

Série STL Biochimie génie biologique

EPREUVE PRATIQUE

1. CONTROLE MICROBIOLOGIQUE DE PROBIOTIQUES

Les préparations de probiotiques sont utilisées préventivement comme additifs dans l'alimentation humaine et également comme traitement symptomatique d'appoint des diarrhées.

La valeur commerciale d'un tel produit de santé ne dépend pas seulement de la nature du probiotique utilisé, mais dépend également de sa concentration et de son activité métabolique.

Afin de garantir des produits sûrs et efficaces, différents contrôles sont mis en place dans les laboratoires, pour vérifier :

- les caractéristiques des souches sélectionnées,
- la qualité microbiologique en cours de production
- la conformité des produits finis.

1.1 Contrôle de l'identité d'une souche de *Lactobacillus acidophilus*

Au cours du contrôle qualité de la production d'un probiotique, une galerie d'identification de *Lactobacillus* a été ensemencée en vue de vérifier son phénotype.

MATIERE D'ŒUVRE

- Souche isolée de *Lactobacillus acidophilus* 1 sur milieu MRS incubé 48 heures à 30°C sous 5% de CO₂
- Galerie API 50 CHL (**annexe 1**) ensemencée avec la souche isolée et incubée 48 heures à 30°C
- Barquette avec lames, lamelles, papier filtre blanc, papier fin blanc, tubes à hémolyse
- Pipettes Pasteur
- Tubes eau physiologique 1 mL

- Tableau d'identification API 50CHL à disposition dans la salle
- Logiciel d'identification apiweb™ sur un ordinateur de la salle
- Fiche d'utilisation du logiciel apiweb™ à disposition dans la salle

MODE OPERATOIRE

- Vérifier la pureté de la souche.
- Contrôler sa morphologie par la réalisation d'un examen microscopique.
- ☞ **Présenter l'examen microscopique à un examinateur.**
- Réaliser la lecture de la galerie API 50 CHL à l'aide de l'**annexe 1**.

COMPTE-RENDU

- Donner les résultats du contrôle de pureté et de l'examen microscopique.
- Compléter la fiche de résultats de la galerie API 50CHL.
- Comparer le profil phénotypique obtenu au profil attendu pour cette souche à l'aide du tableau d'identification.
- En cas de discordance à plus de 85% d'au moins un caractère, vérifier l'identification de l'espèce en utilisant le logiciel apiweb™.

1.2 Suivi de la production industrielle d'une souche de *Saccharomyces boulardii*

La production industrielle d'un probiotique se fait généralement en cuve fermée, par fermentation discontinue. Le démarrage de la production nécessite un inoculum contenant au moins 80% de cellules vivantes.

La relation entre l'absorbance mesurée et la biomasse peut être établie pour le suivi de la croissance d'une culture de *Saccharomyces boulardii* par mesure de l'absorbance à 650 nm. La biomasse est ici évaluée par méthode directe de numération en cellule de comptage.

MATIERE D'ŒUVRE

- Suspension de *Saccharomyces boulardii* référencée « Sb Num » en bouillon de Sabouraud
- Tubes contenant 9 mL de bouillon Sabouraud
- Pipettes graduées stériles de 1 mL
- Système d'aspiration
- Lame de comptage Kova ® Slide à usage unique (**annexe 2**)
- Compteur de cellules
- Cuves de spectrophotomètre
- Parafilm
- Spectrophotomètre présent dans la salle
- Tube à hémolyse avec 1 mL de Bleu trypan à 0,4 %

PROTOCOLE

Réalisation d'une dilution de la suspension de *Saccharomyces boulardii*

- Effectuer une dilution au 1/10 de la suspension « Sb Num »
- Conserver la dilution dans de la glace pilée.

Mesure de l'absorbance à 650 nm

- Homogénéiser la dilution au 1/10 de la suspension « Sb Num » au vortex.
- Mesurer immédiatement l'absorbance à 650 nm.

Donnée : Limite de linéarité : 0,8

Numération directe en cellule de comptage Kova ® Slide (**annexe 2**).

- Effectuer une mise en cellule dans chaque cupule de comptage de la suspension diluée au 1/10.
- Réaliser la numération pour chaque cupule.

Donnée : $s_r = 0,5 \cdot 10^7 / \text{mL}$ de suspension « Sb Num »

Estimation du pourcentage de cellules vivantes après coloration au bleu trypan

- Mélanger dans un tube à hémolyse : 10 gouttes de suspension « Sb Num » et 5 gouttes de bleu trypan à 0,4%.
- Réaliser un état frais et observer au microscope à l'objectif x40.
- Estimer le pourcentage de cellules vivantes sur un champ microscopique en différenciant les cellules vivantes incolores et les cellules mortes colorées en bleu.

