

## LES DESSERTS LACTES

L'alimentation, qu'elle soit d'origine hydrique, végétale ou animale, doit répondre à des critères de qualité, entre autres la sécurité sanitaire.

La nature des dangers peut être chimique ou biologique.

En effet, la présence de plomb, d'allergènes, de toxines, de bactéries constitue une source de danger.

Le lait et les œufs, composants de base des desserts lactés, nécessitent des contrôles sanitaires.

### 1. LE LAIT

#### 1.1. Le plomb

Le plomb apparaît dans le lait de vache lorsque l'animal consomme de l'herbe de pâtures situées en bordure de grands axes routiers (plomb tétraéthyle). L'eau stagnante dans les conduites en plomb peut contaminer le lait tout comme les récipients revêtus de peinture au plomb.

La teneur en plomb du lait doit être inférieure à 10 µg/L.

Le plomb est dosé par photométrie d'absorption atomique, par la méthode des ajouts dosés.

##### 1.1.1. Minéralisation

1 litre de lait a été minéralisé. Les cendres obtenues sont reprises dans 5 mL d'acide nitrique à 1 mol/L.

Le minéralisat M est fourni au candidat.

##### 1.1.2. Etalonnage de l'appareil

- A partir d'une solution étalon de nitrate de plomb  $Pb(NO_3)_2$  à 100 mg de Pb par litre (Pb 100 mg/L), préparer une solution fille à 10 mg Pb/L.
- A partir de cette solution fille, réaliser une gamme de 5 tubes contenant de 10 à 50 µg de Pb par tube :

Tube n°	1	2	3	4	5
Solution étalon fille à 10 mg Pb/L (mL)	1	2	3	4	5
Minéralisat M (mL)	5	5	5	5	5
Eau distillée (mL)	4	3	2	1	0
Quantité de plomb en µg/tube	10	20	30	40	50

- Mélanger chaque tube.
- Lire les absorbances à 217 nm en réglant le zéro de l'appareil avec de l'eau distillée.

##### 1.1.3. Résultats

- Reporter les valeurs d'absorbance dans un tableau de résultats.
- Tracer la droite d'étalonnage  $A = f(\text{quantité de plomb en } \mu\text{g/tube})$ .  
Extrapoler la droite jusqu'à l'intersection avec l'axe des abscisses : l'abscisse à l'origine représente la quantité de plomb dans le minéralisat, en µg/tube.
- Calculer la teneur en plomb du lait, exprimée en µg/L.
- Conclure.

## **1.2. Etude d'une moisissure**

Une souche de moisissure isolée lors d'un contrôle de propreté a été repiquée sur gélose Sabouraud.

### 1.2.1. Etude morphologique

Réaliser les études macroscopique et microscopique de cette moisissure.

*Matériel :*

- moisissure sur gélose Sabouraud (Sab)
- ruban adhésif
- anse de mycologie
- bleu coton

### 1.2.2. Résultats

Reporter les résultats de cette étude (avec un schéma annoté de la morphologie microscopique) sur le compte rendu.

Proposer une identification du genre auquel appartient cette moisissure.

## **1.3. Dénombrement des coliformes totaux d'un lait cru**

### 1.3.1. Mise au point du protocole de dénombrement

- Dans le lait, ce dénombrement s'effectue en gélose au désoxycholate (technique de la double couche).
- Le critère est de 100 UFC / mL pour les coliformes totaux dans le lait cru à la production.  
Sachant que l'on doit pouvoir dénombrer les coliformes des échantillons qui atteignent le seuil de corruption (1000 fois le critère), proposer un protocole de dénombrement indiquant clairement la gamme de dilution à réaliser.
- Préciser sur le compte rendu les conditions d'incubation à respecter.  
Quel sera l'aspect d'une colonie de coliforme ? Justifier la réponse.

### 1.3.2. Réalisation pratique

- Réaliser le dénombrement conformément au protocole établi.
- Présenter à un examinateur la réalisation d'une dilution.

*Matériel :*

- tube de lait à analyser, dans un bac à glace : "lait coliformes"
- géloses au désoxycholate en surfusion à 50°C (grands et petits culots)
- tubes d'eau physiologique (diluant) de 9 mL exactement
- pipettes graduées stériles de 1 mL et dispositif d'aspiration
- grandes boîtes de Pétri

## **1.4. Recherche de staphylocoques entérotoxiques**

La recherche de staphylocoques toxigènes peut se faire par méthode immunologique utilisant des antisérums antitoxines. On se propose de suivre l'immunisation d'un lapin par dosage des anticorps antitoxines contenus dans son sérum.

