

SCIENCES ET TECHNOLOGIES DE LABORATOIRE (STL)
Spécialité BIOTECHNOLOGIES

EVALUATION DES COMPETENCES EXPERIMENTALES
BIOTECHNOLOGIES

DOSSIER TECHNIQUE

A rendre avec la copie en fin d'épreuve

FICHES TECHNIQUES

- **Fiche technique 1** : recherche d'un antibiotique dans un lait cru
- **Fiche technique 2** : détection des anticorps anti-*Brucella* par la technique au Rose Bengale

DOCUMENTS

- **Document 1** : dosage de l'acide lactique du lait par la méthode de Dornic
- **Document 2** : brucellose bovine et contamination humaine
- **Document 3** : aide-mémoire de métrologie

Recherche d'un antibiotique dans un lait cru

Principe

Une souche bactérienne sensible aux antibiotiques recherchés est ensemencée sur le milieu Mueller-Hinton coulé en boîte de Petri. Sur cette gélose, des disques, imprégnés d'antibiotique ou imprégnés du lait à étudier, sont déposés. Après incubation (dans les conditions de durée et de température choisies en fonction de la souche bactérienne employée), une zone d'inhibition apparaît autour du disque contenant un antibiotique capable d'inhiber la croissance de la souche bactérienne.

Matériel et réactifs

<p>1 tube de lait ne contenant pas d'antibiotique (témoin négatif lait) noté « T - » ; 1 tube de lait cru à contrôler noté « L » ; 3 disques de papier filtre stériles ; 1 disque de pénicilline (témoin positif) noté « Pen » ; 1 tube de 5 mL d'eau physiologique stérile ; 2 tubes de 9 mL d'eau physiologique stérile ; 2 pipettes graduées stériles de 1 mL ; 1 écouvillon stérile ;</p>	<p>1 abaque de dépôt ; 1 étalon 0,5 Mc Farland ; 1 pince stérile 1 pipette à piston P20 et des cônes stériles adaptés ; 3 lames de verre stériles ; 1 gélose Mueller-Hinton présentée en boîte de Petri notée « MH » ; 1 souche bactérienne sensible à la pénicilline présentée sur une gélose nutritive inclinée (GNi) et préalablement incubée 24 heures à 37 °C.</p>
---	--

Protocole opératoire

- Préparer l'inoculum :
 - à partir de la culture en gélose nutritive, réaliser une suspension bactérienne d'opacité égale à l'étalon 0,5 Mc Farland.
 - diluer la suspension précédente au 1/100. Cette nouvelle suspension constitue l'inoculum.
- Ensemencer la gélose Mueller-Hinton par la technique de l'écouvillonnage :
 - immerger un écouvillon stérile dans l'inoculum.
 - essorer l'excès d'inoculum contre la paroi du tube.
 - ensemencer en stries serrées sur toute la surface de la boîte. Répéter l'opération en tournant la boîte de 120 ° pour strier dans une autre direction. Répéter une troisième fois l'opération en tournant encore la boîte de 120 °.
- Préparer le disque **témoin négatif lait** (« **T -** ») :
 - Déposer un disque vierge de papier filtre sur une lame de verre stérile.
 - Imbiber le disque en déposant 10 µL de lait sans antibiotique.
- Préparer le disque **lait cru à tester** (« **L** ») :
 - Déposer un autre disque vierge de papier filtre dans une lame de verre stérile.
 - Imbiber le disque en déposant 10 µL de lait cru à tester.
- Déposer 4 disques sur la gélose Mueller-Hinton à l'aide d'une pince stérile en appuyant légèrement dessus, selon l'abaque fourni par le centre d'examen :
 - le disque **témoin négatif lait** ;
 - le disque de pénicilline (**témoin positif**) ;
 - un disque de papier stérile non imbibé (**témoin négatif disque**) ;
 - le disque de **lait cru à tester**.
- Laisser reposer la boîte fermée 10 minutes avant de la retourner pour l'incuber.
- Incuber à 37 °C pendant 24 heures.

Principe de lecture

Une zone d'inhibition de culture bactérienne autour du disque traduit la présence d'un antibiotique.

Lecture

- Vérifier la présence de colonies jointives sur la gélose Mueller-Hinton.
- Valider les 3 témoins.
- Lire le résultat du lait testé.