COMPTE-RENDU

- Déterminer à partir des deux comptages, le nombre de levures par mL de suspension de *Saccharomyces boulardii*.
- Etablir la relation entre la concentration cellulaire et 0,1 unité d'absorbance à 650 nm.
- Estimer le nombre de cellules vivantes pour 100 cellules comptées.
- Conclure quant à l'utilisation de l'inoculum.

1.3 Recherche de contaminants au cours de la production de *Saccharomyces boulardii*

Pour vérifier que la souche de production *Saccharomyces boulardii* n'est pas contaminée par une autre levure de production telle que *Saccharomyces cerevisiae* génétiquement voisine, une technique d'immunofluorescence directe est réalisée.

MATIERE D'ŒUVRE

- Suspension de *Saccharomyces boulardii* référencée « Sb IF »
- Flacon de tampon phosphate PBS pH 7,2
- Solution d'anticorps polyclonaux anti-*Saccharomyces boulardii* marqués à l'isothiocyanate de fluorescéine prête à l'emploi
- Solution de bleu Evans prête à l'emploi
- Boîte de Laveran
- Compte-gouttes à usage unique
- Lamelle de recouvrement
- Porte-lame
- Solution de montage « Fluoprep® »

MODE OPERATOIRE

- Réaliser un frottis avec l'échantillon de levure à analyser.
- Fixer 5 minutes à l'alcool à froid.
- Recouvrir avec la solution d'anticorps anti *Saccharomyces boulardii* marqués à l'isothiocyanate de fluorescéine.
- Incuber 30 minutes en atmosphère humide dans une boîte de Laveran contenant un fond d'eau distillée à l'obscurité.
- Rincer 3 fois avec une solution tampon phosphate PBS.
- Recouvrir par une solution de bleu Evans pendant 30 minutes.
- Rincer rapidement avec la solution tampon phosphate PBS.
- Sécher à l'air sur le porte-lame.
- Couvrir le frottis avec de 2 gouttes de « Fluoprep® » et poser une lamelle de montage.
- Observer au microscope à épifluorescence à l'objectif x40.

Données : Au microscope à fluorescence,

- o Les cellules colorées par le bleu Evans apparaissent rouges.
- o Les cellules marquées par l'isothiocyanate de fluorescéine apparaissent vertes.

☞ **Présenter l'examen microscopique à un examinateur.**

COMPTE-RENDU

- Décrire les observations microscopiques réalisées.
- Conclure quant à la pureté de la levure de production.

1.4 Recherche et dénombrement de bactériophages au cours de la production de *Lactobacillus casei*

Au cours de leur fabrication, les souches bactériennes de probiotiques peuvent être contaminées par des bactériophages qui sont susceptibles d'altérer la qualité ou d'anéantir la production.

La recherche de bactériophages est réalisée sur un prélèvement en cours de production de la souche de *Lactobacillus casei*. Ce prélèvement a été centrifugé et les phages sont recherchés dans le surnageant.

MATIERE D'ŒUVRE

- 5 boîtes de Pétri contenant une couche de gélose molle GM précoulée (7,5 g/L d'agar-agar)

- 5 tubes de 6 mL de gélose molle GM en surfusion à 55°C
- 1 tube à hémolyse contenant 2 mL d'une souche sensible aux phages noté « souche sensible »
- 1 tube à hémolyse contenant 2 mL de surnageant du prélèvement de *Lactobacillus casei* noté « surnageant Lc »
- 1 tube à hémolyse contenant 2 mL de diluant noté « D »
- 1 microplaque stérile
- Pipettes automatiques sur un portoir
- Cônes stériles

PROTOCOLE

Dilutions en microplaques

- Réaliser en microplaque quatre dilutions successives au 1/10 du « surnageant Lc ». Le volume restant dans chaque cupule après dilution sera de 180 µL.
- **MODE OPERATOIRE**

Ensemencement des géloses pour dénombrement

- Pour chaque dilution du « surnageant Lc », ensemercer une boîte de Pétri contenant une couche de gélose molle GM précoulée en procédant de la façon suivante :
 - o Ajouter dans un tube contenant 6 mL de gélose molle en surfusion notée GM :
 - 60 µL de dilution du « surnageant Lc »
 - 60 µL de culture de la souche sensible au phage notée « souche sensible »
 - o Homogénéiser.
 - o Verser rapidement le contenu du tube dans une boîte de Pétri contenant une couche de gélose molle GM pré-coulée.
 - o Laisser solidifier.
 - o Incuber 24 heures à température optimale.
- Réaliser un témoin « souche sensible ».
- Incuber 24 heures à température optimale.
- A partir des boîtes fournies, préalablement ensemencées et incubées 24 heures à température optimale :
 - Dénombrer les plages de lyse sur les boîtes contenant entre 15 et 200 plages de lyse.

