Suivi en unité de soins intensifs d'un patient mordu par *Bothrops moojeni*.

Un patient mordu par un crotale *Bothrops moojeni* a été admis au service des urgences. Il s'agit d'un cas d'envenimation sévère; le patient présente une plaie à l'avant bras et un œdème touchant l'ensemble du membre.

1 ANALYSES MICROBIOLOGIQUES

Une antibiothérapie préventive associant deux antibiotiques, amoxicilline et acide clavulanique, a été entreprise lors de l'admission du patient. Malgré ce traitement, deux jours après son admission, le sujet présente une infection de la plaie. Un prélèvement du pus de la plaie a été réalisé.

1.1 EXAMEN BACTÉRIOLOGIQUE DU PUS

1.1.1 IDENTIFICATION DE LA SOUCHE ISOLÉE DU PUS

La souche isolée du pus est présentée sur gélose trypticase soja GTS après 24 heures d'incubation à 37°C.

- Réaliser les examens microscopiques.
- Effectuer un test biochimique rapide d'orientation de l'identification.

☛ ***Présenter les examens microscopiques et le test d'orientation à un examinateur***.

- Indiquer sur le compte-rendu une orientation du diagnostic bactériologique.

☛ ***Présenter cette orientation à un examinateur.***

- Ensemencer la galerie d'identification distribuée (protocole à disposition dans la salle).
- Incuber 4 heures à 37°C.
- Effectuer la lecture de la galerie.
- Identifier la souche à l'aide du tableau de la fiche technique et conclure.

☛ ***Présenter la fiche de lecture de la galerie complétée à un examinateur.***

MATIÈRE D'ŒUVRE :

- GTS ensemencée avec la souche à identifier
- barquette avec lames, lamelles, papier filtre blanc, papier fin blanc, tubes à hémolyse, pince, poire d'aspiration, allumettes, marqueur
- 2 tubes d'eau physiologique (1 mL)
- 2 tubes d'eau distillée (1 mL)
- 1 flacon de disques d'oxydase
- 1 flacon de peroxyde d'hydrogène (H_2O_2)

1.1.2 ANTIBIOGRAMME DE LA SOUCHE ISOLÉE

Un antibiogramme « ATB G - » a été réalisé sur la souche isolée et incubé 24 heures 37°C. La fiche technique de l'antibiogramme ATB G- est donnée en **annexe 1**.

- Réaliser la lecture de l'antibiogramme ATB G- distribué.
- Interpréter les résultats de l'antibiogramme (R/I/S).

➲ ***Les résultats et leur interprétation sont à indiqués sur la fiche de lecture présentée en annexe 1 – page 4, à rendre avec la copie.***

1.2 RECHERCHE D'UN PORTAGE À *STAPHYLOCOCCUS AUREUS* RÉSISTANT À LA MÉTICILLINE (SARM)

Les SARM sont des souches de *Staphylococcus aureus* multirésistantes, responsables d'échecs thérapeutiques. Ces souches à l'origine d'infections nosocomiales sont particulièrement redoutées en milieu hospitalier. Leur recherche est réalisée à l'admission du patient puis répétée régulièrement durant son séjour afin de mettre en évidence un

éventuel portage. Le prélèvement s'effectue à l'aide d'un écouvillon stérile au niveau de différentes zones de l'organisme.
L'un de ces prélèvements a été réalisé au niveau du nez (zone fréquente de portage) et isolé sur une gélose METISTAPH 2®. Le milieu a été incubé 24 heures à 37°C.
Un extrait de la fiche technique de la gélose METISTAPH 2® est donné en **annexe 2.**

- Réaliser la lecture du milieu METISTAPH 2® fourni.
- Interpréter les résultats.
- Conclure.

1.3 MESURES POUR LIMITER LA PROPAGATION DE SARM EN MILIEU HOSPITALIER

Il a été montré que 80 % de la transmission de *Staphylococcus aureus,* en particulier celle des SARM, se fait par l'intermédiaire de surfaces contaminées (poignées de porte, chasse d'eau, tables roulantes, les robinets …). Afin de limiter la propagation de souches multi résistantes, il est donc nécessaire d'utiliser une solution désinfectante efficace contre les SARM au cours des opérations de nettoyage en milieu hospitalier.
L'efficacité d'une solution désinfectante proposée est testée dans l'unité de soins intensifs. Des prélèvements de surface sont réalisés avant et après utilisation cette solution.

1.3.1 RECHERCHE ET DÉNOMBREMENT DE STAPHYLOCOCCUS AUREUS AVANT UTILISATION DE LA SOLUTION DÉSINFECTANTE

MATIÈRE D'ŒUVRE :

- Tube de « suspension d'écouvillonnage »
- 1 tube d'eau peptonée tamponnée contenant 9 mL
- 3 pipettes graduées stériles de 1 mL
- système d'aspiration
- billes stériles dans un tube à hémolyse
- 2 pipettes « râteau »
- 2 géloses Chapman
- pot avec eau de Javel pour récupération des billes après usage.

PROTOCOLE

Les micro-organismes présents sur 100 cm^2 de la surface à contrôler ont été prélevés par écouvillonnage. Après prélèvement, l'écouvillon est plongé dans un tube contenant 5 mL d'eau peptonée tamponnée noté « suspension d'écouvillonnage ».

- Effectuer une dilution au 1/10 de la suspension d'écouvillonnage.
- Ensemencer en surface une gélose Chapman avec 0,1 mL de la suspension d'écouvillonnage
- Ensemencer en surface une gélose Chapman avec 0,1 mL de la dilution au 1/10.
- Incuber 24 heures à 37°C.

