

# BTS QUALITE DANS LES INDUSTRIES ALIMENTAIRES ET LES BIO – INDUSTRIES

Session 2002

## E5 – TECHNIQUES D'ANALYSE ET DE PRODUCTION U 52 – TECHNIQUES D'ANALYSES ET DE CONTRÔLES

Durée : 6 heures

Coefficient :3

### SERUM – TEST

### MATIÈRE D'ŒUVRE

#### IMMUNOTOXICOLOGIE

**Par candidat, prévoir:**

- un tube à hémolyse avec 0,5 mL de sérum-test Anti A, Anti B (pas Anti A-B) (donner à chaque candidat les références du ST : N°.... fabricant, date de péremption)

pour se procurer les sérums-tests :

- Jacques BOY 45, rue Cognacq- Jay 51065 REIMS Cedex Fax : 03 26 79 72 73
- Diagast laboratoires Eurosanité parc 251, avenue Eugène Avinée BP 9 59 374 LOOS Cedex  
fax commande : 03 20 96 53 64

Périmés ou non, les tester d'abord ; les sérums monoclonaux ont des titres très élevés, par ex 512, 1024 et plus alors qu'un anti-H, d'origine végétale arrive à peine à du 64. Pour des raisons d'économie, on peut soit diluer les sérums monoclonaux au 1/2 ou plus, soit utiliser des sérums de donneurs.

Prix de revient par candidat : 3F si ST monoclonaux, 9F si ST d'origine végétale

- un tube à hémolyse avec 3 mL d'eau physiologique
- avec 2 mL d'hématies-tests à 3 % correspondant au sérum-test donné au candidat, qui sera *délivré sur commande*.
- une plaque d'opaline ou une plaque jetable en carton : Cartoplaque chez Diagast Eurosanité Parc, 251, avenue E. Avinée BP 9 59 374 LOOS Cedex fax commandes 03 20 96 53 64 100 pièces réf 90 209
- une pipette automatique p100 ou 200
- des cônes adéquats
- un agitateur en verre
- 3 pipettes jetables
- 1 chronomètre
- une poubelle de table
- un portoir avec 12 tubes à hémolyse vides
- gants à la disposition des candidats (sans qu'ils soient imposés).

**Par laboratoire:**

- 2 jeux d'hématies-tests A1, B et O à 10% à apporter aux candidats à la demande (laver 2 fois ces hématies-tests à l'eau physiologique puis les mettre en suspension à 10% en eau physiologique). Prévoir  $\times$  1 mL de chacune des hématies-tests + pipettes jetables. Commander à l'EFS le plus proche ou aux adresses ci-dessus.
- Centrifugeuses (1 ou 2 par salle).

# BIOCHIMIE

## Matériel par poste :

- P 1000 réglable + cônes bleus ou équivalent ;
- P 100 réglable + cônes jaunes ou équivalent ;
- 10 cuves sur leur portoir ;
- 1 fiole jaugée de 100 mL ;
- carrés de papier filtre prédécoupés, et de parafilm ;
- papier doux non pelucheux ;
- 1 placard disponible pour porter les tubes à l'obscurité ;
- 1 agitateur mécanique (vortex) pour deux étudiants ;
- 1 feuille de papier millimétré.

## Matériel pour la salle :

- 1 spectrophotomètre pour lecture à 700 nm à cuves ou à aspiration, pour 8 étudiants maxi.

## Réactifs par poste :

- Solution étalon de sérum albumine bovine à 200 mg.L<sup>-1</sup> : 1 mL ;
- Solution de contrôle de sérum albumine bovine à 100 mg.L<sup>-1</sup> : 1 mL ;
- Sérum test : le même que pour l'immunologie : 1,5 mL ;
- Solution alcaline de complexonate de cuivre : 15 mL ;
  - Solution A : Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> à 2% dans NaOH à 0,1 mol.L<sup>-1</sup>
  - Solution B : tartrate double de Na et K à 20 g.L<sup>-1</sup>
  - Solution C : CuSO<sub>4</sub> , 5 H<sub>2</sub>O à 10 g.L<sup>-1</sup>

Préparer extemporanément la solution réactive en respectant l'ordre d'addition des réactifs et en agitant après chaque addition : Solution C : 10 mL ; Solution B : 10 mL ; Solution A : 1 Litre.