COMPTE-RENDU

- Présenter le tableau de dilution.
- Présenter l'ensemble des résultats du dénombrement sous forme d'un tableau.
- Donner le nombre de bactériophages par mL de surnageant de culture de *Lactobacillus casei*. On considère qu'une plage de lyse correspond à un bactériophage.
- Conclure quant à la qualité de la production.

2. SUIVI D'UN PATIENT ATTEINT DE DIABETE DE TYPE 2

Une alimentation trop riche en glucides et en lipides peut entraîner, à long terme, un diabète de type 2. Rééquilibrer ou modifier la composition de la flore intestinale par l'utilisation de probiotiques pourrait constituer un complément thérapeutique susceptible de limiter le développement de la pathologie. Dans le cadre du suivi d'un patient atteint de diabète de type 2, un bilan lipidique est réalisé une fois par an.

L'**annexe 3** présente les résultats d'un bilan réalisé en février 2010 chez un jeune patient atteint d'un diabète de type 2 dont l'enquête alimentaire avait révélé une alimentation quotidienne trop riche en lipides. Au vu des résultats, le médecin lui avait conseillé un régime adapté et lui avait prescrit un bilan de contrôle à faire au mois de mai 2010.

Les résultats partiels de ce bilan sont présentés dans l'**annexe 3** et seront complétés par le dosage d'autres métabolites :

- triglycérides (TG)
- cholestérol total (CT), cholestérol HDL (C-HDL), cholestérol LDL (C-LDL).

2.1. Dosage enzymatique des triglycérides sériques

La méthode de dosage des triglycérides « TG » est présentée dans la fiche technique figurant à l'**annexe 4**.

MATIERE D'ŒUVRE

- Sérum du patient noté « Sé-P »
- Sérum contrôle noté « Sé-Ctrl »
- Solution étalon (réactif R1)
- Solution de travail (réactif R3 repris par R2)

MODE OPERATOIRE

Effectuer le dosage des triglycérides dans les échantillons suivants :

- sérum du patient,
- sérum contrôle.

☞ *Le « ticket » donnant les absorbances lues au spectrophotomètre sera signé par l'examineur et joint à la copie.*

COMPTE RENDU

- Se reporter à l'**annexe 5**.

2.2. Dosage enzymatique du cholestérol sérique

Le cholestérol sérique fait partie de la structure des lipoprotéines : chylomicrons, HDL (high density lipoprotein), LDL (low density lipoprotein), VLDL (very low density lipoprotein). Il est présent sous forme estérifiée ou non estérifiée.

Le principe du dosage du cholestérol et de ses différentes formes est présenté dans l'**annexe 6**.

- Le cholestérol total est dosé directement dans le sérum du patient.
- Le cholestérol-HDL est dosé sur le surnageant après précipitation des VLDL et des LDL.
- Le cholestérol-VLDL est calculé selon la formule en **annexe 6**.
- Le cholestérol-LDL est calculé à partir de la formule de Friedewald donnée en **annexe 6**, ou déterminé à partir du lipoprotéinogramme.

MATIERE D'ŒUVRE

- Sérum du patient noté « Sé-P »
- Surnageant obtenu après précipitation du sérum du patient noté « Surnageant »
- Sérum contrôle noté « Sé-Ctrl »
- Solution de travail notée «Cholestérol RTU »
- Solution étalon notée « Etalon chol »

PROTOCOLE

• Précipitation des VLDL et des LDL (étape déjà réalisée)

☞ *Le surnageant fourni a été obtenu après précipitation selon le protocole qui figure ci-dessous .:*

Dans un tube à centrifuger, introduire :	sérum	500 µL
	réactif précipitant	50 µL

Mélanger. Attendre 10 min. Centrifuger 15 min à 5000 t/min.

• Dosage du cholestérol

- Introduire dans une cuve de spectrophotomètre :
 - 10 µL d'échantillon (Sé-P, Surnageant, Sé-Ctrl, Etalon chol)
 - 1 mL de solution de travail.
- Mélanger.
- Incuber 10 minutes à 20-25°C.
- Mesurer l'absorbance à 500 nm.

☞ *Le « ticket » donnant les absorbances lues au spectrophotomètre sera signé par l'examineur et joint à la copie.*

Données :

Stabilité de la coloration = 1 heure à 20-25°C

Limite de linéarité = 18 mmol/L

COMPTE RENDU

- Se reporter à l'**annexe 7**.