☛ ***Présenter la réalisation de la dilution et un ensemencement en surface à un examinateur.***

RÉSULTAT

La lecture est effectuée sur des milieux préalablement ensemencés et incubés 24 heures à 37°C selon le protocole décrit ci-dessus. La composition du milieu de Chapman est donnée en **annexe 3**.

- Réaliser la lecture des milieux fournis.
- Déterminer le nombre d'UFC pour une surface de 100 cm^2.

1.3.2 RECHERCHE ET DÉNOMBREMENT DE STAPHYLOCOCCUS AUREUS APRÈS UTILISATION DE LA SOLUTION DÉSINFECTANTE

Les résultats obtenus selon la technique de recherche décrite en 1.3.1 appliquée sur la même surface après application de la solution désinfectante sont les suivants :

	Volume ensemencé	Nombre de colonies présentes à la surface du milieu
Suspension non diluée	0,1 mL	Non comptable
Suspension diluée au 1/10	0,1 mL	50

- Déterminer le nombre d'UFC pour une surface de 100 cm^2.
- Conclure quant à l'efficacité de la solution désinfectante.

2 ANALYSES IMMUNO-HÉMATOLOGIQUES

Les réactifs d'origine humaine, doivent être manipulés avec les précautions d'usage s'agissant de produits potentiellement infectieux.

2.1 VÉRIFICATION DU STATUT VACCINAL ANTI-TÉTANIQUE

Le patient n'ayant pu produire un carnet de vaccination à jour, on évalue son statut vaccinal en recherchant les anticorps anti-tétaniques par une méthode d'immunochromatographie.

MATIÈRE D'ŒUVRE :

- plasma à tester
- Tétanos Quick Stick®
- pipette automatique 5-50 µL et cônes jaunes
- gants en latex
- poubelle « déchets contaminés »

MODE OPÉRATOIRE

Se reporter à **l'annexe 4** : fiche technique « Tétanos Quick Stick® ».

COMPTE RENDU

- Présenter le principe de la réaction mise en jeu à l'aide d'un schéma légendé.
- Lire et interpréter le résultat obtenu.
- Conclure quant au statut vaccinal du patient.

2.2 RECHERCHE DES D-DIMÈRES

La présence de D-dimères est le signe d'une coagulation intra vasculaire disséminée, leur recherche est réalisée par une technique d'agglutination passive sur le plasma du patient.

MATIÈRE D'ŒUVRE à disposition au **« poste hémostase »** :

- réactif 1 : suspension de particules de latex sensibilisées par un anticorps monoclonal de souris anti-D-dimère humain
- réactif 2 : tampon glycine
- réactif 3 : plasma humain dépourvu de D-dimères
- réactif 4 : plasma humain contenant des D-dimères
- plasma du sujet à tester
- plaques à usage unique
- agitateurs à usage unique
- pipette automatique 5-50 µL et cônes jaune

➲ ***Se rendre au « poste hémostase » à l'horaire de passage indiqué par l'examinateur.***

MODE OPÉRATOIRE

Appliquer le mode opératoire ci-dessous au plasma du patient et aux contrôles positif et négatif. :

- Déposer dans un anneau d'une plaque
  - 20 µL de solution à tester
  - 20 µL de réactif R1
- Mélanger à l'aide d'un agitateur.
- Agiter délicatement la plaque par rotation pendant 2 à 3 minutes.
- Observer l'apparition d'agglutinats macroscopiques.

☛ ***Présenter la plaque à un examinateur.***

COMPTE RENDU

- Présenter l'ensemble des résultats sous forme d'un tableau incluant la composition et le rôle des deux contrôles.
- Interpréter le résultat obtenu pour le plasma du patient.
- Conclure.

3 ANALYSES BIOCHIMIQUES

3.1 EXPLORATION DES ATTEINTES MUSCULAIRES

De façon générale une atteinte tissulaire se traduit par la libération des enzymes cellulaires des tissus lésés dans le plasma. Les dosages de la CK et de ses isoenzymes sont réalisés sur le plasma du patient.

3.1.1 DOSAGE DE LA CRÉATINE KINASE (CK) PAR MÉTHODE CINÉTIQUE

MATIÈRE D'ŒUVRE à disposition au **« poste cinétique »:**

- Spectrophotomètre thermostaté à 30°C
- bain thermostaté à 30°C
- pipette automatique P1000 et P50, cônes
- microcuves, parafilm, papier Joseph
- poubelle « déchets contaminés », flacon « déchets liquides contaminés »
- réactif 2 (R2) pré-incubé à 30°C
- sérum du patient en tube à hémolyse dans la glace.

➲***Se rendre au « poste cinétique » à l'horaire de passage indiqué par l'examinateur.***

MODE OPÉRATOIRE

L'annexe 5 présente la méthode de dosage de la Créatine Kinase.

- Réaliser un dosage de la CK en simple essai à 30°C, en effectuant des mesures toutes les trente secondes pendant trois minutes.

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

COMPTE RENDU

➲***L'annexe 6 est à compléter et à rendre avec la copie.***

3.1.2 ÉTUDE DU PROFIL DES ISOENZYMES DE LA CK

Une électrophorèse sur gel d'agarose des différentes isoenzymes « MM », « MB » et « BB » de la CK a été réalisée. La méthode et les résultats obtenus sont présentés dans **l'annexe 7**.

