l'activité lytique du sérum
Protocole 2 : dosage des protéines sériques par la méthode de Lowry
Protocole 3 : mesure de l'activité transaminase dans le sérum
Protocole 4 : identification d'un microorganisme responsable de lésions cutanées purulentes
Protocole 5 : dosage de la protéine C-réactive (CRP) par méthode immunoenzymatique

Aide mémoire de métrologie

Echantillons mis à disposition

- Sérum pour la mesure de l'activité lytique du sérum et le dosage des protéines sériques par la méthode de Lowry (noté **U**)
- Sérum pour la mesure de l'activité transaminase (noté **L**)
- Sérum pour le dosage de la CRP par méthode immunoenzymatique (noté **T**)
- Souche pure isolée d'une lésion cutanée purulente présentée sur gélose nutritive (boîte de Pétri)

Ressources numériques

Programmes du cycle terminal STL biotechnologies
Fiches de données de sécurité

Fiche documentaire 1 : le processus inflammatoire

L'inflammation est un mécanisme de réponse à une lésion tissulaire visant à la circonscrire et à la réparer. Cette lésion peut être exogène (agression physique, chimique, microbienne...) ou endogène (auto-immunité, tumeur, infarctus...).

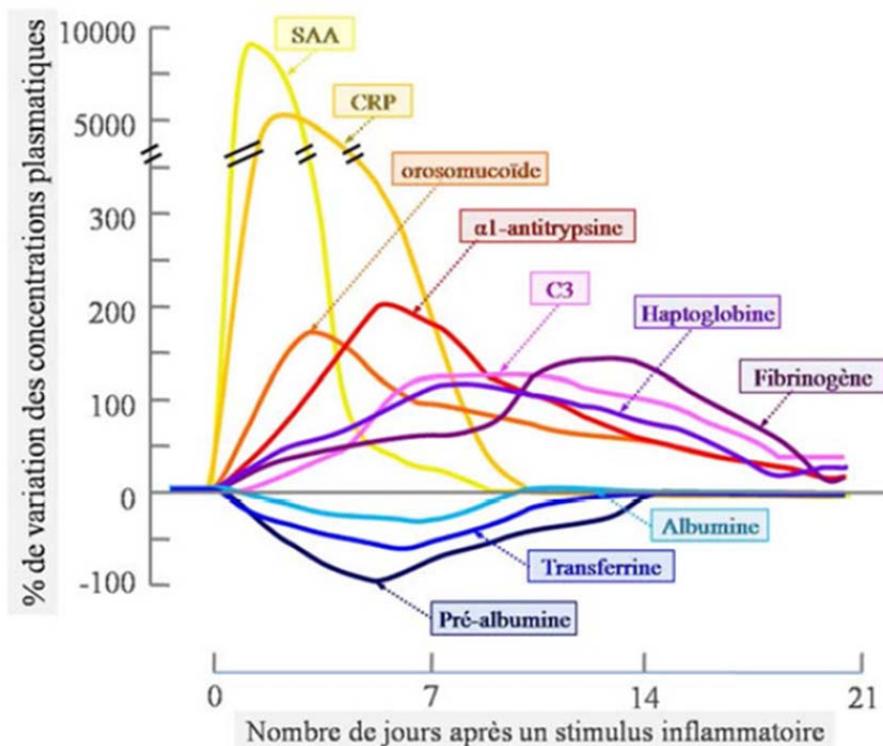
Cette réaction inflammatoire aboutit à la variation des concentrations plasmatiques de protéines qui vont servir d'indicateurs.

On appelle « protéines de la réaction inflammatoire », les protéines dont la concentration plasmatique varie d'au moins 25 % la première semaine de l'inflammation.

Elles peuvent avoir plusieurs origines :

- hépatique : protéine C-réactive (CRP), ALAT, sérum amyloïde A (SAA), haptoglobine, fibrinogène, α 1-antitrypsine, céruloplasmine ; leur origine explique que ces marqueurs peuvent ne pas augmenter en cas d'insuffisance hépatocellulaire.
- plasmocytaire : immunoglobulines
- macrophagique : ferritine.

Evolution des concentrations de certaines protéines au cours d'un syndrome inflammatoire aigu



Source : disponible sur www.memobio.fr, vérifié le 27/04/2015

Fiche documentaire 2 : la protéine C-réactive ou CRP

La protéine C-réactive est synthétisée par le foie et elle constitue l'une des protéines inflammatoires de phase aiguë. Son dosage est utile pour détecter et évaluer les troubles inflammatoires, les lésions tissulaires et les infections.

Cette protéine n'est pas visible sur électrophorèse (migration électrophorétique dans la zone gammaglobulinique, entre β et γ globulines) et sa mise en évidence nécessite un dosage spécifique (néphélométrie ou dosage ELISA). Chez l'adulte sain, le taux de CRP est inférieur à 3 mg.L^{-1} et croît en réponse à un stimulus inflammatoire : sa concentration plasmatique s'élève dès la 6^{ème} heure, est maximale à 24 heures et se normalise en 1 à 2 semaines.

Elle est élevée en cas d'infection, de tumeur, de maladie auto-immune, d'infarctus, de pancréatite, de stress physique et d'hyper-oestrogénémie.

Une concentration plasmatique en CRP supérieure à 200 mg.L^{-1} signe une infection bactérienne très probable.

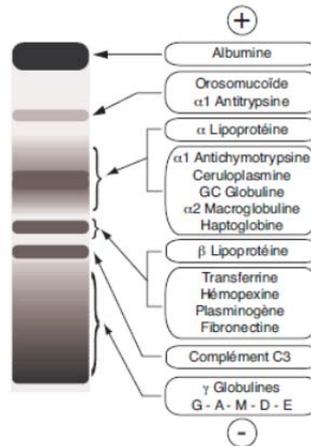
Fiche documentaire 3 : l'électrophorèse des protéines sériques

L'électrophorèse des protéines du sérum ou d'autres liquides biologiques humains est une analyse utile en laboratoire d'analyses cliniques pour rechercher les modifications du profil protéique. Des techniques d'électrophorèse de zone ont été développées sur différents supports, chacun donnant un fractionnement des protéines sériques en fonction de leur charge, dans un tampon de pH donné. L'agarose, d'utilisation très facile, est choisi comme support et les protéines sont séparées en tampon alcalin (pH = 8,6) dans les exemples d'illustration ci-après.