2.3. Lipoprotéinogramme

Pour caractériser une hyperlipidémie éventuelle et déterminer son type (**annexe 9**), l'endocrinologue prescrit un lipoprotéinogramme permettant d'affiner la détermination du taux de cholestérol-LDL.

ORGANISATION

☞ *Se rendre au poste d'électrophorèse, selon l'ordre de passage défini au préalable, afin de réaliser une des étapes de l'électrophorèse.*

MATIERE D'ŒUVRE

☞ *L'ensemble du matériel et des réactifs nécessaires se trouve au poste d'électrophorèse.*

- Sérum du patient noté « Sé-P »
- Sérum contrôle Sébia noté « Ctrl-electro »
- Gel d'agarose « Hydragel lipo K20 » de SEBIA

- Tampon de migration « Hydragel Lipo » SEBIA
- Colorant Noir Soudan SEBIA
- Solution de lavage SEBIA

- Générateur et cuves de migration
- Applicateur et porte-applicateur K20
- Incubateur-sécheur
- Accessoires et bacs pour coloration
- Densitomètre

MODE OPERATOIRE

- Réaliser en présence d'un examinateur une des étapes de l'électrophorèse en opérant comme l'indique la fiche technique « HYDRAGEL – LIPO » de SEBIA de l'**annexe 8** sur :
 - o le sérum du patient
 - o le sérum contrôle
- Effectuer la lecture au densitomètre en présence de l'évaluateur.

COMPTE RENDU

- Rapport d'analyses
 - o Interpréter le lipoprotéinogramme obtenu pour le sérum contrôle.
 - o Exploiter les résultats du lipoprotéinogramme du patient à l'aide de l'**annexe 9**.
- Conclure sur le type d'hyperlipidémie du patient.
- Compte tenu des facteurs de risque du patient et des objectifs thérapeutiques présentés en **annexe 3**, indiquer si le bilan du patient correspond aux objectifs thérapeutiques.

Galerie api® 50 CHL

Extrait de la fiche technique api® 50 CHL de BioMérieux®

La galerie est destinée à l'identification du genre *Lactobacillus* et bactéries apparentés.

PRINCIPE

Le milieu "API 50 CHL Medium" permet l'étude de la fermentation des 49 sucres de la galerie API 50 CH. Le microorganisme à tester est mis en suspension dans le milieu "API 50 CHL Medium" puis inoculé dans chaque tube de la galerie. Pendant l'incubation, le catabolisme des glucides produit des acides organiques qui provoquent le virage de l'indicateur de pH. Les résultats obtenus constituent le profil biochimique permettant l'identification du microorganisme à l'aide du logiciel d'identification.

REACTIFS

- Galerie API 50 CH
- Ampoule API 50 CHL Medium

COMPOSITION DU MILIEU

API 50 CHL Medium 10 ml	Polypeptone	10 g
	(origine bovine/porcine)	
	Extrait de levure	5 g
	Tween 80	1 ml
	Phosphate dipotassique	2 g
	Acétate de sodium	5 g
	Citrate diammonique	2 g
	Sulfate de magnésium	0,20 g
	Sulfate de manganèse	0,05 g
	Bromocrésol Pourpre	0,17 g
	Eau déminéralisée	1000 ml
pH : 6,7-7,1		

MODE OPERATOIRE

Sélection des colonies

- Vérifier la pureté de la souche
- Cultiver la souche sur milieu MRS gélosé 24 H à 30°C ou 37°C en anaérobiose
- Vérifier son appartenance aux bactéries lactiques : bacilles Gram +, catalase -, non sporulés, anaérobies (stricts ou facultatifs), cultivant sur milieu MRS

Préparation de l'inoculum et inoculation de la galerie : voir annexe 1 – page 2

LECTURE ET INTERPRETATION

Lecture de la galerie

On recherche dans chaque tube l'acidification produite qui se traduit par un virage au jaune du pourpre de bromocrésol contenu dans le milieu.