COMPTE RENDU

➲***L'annexe 7 est à compléter et à rendre avec la copie.***

- Justifier, à l'aide des données, les distances de migration obtenues pour les différentes isoenzymes.
- Positionner les bornes sur le profil densitométrique.
- Interpréter les résultats.
- Conclure sur l'atteinte musculaire du patient à partir des résultats du dosage de la CK et de l'électrophorèse des isoenzymes.

Données :

- *Augmentation de la fraction MB, dans les 4 à 8 heures après un accident cardiaque.*
- *Augmentation de la fraction BB, essentiellement dans les maladies neurologiques.*
- *Augmentation de la concentration d'activité catalytique totale de la CK, et essentiellement de la fraction MM dans les cas de traumatisme musculaire, maladie musculaire, dystrophie musculaire…*

3.2 EXPLORATION DE L'ATTEINTE RÉNALE

L'insuffisance rénale se traduit par la perturbation de nombreux paramètres biochimiques, en particulier par :

- l'élévation de la concentration en urée dans le plasma (urémie),
- la présence d'hémoglobine dans l'urine (hémoglobinurie).

3.2.1 DÉTERMINATION DE L'URÉMIE PAR MÉTHODE EN POINT FINAL

La méthode de dosage de l'urée est présentée dans la fiche technique « Urea-Kit S 180 » figurant à l'**annexe 8.**

MATIÈRE D'ŒUVRE

- 4 microcuves de spectrophotomètre
- pipettes automatiques P1000 et P200, cônes
- sérum du patient

- sérum contrôle
- solution étalon à 0,5 g/L
- solution de travail
- réactif 4 (R4)

MODE OPÉRATOIRE

Le dosage de l'urée sera effectué dans les échantillons suivants :

  - sérum du patient,
  - solution étalon,
  - sérum contrôle
- Compléter le tableau de protocole de **l'annexe 9 (à rendre avec la copie).**
- Effectuer le dosage de l'urée dans les trois échantillons.

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

COMPTE RENDU

- L'**annexe 9** est à compléter et à rendre avec la copie

3.2.2 RECHERCHE D'UNE HÉMOGLOBINURIE

L'urine du patient n'est ni trouble, ni colorée. Il n'y a pas de culot globulaire après centrifugation de cette urine. D'autre part aucune hématie n'est observée lors de l'examen microscopique.

Les examens précédents n'ayant pas révélé d'hématurie (présence d'hématies dans l'urine), la recherche de la présence d'hémoglobine est alors réalisée à l'aide de bandelettes réactives urinaires.

MATIÈRE D'ŒUVRE :

- urine du patient
- bandelette réactive urinaire Medi-Test Combi 9®

MODE OPÉRATOIRE

- Immerger la bandelette urinaire Medi-Test Combi 9® pendant 1 seconde dans l'urine.
- Egoutter la bandelette en passant la tranche contre le rebord du récipient.
- Après 30 à 60 secondes, comparer la couleur de la zone réactive « sang » avec la gamme colorimétrique de l'étiquette du flacon (voir **annexe 10**).
- Après 2 minutes, les variations de couleur n'ont aucune signification diagnostique.

➲***Appeler l'examinateur pour obtenir le flacon avec la gamme colorimétrique pour la lecture.***

☛***Présenter à l'examinateur le résultat de la bandelette réactive, immédiatement après la réalisation***.

COMPTE RENDU

- Décrire le résultat obtenu.
- Interpréter ce test à l'aide de l'**annexe 10**.
- Conclure sur l'atteinte rénale du patient à partir des résultats du dosage de l'urée sérique et de la recherche de l'hémoglobinurie

Données :

L'élévation de l'urée sérique est observée dans le cadre des insuffisances rénales aigües et chroniques.

Dans le cas du patient mordu par Bothrops moojeni, la recherche d'une hémoglobinurie permet de surveiller l'intégrité de la fonction rénale.

4 CONCLUSION GÉNÉRALE

Après avoir rappelé les résultats obtenus pour les différentes analyses pratiquées, proposer une synthèse sur la situation du patient victime de l'envenimation.

Annexe 1 Galerie ATB G –

Extrait de la fiche technique ATB G - de BioMérieux®

La galerie ATB G- permet de déterminer la sensibilité des entérobactéries aux antibiotiques en milieu semi-solide dans des conditions très proches des techniques de référence de dilution en gélose.

PRINCIPE

La galerie ATB G- comporte trente deux cupules. Les deux premières, sans antibiotique, servent de témoin de croissance. Les cupules suivantes contiennent des antibiotiques aux concentrations critiques c ou C.

La bactérie à tester est mise en suspension puis transférée dans le milieu de culture et inoculée dans la galerie. Après incubation, la lecture de la croissance se fait soit visuellement, soit avec l'automate ATB. Le résultat obtenu permet de catégoriser la souche Sensible, Intermédiaire ou Résistante.

RÉACTIFS

Galerie ATB G- avec couvercle d'incubation

API Suspension Medium ou API NaCl 0,85%

ATB Medium

MODE OPÉRATOIRE

Préparation de la galerie

Sortir la galerie de son emballage.

Noter l'identifiant de la bactérie à tester sur la languette latérale de la galerie.

Préparation de l'inoculum

Préparer une suspension bactérienne dans une ampoule API Suspension Medium ou API NaCl 0,85% Medium d'opacité équivalente à l'étalon 0,5 de Mac Farland.

Transférer 10 µL de cette suspension dans ATB Medium à l'aide d'une oese calibrée.

Inoculation de la galerie

Homogénéiser ATB Medium.

Inoculer la galerie en distribuant 135 µL d'ATB Medium par cupule avec la pipette électronique ATB.

Mettre un couvercle sur la galerie.