On utilise des hématies de mouton que l'on sensibilise par une toxine (T) purifiée à partir d'une culture de *Staphylococcus* élaborant la toxine à identifier.

Le protocole figure **document 1**.

Réaliser le titrage du sérum fourni.

- Quel type de réaction « antigène – anticorps » utilise-t-on au cours de cette technique ?
- On teste le sérum du lapin immunisé préalablement adsorbé sur des hématies. En quoi consiste cette adsorption ? Quel est son rôle ?
- Que contient le réactif « contrôle positif » ?
- Présenter les résultats sous forme d'un tableau, en indiquant les dilutions du sérum à titrer (avant addition des globules rouges).
- Que représentent respectivement les cupules 10, 11 et 12 ? Quels sont leurs rôles ?
- Donner le titre du sérum inconnu.
- Sachant que, pour pouvoir servir de réactif dans un kit d'identification de *Staphylococcus* producteur d'entérotoxine, l'antisérum doit encore donner une réaction positive pour une dilution au 1/320 000, conclure sur l'efficacité de l'immunisation.

## **2. LES ŒUFS**

### **2.1. Dosage des protéines du blanc d'œuf**

Les protéines du blanc d'œuf sont dosées par la méthode du biuret.

#### 2.1.1. Etalonnage du spectrophotomètre

A partir d'une solution étalon d'albumine à 10,0 g/L (SA 10 g/L), réaliser une gamme de 5 tubes contenant de 0 à 10 mg d'albumine par tube.

tube N°	<b>0</b>	<b>1</b>	<b>2</b>	<b>3</b>	<b>4</b>	<b>5</b>
SA 10 g/L (mL)	0					
Eau physiologique (mL)	1					
Réactif de Gornall (mL)	4	4	4	4	4	4
Albumine par tube (mg)	0	2	4	6	8	10

- Mélanger chaque tube, attendre 30 minutes à l'obscurité.
- Lire les absorbance à 540 nm contre le témoin de gamme.

### 2.1.2. Dosage des protéines du blanc d'œuf

Un blanc d'œuf de masse  $m$  (masse précisée en salle) est mis en solution dans 1 litre d'eau physiologique (solution BO).

La composition moyenne du blanc d'œuf est :

éléments	% en masse
eau	85,0
glucides	0,8
protéines	12,9
lipides	0,3
sels minéraux	1,0

- Réaliser deux essais à partir de la solution BO selon la technique utilisée pour l'étalonnage.
- Préciser la composition des tubes essais.

### 2.1.3. Résultats

- Etablir un tableau complet de colorimétrie.
- Tracer la courbe d'étalonnage :  $A = f(\text{quantité de protéines/tube})$
- Calculer la concentration en protéines dans la solution de blanc d'œuf en g/L, puis déduire la teneur en protéines pour 100 g de blanc d'œuf.
- Vérifier la concordance des résultats ( $CV = 5\%$ ).

## 2.2. Détermination de l'activité du lysozyme du blanc d'œuf

### 2.2.1. Principe

Le lysozyme (EC 3.2.1.17) catalyse l'hydrolyse du peptidoglycane des parois bactériennes. Son activité catalytique est déterminée par mesure de la diminution, au cours du temps, de l'absorbance à 450 nm d'une suspension de parois bactériennes de *Micrococcus luteus*.

### 2.2.2. Mode opératoire

- Dans une cuve spectrophotométrique à usage unique, introduire :  
2,5 mL de suspension tamponnée pH 6,2 (équilibrée à 25°C) de parois bactériennes.
- A  $t = 0$ , ajouter 0,2 mL de solution enzymatique à analyser.
- Homogénéiser.
- Suivre l'évolution de l'absorbance à 450 nm pendant 2 minutes.

### 2.2.3. Exploitation des résultats

- Tracer le graphe  $A = f(t)$
- Déterminer la variation d'absorbance par unité de temps.
- Calculer la concentration d'activité catalytique de la solution enzymatique en unité lysozyme par litre.
- Calculer l'activité spécifique du lysozyme dans le blanc d'œuf en unité lysozyme par g de protéines.