Sérodiagnostic de la brucellose

Détection des anticorps anti-*Brucella* par la technique au Rose Bengale




La réaction à l'antigène au Rose Bengale permet le diagnostic sérologique des brucelloses dues à *Brucella melitensis*, *Brucella abortus*, *Brucella bovis* ou *Brucella suis*. Ce test qualitatif est utile au dépistage, au diagnostic ainsi qu'à la surveillance de la brucellose.

Principe

La réaction à l'antigène au Rose Bengale ou antigène tamponné, est une réaction d'agglutination rapide utilisant comme suspension bactérienne, *Brucella abortus*, colorée au Rose Bengale en milieu acide tamponné.

Après mélange à parts égales d'antigène au Rose Bengale et d'anticorps anti-*Brucella* on observe l'apparition d'agglutinats colorés en rose.

Matériel et réactifs

- Support de réaction : lame de verre ou carton permettant de faire 3 dépôts.
- Pipette à piston délivrant 30 μ L et cônes adaptés.
- Agitateur à usage unique (x3).
- 110 μ L d'antigène Rose Bengale noté « **Ag** ».
- 45 μ L de sérum de vache laitière, suspectée atteinte de mammite noté « **S** » .
- 45 μ L de sérum contrôle positif noté « **S+** » 
(sérum contenant des anticorps anti-*Brucella*).
- 45 μ L de sérum contrôle négatif noté « **S-** » 
(sérum ne contenant pas d'anticorps anti-*Brucella*)
- Gants en latex ou nitrile (S, M ou L).
- Poubelle destinée aux déchets biologiques.

Protocole opératoire

- Déposer 30 μ L de chaque sérum à étudier sur le support.
- Ajouter 30 μ L de l'antigène Rose Bengale dans chaque goutte de sérum.
- Mélanger à l'aide d'un agitateur à usage unique.
- Agiter le mélange et observer au bout de 4 minutes.
- Eliminer les déchets générés dans les poubelles appropriées.

Lecture

Valider les témoins puis lire le résultat pour le sérum testé.

Dosage de l'acide lactique d'un lait par la méthode Dornic

Le degré Dornic est une unité de mesure d'acidité du lait du nom de M. Dornic, ancien directeur de l'école nationale d'industrie laitière de Mamirolle (Doubs).

1 degré Dornic (1 °D) correspond à 0,1 g d'acide lactique par litre de lait.

Principe de mesure

L'acidité d'un lait est déterminée par un dosage volumétrique acide-base.

L'acide lactique est un monoacide, de formule semi-développée : CH₃-CHOH-COOH.

La réaction mise en jeu est donnée ci-dessous :



Le détecteur employé est un indicateur coloré de pH : la phénolptaléine.

L'équivalence acido-basique est mise en évidence par le virage au rose très clair persistant.

Matériel et réactifs

- Matériel usuel pour un dosage volumétrique (fiolle d'Erlenmeyer, burette graduée, bécher, entonnoir, lunettes de protection...)
- Solution étalon aqueuse d'hydroxyde de sodium (NaOH) de concentration molaire $c_{(\text{HO}^- ; \text{solution NaOH})} = 0,111 \text{ mol.L}^{-1}$ (volume à disposition 100 mL).
- Lait à analyser noté « L » (volume à disposition 100 mL).
- Détecteur : indicateur coloré de pH en flacon compte-gouttes.



Donnée : le dosage sera réalisé sur une prise d'essai $V_{\text{lait}} = 20 \text{ mL}$ de lait.

Législation

Un lait cru est considéré comme « frais » lorsque son acidité est inférieure ou égale à 18 °D.

Brucellose bovine et contamination humaine

La brucellose bovine est une infection le plus souvent due à *Brucella abortus*, elle provoque des mammites (inflammation des mamelles) chez la vache. Elle peut se transmettre à l'Homme par **contact direct au travers de la peau et des muqueuses** ou par contact indirect en consommant des produits laitiers frais. Cette bactérie provoque des avortements chez la femme enceinte et une fièvre.

Le dépistage sérologique (recherche d'anticorps) peut être réalisé à partir de sérum bovin et humain mais aussi à partir de lait (collecté après la traite d'une vache ou d'un troupeau).