Incuber 18-24 heures à 36°C ± 2°C en aérobiose.

LECTURE ET INTERPRÉTATION

Effectuer la lecture de la paire de cupules sans antibiotique, témoin de croissance : l'absence de culture dans une (ou deux) cupule(s) invalide l'antibiogramme qui doit être recommencé.

Rechercher dans chaque cupule la présence d'un trouble (+) par lecture visuelle ou par l'automate ATB.

Pour les antibiotiques testés à deux concentrations :

Aspect de la cupule c	Aspect de la cupule C	Résultat pour la cupule c	Résultat pour la cupule C	La souche est :
clair	clair	-	-	S : Sensible
trouble	clair	+	-	I : Intermédiaire
trouble	trouble	+	+	R : Résistante

Pour les antibiotiques testés à une seule concentration :

Aspect de la cupule	Résultat	La souche est :
clair	-	S : Sensible
trouble	+	R : Résistante

Notes :

En lecture visuelle, une croissance limitée à la périphérie de la cupule doit être lue négative.

Une galerie dont les cupules sont partiellement desséchées suite à l'incubation peut induire de faux résultats. L'antibiogramme doit être recommencé.

Triméthoprime – Sulfaméthoxazole (TSU) : considérer comme négatif toute croissance inférieure au témoin de croissance.

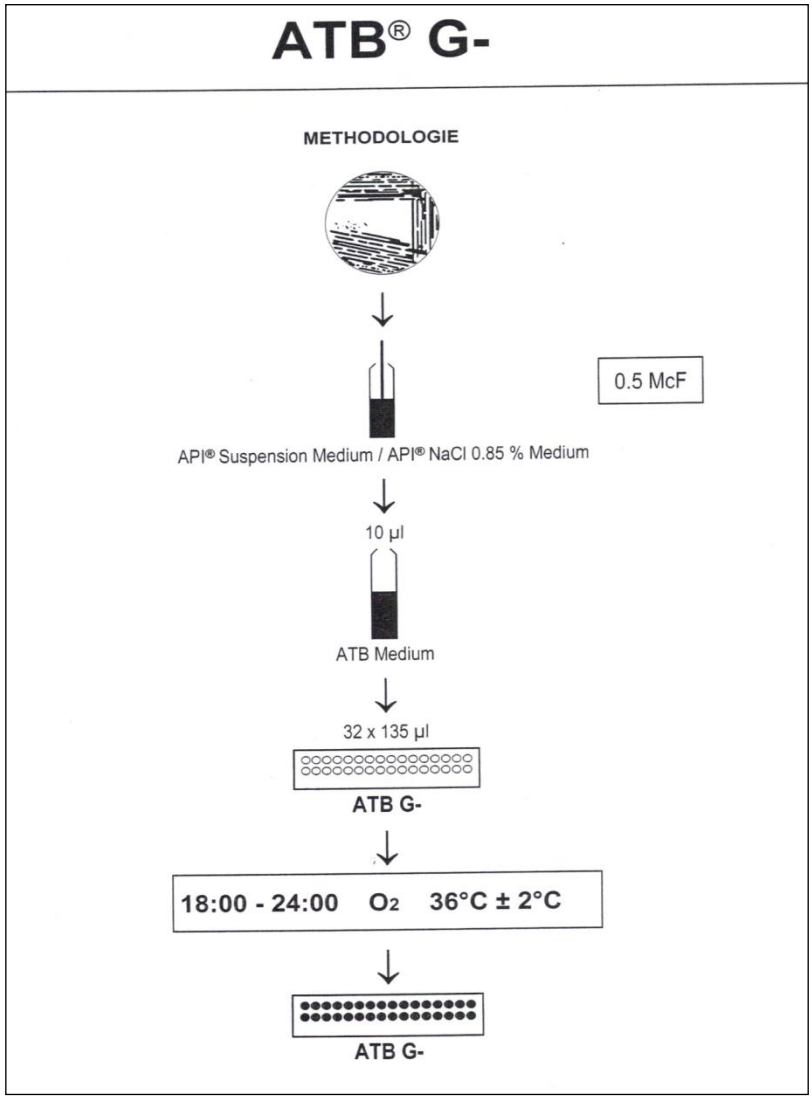
CONTROLE QUALITÉ

La méthode a été validée par un contrôle qualité avec la souche test indiquée pour cette galerie.

			mg/l	CQ1
01.	AMO	AMOXICILLINE	4 - 16	S/I
02.	AMC	AMOXICILLINE-ACIDE CLAVULANIQUE	4/2 - 16/2	S/I
03.	TIC	TICARCILLINE	16	S
	TCC	TICARCILLINE-ACIDE CLAVULANIQUE	16/2	S
04.	TZP	PIPERACILLINE+TAZOBACTAM	8/4 - 64/4	S
05.	PIC	PIPERACILLINE	8	S
	IMI	IMIPENEME	4	S
06.	CFT	CEFALOTINE	8	S/R
	CXT	CEFOXITINE	8	S
07.	CTX	CEFOTAXIME	4 - 32	S
08.	CAZ	CEFTAZIDIME	4 - 32	S
09.	CA1	CEFTAZIDIME - 1	1	S
	FOS	FOSFOMYCINE	32	S
10.	FEP	CEFEPIME	4 - 32	S
11.	GEN	GENTAMICINE	4	S
	TOB	TOBRAMYCINE	4	S
12.	NET	NETILMICINE	4	S
	AKN	AMIKACINE	8	S
13.	TSU	COTRIMOXAZOLE	2/38	S
	NAL	ACIDE NALIDIXIQUE	8	S
14.	OFL	OFLOXACINE	1 - 4	S
15.	CIP	CIPROFLOXACINE	1 - 2	S