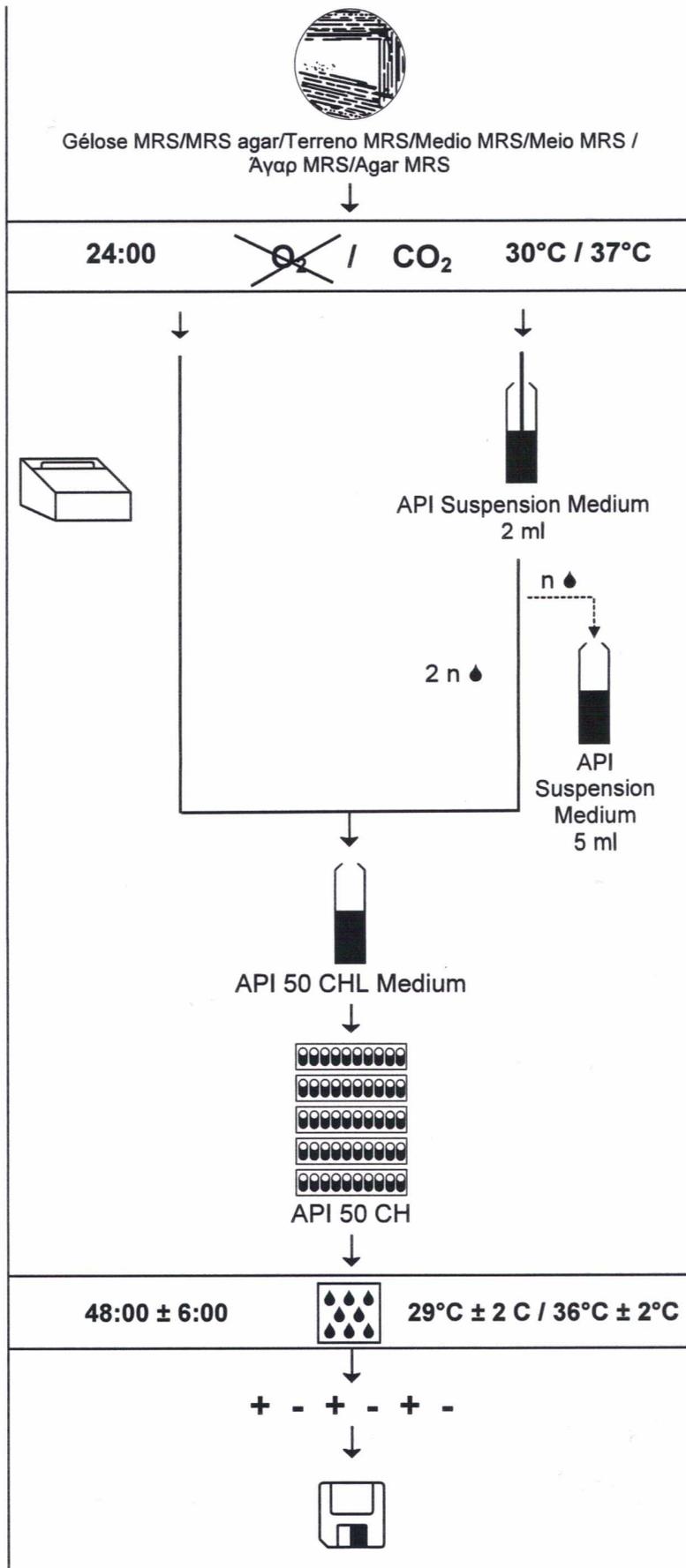
Pour le test esculine (tube N°25), on observe un changement de couleur du pourpre au noir.

Une feuille de résultats des tests est fournie.

Interprétation

Le profil biochimique ainsi obtenu permet d'identifier la souche à l'aide du tableau d'identification et/ou du logiciel d'identification *apiweb*TM.

METHODOLOGIE / PROCEDURE / METHODIK / TECNICA / PROCEDIMENTO /
ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ / METOD / METODYKA

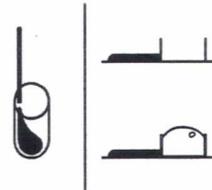


Lactobacillus

toutes les bactéries
all the bacteria
die gesamte Kultur
todas las bacterias
tutti i batteri
todas a bactérias
όλα τα βακτήρια
samtliga bakterier
alle bakterier
wszystkie bakterie

2 McF

2 McF



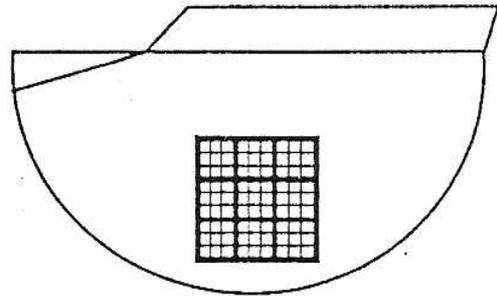
Lame à usage unique pour la numération cellulaire.

Extrait de la fiche technique Kova®Slide (Boehringer)

1. Caractéristiques

Chaque lame comporte 10 cupules individuelles à grille quadrillée.
 Le volume de suspension retenu sur la grille est de 1 μL (1 mm^3)
 La grille comporte 9 cases, chacune d'entre elles étant subdivisée en 9 petits carrés.