- Réactif de Folin dilué au demi : 1,5 mL.

**Tableau de la gamme d'étalonnage complété**

Tube	unités	0	1	2	3	4	5	Contrôle	Essai 1	Essai 2
Sol. étalon mère à 200 µg/mL	µL	0	50	100	150	200	250			
Sérum test dilué au 1/200	µL								250	250
Sol. Contrôle à 100 µg/mL	µL							250		
Eau physiologique qsp 500 µL	µL	500	450	400	350	300	250	250	250	250
Solution alcaline de Cu <sup>2+</sup>	mL	1	1	1	1	1	1	1	1	1
Homogénéiser ; attendre 5 minutes.										
Folin au ½	µL	100	100	100	100	100	100	100	100	100
Homogénéiser ; attendre 30 minutes à l'obscurité ; lire à 700 nm.										
Quantité de protéines par tube	µg	0	10	20	30	40	50			
A obtenue										

# MICROBIOLOGIE

## Dénombrement de la flore aérobie mésophile à 30°C.

- Eau physiologique renfermant  $10^2 \text{ mL}^{-1}$  d'*Enterococcus faecalis*. et répartis en tube à vis à raison de 10 mL tubes (notés L + numéro de paillasse).
- 2 tubes d'eau peptonée tamponnée de 9 mL (prévoir une réserve).
- 6 boîtes de Pétri stériles vides.
- 3 pipettes graduées de 1 mL (ou micropipettes et cônes ou pailles stériles pour délivrer 1 mL).
- 1 système d'agitation mécanique (vortex) pour 1 candidat.
- 6 tubes de gélose PCA de 15 mL en surfusion.
- 6 tubes de gélose blanche de 5 mL en surfusion.

## Identification de la souche bactérienne

### Jour 1

- 1 gélose inclinée (trypticase soja) ensemencée en nappe avec une culture pure de *Pseudomonas* non pigmenté cultivant à 37°C (pour une culture en 24 heures).
- Languettes ou autre matériel pour réaliser le test de l'oxydase.
- 1 galerie API 20 NE + fond + couvercle + 1 ampoule Aux medium.
- 1 GTS
- Un protocole opératoire de la galerie.
- 1 VF en surfusion.
- 1 tube de 2 mL d'eau physiologique en vue de la réalisation de la suspension à 0,5 McF.
- étalon 0,5 McF (1 pour 4 candidats).

### Jour 2

- 1 fiche de lecture Api 20 NE, code API, logiciel d'identification
- Les réactifs habituels pour révélation : Nit1, Nit2, James (Kovacs).

## Une souche microbienne

- Des cultures de 5 jours minimum de *Mucor* et *Penicillium* présentées en gélose Sabouraud + chloramphénicol (alterner les numéros).
- Anse «spatule», pinces.
- 1 mL de bleu lactophénol distribué en tube à hémolyse stérile par étudiant.
- Lame et lamelle ( 2 de chaque) + éventuellement du scotch.
- Documents pour l'identification.

## Consignes Microbiologie

Distribuer la galerie Api 20 NE, VF, GTS après avoir ramassé l'annexe 2.

Définir une heure de remise de cette annexe à savoir 2 h après le début de l'épreuve.

Prévoir une échelle de résultat pour l'intensité des agglutinations.

# BTS QUALITE DANS LES INDUSTRIES ALIMENTAIRES ET LES BIO - INDUSTRIES

Session 2002

## E5 – TECHNIQUES D'ANALYSE ET DE PRODUCTION U 52 – TECHNIQUES D'ANALYSES ET DE CONTRÔLES

Durée : 6 heures

Coefficient : 3

### SERUM – TEST

Premier jour : 4 H 30

### IMMUNO - TOXICOLOGIE (15 points)

#### 1.1 Textes officiels :

D'après la circulaire de la D.G.S. 264.84, les caractéristiques et normes des réactifs utilisés en immunohématologie érythrocytaire sont les suivantes :

##### 1.1.1. Dispositions générales applicables à tout réactif pour groupages sanguins :

###### *Spécificité :*

“Le réactif doit reconnaître exclusivement les échantillons d'hématies porteuses de l'antigène correspondant et ne doit réagir avec aucun antigène reconnu distinct de ce dernier.”