CQ1 : *Escherichia coli* ATCC 25922

Méthodologie de la galerie ATB G –



A rendre avec la copie

FICHE DE RÉSULTATS **Galerie ATB G-**

	c	C	R / I / S	c C mg/l
0	O	O		
AMO	O	O		4 - 16
AMC	O	O		4/2 - 16/2
TIC	O			16
TCC		O		16/2
TZP	O	O		8/4 - 64/4
PIC	O			8
IMI		O		4
CFT	O			8
CXT		O		8
CTX	O	O		4 - 32
CAZ	O	O		4 - 32
CA1	O			1
FOS		O		32
FEP	O	O		4 - 32
GEN	O			4
TOB		O		4
NET	O			4
AKN		O		8
TSU	O			2/38
NAL		O		8
OFL	O	O		1 - 4
CIP	O	O		1 - 2

Annexe 2 Milieu pour l'isolement sélectif des Staphylococcus aureus résistant à la méticilline (SARM)

Extrait de la fiche technique METISTAPH 2 AES

PRINCIPE

La gélose « METISTAPH 2 » est un milieu recommandé pour l'isolement et l'identification présomptive des *Staphylococcus aureus* résistant à la méticilline (SARM) responsables d'infections nosocomiales, à partir de produits biologiques.

Ce milieu est constitué de deux géloses sélectives permettant de détecter les résistances aux fluoroquinolones et aux céphalosporines qui sont classiquement associées à la résistance à la méticilline chez les SARM. La détection conjuguée de ces deux résistances permet d'augmenter la sensibilité de la recherche des SARM.

La céphalosporine utilisée dans ce milieu est la céfoxitine qui permet l'induction du gène mec-A. Ce gène code pour une protéine liant les pénicillines (PLP) et intervient dans le mécanisme de résistance des SARM.

La fluoroquinolone utilisée est l'ofloxacine.

Les deux géloses contiennent de la colistine et de l'amphotéricine B de manière à inhiber les flores bactériennes et fongiques interférentes.

COMPOSITION

En gramme par litre d'eau purifiée

Demi-boîte 1 : résistance aux fluoroquinolones

Mueller Hinton	38
Mannitol	3,5
Rouge de phénol	0,25
Ofloxacine	1 mg
Colistine	4 mg
Amphotéricine B	5 mg

pH = 7,3 +/- 0,2

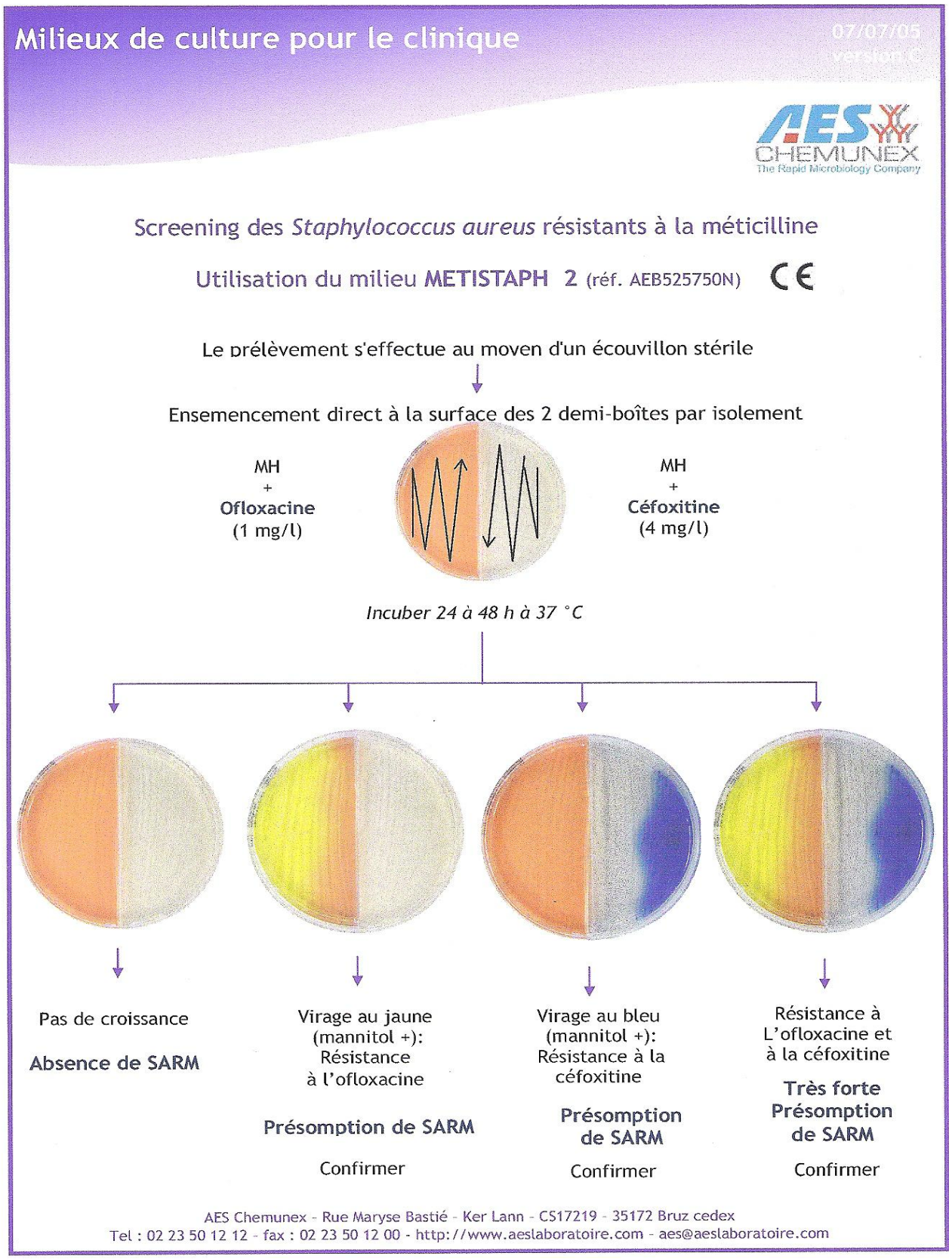
Demi-boîte 2 : résistance à la céfoxitine