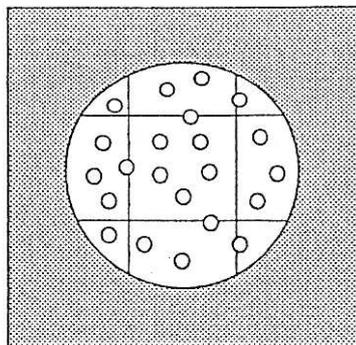
2. Schéma d'une cupule



3. Mode opératoire

- Introduire la suspension cellulaire dans une cupule à l'aide d'une pipette Pasteur.
- Laisser sédimenter 5 minutes puis observer au microscope.
- Ne compter que les cellules situées à l'intérieur des carrés.

Exemple : Dans l'exemple figuré ci-dessous on compte 5 cellules dans le carré central ; les cellules à cheval sur les traits de la grille ne sont pas prises en compte.



A la suite du bourgeonnement, les cellules peuvent rester accolées. Si elles ont la même taille, elles sont considérées comme deux entités.

4. Règles de comptage des cellules

- Pour les suspensions cellulaires peu abondantes en cellules, compter le nombre total N de cellules situées sur toute la grille et correspondant à 1 μL
- Pour les suspensions cellulaires moyennement denses, compter le nombre n de cellules situées dans une case de 9 petits carrés. On obtient le nombre total N de cellules par μL en multipliant par 10 :

$$N = n \times 10$$

- Pour les suspensions cellulaires denses, compter le nombre n de cellules situées à l'intérieur d'un petit carré. On obtient le nombre total N de cellules par μL en multipliant par 100 :

$$N = n \times 100$$

Dosage des triglycérides par méthode enzymatique en point final

Extrait de la fiche technique « Triglycérides Enzymatique PAP 150 » bioMérieux®

INTRODUCTION ET OBJET DU TEST (1, 2, 3, 4)

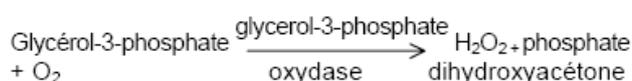
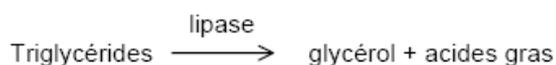
Les triglycérides sont des lipides, esters de glycérol et d'acides gras, liés aux protéines sous forme de lipoprotéines. Ils entrent principalement dans la composition des chylomicrons sécrétés par les entérocytes et des lipoprotéines de basse densité synthétisées par le foie (VLDL).

Des concentrations en triglycérides élevés sont associés à différentes pathologies (maladies cardiovasculaires, perturbation des paramètres de l'hémostase, diabète, hyperlipidémies alcooliques dépendantes, syndrome néphrotique, hypertriglycéridémies de type I et IV...). Des concentrations faibles peuvent être rencontrés lors d'atteinte hépatique ou de malnutrition.

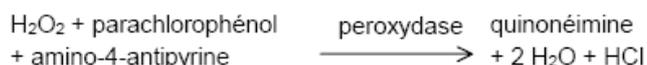
Le dosage des triglycérides est utilisé pour dépister ces pathologies et faire le diagnostic et le suivi du traitement.

PRINCIPE

Les triglycérides sont dosés en utilisant la séquence lipase – glycérokinase – glycérol-3-phosphate oxydase – peroxydase - chromogène (5) :



L'eau oxygénée formée est dosée selon une réaction de type TRINDER (6).



L'intensité de la coloration (quinonéimine) mesurée est proportionnelle à la quantité de triglycérides présente dans l'échantillon.

Code SFBC : KB

PRESENTATION ET COMPOSITION DU COFFRET (150 tests)

Réactif 1 Etalon 1 x 8 ml (liquide)	R1	Glycérol	2,29 mmol/l ou 2 g/l de triglycérides (PM moyen des triglycérides = 875)
Réactif 2 Tampon 2 x 90 ml (liquide)	R2	Tampon Tris pH 7,6* Parachlorophénol Magnésium	100 mmol/l 2,7 mmol/l 4 mmol/l
Réactif 3 (repris par R2) Enzymes 6 x 25 ml (lyophilisé)	R3	Tampon base protéique (origine bovine) Amino-4-antipyrine Lipase Glycérokinase Glycérol 3 phosphate oxydase Peroxydase ATP	0,4 mmol/l ≥ 1000 U/l ≥ 200 U/l ≥ 2000 U/l ≥ 200 U/l 0,8 mmol/l
1 notice			

* Ce réactif contient 1% de Tris. Une fiche de données de sécurité est disponible sur demande.