### Donnée :

Une unité lysozyme est définie comme la quantité d'enzyme qui provoque une diminution de 0,001 unité d'absorbance par minute dans les conditions de l'expérience.

## **2.3. Prévention des salmonelloses : recherche et identification de *Salmonella***

Des recherches de *Salmonella* sont systématiquement effectuées sur les œufs utilisés. Elles se déroulent de la manière suivante :

- 1) préenrichissement
- 2) enrichissement
- 3) isolement sur géloses sélectives
- 4) identification biochimique des colonies suspectes
- 5) sérotypage en cas de présence de *Salmonella enterica*

Deux échantillons sont en cours d'analyse (échantillon A au stade 3, échantillon B au stade 5).

### 2.3.1. Echantillon A : exploitation d'un isolement

*Matériel :*

- isolement sur gélose VB-RP
  - tubes d'eau stérile
  - tubes d'huile stérile
  - Mac Farland 0,5
  - galerie RapiD 20 E et notice d'utilisation
  - gélose nutritive en boîte de Pétri.
- Réaliser la lecture macroscopique de l'isolement sur gélose VB-RP (vert brillant et rouge de phénol).
- Repérer les colonies suspectes, identifier l'une de ces colonies à l'aide de la galerie fournie et vérifier sa pureté par isolement sur gélose nutritive.

**Donnée :** cette gélose, qui ne permet pas la lecture du caractère H<sub>2</sub>S, contient des peptones, du lactose et du saccharose.

### 2.3.2. Echantillon B : réalisation du sérotypage

*Matériel :*

- culture de *Salmonella enterica* sur gélose nutritive inclinée
  - tube d'eau physiologique stérile (2 mL)
  - fond noir
  - lames de verre
  - sérums pour sérotypage de *Salmonella*
- Réaliser le sérotypage de cette souche.
- Après avoir réalisé l'ensemble des tests, montrer les résultats obtenus à un examinateur.
- Dans le compte rendu, conclure sur le sérotype présent.

**Donnée :**

**document 2 :** extrait du tableau de Kauffmann-White.

## **2.4. Les allergènes de l'œuf**

Des manifestations hématologiques peuvent survenir à la suite d'ingestion d'aliments à base d'œufs.

2.4.1. Un frottis a été réalisé à partir d'un sang prélevé chez un malade présentant des manifestations allergiques.

- Réaliser l'examen cytologique et la formule leucocytaire de ce frottis coloré par la méthode de May-Grünwald Giemsa, le nombre de leucocytes par litre de sang étant fourni.
- Conclure ; les valeurs de référence sont fournies **document 3**.
- Décrire la population de cellules incriminées et justifier ses affinités tinctoriales.

2.4.2. Dans le cadre du suivi d'un traitement des manifestations allergiques, un deuxième prélèvement sanguin est effectué sur ce même patient.

- Préciser sur quel type de prélèvement sanguin on effectue ce contrôle hématologique.
- Réaliser, à partir de l'échantillon fourni, deux frottis sanguins dont un sera coloré par la technique de May-Grünwald Giemsa (protocole fourni **document 4**).
- Faire l'étude cytologique qualitative de ce frottis et conclure.

# DOCUMENT 1 : LES ENTEROTOXINES

## PREPARATION D'UN ANTISERUM EN VUE DE LA REALISATION D'UNE TECHNIQUE IMMUNOLOGIQUE D'IDENTIFICATION DE *STAPHYLOCOCCUS*

### 1. Matériels et réactifs

- une microplaque à fond rond et un film autocollant,
- 2 tubes à hémolyse avec bouchon,
- un tube de «tampon de sensibilisation» (5 mL),
- un tube de «tampon PBS» pH 7,2 (15 mL),
- solution de «toxine T» (1,5 mL),
- sérum de lapin immunisé (préalablement adsorbé sur des hématies et déjà dilué au 1/1250), étiqueté «S 1/1250» (200  $\mu$ L),
- «contrôle positif» (100  $\mu$ L),
- «acide tannique» (1,5 mL),
- globules rouges de mouton (formolés) à 2,5 % en PBS étiquetés «GRM à 2,5 %» (2,5 mL),
- «PBS-PVP» (solution de polyvinylpyrrolidone à 0,35 % dans le tampon PBS) (2,5 mL).