Mueller Hinton	38
Mannitol	3,5
Bleu d'aniline	0,2
Céfoxitine	4 mg
Colistine	4 mg
Amphotéricine B	5 mg

MODE OPÉRATOIRE

Etaler l'inoculum recueilli par écouvillonnage à la surface de la gélose. Incuber à 37°C pendant 24 à 48 heures.

Gélose « METISTAPH 2 »



Annexe 3 Milieu de Chapman

- **Composition** en g/L

- Peptones ……. 11
- Extrait de viande ……. 1
- Chlorure de sodium …… 75
- Mannitol …….…. 10
- Agar …… 15

Annexe 4 Recherche des anticorps anti-tétaniques

Extrait de la fiche technique « TETANOS QUICK STICK® GAMMA »

PRINCIPE

Le TETANOS QUICK STICK® est un test immunologique rapide, basé sur le principe de l'immunochromatographie.

Cette méthode utilise un conjugué d'anatoxine tétanique marqué à l'or et de l'anatoxine tétanique fixée à la phase solide.

L'échantillon de sang, de sérum ou de plasma est déposé dans le puits de dépôt du TETANOS QUICK STICK®. On ajoute ensuite le diluant dans le même puits.

Le diluant migre sur le stick, entrainant le conjugué d'anatoxine tétanique marqué à l'or qui forme un complexe avec les anticorps anti-tétaniques présents dans un échantillon.

Ces complexes réagissent avec l'anatoxine immobilisée, ce qui entraine l'apparition d'une ligne colorée dans la fenêtre T.

S'il n'y a pas d'anticorps anti-tétaniques dans l'échantillon, aucune ligne colorée n'apparaît dans la fenêtre T.

L'excès de conjugué d'anatoxine tétanique marqué à l'or est capté par un réactif de contrôle fixé au niveau de la fenêtre C, pour former une ligne rose, témoin du bon fonctionnement du test.

MODE OPÉRATOIRE

- Ouvrir le sachet du « TETANOS QUICK STICK® » en le déchirant à partir de l'encoche.
- Poser le boitier sur une surface horizontale.
- Déposer 20 µL de plasma dans le puits de dépôt.
- Ajouter immédiatement (dans les 10 secondes) 3 gouttes de diluant en tenant le flacon verticalement au-dessus du puits de dépôt, en évitant que l'extrémité du compte-gouttes n'entre en contact avec le fond du puits.
- Après 10 minutes, lire les résultats.

Si aucun flux de liquide d'apparaît dans la fenêtre de lecture après 2 minutes, on peut ajouter une goutte de diluant supplémentaire.

LECTURE ET INTERPRÉTATION

1. **Validation du test**

- Une ligne colorée rose dans la zone C indique que le test a été effectué correctement.

2. **Lecture du test**

- Aucune ligne colorée dans la zone T : le test est négatif
- Présence d'une ligne colorée rose dans la zone T quelle qu'en soit l'intensité : le test est positif.

Toute réaction positive indique que le taux d'anticorps est supérieur au seuil de calibration du test : 0,1 UI/mL. A partir de ce seuil le taux d'anticorps est considéré comme protecteur au regard du tétanos.

En cas d'hésitation sur la présence ou non d'une bande colorée sur la zone T (taux d'anticorps proche du seuil de calibration du test) : le test est rendu négatif.

En aucun cas il ne doit y avoir de comparaison de l'intensité de la coloration des lignes T et C

Annexe 5 Dosage de la créatine kinase par méthode cinétique

Extrait de la fiche technique ENZYLINE™ CK NAC optimisé 10 bioMérieux®

PRESENTATION ET COMPOSITION DU COFFRET

(Réf. 61 141 : 160 tests - Réf. 61 145 : 200 tests)

Réactif 1 Tampon - Réf. 61 141 : 2 x 90 ml - Réf. 61 145 : 4 x 65 ml	R1	Tampon imidazole-acétate pH 6,6 D-glucose EDTA Acétate de magnésium NaN_3	104 mmol/l 20,8 mmol/l 2,1 mmol/l 10,4 mmol/l 0,9 g/l
Réactif 2 (repris par R1) Enzymes - coenzymes - Réf. 61 141 : 16 x 10 ml (lyophilisé) - Réf. 61 145 : 10 x 20 ml (lyophilisé)	R2	N-acétylcystéine ADP AMP NADP Diadénosine pentaphosphate Créatine phosphate Hexokinase Glucose-6-phosphate déshydrogénase	20,8 mmol/l 2,1 mmol/l 5,2 mmol/l 2,1 mmol/l 10 µmol/l 31,2 mmol/l ≥ 3 000 U/l ≥ 2 000 U/l
1 notice			

PRINCIPE (1, 2, 3)

ENZYLINE™ CK NAC optimisé permet la détermination cinétique de l'activité créatine kinase totale, réactivée par la N-acétylcystéine, selon la réaction :

$$\text{Créatine phosphate} + \text{ADP} \xrightleftharpoons{\text{CK}} \text{créatine} + \text{ATP}$$

$$\text{ATP} + \text{glucose} \xrightleftharpoons{\text{HK}} \text{glucose-6-P} + \text{ADP}$$

$$\text{Glucose-6-P} + \text{NADP}^+ \xrightleftharpoons{\text{G6PDH}} \text{gluconate-6-P} + \text{H}^+ + \text{NADPH}$$

La vitesse de formation du NADPH, mesurée à 340 nm, est proportionnelle à l'activité enzymatique de la CK totale.