Soumises à un champ électrique, les protéines sériques se répartissent en 5 fractions majeures :

- l'albumine
- les α 1-globulines, comprenant l'orosomucoïde, l' α 1-antitrypsine, l' α 1-antichymotrypsine
- les α 2-globulines comprenant l'haptoglobine, la céruléoplasmine, l' α 2-macroglobuline
- les β -globulines comprenant la fraction C3 (complément), la transferrine et des lipoprotéines
- les γ -globulines comprenant les immunoglobulines

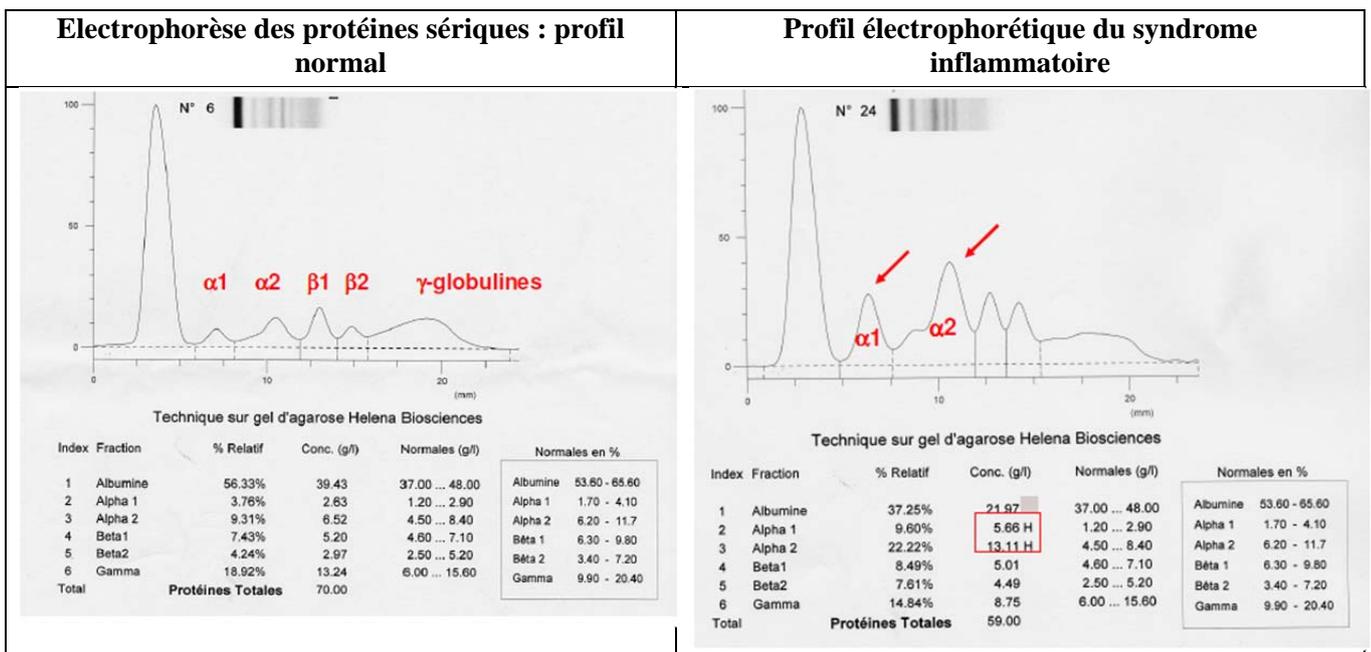
En cas d'inflammation aiguë, on peut constater une augmentation des α 1 et des α 2-globulines. En cas d'inflammation chronique, on peut constater une augmentation des γ -globulines et une diminution de l'albumine. L'électrophorèse peut donner aussi des indications étiologiques (hypo- γ -globulinémie, pic dans les γ -globulines, bloc $\beta\gamma$ en cas de cirrhose).



Source : disponible sur www.sebia.com, vérifié le 27/04/2015

La lecture du gel par densitométrie permet de définir les concentrations relatives (pourcentages) de chaque fraction.

Exemples de profils électrophorétiques :



Fiche documentaire 4 : la lyse cellulaire par le complément

Le système du complément constitue un mécanisme de défense contre les infections. Elément central de l'immunité naturelle, il intervient non seulement dans la destruction des agents infectieux et dans l'élimination des complexes immuns, mais aussi dans le contrôle des réponses inflammatoires et la modulation des réponses immunes adaptatives.

Il s'agit d'un ensemble de protéines synthétisées par le foie et circulant dans le plasma, normalement présentes à l'état inactif chez le sujet sain. Sous l'effet de sollicitations diverses, ces protéines sont activées par une série de réactions de protéolyse libérant différents peptides doués d'activités biologiques :

- peptide - ligand nécessaire au processus d'opsonisation
- peptide - hormone provoquant l'activation de cellules effectrices de l'inflammation
- complexe multimoléculaire cytolytique induisant des lésions irréversibles dans la membrane de cellules cibles (bactéries, par exemple).

Protocole 1 : mesure de l'activité lytique du sérum

Alors que les dosages immunochimiques quantifient les différents composants du complément, les tests fonctionnels permettent de mesurer l'activité lytique globale ou celle d'un seul composant du complément.

1. Matériels spécifiques, réactifs et gestion des déchets

- Préculture d'*Escherichia coli* en milieu Luria Bertani (LB) : 5 mL
- Sérum à doser (noté **U**) : 500 μ L
- Milieu LB liquide stérile : 2 flacons de 20 mL
- Géloses ordinaires coulées en boîte de Pétri : 6
- Billes de verres stériles et flacon de récupération des billes

- Les déchets doivent être traités comme des DASRI et récupérés dans des récipients de collecte adaptés.