### 2. Mode opératoire

#### 2.1. Sensibilisation des hématies

- Préparer, en parallèle, dans deux tubes à hémolyse, des GRS (globules rouges sensibilisés par la toxine T) et des GRNS (globules rouges non sensibilisés).
- Dans chaque tube à hémolyse en plastique, introduire :
  - 1 mL de suspension de globules rouges à 2,5 %
  - 0,5 mL de tampon PBS
  - 0,5 mL d'acide tannique
- Boucher et agiter par retournements pendant 3 minutes.
- Centrifuger à 1700 g pendant 3 minutes. Eliminer le surnageant par décantation.
- Reprendre chaque culot par 1 mL de tampon de sensibilisation. Remettre en suspension.
- Ajouter 1 mL de toxine T dans le tube GRS et 1 mL de tampon PBS dans le tube GRNS.
- Agiter par quelques retournements, puis sur un agitateur à plateau horizontal à 170 tours par minute pendant 5 minutes (éventuellement, cette agitation peut être une homogénéisation manuelle continue par rotation du poignet pendant 5 minutes). Laisser reposer pendant 10 minutes.
- Centrifuger à 1700 g pendant 3 minutes. Rejeter les surnageants.
- Remettre en suspension chaque culot dans 2 mL de tampon PBS. Centrifuger. Rejeter les surnageants et répéter ce lavage. Centrifuger. Rejeter les surnageants.
- Remettre enfin chaque culot en suspension dans 1 mL de PBS-PVP : on obtient ainsi les GRS et GRNS à 2,5 %.

#### 2.2. Technique

- Répartir dans une microplaque à fond rond :

									Rejeter	Rejeter	Rejeter	
										75 $\mu$ L	75 $\mu$ L	75 $\mu$ L
Cupule	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
Tampon PBS (en $\mu$ L)	75	75	75	75	75	75	75	75	75	75	75	75
Sérum à doser préalablement dilué (en $\mu$ L)	75											75
Redistribution (en $\mu$ L)	---	75	75	75	75	75	75	75	75	---	---	---
Contrôle positif (en $\mu$ L)	---	---	---	---	---	---	---	---	---	75	---	---
GRS à 2,5% (en $\mu$ L)	50	50	50	50	50	50	50	50	50	50	50	---
GRNS à 2,5% (en $\mu$ L)	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	50

- Recouvrir la plaque d'un film autocollant. Agiter par tapotements latéraux sur la plaque puis par mouvements rotatifs.
- Laisser incuber à l'abri de toute vibration à température ambiante pendant 1 heure 30 à 2 heures.

### 2.3. Lecture et interprétation

2 + : agglutination avec tapis uni d'hématies couvrant le fond du puits 1 + : agglutination avec tapis uni d'hématies un peu rétracté avec ou sans bouton résiduel -- : bouton de sédimentation avec surnageant incolore
--

Le titre correspond à l'inverse de la plus haute dilution donnant une réaction à 1 +.

FORMULES ANTIGÉNIQUES DES SÉROTYPES DE SALMONELLA LES PLUS  
FRÉQUEMMENT RENCONTRÉS EN FRANCE  
(Extrait du tableau de Kauffmann-White)