CK = créatine kinase.
HK = hexokinase.
G6PDH = glucose-6-phosphate déshydrogénase.

Code SFBC : L6

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 Echantillon	1 ml 40 µl
Mélanger. Attendre 3 minutes à 30°C ou 37°C. Mesurer l'augmentation moyenne de DO par min (n) pendant 1 à 3 minutes.	

VALEURS ATTENDUES (6, 7)

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 (U/l) *	37°C (U/l)
Hommes	≤ 109	≤ 175
Femmes	≤ 84	≤ 135

Les valeurs attendues dépendent de l'âge, du sexe et de l'origine ethnique du sujet (8, 9).

DONNÉES :

Calcul : catc ($U.L^{-1}$) = **4127 x $\Delta A/\Delta t$ (min^{-1})**
1 U 1 $\mu mol.min^{-1}$
sr = 5,1 $U.L^{-1}$

Annexe 6 Dosage de la créatine kinase par méthode cinétique

A rendre avec la copie

Résultats expérimentaux

Temps (t) en ….						
Absorbance (A) à ….						

Compte rendu

Tracer la courbe de la cinétique de la créatine kinase à 30°C sur papier millimétré : A = f (t).

Déterminer la variation d'absorbance par minute : $\Delta A/\Delta t$ (min^{-1}).

Calculer la concentration d'activité catalytique de la CK dans le sérum du patient, exprimée en U/L.

Justifier la formule de calcul de la concentration d'activité catalytique en U/L donnée dans la fiche technique.

Donnée : Coefficient d'absorbance molaire du NADPH à 340 nm : $\varepsilon = 630\ m^2.mol^{-1}$

Interpréter le résultat.

Annexe 7 Étude du profil des isoenzymes de la créatine kinase

A rendre avec la copie

NOM : **Prénom :** **Réf :**

UTILISATION

L'hydragel ISO CK est un gel d'agarose qui permet l'identification et la quantification des trois isoenzymes de la créatine kinase (CK) présentes dans le sérum humain, par électrophorèse. Ces isoenzymes sont séparées en milieu alcalin (pH 8,4) puis révélées à l'aide d'un substrat spécifique. Après blocage de la réaction enzymatique et séchage du gel, une analyse qualitative peut alors être réalisée et la densitométrie donne une quantification relative précise (%) de chaque fraction CK individualisée.

PRINCIPE

Les isoenzymes de la CK sont composées de deux sous-unités, M « muscle » et B « brain » (cerveau) assemblées en dimère.

Chaque dimère a une charge propre qui lui confère une mobilité particulière dans un système électrophorétique donné.

pHi MM > pH tampon pHi MB et BB < pH tampon pHi MB > pHi BB

VALEURS DE RÉFÉRENCE

Les pourcentages obtenus pour des échantillons normaux sont :

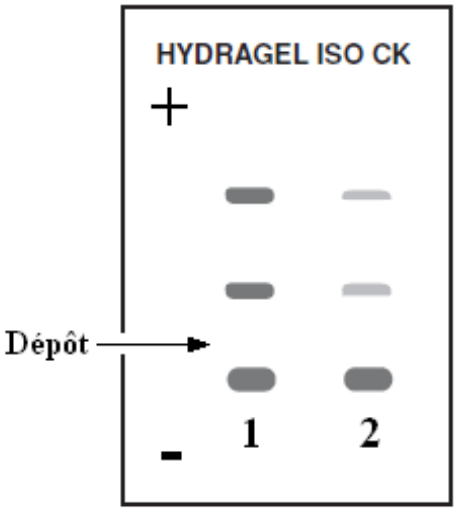
CK MM : 97 à 100%

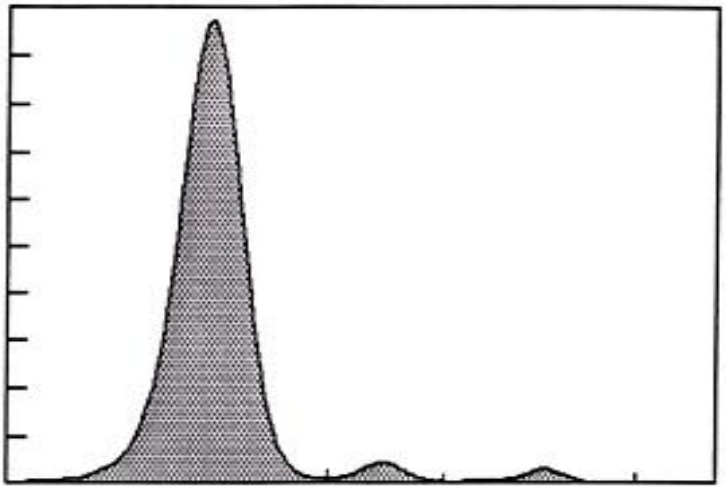
CK MB : 0 à 4 %

CK BB : 0 à 2 %

RÉSULTATS

Profil électrophorétique **Profil densitométrique**





Fraction	%
CK-MM	95.3
CK-MB	2.9
CK-BB	1.9

Annexe 8 Dosage de l'urée par méthode enzymatique en point final

Extrait de la fiche technique Urea-Kit S 180 bioMérieux®

PRESENTATION ET COMPOSITION DU COFFRET

(Réf. 61 912 : 183 tests - Réf. 61 913 : 1017 tests)