2. Pratique opératoire

- Mesurer l'absorbance à 600 nm de la pré-culture bactérienne d'*Escherichia coli*.
- Calculer le volume de préculture à introduire dans un flacon de 20 mL de LB de manière à obtenir une DO comprise entre 0,100 et 0,160.
- A partir de cette suspension, réaliser en tubes à hémolyses stériles des dilutions décimales en cascade dans du milieu LB jusqu'à une dilution correspondant à 10^{-6} .
- Dans 6 tubes Eppendorf de 1,5 mL stériles, préparer les mélanges selon le tableau suivant :

	LB 5	U 5	U 5T	LB 6	U 6	U 6T
dilution 10^{-5} préculture (μ L)	100	100	100			
dilution 10^{-6} préculture (μ L)				100	100	100
milieu LB	100			100		
sérum U		100			100	
sérum U prétraité 30 minutes à 56 °C			100			100

- Placer les tubes à 37 °C pendant **90 minutes**.
- Déposer 100 μ L de chaque mélange sur des géloses ordinaires.
- Etaler à l'aide de billes stériles.
- Incuber 24 h à 37 °C.

**A la demande des candidats, des résultats peuvent leur être fournis,
si la manipulation a été menée jusqu'à l'incubation.**

Protocole 2 : dosage des protéines par la méthode de Lowry

Développée par Lowry et col (1951), cette méthode combine une réaction du biuret (CuSO_4 en milieu alcalin) et une réaction au réactif de Folin-Ciocalteu. Ce réactif, à base de phosphomolybdate et de phosphotungstate, réagit avec les tyrosines et les tryptophanes, pour donner une coloration bleue qui s'ajoute à celle du biuret.

1. Matériels spécifiques, réactifs et gestion des déchets

- Semi-microcuvettes
- Solution de protéines à $0,600 \text{ g.L}^{-1}$
- Etalon de contrôle de protéines à $75,0 \text{ mg.L}^{-1}$
- Sérum à doser (noté **U**)
- Eau physiologique
- Solution alcaline de sulfate de cuivre (SGH09, Attention, H410, P273)
- Réactif de Folin dilué au 1/2 (SGH 05, Danger, H314, P280, P305 +P351 + P338, P310)

- Les réactifs non contaminés seront récupérés dans les récipients d'origine, pour une utilisation ultérieure.
- Les effluents du dosage seront récupérés dans un bidon approprié, étiqueté en blanc « divers ».

2. Pratique opératoire

- A partir d'une solution de protéines à $0,600 \text{ g.L}^{-1}$, préparer une gamme d'étalonnage de 5 tubes renfermant de 0,0 à 30 μg de protéines.

2.1. Préparation d'un tube de mesure

- Introduire 200 μL d'échantillon
- Ajouter 600 μL de solution alcaline de sulfate de cuivre
- Agiter puis laisser reposer 10 minutes
- Ajouter 80 μL de réactif de Folin dilué au 1/2
- Agiter puis laisser reposer 30 minutes
- Lire les absorbances à 750 nm

2.2. Réalisation de l'ensemble des tubes dans les mêmes conditions

- Gamme d'étalonnage
- Etalon de contrôle
- Sérum à doser convenablement dilué

Données :

- Protéïnémie normale : 60 à 85 g.L^{-1}
- Intervalle d'acceptabilité pour l'étalon de contrôle : [68 ; 82] mg.L^{-1}
- Pour les essais (solution diluée) :
 $s_r = 2,5 \text{ mg.L}^{-1}$
 $u_c = 3,5 \text{ mg.L}^{-1}$

Protocole 3 : Mesure de l'activité transaminase dans le sérum

- Le réactif nécessaire à la mesure de l'activité transaminase est proposé prêt à l'emploi (réactif 2 repris par le réactif 1.). Il est noté R_{ALAT}.
- Mesurer l'activité transaminase du sérum (noté L) à l'aide du kit « Enzyline ALAT/GPT monoréactif » (Protocole sur 3 pages, ci-dessous)

Données : $s_r = 1,0 \text{ UI.L}^{-1}$; $u_c = 1,5 \text{ UI.L}^{-1}$

REF 63 312 / 63 313

03589 I - fr - 2013/01 **FR**

ENZYLINE™ ALAT / GPT 20 monoréactif ENZYLINE™ ALAT / GPT 50 monoréactif

IVD

Mesure cinétique de l'activité alanine aminotransférase dans sérum et plasma humains.

Méthode avec tampon Tris, sans phosphate de pyridoxal.

INTRODUCTION ET OBJET DU TEST

Les transaminases sont présentes en grande quantité dans certains tissus comme le foie (ALAT/GPT et ASAT/GOT) ou le cœur (principalement ASAT/GOT). Leur apparition dans le sang reflète une nécrose de ces tissus.

Le dosage de l'ALAT sérique est d'un grand intérêt dans le dépistage précoce des hépatites et des désordres hépatiques en général, et dans le suivi d'évolution de ces maladies.

Dans le cas de désordres hépatiques, une augmentation importante des transaminases témoigne d'une cytolyse. Le rapport ASAT/ALAT (avec élévation des 2 activités) est habituellement > 1 chez des patients avec cirrhose alcoolique, congestion hépatique et cancer métastatique du foie, et < 1 chez des patients avec hépatite aiguë, hépatite virale ou mononucléose infectieuse.

Dans le cadre d'un bilan cardiaque, les transaminases sont des indicateurs de l'infarctus du myocarde. Elles s'élèvent dès la 10^{ème} heure et se normalisent en 3 à 6 jours. Les ASAT/GOT sont plus élevées que les ALAT/GPT.

En dehors de ces 2 bilans, les ALAT/GPT s'élèvent de façon modérée dans diverses affections (1, 2, 3, 4).

PRINCIPE

Ce réactif permet la détermination cinétique de l'activité alanine aminotransférase avec couplage à une réaction indicatrice à NAD réduit, en tampon Tris-HCl 100 mM pH 7,50, sans phosphate de pyridoxal, dans le sérum et le plasma humains, selon les réactions suivantes :



On mesure la vitesse de disparition du NADH à 340 nm, qui est proportionnelle à l'activité catalytique de la GPT (5, 6).

GPT = glutamate pyruvate transaminase.

LDH = lactate déshydrogénase.

