

**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

**MATIÈRE D'ŒUVRE**

**BIOCHIMIE**

Matériel:

Par personne

Par salle

Dosage de l'activité ASAT		
Semi microcuves UV + portoir	2	
Parafilm		
Pipette automatique P100 + 2 cônes jaunes	1	
Bain thermostaté à 30 °C avec portoir pour cuve		1
Spectrophotomètre thermostaté réglé sur 340 nm mode cinétique		1

Dosage des phosphates		
Macrocuves visible + portoir	8	
Parafilm		
Tube conique à centrifuger contenant 10 mL	1	
Fiole jaugée de 100 mL	1	
Pipette jaugée de 10 mL	1	
Becher contenant 100 mL	1	
Pissette eau distillée	1	
Compte goutte	1	
Centrifugeuse + plots + balance pour équilibrage		1
Spectrophotomètre réglé sur 700 nm		1
Feuille de papier millimétré	1	
Pipette automatique P1000 +3 cônes bleus	1	

Réactifs:	Par personne	Par salle
Sérum de veau fœtal : Eurobio 010062 en flacon 100 mL noté « SÉRUM »	5 mL	

Dosage de l'activité ASAT		
Coffret de dosage ASAT Biomérieux Enzyline ASAT/GOT (standardisé 50 (1 coffret pour 50 tests)		
Mélange réactionnel (R1 +R2)		1
Réactif déclenchant (R3)		1

Dosage phosphates du lait		
Solution KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> à 0,85 g/L	25 mL	
Solution Acide trichloroacétique (ATCA) à 200 g/L (DANGER)	10 mL	
Réactif sulfomolybdique (Briggs)	6 mL	
Solution Hydroquinone à 10 g/L	3 mL	
Solution sulfite de sodium à 200 g/L	3 mL	
Flacon de récupération Briggs		1

## TOXICOLOGIE

Matériel:	Par personne	Par salle
Microplaque à fond plat	1	
Pipette automatique P100 + 5 cônes jaunes	1	
Pot + glace	1	
Lecteur de microplaque réglé sur 405 nm		1
Chronomètre	1	
Feuille de papier millimétré	1	

Réactifs:	Par personne	Par salle
Sérum de veau fœtal (Eurobio) dilué au 1/2 en eau physiologique en tube à hémolyse noté "SVF" dans la glace. Ajuster la dilution pour avoir une absorbance comprise entre les cupules 8 et 9.	100 µL	
Tampon DEA pH 10 noté "diluant" en tube à hémolyse	600 µL	
Solution de PNPP à 0,185 g/L en tampon DEA en tube à hémolyse entouré de papier alu noté "LAL" dans la glace. Ajuster la concentration pour avoir une absorbance d'environ 1,5 pour la cupule 1.	700 µL	
Solution de soude à 5 mol/L en tube à hémolyse noté "stop"	1,5 mL	
Solution de PAL Roche calf intestine (108162 1 flacon 100 mg -> 10 mL) au 1/100 en eau phy ou en tampon DEA (plus stable) en tube à hémolyse noté "LPS" dans la glace	150 µL	

# MICROBIOLOGIE

## Contrôle de fertilité

Souches et mélanges		
Staphylococcus aureus en bouillon identifié « SA+ n° poste »	1	

Milieux et matériels		
Flacons de 15 mL de GTS en surfusion	2	
Pipettes graduées stériles de 2 mL ou P1000 + cônes bleus	2	

## Vérification de souche contrôle

Souches et mélanges		
Bacillus subtilis contaminé par Pseudomonas aeruginosa apigmenté, en Bouillon identifié «BS+n°poste»	1	

Milieux et matériels		
GTS en boîte	1	

## Recherche de bactériophage

Souches et mélanges		
1 mL d'E coli sensible au phage T2 en bouillon Mueller Hinton identifié « EC+ n° poste »	1	
2 mL d'une suspension en eau peptonée de phage T2 à 103 – 104 phage / mL en tube à hémolyse identifié« S PHAGE + n° poste » »	1	

Milieux et matériels		
Tubes de 9 mL exactement d'eau peptonée	3	
Géloses Mueller Hinton en boîte de Pétri	6	
Tubes contenant 5 mL de gélose Mueller Hinton molle (5g/L d'agar) en surfusion	6	
P 100 + cônes stériles	3	