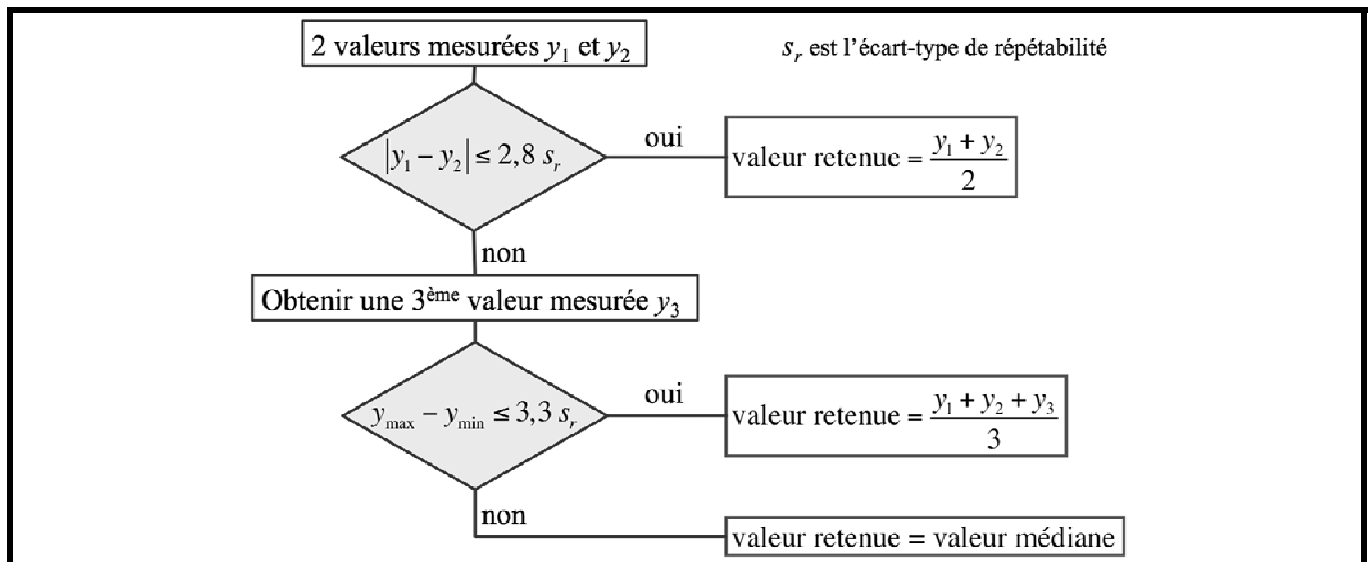
La présence d'anticorps anti-*Brucella* dans le lait et dans le sérum d'une vache laitière indique que celle-ci est atteinte de brucellose.

D'après le document « **Vocabulaire International de Métrologie** » (VIM) :

- Le **mesurande** est la grandeur que l'on veut mesurer.
- Le **mesurage** est un processus consistant à obtenir expérimentalement une ou plusieurs valeurs pouvant être raisonnablement attribuées à une grandeur.
- Les indications de mesure sont les valeurs numériques rendues par des appareils de mesure.
- Le **résultat de mesure** est exprimé par la valeur retenue et l'incertitude de mesure associée, complétées par toutes les autres informations pertinentes disponibles.
- Les conditions de répétabilité sont des conditions de mesurage qui comprennent des mesurages répétés, par le même opérateur, sur le même objet, avec la même procédure de mesure, le même système de mesure, les mêmes conditions de fonctionnement, dans le même lieu, pendant une courte période de temps.

Logigramme de compatibilité en répétabilité à deux ou trois valeurs

Justesse et fidélité de la procédure de mesure ayant été vérifiées, le logigramme suivant peut-être utilisé dans le cadre d'une vérification partielle de compatibilité en répétabilité.



Guide pour l'expression du résultat de mesure

L'incertitude élargie U est calculée en multipliant l'incertitude-type composée u_c par le facteur d'élargissement k associé à un niveau de confiance donné. La valeur de k généralement utilisée est de 2, ce qui correspond à un niveau de confiance d'environ 95 %.

L'incertitude élargie U est ensuite arrondie selon les cas :

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

Dans certains cas, l'incertitude élargie U est directement donnée avec son niveau de confiance.

Pour l'arrondissement du résultat, le dernier chiffre significatif doit être à la même position décimale que le dernier chiffre de l'incertitude élargie.

Expression du résultat de mesure :

- Grandeur mesurée (*constituant, système*) = (valeur retenue $\pm U$) unité
- valeurs du s_r , de U , et nombre de valeurs mesurées utilisées pour le calcul de la valeur retenue