Code SFBC : SA

PRESENTATION ET COMPOSITION DU COFFRET

(Réf. 63 312 : 200 tests - Réf. 63 313 : 200 tests)

Réactif 1 L-alanine - Réf. 63 312 : 4 x 65 ml (liquide) - Réf. 63 313 : 4 x 50 ml (liquide)	R1	Tampon tris pH 7,5 L-alanine NaN ₃	101 mmol/l 550 mmol/l 1 g/l
Réactif 2 (repris par R1) Enzymes-coenzyme - Réf. 63 312 : 10 x 20 ml (lyophilisé) - Réf. 63 313 : 4 x 50 ml (lyophilisé)	R2	α cétoglutarate NADH LDH (origine porcine)	16,5 mmol/l $\geq 0,24 \text{ mmol/l}$ $\geq 1200 \text{ U/l}$
Réf. 63 313 : 4 adaptateurs			
1 notice fournie dans le kit ou téléchargeable sur www.biomerieux.com/techlib			

MATERIEL NECESSAIRE MAIS NON FOURNI

Equipement général de laboratoire.

PRECAUTIONS D'UTILISATION

- Pour diagnostic *in vitro* uniquement.
- Pour usage professionnel uniquement.
- Ce coffret contient des composants d'origine animale. La maîtrise de l'origine et/ou de l'état sanitaire des animaux ne pouvant garantir de façon absolue que ces produits ne contiennent aucun agent pathogène transmissible, il est recommandé de les manipuler avec les précautions d'usage relatives aux produits potentiellement infectieux (ne pas ingérer ; ne pas inhaler).

- Vérifier l'intégrité des réactifs avant leur utilisation.
- Ne pas utiliser le réactif après la date de péremption indiquée sur l'étiquette étui.
- Le réactif contient un conservateur (azoture de sodium), susceptible de réagir avec les tuyauteries en plomb ou en cuivre et de former des azotures métalliques explosifs. Il est recommandé de rincer à l'eau tout rejet.

CONDITIONS DE STOCKAGE

- Conserver le coffret à 2-8°C.
- Les réactifs sont stables jusqu'à la date de péremption indiquée sur l'étiquette étui, s'ils sont conservés dans les conditions préconisées.

ECHANTILLONS**Nature des échantillons**

Sérum ou plasma recueilli sur héparinate de lithium.

Stabilité (6)

- 5 jours à 2-8°C.
- 24 heures à 20-25°C.

Interférences

Il n'a pas été observé, pour ce dosage, d'influence significative :

- de l'hémolyse, après surcharge d'échantillons en hémoglobine, jusqu'à 183 µmol/l de monomère,
- de la lipémie, après surcharge d'échantillons en lipides, jusqu'à 7 mmol/l d'équivalent triglycérides,
- de la bilirubinémie, après surcharge d'échantillons en bilirubine, jusqu'à 368 µmol/l,
- du pyruvate jusqu'à 300 µmol/l.

Il est néanmoins conseillé d'être vigilant sur les échantillons visiblement hémolysés, lipémiques ou ictériques et d'effectuer si possible un nouveau prélèvement.

MODE OPERATOIRE MANUEL**Préparation du réactif**

Reprendre le contenu d'un flacon de Réactif 2 par :

- **ENZYLINE™ ALAT/GPT 20 monoréactif** (Réf. 63 312) : 20 ml de Réactif 1.
- **ENZYLINE™ ALAT/GPT 50 monoréactif** (Réf. 63 313) : le contenu d'un flacon de Réactif 1 à l'aide d'un adaptateur.

Stabilité dans le flacon d'origine

- 1 mois à 2-8°C.
- 5 jours à 20-25°C.

Réalisation du test

Longueur d'onde : — 340 nm (Hg 334 nm – Hg 365 nm)

Température : — 30°C ou 37°C

Cuve : — trajet optique 1 cm

Zéro de l'appareil : — air ou eau déminéralisée

Introduire dans un tube ou une cuve de mesure thermostaté à 30°C ou 37°C :

Réactif 2 repris et porté à 30 ou 37°C	1 ml
Echantillon	100 µl

Mélanger. Attendre 1 minute à 30 ou 37°C.
Mesurer la diminution moyenne de DO par min (n) pendant 1 à 3 minutes.

- Pour une variation moyenne de DO par min $\geq 0,16$ à 340 nm, refaire la détermination en diluant l'échantillon au 1/5 ou 1/10 dans une solution de NaCl à 9 g/l.
- **Une variation de DO moyenne par minute très faible peut indiquer une consommation totale du NADH avant lecture (DO de départ < 1,0) et donc signifier une activité transaminasique élevée et / ou une concentration en pyruvate endogène exceptionnellement élevée (5). Refaire la détermination après dilution de l'échantillon.**

RESULTATS ET INTERPRETATION

L'interprétation des résultats du test doit être faite en tenant compte du contexte clinique et éventuellement des résultats d'autres tests.

Calcul

340 nm _____ U/l = n x 1746

334 nm _____ U/l = n x 1780

365 nm _____ U/l = n x 3235

CONTROLE DE QUALITE

- LYOTROL™ P (Réf. 62 383)
- Zymo-Trol™ (Réf. 62 952)

Pour s'assurer de la validité de la série, effectuer un contrôle à chaque série de dosages. La valeur obtenue doit être dans l'intervalle d'acceptation.

Remarque

Il est de la responsabilité de l'utilisateur de s'assurer que le contrôle de qualité est mis en oeuvre conformément à la législation locale en vigueur.

VALEURS ATTENDUES

Ces valeurs sont données à titre indicatif, il est recommandé à chaque laboratoire d'établir ses propres valeurs de référence sur une population rigoureusement sélectionnée.

	30°C *	37°C *
Hommes	≤ 29 U/l	≤ 40 U/l
Femmes	≤ 24 U/l	≤ 33 U/l

* valeurs recalculées. Les facteurs utilisés pour la conversion des valeurs attendues à 25°C sont respectivement 1,32 (pour le calcul des valeurs attendues à 30°C) et 1,85 (pour le calcul des valeurs attendues à 37°C) (7).

PERFORMANCES (8)

Les études du réactif **ENZYLINE™ ALAT/GPT monoréactif** ont donné les résultats suivants à 37°C.

Les performances présentées ont été obtenues avec la méthodologie indiquée dans cette notice.