## JOUR 2

Par personne

Par salle

Réactifs oxydase et catalase		
------------------------------	--	--

Prévoir de pouvoir donner des isollements réussis de Bacillus + Pseudommas

**BTS QUALITÉ DANS LES INDUSTRIES  
ALIMENTAIRES ET LES BIO-INDUSTRIES**

**Session 2002**

**E5 – TECHNIQUE D'ANALYSE ET DE PRODUCTION  
U 52 – TECHNIQUES D'ANALYSE ET DE CONTRÔLES**

**CONTRÔLE DE QUALITÉ D'UN SÉRUM DE VEAU FŒTAL**

**Durée : 6 heures**

**Coefficient : 3**

**Premier jour : 4 H 30**

Le sérum de veau fœtal est couramment utilisé comme complément aux milieux de cultures cellulaires. Il est très riche en diverses substances nutritives (glucose, acides gras libres...), en éléments minéraux (fer, calcium, potassium, phosphates, sodium...), en enzymes, hormones...

Il est donc nécessaire de procéder à de nombreux contrôles afin de déterminer la composition exacte du sérum en ces différentes substances.

D'autre part, l'utilisation de sérum de veau fœtal présente certains risques liés à la présence de virus, d'agents pathogènes non conventionnels, de bactéries, de LPS (endotoxines). La fiche suivante récapitule les différents critères utilisés :

**Fiche de contrôle qualité d'un sérum de veau fœtal**

**Analyse biochimique**

Phosphates	27,9 à 29,1 mmol/L
ASAT	47 à 51 UI/L (780 à 850 nkat/L)

**Analyse toxicologique**

LPS (Endotoxines)	< 10 UI/mL
-------------------	------------

**Analyse microbiologique**

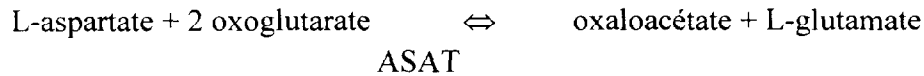
Stérilité	Stérile
Phages	Absence
Fertilité sur souches de référence	Culture

L'absence de ces éléments doit donc être vérifiée.

# Analyse biochimique de la composition d'un sérum de veau fœtal (26 pts)

## 1. Dosage de l'activité enzymatique Aspartate amino transférase (ASAT)

### 1.1. Principe



ASAT = aspartate oxaloacétate transférase

MDH = malate deshydrogénase

### 1.2. Mode opératoire

À partir du sérum de veau fœtal fourni noté « SÉRUM », réaliser le test suivant.

Longueur d'onde 340 nm.

Cuve de 1 cm de trajet optique.

Faire le zéro sur l'air ou sur de l'eau distillée.

Dans une cuve thermostatée à 30°C, introduire :

Introduire	Essai 1	Essai 2
Mélange réactionnel	1 mL	1 mL
Échantillon (Noté « SÉRUM »)	100 µL	100 µL
Mélanger, incuber 10 minutes à 30°C puis ajouter		
Réactif déclenchant	100 µL	100 µL
Mélanger, attendre 1 minute		
Mesurer la variation d'absorbance ( $\Delta A/\text{min}$ ) pendant 1 à 3 minutes		

### 1.3. Résultats

Déterminer la vitesse initiale de la réaction en  $\mu\text{mol/L}/\text{min}$  ou en  $\mu\text{mol/L}/\text{s}$ .

En déduire l'activité de l'échantillon en UI ou en katal et la concentration catalytique de l'ASAT en UI/L ou en katal/L.

Conclure sur la conformité du sérum.

Données :  $\epsilon_{\text{NADH } 340 \text{ nm}} = 630 \text{ m}^2 \cdot \text{mol}^{-1}$

CV = 4% (on considèrera les essais valides si l'écart relatif à la moyenne est

inférieur à  $\pm 2 \text{ CV}$ , soit  $\left| \frac{C_{\text{essai}} - C_m}{C_m} \right| < 2 \cdot \text{CV}$  ou  $\left| \frac{C_1 - C_2}{C_1 + C_2} \right| < 2 \cdot \text{CV}$ )

## 2. Dosage des phosphates

### 2.1. Principe

Après défécation du sérum, c'est-à-dire élimination des protéines, les phosphates sont dosés par la méthode de Briggs.

Les phosphates, sous forme  $\text{HPO}_4^{2-}$  et  $\text{H}_2\text{PO}_4^-$ , réagissent en milieu acide avec le molybdate d'ammonium pour donner le complexe phosphomolybdique. Ce dernier est réduit pour donner le complexe phosphomolybdeux-molybdique qui absorbe à 700 nm.