DOCUMENT 2

N	Sérotype.	Antigène 0	Antigène H	
			Phase 1	Phase 2
		<b>Groupe A</b>		
	<i>S. Paratyphi A</i>	<u>1</u> , 2, 12	a	
		<b>Groupe B</b>		
10	<i>S. Paratyphi B</i>	<u>1</u> , 4, (5), 12	b	1, 2
	<i>S. Wien</i>	<u>1</u> , 4, 12, <u>27</u>	b	1, w
	<i>S. Schwanengrund</i>	<u>1</u> , 4, 12, <u>27</u>	d	1, 7
	<i>S. Duisburg</i>	<u>1</u> , 4, 12, <u>27</u>	d	e, n, z15
	<i>S. Saint-Paul</i>	<u>1</u> , 4, 12	e, h	1, 2
14	<i>S. Derby</i>	<u>1</u> , 4, (5), 12	f, g	
	<i>S. Agona</i>	<u>1</u> , 4, 12	f, g, s	
1	<i>S. Typhimurium</i>	<u>1</u> , 4, (5), 12	i	1, 2
15	<i>S. Bredeney</i>	<u>1</u> , 4, 12, <u>27</u>	l, v	1, 7
13	<i>S. Brandenburg</i>	<u>1</u> , 4, 12	l, v	e, n, z15
11	<i>S. Heildeberg</i>	<u>1</u> , 4, (5), 12	r	1, 2
	<i>S. Coeln</i>	4, 5, 12	y	1, 2
		<b>Groupe C1</b>		
	<i>S. Oslo</i>	6, 7	a	e, n, x
	<i>S. Paratyphi C</i>	6, 7 (Vi)	c	1, 5
	<i>S. Cholerae suis</i>	6, 7	c	1, 5
	<i>S. Larochele</i>	6, 7	e, h	1, 2
	<i>S. Montevideo</i>	6, 7	g, m, s	
	<i>S. Thompson</i>	6, 7	k	1, 5
7	<i>S. Infantis</i>	6, 7	r	1, 5
6	<i>S. Virchow</i>	6, 7	r	1, 2
		<b>Groupe C2</b>		
	<i>S. Manhattan</i>	6, 8	d	1, 5
9	<i>S. Newport</i>	6, 8	e, h	1, 2
	<i>S. Kottbus</i>	6, 8	e, h	1, 5
2	<i>S. Bovismorbificans</i>	6, 8	r	1, 5
	<i>S. Hadar</i>	6, 8	z10	e, n, x
		<b>Groupe D</b>		
5	<i>S. Panama</i>	<u>1</u> , 9, 12	l, v	1, 5
4	<i>S. Typhi</i>	9, 12, (Vi)	d	
3	<i>S. Enteritidis</i>	<u>1</u> , 9, 12	g, m	
8	<i>S. Dublin</i>	<u>1</u> , 9, 12 (Vi)	g, p	
	<i>S. Goettingen</i>	9, 12	l, v	e, n, z15
	<i>S. Gallinarum</i>	<u>1</u> , 9, 12		
		<b>Groupe E</b>		
12	<i>S. Anatum</i>	3, 10	e, h	1, 6
	<i>S. Meleagridis</i>	3, 10	e, h	1, w
	<i>S. Senftenberg</i>	1, 3, 19	g, s, t	
	<i>S. London</i>	3, 10	l, v	1, 6
	<i>S. Give</i>	3, 10	l, v	1, 7
		<b>Groupe G</b>		
	<i>S. Tel-el-kebir</i>	13, 23	d	e, n, z15
	<i>S. Kedougou</i>	<u>1</u> , 13, 23	i	1, w
	<i>S. Worthington</i>	<u>1</u> , 13, 23	z	1, w

Les facteurs soulignés ou entre parenthèses peuvent être absents.

Les chiffres de la colonne N correspondent à l'ordre de fréquence d'isolement des 15 sérotypes les plus fréquents des souches isolées de l'homme en France.

OMA : groupes A, B, D, E et L OMB : groupes C, F, G et H OMC : groupes rares en France

### DOCUMENT 3

Valeurs de référence de la numération des leucocytes et de la formule leucocytaire chez l'adulte

<b>Cellules</b>	<b>Nombre absolu x 10<sup>9</sup> par litre de sang</b>
<b>Leucocytes</b>	<b>4 à 10</b>
<b>Polynucléaires neutrophiles</b>	<b>1,7 à 7</b>
<b>Polynucléaires éosinophiles</b>	<b>0,05 à 0,5</b>
<b>Polynucléaires basophiles</b>	<b>0,01 à 0,05</b>
<b>Lymphocytes</b>	<b>1,5 à 4</b>
<b>Monocytes</b>	<b>0,1 à 1</b>

## DOCUMENT 4

### COLORATION PAR LA TECHNIQUE DE MAY-GRUNWALD GIEMSA

#### Technique :

L'eau utilisée pour diluer les colorants doit être neutre. Elle est préparée extemporanément et fournie au candidat.

- Fixation :

Placer la lame horizontalement sur un support et la recouvrir de colorant de MAY-GRUNWALD.

Laisser agir 3 minutes.

- Première étape de coloration :

Ajouter un volume d'eau neutre sur la lame de façon à diluer le colorant de MAY-GRUNWALD au demi. Le mélange est spontané.

Laisser agir 1 minute.

- Seconde étape de coloration :

Préparer extemporanément 25 mL de colorant de GIEMSA au 1/5<sup>ème</sup> en eau neutre et verser dans une boîte de Laveran.

Après avoir rejeté le colorant de MAY-GRUNWALD, placer la lame dans la boîte, frottis en dessous, et laisser agir 10 minutes.

- Rinçage :

Rincer modérément la lame, essuyer l'envers et laisser sécher.