Toute déviation de méthodologie peut modifier les résultats.

Elles sont données à titre indicatif.

Limite de détection analytique

Elle a été déterminée à partir de dosages effectués sur de l'eau déminéralisée (moyenne + 5 x écart type).

La limite de détection est inférieure ou égale à 6,5 U/l.

Linéarité

Le réactif est linéaire jusqu'à 290 U/l.

Précision**Précision intra-série**

Trois échantillons ont été dosés dans la même série.

	n	Moyenne (U/l)	C.V (%)
Niveau 1	20	10	7,50
Niveau 2	20	151	1,10
Niveau 3	20	281	0,93

Précision inter-séries

Trois échantillons ont été dosés en double dans 10 séries différentes.

	n	Moyenne (U/l)	C.V (%)
Niveau 1	20	11	9,60
Niveau 2	20	154	1,94
Niveau 3	20	288	2,53

Corrélation

49 échantillons de patients ont été dosés comparativement au réactif bioMérieux **ENZYLINE™** ALAT/GPT standardisé 50 utilisant la méthode SFBC avec phosphate de pyridoxal.

L'équation de la droite d'allométrie obtenue est :

$y = 0,88 x + 3,13$ (en U/l) avec un coefficient de corrélation de 0,997.

APPLICATIONS DISPONIBLES SUR DEMANDE

- Applications spectrophotomètres (11861B)
- AU 400 / 640 / 2700 (13553C)
- AU 600 (11862C)
- CX 5 / CX 7 / CX 9 (11863C)
- HITACHI 704 (11864B)
- HITACHI 717 (11865C)
- HITACHI 911 (11866C)
- KONELAB 20 (13227B)
- MASCOTT PLUS / LISA (11867C)
- MIRA S / MIRA PLUS (11868B)
- SELECTRA 2 / E / XL (11870C)
- TARGA / FALCOR 250 / BT 3000 plus (13229B)

ELIMINATION DES DECHETS

Éliminer les réactifs utilisés ou non utilisés ainsi que les matériels à usage unique contaminés en suivant les procédures relatives aux produits infectieux ou potentiellement infectieux.

Il incombe à chaque laboratoire de gérer les déchets et les effluents qu'il produit selon leur nature et leur dangerosité, et d'en assurer (ou faire assurer) le traitement et l'élimination selon les réglementations applicables.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

1. PAPPAS N.J. - Enhanced cardiac enzyme profile. - *Clin. Lab. Med.* - 1989, vol. 9, n° 4, p. 689-716.
2. REICHLING J.J., KAPLAN M.M. - Clinical use of serum enzymes in liver disease. - *Dig. Dis. Sci.* - 1988, vol. 33, n° 12, p. 1601-1614.
3. DUFOUR D.R., LOTT J.A., NOLTE F.S., et al. - Diagnosis and monitoring of hepatic injury. Part I : Performance characteristics of laboratory tests - *Clinical Chemistry* - 2000, vol. 46, n°12, p. 2027-2049.
4. DUFOUR D.R., LOTT J.A., NOLTE F.S., et al. - Diagnosis and monitoring of hepatic injury. Part II : Recommendations for use of laboratory tests in screening, diagnosis, and monitoring - *Clinical Chemistry* - 2000, vol. 46, n°12, p. 2050-2068.
5. BERGMAYER H.U., HORDER M., REJ R. - Approved recommendation (1985) on IFCC methods for the measurement of catalytic concentration of enzymes Part 3. IFCC Method for Alanine Aminotransferase. - *J. Clin. Chem. Clin. Biochem.* - 1986, vol. 24, p. 481-495.
6. MATHIEU M., GUIDOLLET J., JUNIEN C., et al. - Recommandations pour la détermination dans le sérum humain de la concentration catalytique de l'Alanine aminotransférase à +30°C. *Ann. Biol. clin.* - 1982, vol. 40, p. 117-122.
7. THEFELD W., HOFFMEISTER H., BUSCH E.-W. et al. - Referenzwerte für die Bestimmungen der Transaminasen GOT und GPT sowie der alkalischen Phosphatase im Serum mit optimierten Standardmethoden - *Dtsch. med. Wschr.* - 1974, vol. 99, 343-351.
8. VASSAULT A., GRAFMEYER D., NAUDIN C. et al. - Protocole de validation de techniques (document B) - *Ann. Biol. Clin. (Paris)* - 1986, vol. 44, p. 686-745.

TABLE DES SYMBOLES

Symbole	Signification
	Référence du catalogue
	Dispositif médical de diagnostic in vitro
	Fabricant
	Limites de température
	Utiliser jusque
	Code du lot
	Consulter les instructions d'utilisation

BIOMERIEUX, le logo bleu, ENZYLINE, LYOTROL et Zymo-Trol sont des marques utilisées, déposées et/ou enregistrées appartenant à bioMérieux, ou à l'une de ses filiales, ou à une de ses sociétés.
Les autres marques et noms de produits mentionnés appartiennent à leurs propriétaires respectifs.

Protocole 4 : identification d'un microorganisme responsable de lésions cutanées purulentes

Identifier une souche pure isolée d'une lésion cutanée purulente présentée sur gélose nutritive à l'aide de la fiche technique « SLIDEX® Staph-kit » (2 pages).

REF 73 112

06125 L - fr - 2009/11

SLIDEX® Staph-Kit

IVD

SLIDEX® Staph-Kit est un test rapide d'agglutination de particules de latex et d'hématies pour l'identification des souches de *Staphylococcus aureus* à partir des milieux d'isolement.

INTRODUCTION ET OBJET DU TEST

Les staphylocoques font partie des bactéries les plus fréquemment rencontrées en pathologie humaine. Les infections les plus communes provoquées par *Staphylococcus aureus* sont cutanées, mais des atteintes sévères (septicémies, endocardites, méningites, pneumonies, ostéomyélites) peuvent être observées en milieu hospitalier (1).

La méthode la plus répandue pour l'identification de *Staphylococcus aureus* a longtemps été la recherche de la coagulase. Ce test est basé sur la capacité des souches de *Staphylococcus aureus* à produire cette enzyme extra-cellulaire qui coagule le plasma de lapin. Ce test permet ainsi de différencier *Staphylococcus aureus* des autres espèces de staphylocoques, majoritairement coagulase négative. Cependant, cette méthode nécessite 4 à 24 heures d'incubation.