###### *Puissance :*

“Elle est appréciée par 3 critères : le titre, le score d'agglutination et l'intensité. En outre pour les réactifs utilisés sur plaque, l'avidité doit être appréciée.”

##### 1.1.2. Dispositions particulières à chaque catégorie de réactifs :

Puissance : critères minimaux exigibles pour réactifs de groupage ABO :

Réactifs	Hématies- tests	Avidité	Intensité	Titre	Score
Anti-A	A 1	8 s	+	64	50
Anti-B	B	8 s	+++	64	50
Anti-AB	A 1 et B	Caractéristiques de l'anti -A et de l'anti -B			

#### 1.2. Techniques :

##### 1.2.1. Recherche de la spécificité du sérum-test :

Sur une plaque en carton, déposer côte à côte :

1 goutte d'hématies -tests A1 à 10% en eau physiologique.

1 goutte d'hématies -tests B à 10 % en eau physiologique,

1 goutte d'hématies -tests O à 10% en eau physiologique.

Ajouter 1 goutte de sérum-test à tester.

Mélanger à l'aide d'un agitateur essuyé à l'aide d'un papier filtre jeté ensuite dans la poubelle des déchets contaminés.

Lire : donner l'intensité en croix : 4 +, 3 +, 2 +, 1 + ou nulle. Conclure

En déduire la nature des hématies tests à utiliser pour les tests suivants (avidité, intensité, titre et score) et les demander à l'examineur.

### 1.2.2. Mesure de l'avidité :

Sur la même plaque en carton, déposer 1 goutte d'hématies - tests choisies et 1 goutte de sérum- test à tester.

Mélanger rapidement à l'aide d'un agitateur pour former une surface de réaction circulaire de 3 cm de diamètre.

Déclencher alors le chronomètre.

Mesurer le temps d'apparition en secondes des agglutinats visibles à l'œil nu.

### 1.2.3. Mesure de l'intensité :

Elle est appréciée 3 minutes après la fin de l'étalement précédent en agitant la plaque pour homogénéiser le mélange. (Comparer à l'échelle de résultats fournie par le centre).

### 1.2.4. Mesure du titre et du score :

La gamme de dilutions du sérum-test se fait en eau physiologique sous un volume de 100  $\mu$ L dans 12 tubes à hémolyse à partir de la dilution au 1/2 du sérum. La raison est de 1/2. Rejeter 100  $\mu$ L du dernier tube.

Ajouter 100  $\mu$ L d'hématies - tests adéquates à 3% en eau physiologique, homogénéiser puis centrifuger pendant 1 minute à 2000 tours/min.

Après une légère agitation pour décoller le culot, lire à l'œil nu sur fond blanc.

Pour le calcul de la dilution finale, tenir compte du volume des hématies-tests.

- Déterminer le titre, dilution limite donnant une agglutination visible.
- Déterminer le score : pour cela évaluer la réaction d'agglutination dans chaque tube selon les conventions ci-dessous, puis additionner ces points pour obtenir le score final.

4+ ou 3 +	=	score 10
2+	=	score 8
+	=	score 5
(+)	=	score 2
0	=	score 0

(+) : réaction faiblement positive.

## 1.3. Compte rendu

Sérum – test : n° :

date de péremption :

références :

1. Spécificité du sérum- test , résultats :

2. Avidité :

3. Mesure du titre et du score :

- Mode opératoire ; tableau de travail et résultats.
- Titre :
- Score :

4. Tableau récapitulatif des résultats et des critères ; Conclusion.

# BIOCHIMIE (15 points)

On se propose de vérifier la concentration en protéines totales du sérum test. En effet, de l'albumine est rajoutée dans le milieu, de manière à éviter le « collage » lors des réactions antigène – anticorps. Ces sérums contiennent donc normalement entre 10 et 20 g.L<sup>-1</sup> de protéines totales.

Cette vérification se fera par dosage colorimétrique selon la méthode de Folin – Lowry.