### 2.2. Défécation

Dans un tube à centrifuger conique, introduire :

Sérum de veau fœtal noté « SÉRUM »	0,5 mL
ATCA à 200 g/L	3,5 mL

(ATCA = acide trichloroacétique)

Boucher le tube, agiter puis laisser reposer 10 minutes.

Centrifuger 10 minutes à 5000 tr/min.

**Pratiquer rapidement la réaction de dosage.**

### 2.3. Préparation d'une solution étalon et d'une gamme d'étalonnage

À partir d'une solution mère de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  à  $6,5 \text{ mmol.L}^{-1}$ , préparer 100 mL d'une dilution au 1/10. Réaliser une gamme étalon de 6 cuves selon le tableau ci-dessous.

Cuve	0	1	2	3	4	5
Quantité de P en $\mu\text{mol}$						
Volume de solution fille en mL	0	0,2	0,4	0,6	0,8	1
Eau distillée en mL	1,5	1,3	1,1	0,9	0,7	0,5
Réactif sulfomolybdique en mL	0,5					
Hydroquinone en mL	0,25					
Sulfite de sodium en mL	0,25					

Laisser reposer 20 minutes à l'obscurité.

Lire l'absorbance à 700 nm.

### 2.4. Dosage

Réaliser 2 essais contenant 0,5 mL du surnageant de sérum noté « SÉRUM ».

Déterminer la quantité de phosphate en  $\mu\text{mol}$  par tube.

Déterminer la concentration molaire en phosphates du sérum.

Conclure sur la conformité du sérum.

Donnée : CV = 2%

(on considèrera les essais valides si l'écart relatif à la moyenne est inférieur à  $\pm 2 \text{ CV}$ , soit

$$\left| \frac{C_{\text{essai}} - C_m}{C_m} \right| < 2.CV \quad \text{ou} \quad \left| \frac{C_1 - C_2}{C_1 + C_2} \right| < 2.CV)$$

# Étude toxicologique d'un sérum de veau fœtal (12 pts)

## 1. Principe

La recherche des endotoxines (LPS) se fait par l'utilisation d'un réactif particulier, le LAL (*Limulus Amebocyte Lysate*). En présence d'endotoxines (LPS), les composants du LAL sont activés au cours d'une réaction protéolytique en cascade qui aboutit à la dissociation d'un substrat peptidique artificiel incolore. Cette dissociation libère de la p-nitroaniline (pNA) qui est de couleur jaune et absorbe à 405 nm.

## 2. Réalisation pratique

### Matériel et réactifs :

- 1 tube de solution étalon d'endotoxine (LPS) de concentration connue = 0,2 UI/ $\mu$ L = « LPS »
- 1 tube de solution de substrat = « LAL »
- 1 tube de diluant
- 1 tube de sérum à tester = « SVF »
- Microplaque à fond plat.

### Protocole :

On réalise une dilution en série d'un étalon d'endotoxine de la cupule 1 à 10 et l'on ajoute le LAL à chaque dilution.

La cupule 11 sera l'essai.

La cupule 12 sera un témoin.

N° cupule	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	Essai	T
Solution d'endotoxine étalon ( $\mu$ L)	50	50										
Diluant ( $\mu$ L)		50	50	50	50	50	50	50	50	50		
Redistribuer ( $\mu$ L)			50	50	50	50	50	50	50	50 (*)		
Quantité LPS (UI par cupule)												
Substrat ( $\mu$ L)	50	50	50	50	50	50	50	50	50	50	50	
Sérum à tester noté « SVF » ( $\mu$ L)											50	
Incuber 3 minutes exactement												
Soude = solution stop ( $\mu$ L)	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	

(\* rejeter 50  $\mu$ L)

Lire l'absorbance contre le témoin à 405 nm.

## Compte rendu

- Donner la composition et le rôle du témoin.
- Donner la quantité de LPS par cupule en UI.
- Tracer la droite  $A = f(\text{quantité LPS/cupule})$ .
- Donner la concentration en UI/mL du sérum de veau fœtal en LPS.
- Conclure sur la conformité du sérum.

Donnée : Limite de linéarité du lecteur de microplaque fournie par le centre.

## Aspects microbiologiques (22 pts)

Sur le plan microbiologique, les lots de sérum doivent être contrôlés par rapport aux paramètres suivants :

- la stérilité (absence de bactérie et de champignon microscopique),
- l'absence de mycoplasmes,
- l'absence de bactériophages,
- l'absence de plusieurs virus (virus de la diarrhée bovine (BDV), virus de la rhinotrachéite infectieuse bovine (RTIV) et virus Para influenza 3 (PIV3)).