D'autres méthodes, basées sur l'agglutination d'hématies ou de particules de latex, sont actuellement reconnues pour l'identification de *Staphylococcus aureus* (1, 2).

En effet, *Staphylococcus aureus* possède un récepteur protéique pour un fragment du fibrinogène. Ce récepteur est présent sur 96 % des souches d'origine humaine (3) et sur la plupart des autres biotypes. Certaines souches résistantes aux Pénicillines M ne présentent pas ce facteur d'affinité pour le fibrinogène (4).

A la surface de *Staphylococcus aureus* une protéine, la protéine A, réagit électivement avec le fragment Fc de la plupart des immunoglobulines d'isotype G (IgG). Cette protéine est produite sur tous les milieux mais faiblement sur gélose au sang. Elle est présente sur environ 90 % des souches (5). Enfin, des protéines ou glycoprotéines et des acides téichoïques dont les spécificités antigéniques sont extrêmement variables (1) existent à la surface de *Staphylococcus aureus*.

SLIDEX Staph-Kit permet l'identification des souches de *Staphylococcus aureus* à partir de milieux d'isolement.

PRINCIPE

SLIDEX Staph-Kit est un réactif constitué d'un mélange :

- d'hématies de mouton stabilisées, sensibilisées par du fibrinogène et agglutinées lorsqu'elles sont mises en présence d'une souche de *Staphylococcus aureus* portant le récepteur d'affinité pour le fibrinogène,
- de particules de latex sensibilisées par un anticorps monoclonal (IgG) et agglutinées lorsqu'elles sont mises en présence d'une souche de *Staphylococcus aureus* portant la protéine A et/ou des antigènes protéiques de surface.

COMPOSITION DU COFFRET POUR 50 TESTS

R1 <i>S. aureus</i> (H / L) 1 x 1,7 ml Flacon compte-gouttes** à bouchon rouge	Réactif anti-<i>Staphylococcus aureus</i> (prêt à l'emploi, stocker en position verticale) Hématies de mouton sensibilisées par du fibrinogène humain* et latex sensibilisé par un anticorps monoclonal souris anti- <i>Staphylococcus aureus</i> (souris) (merthiolate de sodium 0,13 g/l + azoture de sodium 1 g/l)
R2 <i>S. aureus</i> (H / LCO) 1 x 1,7 ml Flacon compte-gouttes** à bouchon blanc	Réactif contrôle négatif (prêt à l'emploi, stocker en position verticale) Hématies de mouton et latex non sensibilisé (merthiolate de sodium 0,13 g/l + azoture de sodium 1 g/l)
1 notice	

* L'absence d'antigène HBs, d'anticorps anti-VIH1, anti-VIH2 et d'anticorps anti-VHC a été vérifiée. Cependant, aucun test ne pouvant apporter une garantie absolue, ce produit doit être manipulé avec les précautions d'usage relatives aux produits potentiellement infectieux.

** 1 goutte = 0,03 ml

Bien homogénéiser les réactifs avant utilisation.

MATERIEL NECESSAIRE MAIS NON FOURNI

- Cartes jetables ou, Lames de verre porte-objets parfaitement propres
- Oeses plastiques ou bâtonnets jetables
- Minuteur

PRECAUTIONS D'UTILISATION

- Pour diagnostic *in vitro* uniquement.
- Pour usage professionnel uniquement.
- Ce coffret contient des composants d'origine humaine. Aucune des méthodes d'analyse actuellement connues ne peut garantir de façon absolue que ces produits ne contiennent aucun agent pathogène transmissible. Il est recommandé de les manipuler avec les précautions d'usage relatives aux produits potentiellement infectieux (se reporter au Manuel de Sécurité Biologique en Laboratoire - OMS - Genève - dernière édition).
- Ce coffret contient des composants d'origine animale. La maîtrise de l'origine et/ou de l'état sanitaire des animaux ne pouvant garantir de façon absolue que ces produits ne contiennent aucun agent pathogène transmissible, il est recommandé de les manipuler avec les précautions d'usage relatives aux produits potentiellement infectieux (ne pas ingérer ; ne pas inhaler).
- Les prélèvements, cultures bactériennes et produits ensemencés doivent être considérés comme potentiellement infectieux et doivent être manipulés de façon appropriée. Les techniques aseptiques et les précautions usuelles de manipulation pour le groupe bactérien étudié doivent être respectées tout au long de la manipulation ; se référer à "CLSI/NCCLS M29A, *Protection of Laboratory Workers from Occupationally Acquired Infections, Approved Guideline* – révision en vigueur". Pour informations complémentaires sur les

précautions de manipulation, se référer à "Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories, CDC/NIH dernière édition," ou à la réglementation en vigueur dans le pays d'utilisation.

- Ne pas utiliser les réactifs après la date de péremption indiquée sur l'étiquette coffret.
- Eviter le contact avec les yeux, la peau ou les vêtements.
- Ne pas intervertir ou mélanger les réactifs de lots différents.
- Ne pas pipeter à la bouche les réactifs.
- Ne pas utiliser d'osee métallique pour réaliser le test d'agglutination au latex.
- Ne pas réutiliser les cartes jetables.
- Les réactifs du coffret contiennent un conservateur (azoture de sodium), susceptible de réagir avec les tuyauteries en plomb ou en cuivre et de former des azotures métalliques explosifs. Il est recommandé de rincer à l'eau tout rejet.
- L'interprétation des résultats du test doit être faite en tenant compte du contexte clinique, de l'origine du prélèvement, des aspects macro et microscopiques de la souche et éventuellement des résultats d'autres tests.

CONDITIONS DE STOCKAGE

- Conserver les réactifs à 2-8°C.
- **Ne pas congeler les réactifs.**
- Si les réactifs ont été congelés accidentellement, ils ne doivent pas être utilisés.
- Tous les composants sont stables jusqu'à la date de péremption indiquée sur l'étiquette coffret, s'ils sont conservés dans les conditions préconisées.