## 2.1 Gamme d'étalonnage :

À partir de la solution étalon de sérum albumine bovine à 200 mg.L<sup>-1</sup>, préparer une gamme d'étalonnage en 6 cuves de 0 à 50 µg de protéine par cuve.

Compléter toutes les cuves à 0,5 mL avec de l'eau physiologique.

Ajouter 1 mL de solution alcaline de sulfate de cuivre. Agiter. Attendre 5 minutes.

Ajouter 0,1 mL de réactif de Folin prêt à l'emploi. Agiter.

Laisser les cuves 30 minutes à l'obscurité.

Lire les absorbances contre le blanc réactif à 700 nm.

## 2.2 Essais sur le sérum test :

Effectuer une prédilution du sérum-test en eau physiologique, de manière à pouvoir réaliser les essais dans des conditions satisfaisantes.

Réaliser deux cuves essais sur cette dilution du sérum-test.

## 2.3 Contrôle :

Réaliser la manipulation sur une solution de contrôle dont la concentration est de 100 mg.L<sup>-1</sup>.

## 2.4 Résultats :

- Remplir le tableau récapitulatif la composition de chaque cuve (annexe 1 à rendre) en explicitant les calculs.
- Tracer la courbe d'étalonnage A = fonction (quantité de protéines dans la cuve, exprimé en µg) ou réaliser la régression linéaire. Justifier le choix des points retenus.
- En déduire les quantités de protéines dans les cuves contrôles et essais en le justifiant.
- Calculer la concentration de la solution contrôle.
- La manipulation peut-elle être validée sachant que le CV admissible pour cette méthode est de 3 % :
  - pour le contrôle d'une part, (on considèrera le contrôle valide si l'écart relatif à la valeur attendue est inférieur à ±2 CV, soit  $\left| \frac{C_{\text{contrôle}} - C_{\text{valeur attendue}}}{C_{\text{valeur attendue}}} \right| < 2.CV$  )
  - pour les deux essais d'autre part (on considèrera les essais valides si l'écart relatif à la moyenne est inférieur à ±2 CV, soit  $\left| \frac{C_{\text{essai}} - C_m}{C_m} \right| < 2.CV$  ou  $\left| \frac{C_1 - C_2}{C_1 + C_2} \right| < 2.CV$ )
- Calculer la teneur en protéines du sérum-test, en g.L<sup>-1</sup>.
- Conclure.

# MICROBIOLOGIE (30 points)

De nombreux problèmes de contaminations ont été signalés dans le laboratoire de conditionnement des sérums . On se propose de réaliser la vérification du plan de nettoyage appliqué en procédant à l'étude de la contamination de certains points de contrôle.

## 3.1. Dénombrement de la flore aérobie mésophile (9 points)

La numération de la flore aérobie mésophile est effectuée selon la technique de comptage des colonies en double couche en gélose pour dénombrement (PCA), une gélose blanche étant utilisée pour la double couche.

### Préparation de la solution mère :

La solution mère à dénombrer correspond à une solution de 10 mL obtenue par écouvillonnage d'une surface de 25 cm<sup>2</sup>.

On obtient la solution mère de 10 mL présentée en tube à vis noté (L + numéro) conservée à + 4°C.

### Conduite du dénombrement :

Réaliser les dilutions 10<sup>-1</sup> et 10<sup>-2</sup>. La technique de dilution est à montrer à l'examineur.

Ensemencer, en double, le produit pur et les dilutions dans la masse du milieu.

Incuber les boîtes à 30°C pendant 24 h.

## 3.2. Identification d'une souche bactérienne. (15 points)

Une souche bactérienne a été isolée à partir de la solution albumineuse servant de diluant.

Cette souche est présentée en culture sur gélose inclinée (trypticase soja) incubée 24 heures à 30°C.

- 3.2.1. Procéder à l'observation microscopique de cette souche en réalisant une coloration de Gram.
- 3.2.2. Réaliser le ou les tests enzymatiques adéquats.
- 3.2.3. Proposer par écrit une orientation du germe à identifier (annexe 2 à rendre).
- 3.2.4. Ensemencer la galerie biochimique miniaturisée fournie, la gélose pour réisolement (GTS) et la gélose VF. Un étalon de Mac Farland est disponible. Indiquer sur tous les milieux la température d'incubation choisie.