Les examens réalisés porteront sur l'étude de la stérilité ainsi que la recherche des bactériophages.

### 1. Contrôle de fertilité

La présence du produit à contrôler peut masquer la présence de micro-organisme du fait de propriétés bactériostatiques. La fertilité du milieu de culture pour les micro-organismes de contrôle doit donc être vérifiée sur des milieux additionnés de sérum.

#### 1.1. Préparation des milieux

Dans le cas de la méthode de contrôle par ensemencement direct, le **rapport de dilution recommandé est de 1/10** entre le produit liquide à contrôler et le milieu de culture. On respectera ces proportions en utilisant un milieu gélosé.

En suivant ces recommandations, ajouter dans la masse un volume adéquat de sérum issu du flacon noté « SÉRUM » avec du milieu gélosé à l'hydrolysate de caséine et de soja (GTS) proposé en surfusion (volume 15 mL/flacon).

Couler ainsi deux milieux GTS additionnés de sérum en boîtes de Pétri. Laisser solidifier les géloses.

#### 1.2. Ensemencement des milieux

Le micro-organisme de contrôle utilisé dans cet essai est *Staphylococcus aureus* souche ATCC 6538 P. Il est présenté en bouillon identifié par le sigle « SA ». Réaliser un ensemencement sur chacune des deux géloses préparées précédemment avec cette souche par la technique d'isolement.

Incuber ces boîtes 24 h à 37°C.

#### 1.3. Vérification d'une autre souche de contrôle

On dispose d'une souche présentée en bouillon contenant un autre micro-organisme de contrôle qui est *Bacillus subtilis* souche ATCC 6633. Le bouillon est identifié par le sigle « BS ». On souhaite contrôler la pureté de cette souche pour vérifier qu'elle est utilisable pour le contrôle de fertilité des milieux de culture.

Réaliser Gram et état frais sur cette souche ainsi qu'un réisolement sur GTS en boîte. Incuber la boîte 24 h à 37°C.



## **2. Recherche des bactériophages**

### **2.1. Principe**

Cette recherche est réalisée par la technique des plages de lyse obtenue sur gélose présentant une culture homogène de *Escherichia coli* phage-sensible. La bactérie est présentée en bouillon identifié par le sigle « EC ».

### **2.2. Réalisation du test**

Réaliser des dilutions  $10^{-1}$ ,  $10^{-2}$ ,  $10^{-3}$  de la solution de sérum marquée « S PHAGE » dans des tubes de 9 mL d'eau peptonée. Chaque dilution sera testée en double.

Traiter chaque tube séparément de la manière suivante :

- introduire dans des tubes de gélose Mueller Hinton molle en surfusion à 45°C : 0,1 mL de «EC» et 0,1 mL des différentes dilutions de «S PHAGE».
- homogénéiser à l'agitateur mécanique (vortex) ;
- verser stérilement la totalité du tube au centre d'une boîte de Pétri contenant la gélose Mueller Hinton solidifiée ;
- répartir à la surface de la gélose ;
- laisser solidifier les boîtes et les placer à l'étuve 24 h à 37°C.

**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

**CONTRÔLE DE QUALITÉ D'UN SÉRUM DE VEAU FŒTAL**

**Deuxième jour : 1 heure 30 min**

Aspects microbiologiques :

Rappel : Aspect qualité microbiologique

**1. Contrôle de fertilité**

- stérilité	stérile
- phages	absence
- fertilité sur souches de référence	culture

*Lecture des milieux ensemencés*

Rechercher la présence de colonies sur les boîtes de GTS additionné de sérum.

Vérifier la nature des colonies observées par la coloration de gram et la recherche d'une enzyme.  
Conclure.

*Vérification de l'autre souche de contrôle*

Décrire les colonies présentes sur le milieu GTS.

Vérifier la nature des différentes colonies observées par des tests d'orientation rapides (gram et recherche d'enzymes). Conclure et proposer une orientation pour le contaminant.

**2. Recherche des bactériophages**

*Lecture des plages de lyse*

Le cas échéant, dénombrer les plages de lyse sur les milieux. Consigner les résultats dans un tableau.

À partir des résultats obtenus, exprimer le titre du sérum « S PHAGE » en nombre d'Unités Formant Plages (UFP) par mL de solution.

**3. Conclure sur la conformité du sérum.**