ECHANTILLONS (prélèvements et préparation)

Ensemencer le prélèvement sur un milieu d'isolement sélectif (gélose Chapman, gélose Baird Parker, gélose tellurite glycine) ou non sélectif [(gélose Columbia au sang de mouton (5 %), gélose Trypcase soja avec ou sans sang de mouton (5 %), gélose Mueller Hinton avec ou sans sang de mouton, gélose CLED, gélose BCP, gélose CPS ID] : les performances peuvent varier en fonction du type de milieu utilisé.

Une étude interne réalisée sur 191 souches de *S. aureus* (MRSA et MSSA) et 89 souches de *S. non aureus* montre une sensibilité identique en fonction du milieu utilisé. L'étude montre également que les résultats de spécificité ne sont pas statistiquement différents en fonction du milieu utilisé (voir tableau ci-dessous). Cependant, il est recommandé d'utiliser les milieux suivants : Gélose Columbia au sang, Columbia ANC + sang, TSA, TSA + sang, CPS et Baird Parker.

Milieu	Sensibilité	Spécificité
Gélose Columbia au sang Columbia ANC + sang TSA TSA + sang CPS Baird Parker	94,2 %	89,5 %
Mueller Hinton Mueller Hinton + sang Tellurite Glycine Agar BCP CLED	94,2 %	88,4 %
Chapman	94,2 %	87,2 %

Après incubation 18-24 heures à 33-37°C, repérer les colonies suspectes. **S'assurer dans un premier temps qu'il s'agit bien d'un staphylocoque par les réactions classiques (morphologie, Gram, catalase).**

MODE OPERATOIRE

1. Laisser les réactifs à température ambiante (18-25°C) avant utilisation.
2. Bien remettre en suspension les réactifs. Chasser les bulles retenues dans les compte-gouttes.
3. Sur une carte jetable ou lame de verre porte-objet parfaitement propre, dans 2 cercles, déposer :
 - 1 goutte de R1 (réactif anti-*Staphylococcus aureus*) ;
 - 1 goutte de R2 (réactif contrôle négatif).**Veiller à tenir les flacons compte-gouttes verticalement lors de la distribution des gouttes.**
4. Dans chacune des gouttes, disperser très soigneusement et complètement pendant 10 secondes, 1 à 2 colonies suspectes de taille moyenne issues d'une gélose non sélective ou 3 à 6 colonies très petites issues d'une gélose sélective (ex. : gélose Chapman) à l'aide d'une oese ou d'un bâtonnet jetable.
5. Donner à la lame un léger mouvement de rotation pendant 20 secondes et lire la réaction sous éclairage normal sans utiliser de loupe.

LECTURE ET INTERPRETATION DES RESULTATS

- **Un résultat positif** est indiqué par l'apparition dans le réactif R1 d'une agglutination dans les 30 secondes (temps du mélange + temps de rotation de la lame) soit des hématies sensibilisées (coloration rouge), soit des particules de latex (coloration blanche), ou des deux simultanément (coloration rouge orangé).
- **Un résultat négatif** est indiqué par l'absence d'agglutination avec les réactifs R1 et R2.
- **La réaction est ininterprétable** si le réactif R2 présente une agglutination.
- L'agglutination des hématies sensibilisées indique la présence de facteur d'affinité pour le fibrinogène.
- L'agglutination du latex indique que la souche possède la protéine A ou l'antigène contre lequel est dirigé l'anticorps monoclonal.
- Si l'agglutination est très faible avec le réactif anti-*Staphylococcus aureus*, si le réactif contrôle est agglutiné ou si des grumeaux sont obtenus, l'identification de la souche doit alors être effectuée par la recherche de la coagulase ou par l'étude des caractères biochimiques.

CONTROLE DE QUALITE

Un contrôle de qualité des réactifs doit être effectué à l'ouverture d'un nouveau coffret avec les souches ci-dessous :

Souches contrôle recommandées	Hématies		Latex	
	R1	R2	R1	R2
<i>S. aureus</i> ATCC® 25923	+	-	-	-
<i>S. epidermidis</i> ATCC® 14990	-	-	-	-
<i>S. aureus</i> ATCC® 51153	-	-	+	-

Suivre les étapes de la méthodologie et de la lecture à partir des colonies correspondant aux souches ci-dessus. Les souches servant au contrôle de qualité doivent être cultivées sur les milieux habituellement utilisés au laboratoire.

Protocole 5 : dosage de la protéine C-réactive (CRP) par méthode immunoenzymatique

La CRP est détectée par technique ELISA à l'aide d'anticorps monoclonaux spécifiques dirigés contre divers épitopes de cette protéine multimérique.

1. Matériels spécifiques, réactifs et gestion des déchets

- Barrette sensibilisée avec 100 μL d'un anticorps monoclonal dirigé contre la protéine C-réactive
- Barrette pour réaliser les dilutions
- Cadre de barrette
- Ravier pour lavage
- Agitateur de microplaques
- Lecteur de microplaques (**fiche technique fournie par le centre**)
- Tampon PBS + Tween à 0,1 % en pissette (noté **PBS Tween**)
- Tampon PBS : 2 mL (noté **PBS**)
- Solution étalon de protéine C-réactive à 250 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$: 200 μL (notée **CRP**)
- Anticorps anti-CRP couplé à une peroxydase, dilué en PBS : 1 mL (noté **conjugué**)
- O-phénylène diamine en tampon citrate et en présence d' H_2O_2 , préparé extemporanément: 2 mL (noté **substrat**) à **demandeur à l'examinateur** (SGH 06, SGH 08, SGH 09, H301-H312 + H332-H317-H319-H341-H351-H371-H410, P260-P273-P280-P301 + P310-P305 + P351 + P338-P501)
- Solution d'arrêt H_2SO_4 à 2 $\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$: 1 mL (notée **H_2SO_4**) (SGH 05, Danger, H314, P280-P305 + P351 + P338-P310)
- Sérum à tester (noté **T**)
- Les déchets issus des lavages doivent être traités comme des DASRI et versés dans des récipients de collecte adaptés.

2. Pratique opératoire

2.1. Etalonnage

A partir de la solution étalon de CRP, préparer une gamme de dilution géométrique de raison $\frac{1}{2}$, allant de 1 à 512 en tampon PBS. Le volume restant dans la cupule est de 100 μL .