Réactif 1 Etalon - Réf. 61 912 : 1 x 4 ml (liquide) - Réf. 61 913 : 1 x 9 ml (liquide)	R1	Urée	8,33 mmol/l (0,5 g/l)
Réactif 2 Enzymes - Réf. 61 912 : 2 x 1,5 ml (liquide) - Réf. 61 913 : 5 x 3,5 ml (liquide)	R2	Uréase	≥ 350 kU/l
Réactif 3 Réactif de coloration - Réf. 61 912 : 2 x 90 ml (liquide) - Réf. 61 913 : 5 x 200 ml (liquide)	R3	Tampon phosphate pH 8 Salicylate de sodium Nitroprussiate de sodium EDTA	50 mmol/l 62 mmol/l 3,35 mmol/l 1 mmol/l
Réactif 4 Réactif alcalin - Réf. 61 912 : 1 x 50 ml (liquide) - Réf. 61 913 : 1 x 240 ml (liquide)	R4	Soude (NaOH) * Hypochlorite de sodium (NaClO)	0,5 mol/l 24,8 mmol/l
1 notice			

*** Réactif IRRITANT :**

- **R 36/38: irritant pour les yeux et la peau.**
- **S 26 : en cas de contact avec les yeux, laver immédiatement et abondamment avec de l'eau et consulter un spécialiste.**
- **S 36/37/39 : porter un vêtement de protection approprié, des gants et un appareil de protection des yeux / du visage.**

PRINCIPE (3, 4)

Urea-Kit S permet la détermination enzymatique de l'urée en mode point final (Uréase - réaction de Berthelot modifiée) dans les urines, le sérum ou le plasma humains.
L'uréase hydrolyse l'urée en produisant de l'ammoniaque :

$$\text{Urée} + H_2O \xrightarrow{\text{uréase}} 2\,NH_3 + CO_2$$

Les ions ammonium réagissent, en milieu alcalin, avec le salicylate et l'hypochlorite pour former un indophénol (dicarboxyl-2,2' indophénol) de couleur verte.
La réaction est catalysée par le nitroprussiate.

$$NH4^+ + \text{salicylate} + \text{hypochlorite} \longrightarrow \text{indophénol}$$

L'intensité de la coloration est proportionnelle à la concentration d'urée dans l'échantillon.
Une éventuelle présence de métaux lourds inhibe la formation de l'indophénol. L'EDTA lève cette inhibition.

Réalisation du test

Longueur d'onde : 580 nm (Hg 578 nm)
Zéro de l'appareil : blanc réactif

	Blanc réactif	Etalon	Dosage
Etalon	-	10 µl	-
Echantillon	-	-	10 µl
Solution de travail	1 ml	1 ml	1 ml
Mélanger. Incuber 5 minutes à 20-25°C.			
Réactif 4	200 µl	200 µl	200 µl
Mélanger. Incuber 10 minutes à 20-25°C. Photométrer.			

Stabilité de la coloration à l'abri de la lumière : 2 heures à 20-25°C.

VALEURS ATTENDUES (7)

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.

Sérum ou plasma

	mmol/l	g/l	mg/dl
Nourrissons	1,00 – 3,00	0,06 – 0,18	6 - 18
Enfants	2,50 – 5,50	0,15 – 0,33	15 - 33
Adultes	2,50 – 7,50	0,15 – 0,45	15 - 45

Calcul

$$\text{Concentration de l'échantillon} = \frac{DO_{\text{échantillon}}}{DO_{\text{étalon}}} \times n$$

n = concentration de l'étalon

Annexe 9 Dosage de l'urée par méthode enzymatique en point final

A rendre avec la copie

Feuille de résultats

Compléter le tableau suivant :

	Blanc	Etalon	Contrôle	Patient
Volume de solution étalon				
Volume de sérum contrôle				
Volume de sérum du patient				
Volume de solution de travail				
Mélanger, incuber 5 minutes à 20-25°C				
Volume de réactif 4				
Mélanger, incuber 10 minutes à 20-25°C				
Absorbance à …….				

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

Valeur cible = 0,37 g/L, limites de confiance = 0,34 à 0,40 g/L

Calculer la concentration en urée du sérum du patient. Interpréter.

Annexe 10 Dépistage de l'hémoglobinurie

Présentation de la bandelette réactive urinaire Medi-Test Combi 9®

Présentation de la gamme colorimétrique sur le flacon

Zone réactive du « sang »

La mise en évidence de l'hémoglobine repose sur son action oxydante se traduisant par la coloration bleu-vert de l'indicateur redox.

La limite de détection de la bandelette est de 5 à 10 érythrocytes /µL d'urine, ce qui correspond à 0,015 mg d'hémoglobine /dL d'urine.

Lecture de la zone réactive du « sang »	
Résultat négatif	**Résultats positifs**
	Des colorations homogènes dans la zone réactive, indiquent la présence d'hémoglobine libre. **Hémoglobine (mg/dl)**
	Des colorations en forme de points dans la zone réactive, indiquent la présence d'érythrocytes intacts. **Erythrocytes (ery/µL)**