## DOCUMENT À RENDRE ET À AGRAFER AVEC LA COPIE

## FEUILLE DE RÉSULTATS DE BIOCHIMIE

Gamme : explications sur sa préparation :

Sérum-test : Calcul de la prédilution et de la prise d'essai :

Contrôle : Calcul de la prise d'essai :

Tableau récapitulatif :

Tube	unités	0	1	2	3	4	5	Contrôle	Essai 1	Essai 2
Sol. étalon mère à	μL									
Sérum-test	μL									
Sol. Contrôle à	μL									
Eau physiologique	μL									
Solution alcaline de Cu <sup>2+</sup>	μL									
Homogénéiser ; attendre 5 minutes.										
Folin au 1/2	μL									
Homogénéiser ; attendre 30 minutes à l'obscurité ; lire à 700 nm.										
Quantité de protéines par cuve	μg									
Absorbance obtenue										

Courbe d'étalonnage ou régression linéaire



## ANNEXE 1 (suite)

### DOCUMENT À RENDRE ET À AGRAFER AVEC LA COPIE

Concentration du contrôle, en $\text{g.L}^{-1}$ :	
La manipulation est-elle validable ?	

Essais :

	Essai 1	Essai 2
Concentration du sérum, en $\text{g.L}^{-1}$ :		

Discussion sur ces résultats :

Concentration retenue du sérum, en $\text{g.L}^{-1}$ :	
-----------------------------------------------------------	--

Conclusion :

**DOCUMENT À RENDRE ET À AGRAFER AVEC LA COPIE**

**Microbiologie**

Numéro du poste :

Numéro de la souche :

Observation microscopique :

Résultat du ou des tests enzymatiques :

Orientation proposée :

# BTS QUALITÉ DANS LES INDUSTRIES ALIMENTAIRES ET LES BIO INDUSTRIES

Session 2002

## E5 – TECHNIQUES D'ANALYSE ET DE PRODUCTION U 52 – TECHNIQUES D'ANALYSES ET DE CONTRÔLES

Durée : 6 heures

Coefficient : 3

### SERUM – TEST

Deuxième jour : 1 H 30

### CONTRÔLES MICROBIOLOGIQUES

#### 1. Dénombrement de la flore aérobie mésophile à 30°C

Rappel : La solution mère à dénombrer, utilisée le premier jour, correspond à une solution de 10 mL obtenue par écouvillonnage d'une surface de 25 cm<sup>2</sup>.

Dénombrer la flore aérobie mésophile.

Présenter les résultats sous forme d'un tableau.

Calculer le nombre d'UFC (unités formant des colonies) par mL de solution mère.

Données: Formule de la norme AFNOR

$$N = \frac{\Sigma C}{V(n_1 + 0,1 n_2)d}$$

N = nombre d'UFC de microorganismes par mL.

$\Sigma C$  = somme des colonies comptées sur toutes les boîtes retenues.

$n_1$  = nombre de boîtes retenues à la 1<sup>ère</sup> dilution (la plus petite).

$n_2$  = nombre de boîtes retenues à la 2<sup>ème</sup> dilution (la plus grande).

d = taux de dilution de la première dilution.

V = volume d'inoculum en mL.

En déduire la quantité de microorganismes par cm<sup>2</sup>.

Discuter le résultat.

Données : les recommandations précisent, dans une enceinte de ce type classée en niveau 4, le seuil suivant : colonies par cm<sup>2</sup> : inférieur à 0,2.

#### 2. Identification de la souche bactérienne.

Lire la galerie biochimique ensemencée et incubée 24 heures à 30°C.

Procéder à l'identification du germe à l'aide des tableaux, du code API ou du logiciel.

#### 3. Identification d'une souche microbienne de l'environnement (6 points)

Une souche microbienne a été isolée à partir du système de climatisation du laboratoire.

Cette souche est présentée sur gélose Sabouraud additionnée de chloramphénicol en tube et a été incubée 4 jours à 25 °C.

3.1. Réaliser l'observation macroscopique.

3.2. Réaliser l'observation microscopique adéquate.

3.3. Proposer une identification à l'aide de la documentation fournie par le centre.