MODE OPERATOIRE MANUEL

Préparation du réactif

Reprendre le contenu d'un flacon de Réactif 3 par 25 ml de Réactif 2 (agitation douce).

Stabilité dans le flacon d'origine

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

Réalisation du test

Longueur d'onde : _____ 505 nm (492 à 550 nm)

Zéro de l'appareil : _____ blanc réactif

	Blanc réactif	Etalon	Dosage
Etalon	-	10 µl	-
Echantillon	-	-	10 µl
Réactif 3 repris	1 ml	1 ml	1 ml

Mélanger.
 Photométrer après une incubation de :
 • 5 minutes à 37°C,
 • 10 minutes à 20-25°C.

Stabilité de la coloration : _____ 30 minutes à 20-25°C.

Stabilité de la calibration : Effectuer une calibration et un contrôle à chaque série de dosages.

VALEURS ATTENDUES (4, 8)

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.

	mmol/l	g/l	mg/dl
Adulte			
• Homme	0,50 à 2,10	0,44 à 1,84	43,8 à 183,8
• Femme	0,40 à 1,50	0,35 à 1,31	35,0 à 131,3
Adolescent de 14 à 19 ans			
• garçon	0,40 à 1,80	0,35 à 1,58	35,0 à 157,5
• fille	0,45 à 1,45	0,39 à 1,27	39,4 à 126,9
Enfant de 10 à 14 ans			
• garçon	0,35 à 1,50	0,31 à 1,31	30,6 à 131,3
• fille	0,40 à 1,55	0,35 à 1,36	35,0 à 135,6
Enfant de 4 à 9 ans			
• garçon	0,35 à 1,20	0,31 à 1,05	30,6 à 105,0
• fille	0,40 à 1,25	0,35 à 1,09	35,0 à 109,4
Enfant de 0 à 4 ans			
• garçon	0,35 à 1,10	0,31 à 0,96	30,6 à 96,3
• fille	0,35 à 1,20	0,31 à 1,05	30,6 à 105,0

ANNEXE 5

A compléter et à rendre avec la copie

NOM :

Prénom :

Réf :

Feuille de résultats du dosage des triglycérides par méthode enzymatique en point final

1. Compléter le tableau suivant :

	Blanc	Étalon	Contrôle	Patient
Volume de solution étalon				
Volume de sérum contrôle				
Volume de sérum du patient				
Volume de réactif 3 repris				
Mélanger, incuber 10 minutes à 20-25°C				
Absorbance à				

2. Calculer la concentration en triglycérides du sérum contrôle et interpréter le résultat.

Données :

Valeur cible = 1,49 mmol/L, limites de confiance = 1,31 à 1,67 mmol/L.

3. Calculer la concentration en triglycérides du sérum du patient. Interpréter.

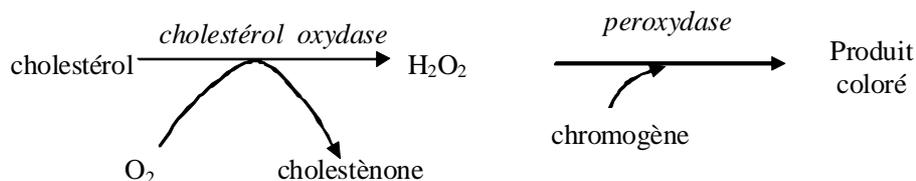
Dosage du cholestérol par méthode enzymatique en point final

Extrait de la fiche technique bioMérieux® « Cholestérol RTU »

PRINCIPE

- Le dosage du cholestérol total « **CT** » nécessite :
 - l'utilisation d'un agent tensioactif pour libérer le cholestérol des lipoprotéines,
 - l'utilisation d'une cholestérol estérase pour hydrolyser le cholestérol estérifié et libérer le cholestérol.

Le cholestérol est dosé grâce à la séquence de réactions enzymatiques suivante :



- Le dosage du cholestérol présent dans les HDL « **C-HDL** » est réalisé selon le même principe après précipitation des LDL et des VLDL.
- La concentration en cholestérol présent dans les VLDL « **C-VLDL** » est déterminée par calcul :

$$\text{C-VLDL} = \text{TG}(\text{mmol/L}) / 2,2$$
- La concentration en cholestérol présent dans les LDL « **C-LDL** » est déterminée par calcul :

Formule de Friedewald

$$\text{C-LDL} = [\text{CT dosé}] - [\text{C-HDL dosé}] - [\text{C-VLDL calculé}]$$



Attention :

Si la concentration en TG est > à 3,9 mmol/L la formule de Friedewald n'est pas valable, le calcul est impossible. Le lipoprotéinogramme est alors indispensable pour caractériser l'hyperlipidémie.