2.2. Dosage de la CRP

- Rejeter le contenu des cupules sensibilisées et égoutter les puits sur papier absorbant.
- Laver 3 fois par 200 μL de tampon PBS-Tween.
- Déposer 50 μL de chacune des dilutions de la solution étalon de CRP dans les puits A1 à A8 et B1 à B2.
- Déposer 50 μL de tampon PBS dans les puits B3 à B4.
- Déposer 50 μL des échantillons de **sérum T**, dans les puits B5 à B6.
- Incuber 20 minutes à température ambiante sous agitation.
- Rejeter le contenu des cupules et laver 3 fois par 200 μL de tampon PBS-Tween.
- Déposer 50 μL de conjugué dans chacune des cupules A1 à A8 et B1 à B3 et B5 à B6
- Déposer 50 μL de tampon PBS dans B4.
- Incuber 20 minutes à température ambiante et sous agitation.
- Rejeter le contenu des cupules et laver 3 fois par 200 μL de tampon PBS-Tween.
- Déposer 50 μL de substrat dans les cupules A1 à A8 et B1 à B6 et laisser agir 1 min 30 (jusqu'à apparition d'une coloration).
- Ajouter 20 μL de solution d'arrêt H_2SO_4 dans chacune des cupules.
- Lire rapidement les absorbances au lecteur de microplaques à 490 nm (le blanc est réalisé sur l'air en B7 ou B8).

Données :

- Ecart type de répétabilité (s_r) de la technique ELISA : 0,025 (valeur d'absorbance)
- $u_c = 3,0 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$

Aide mémoire de métrologie

On considère que les qualités de justesse et de fidélité des procédures de mesure utilisées ont été étudiées et reconnues.

Vérification de la bonne exécution de la procédure

Lorsqu'un mesurage est effectué, deux types de vérification sont proposés afin de pouvoir accepter les valeurs mesurées obtenues pour des échantillons inconnus.

On effectue, dans la même série de mesurages :

- un essai sur un étalon de contrôle ; la valeur mesurée obtenue est notée y_{EC} .
- un ou deux essais sur chacun des échantillons à doser.

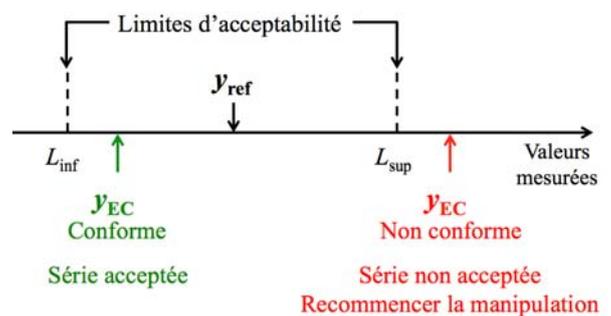
Vérification de l'exactitude de mesure à l'aide d'un étalon de contrôle

On dispose d'un étalon de contrôle avec sa valeur conventionnelle (y_{ref}) ainsi que ses limites d'acceptabilité (L_{inf} et L_{sup}). On recherche si la valeur mesurée (y_{EC}) est comprise dans l'intervalle d'acceptabilité, soit :

$$L_{inf} \leq y_{EC} \leq L_{sup}$$

Si la valeur mesurée y_{EC} appartient à l'intervalle d'acceptabilité :

- la valeur mesurée y_{EC} est **exacte**, donc **conforme** : l'exécution de la procédure de mesure est satisfaisante dans les conditions du jour ;
- en conséquence, les valeurs mesurées obtenues pour les échantillons inconnus dans la même série sont **acceptés**.



Si la valeur mesurée y_{EC} n'appartient pas à l'intervalle d'acceptabilité :

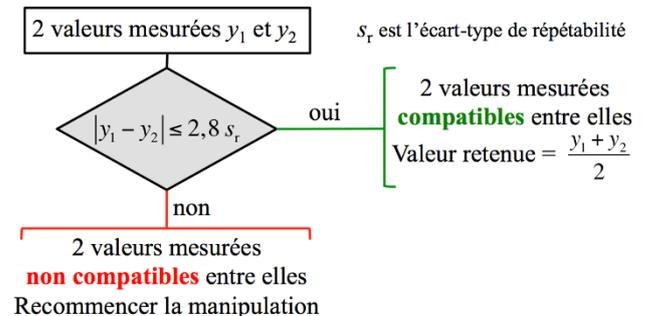
- la valeur mesurée n'est **pas exacte** donc **non conforme** : l'exécution de la procédure de mesure n'est pas satisfaisante dans les conditions du jour ;
- en conséquence, les valeurs mesurées de toute la série **ne sont pas acceptées**; il faut rechercher l'origine de la mauvaise exactitude avant de recommencer la manipulation.

Vérification de la compatibilité métrologique dans le cas de deux essais effectués en répétabilité

Soient deux valeurs mesurées (y_1 et y_2) pour un même échantillon et l'écart-type de répétabilité (s_r) de la procédure de mesure correspondant à cet échantillon. Le logigramme de compatibilité à appliquer est le suivant :

Si les deux valeurs mesurées sont compatibles :
la valeur retenue est la moyenne.

Si les deux valeurs mesurées ne sont pas compatibles : il faut en rechercher la cause et recommencer la manipulation.



Guide pour l'expression du résultat de mesure

L'incertitude élargie (U) est directement donnée avec son niveau de confiance ou calculée en multipliant l'incertitude-type composée (u_c) par le facteur d'élargissement k , par exemple $k = 2$ pour un niveau de confiance de 95 %.

L'incertitude élargie est ensuite arrondie. Selon les cas :

- si le premier chiffre significatif est 1, 2 ou 3 : garder deux chiffres significatifs ;
- si le premier chiffre significatif est 4 ou plus : garder un chiffre significatif.

La valeur retenue du résultat est arrondie de la façon suivante : le dernier chiffre significatif doit être à la même position décimale que le dernier chiffre de l'incertitude élargie.

Expression du résultat de mesure :

Grandeur mesurée (analyte ; système) = (valeur retenue $\pm U$) unité