RÉACTIFS UTILISÉS

- Solution de travail cholestérol :	Tampon MOPS pH 7	20 mmol/L
	Phénol	15 mmol/L
	Cholate de sodium	3,7 mmol/L
	Chlorure de magnésium	20 mmol/L
	Agent tensioactif	≥ 0,1%
	Amino-4-antipyrine	0,5 mmol/L
	Peroxydase	≥ 1000 UI/L
	Cholestérol oxydase	≥ 200 UI/L
	Cholestérol estérase	≥ 125 UI/L
	- Réactif précipitant cholestérol	Acide phosphotungstique
Chlorure de magnésium hexahydraté		100 g/L
- Solution étalon	pH 6,2	
	Cholestérol	5,17 mmol/L

ANNEXE 7

A compléter et à rendre avec la copie

NOM :

Prénom :

Réf :

Feuille de résultats du dosage du cholestérol par méthode enzymatique en point final

1. Compléter le tableau suivant :

	Blanc	Étalon	Contrôle	Patient CT	Patient C-HDL
Volume de solution étalon					
Volume de sérum contrôle					
Volume de sérum du patient					
Volume de surnageant					
Solution de travail					
Mélanger, incuber 10 minutes à 20-25°C					
Absorbance à					

2. Calculer la concentration en cholestérol du sérum contrôle et interpréter le résultat.

Données :

Valeur cible = 3,89 mmol/L, limites de confiance = 3,59 à 4,19 mmol/L.

3. Déterminer les concentrations sériques pour les paramètres suivants : CT, C-HDL, C-LDL, à l'aide de l'annexe 6.

Electrophorèse des lipoprotéines

Extraits de la fiche technique SEBIA

TECHNIQUE

I. MIGRATION

1. Poser le porte-applicateur HYDRAGEL K20 à plat sur la pailleasse (Fig. 1) et relever le chariot porte-applicateur.
2. Déposer 120 µL d'eau distillée ou déminéralisée sur le plateau du porte-applicateur dans le tiers inférieur du cadre sérigraphié.
3. Sortir le gel de son emballage.
4. Éliminer rapidement l'excès de liquide en surface, en effleurant le gel avec un papier-filtre fin.

ATTENTION : Ne surtout pas laisser le papier-filtre en contact prolongé avec le gel pour éviter sa déshydratation.

5. Placer le gel (face orientée vers le haut) sur le plateau du porte-applicateur contre la barrette, à l'intérieur du cadre sérigraphié (Fig. 2).
6. Donner une forme concave au gel (Fig. 2) et le dérouler sur le plateau jusqu'au contact de la goutte d'eau qui doit se répartir sur toute la largeur du gel. Relever légèrement le gel pour éliminer les bulles d'air éventuellement piégées, puis dérouler totalement le gel au contact du plateau. La goutte d'eau doit s'étaler sous toute la surface du film.
7. Abaisser le chariot porte-applicateur jusqu'en position intermédiaire, la manette située sur le côté du porte-applicateur en position haute.
8. Poser un applicateur à plat sur la pailleasse, numérotations (puits) vers le haut (Fig. 3).
9. Déposer 10 µL de sérum pur dans chaque puits. Le chargement de l'applicateur ne doit pas excéder 2 minutes.
 - L'applicateur doit être utilisé immédiatement après le chargement.
 - Pour un dépôt différé (8 heures maximum), placer l'applicateur dans la chambre humide dents vers le haut (en manipulant l'applicateur par la protection en plastique), placer la chambre humide au réfrigérateur et ne placer le gel sur le porte-applicateur HYDRAGEL K20 qu'au moment de l'utilisation.

Voir la notice de la chambre humide pour les instructions d'utilisation.

10. Éliminer la protection des dents de l'applicateur.
11. Placer l'applicateur en position n° 4 sur le porte-applicateur.

IMPORTANT : Les numérotations de l'applicateur sont toujours dirigées vers l'opérateur (Fig. 4).
12. Abaisser le chariot porte-applicateur jusqu'en butée, à l'aide de la manette du porte-applicateur pour amener l'applicateur au contact du gel.
NE PAS FORCER LA DESCENTE DU CHARIOT.

13. Après 7 minutes 30 secondes d'application, tourner la manette du porte-applicateur pour relever l'applicateur et le jeter.
14. Placer le gel dans la cuve d'électrophorèse, selon la polarité indiquée sur le gel, bas du gel côté cathodique.

ERROR: ioerror
OFFENDING COMMAND: image

STACK: