

CALULATRICE AUTORISEE

RENDRE LE SUJET AVEC LA COPIE

Mirabelle consulte une nouvelle fois !

Son médecin rédige une ordonnance pour un bilan sanguin et urinaire.

Mirabelle dépose un prélèvement d'urine jaune et trouble et un prélèvement de son sang est effectué au laboratoire.

Un technicien du laboratoire d'analyses médicales réalise

- Le dosage du glucose dans les urines et le sérum,
- Le dosage des protéines dans le sérum,
- Le dénombrement de leucocytes urinaires,
- L'analyse bactériologique des urines.

Il dresse un rapport d'analyses qui sera remis à Mirabelle et à son médecin.

1. Dosage des protéines sériques

Principe du dosage

En milieu basique, les ions cuivriques Cu^{2+} forment un complexe bleu-violet avec les composés contenant au moins deux groupements voisins du type $-\text{CO}-\text{NH}-$ ou $-\text{CO}-\text{NH}_2$. Cette coloration se développe en particulier avec le biuret $\text{NH}_2-\text{CO}-\text{NH}-\text{CO}-\text{NH}_2$. L'intensité de la coloration obtenue est proportionnelle à la concentration en protéines, dans la limite de validité de la loi de Beer Lambert.

Une gamme d'étalonnage et des essais sont réalisés simultanément.

- 1.1. Compléter le tableau de manipulation et de résultats du **document 1**. Justifier par un calcul pour chaque ligne.
- 1.2. Décrire le protocole de réalisation d'une dilution au $1/10^{\text{ème}}$ de 2 mL de sérum humain.
- 1.3. Déterminer, à l'aide du **document 2** la zone de validité de la loi de Beer Lambert pour ce dosage.
- 1.4. Utiliser la courbe d'étalonnage pour déterminer la concentration massique en protéines du sérum non dilué pour les 2 essais.
- 1.5. A l'aide du logigramme du **document 3** et du s_r , exprimer le résultat du dosage des protéines dans le sérum.
($s_r = 2,1 \text{ g/L}$)

2. Dosage du glucose dans l'urine et le sérum de Mirabelle

Le dosage du glucose, **document 4**, met en jeu deux enzymes : la glucose oxydase et la peroxydase.

- 2.1. Indiquer le nom et la formule chimique des substrats de la glucose oxydase.
- 2.2. Indiquer le nom des produits de la réaction à la peroxydase mise en jeu dans ce kit.
- 2.3. Le phénol présente sur son emballage un étiquetage avec des pictogrammes **document 5**. Que signifient ces 3 pictogrammes?
- 2.4. Quel est l'intérêt de produire à partir du glucose de la quinonéimine ?

La mesure s'effectue avec un spectrophotomètre.

- 2.5. Annoter le **document 6**.
- 2.6. Le suivi du dosage est réalisé à $\lambda_{\text{max}} = 505 \text{ nm}$. Comment déterminer λ_{max} ? Indiquer la fonction mathématique à représenter $y = f(x)$ pour l'identifier.
- 2.7. Pour réaliser une quantification au spectrophotomètre, il faut se placer dans les conditions de validité de la loi de Beer Lambert.
 - 2.7.1. Relever la phrase du **document 4** qui montre que dans certaines conditions, ce dosage spectrophotométrique suit la loi de BEER LAMBERT.
 - 2.7.2. Indiquer la loi de BEER LAMBERT (symboles, significations et unités).

2.7.3. Recopier et compléter le tableau suivant.

	Glucose mmol/L
Limite inférieure de quantification	
Limite supérieure de quantification	
Intervalle de mesure	

Le **document 7** présente les résultats expérimentaux du dosage du glucose dans le sérum et l'urine de Mirabelle.

Etude de la concentration en glucose dans les urines de Mirabelle

- 2.8. Déterminer, par le calcul, la concentration molaire de glucose dans l'urine de Mirabelle.
- 2.9. Quelle est la concentration en glucose de l'urine en conditions physiologiques normales ?

Etude de la concentration en glucose dans le sérum de Mirabelle

- 2.10. Calculer la concentration molaire du sérum.
- 2.11. Relever le facteur de conversion sur le **document 4**, justifier ce facteur de conversion.
- 2.12. Calculer la concentration massique en glucose du sérum en g/L.
- 2.13. Une erreur grossière a été faite lors d'un précédent dosage. Citer deux sources d'erreurs grossières.

3. Dénombrement des leucocytes dans l'urine

Les leucocytes (globules blancs) sont dénombrés dans l'urine sur cytomètre de Malassez. Pour cela, la chambre de Malassez est remplie et observée à l'objectif x40 au microscope optique. Le **document 8** présente les résultats de comptage obtenus par rectangle de Malassez.

Rappel : Le volume total de la chambre de Malassez est de $1 \mu\text{L}$ (soit 10^{-3} mL) et elle est composée de 100 rectangles.

- 3.1. Calculer le nombre moyen de leucocytes par rectangle de Malassez.
- 3.2. Calculer le volume d'un rectangle en μL puis en mL.
- 3.3. Calculer le Nombre de leucocytes par mL d'urine analysée.

4. Analyse bactériologique de l'urine

Afin de rechercher des contaminants, on isole l'urine sur un milieu sélectif Drigalski.

- 4.1. Compléter le **document 9**.
- 4.2. Après 24 h d'incubation, on obtient le résultat sur le **document 10**: lire les résultats.
- 4.3. A l'aide des **documents 9 et 10**, proposer les micro-organismes suspectés.
- 4.4. Une colonie suspecte a donc été ensemencée sur galerie API 20^E.
A l'aide du profil biochimique de la souche (**document 11**) et d'un extrait du tableau d'identification API (**document 12**), procéder à l'identification du contaminant retrouvé dans l'urine, en expliquant votre démarche.

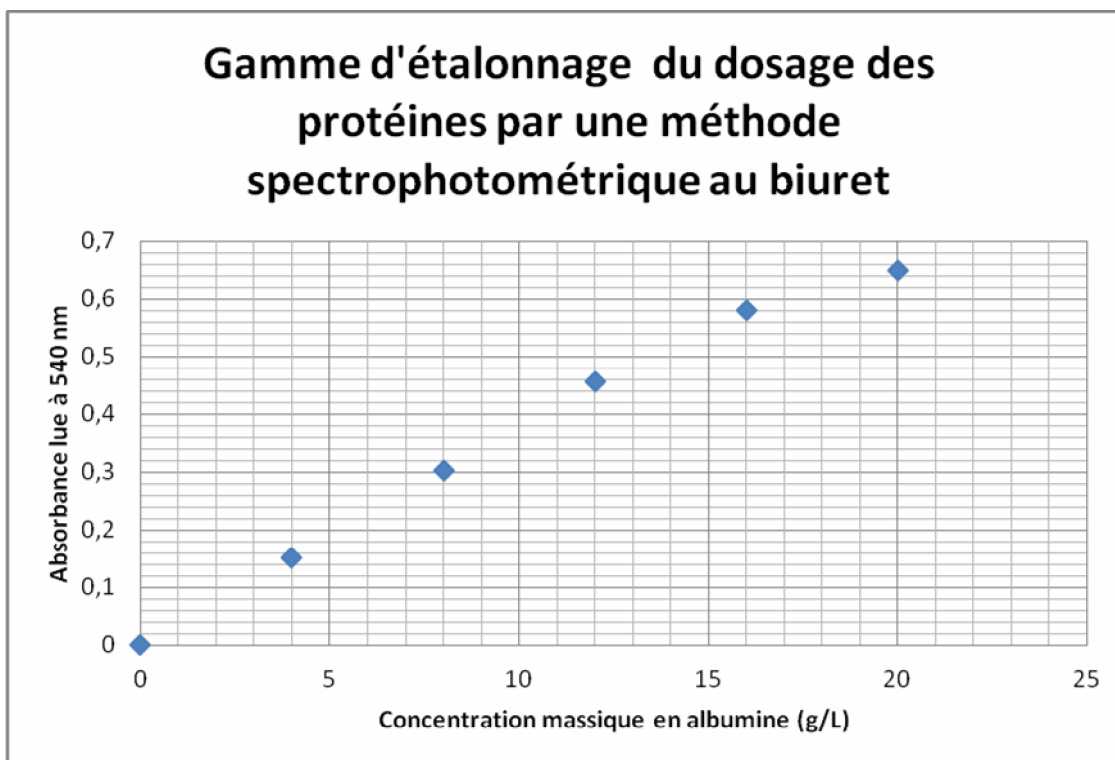
5. Rapport d'analyses

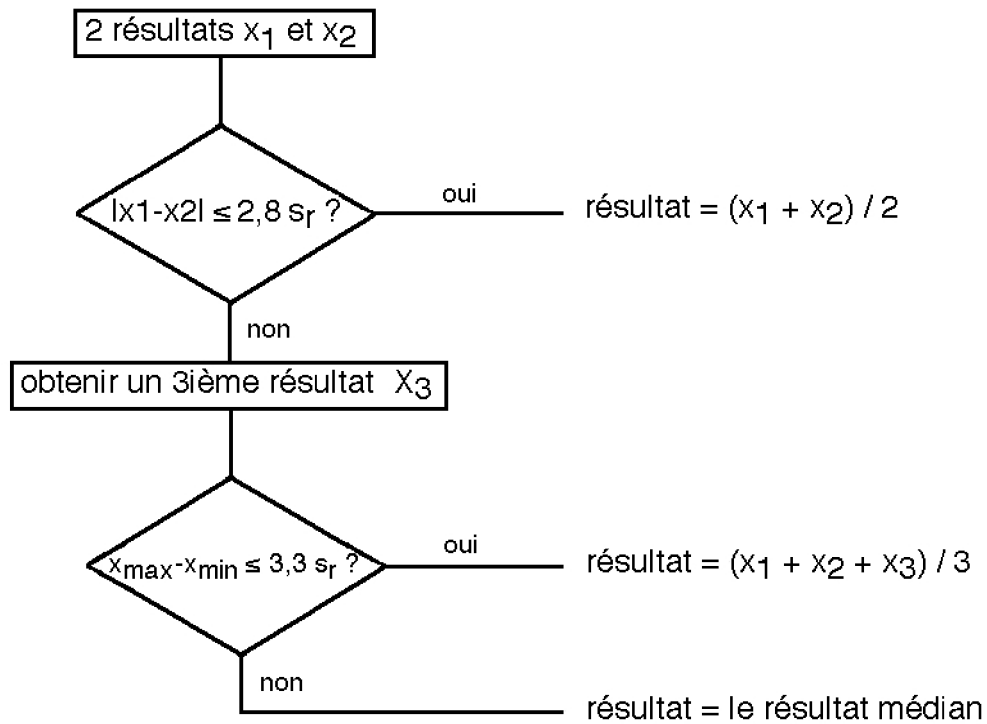
- 5.1. Compléter le rapport d'analyses (**document 13**) qui sera donné à la patiente.

Document 1 Tableau de manipulation et de résultats du dosage des protéines par méthode spectrophotométrique au biuret.

Tube	0	1	2	3	4	5	Essai 1	Essai 2
Volume de solution albumine à 40 g/L (mL)								
Volume d'eau physiologique qsp 2mL								
Sérum dilué au 1/10ème							2	2
Concentration massique de solution d'albumine dans le tube g/L	0	4	8	12	16	20		
Réactif de Gornall	Ajouter 8 mL dans chaque tube, homogénéiser et incuber à température ambiante 20 minutes à l'obscurité							
Absorbance lue à 540 nm	0,00	0,151	0,302	0,456	0,580	0,650	0,200	0,220

Document 2

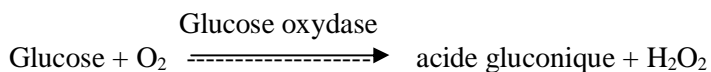


Document 3 Logigramme pour l'expression d'un résultat final accompagné de son incertitude

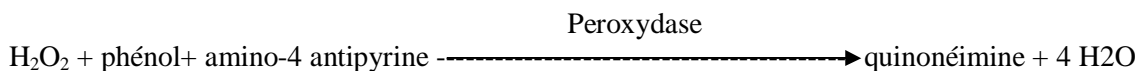
Document 4 Glucose RTU

PRINCIPE

Le glucose ($M_{\text{glucose}} = 180 \text{ g/mol}$) est dosé en utilisant la séquence de deux réactions enzymatiques



L'eau oxygénée (H_2O_2) formée est dosée selon la réaction suivante dite réaction de Trinder :



L'intensité de la coloration rose (quinonéimine), mesurée à 505 nm est proportionnelle à la concentration en glucose présente dans l'échantillon.

MODE OPERATOIRE MANUEL

Réalisation du test

Longueur d'onde 505 nm
Zéro l'appareil Blanc réactif

	Blanc réactif	Etalon	Dosage
Etalon	-	10 μL	-
Echantillon	-	-	10 μL
Réactif -Glucose RTU®	1 mL	1 mL	1 mL

Mélanger et lire au spectrophotomètre après une incubation de 10 minutes à 37 °C

RESULTATS ET INTERPRETATION

Calculs

$$\text{Concentration de l'échantillon} = \frac{\text{Absorbance de l'échantillon}}{\text{Absorbance de l'étalon}} \times \text{concentration de l'étalon}$$

FACTEUR DE CONVERSION

$$\text{mmol/L} \times 0.180 = \text{g/L}$$

VALEURS ATTENDUES

Sérum ou plasma

	mmol/L	g/L
Enfants	3.30-5.60	0.59-1.01
Femmes	4.10-5.90	0.74-1.06
Hommes	4.20-6.10	0.76-1.10

Urines

En conditions physiologiques normales, le glucose n'est pas retrouvé dans les urines.

PERFORMANCES

Limite inférieure de quantification

Elle a été déterminée à partir de dosages effectués sur de l'eau déminéralisée. La limite de détection est égale à 0.07 mmol/L

Limite supérieure de quantification Le réactif est linéaire jusqu'à 22.2 mmol de glucose/L

Document 5

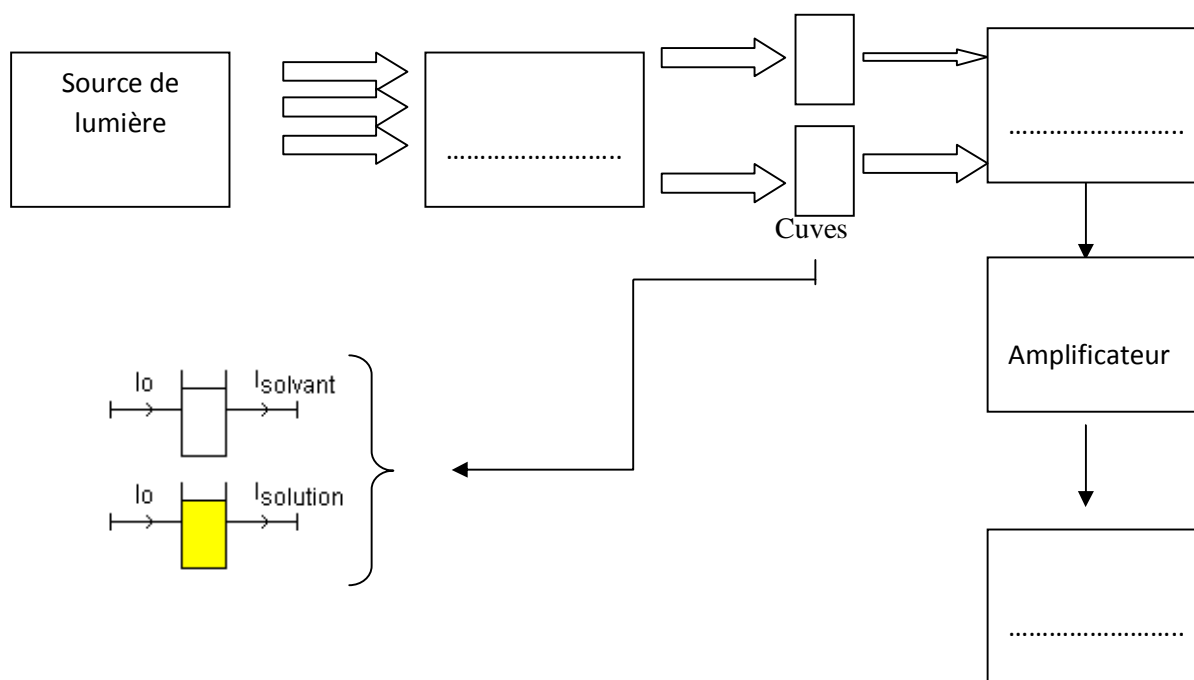
Pictogrammes sur un emballage d'une solution de phénol pur



PHÉNOL

Document 6

Principe de fonctionnement du spectrophotomètre



Document 7 tableau de résultats bruts de dosage du glucose

	Absorbance mesurée à 505 nm
Etalon de glucose à 10 mmol/L	0.510
Echantillon d'urine	0.000
Echantillon de sérum de Mirabelle	0.251
Blanc du réactif	0.000

Document 8 : Résultats du comptage des leucocytes dans l'urine sur Malassez

N° rectangle	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Nombre de leucocytes comptés	22	19	25	24	15	17	23	28	26	16

Document 9 : La gélose Drigalski

Composition pour 1 L :

Peptones	15 g
Extrait de viande	3 g
Désoxycholate de sodium	1 g
Lactose	15 g
Bleu de bromothymol	80 mg
Agar	11 g

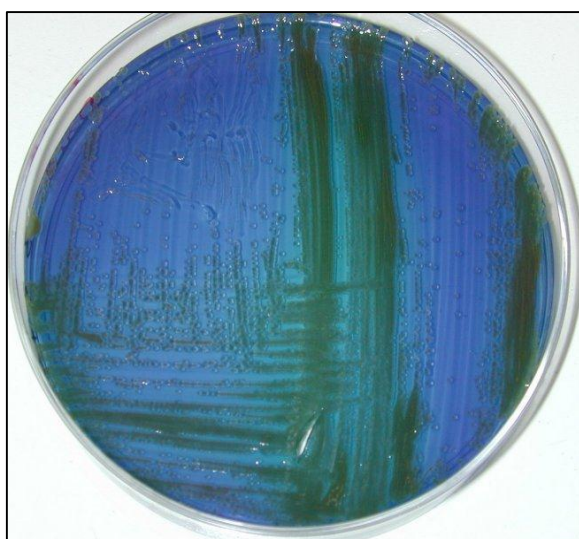
Principe :

- La gélose Drigalski est utilisée pour l'isolement sélectif des entérobactéries. Elle permet la différenciation des bactéries suivant leur aptitude à utiliser le Na_2CO_3 .
- Le développement des bactéries à Gram positif est inhibé en présence de désoxycholate de sodium.
- La fermentation du lactose se traduit par une production d'acide qui entraîne le virage au rouge du bleu de bromothymol.

Lecture :

Les bactéries lactose-positif (*Escherichia coli*, *Klebsiella*, *Enterobacter*) présentent des colonies de couleur rouge. Les bactéries lactose-négatif (*Salmonella*, *Shigella*, *Proteus*, *Providencia*, *Pseudomonas*) donnent des colonies incolores.

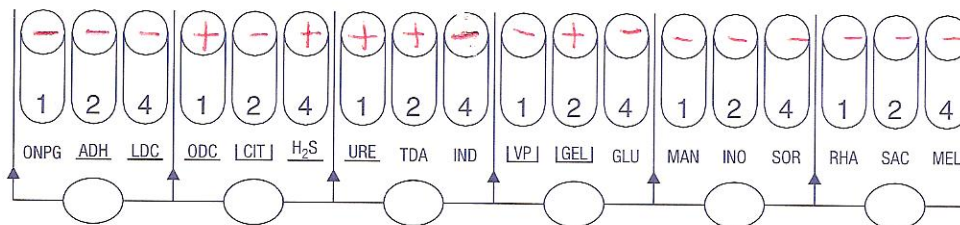
Document 10 : Résultat de l'isolement de l'urine sur gélose Drigalski



Document 11: Profil biochimique d'une colonie suspecte isolée sur Drigalski



Origine / Source / Herkunft /
 Origen / Origem / Προέλευση /
 Ursprung / Oprindelse / Pochodzenie :



Document 12 : Extrait du tableau API avec % de positivité de chaque test

TEST	ONPG	ADH	LDC	ODC	CIT	H2S	URE	TDA	IND	VP	GEL	GLU	MAN	INO	SOR	RHA	SAC	MEL
<i>E. coli</i>	88	5	74	70	0	3	2	0	89	0	0	99	97	3	90	82	41	67
<i>Salmonella spp</i>	3	70	96	95	75	85	0	0	0	0	0	99	97	30	93	93	2	78
<i>Proteus mirabilis</i>	1	2	1	98	45	83	98	98	2	4	74	96	1	0	1	1	0	0
<i>Klebsiella oxytoca</i>	89	0	80	0	89	0	78	0	99	44	0	99	99	98	99	98	98	99
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	0	87	0	0	92	0	35	0	0	2	80	60	1	2	1	4	2	11

Ex : 74 signifie 74% de probabilité d'avoir un test positif

Document 13 : Rapport d'analyse

Laboratoire du lycée Senghor

RAPPORT D'ANALYSES

Date : 20/04/2012

Nom du patient :

Analyse	Résultat	Norme
Aspect de l'urine		Jaune clair limpide
Glycosurie (Concentration en glucose dans l'urine)		0 mmol/L
Nombre de Leucocytes/mL d'urine		< 10 000 /mL
Recherche de contaminant		Urine stérile
Glycémie (Concentration en glucose dans le sang)		4,1 à 5,9 mmol/L
Protéïnémie (Concentration en protéines dans le sérum)		64 à 82 g/L

CONCLUSION :

Analyses effectuées par :

Éléments de correction

6. Dosage du glucose dans l'urine et le sérum de Mirabelle

6.1. Etude du kit de dosage du glucose

Lire le **document 1** et répondre aux questions suivantes

6.1.1. le dosage du glucose, **document 1**, met en jeu deux enzymes : la glucose oxydase et la peroxydase

6.1.1.1. Indiquer le nom et la formule chimique des substrats de la glucose oxydase.

Glucose $C_6H_{12}O_6$
(Di ??)oxygène O_2

6.1.1.2. Indiquer le nom des produits de la réaction à la peroxydase mise en jeu dans ce kit.

Quinonéimine
Eau H_2O

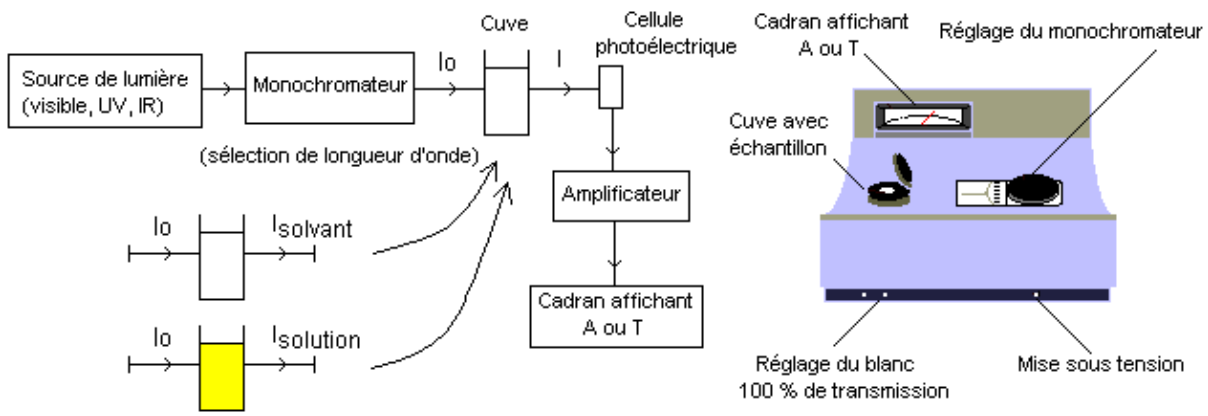
6.1.1.3. Le phénol présente sur son emballage un étiquetage avec des pictogrammes **document 2**. Que signifient ses 3 pictogrammes?

6.1.1.4. Quel est l'intérêt de produire à partir du glucose de la quinonéimine ?

La quinonéimine est un produit coloré rose
L'intensité de la coloration rose est proportionnelle à la quantité de glucose présente dans l'échantillon.

6.1.2. La mesure s'effectue avec un spectrophotomètre

6.1.2.1. Annoter le document 3



L'absorbance de l'espèce colorée B pour la longueur d'onde λ est :
 $A_B(\lambda) = \log (I_{\text{solvant}} / I_{\text{solution}})$
 Réglage du blanc: en présence de la cuve avec le solvant "transparent", on fait afficher $A = 0$ sur le cadran.
 En présence de la cuve avec la solution contenant l'absorbant B, le cadran donnera directement $A_B(\lambda)$.

6.1.2.2. Le suivi du dosage est réalisé à $\lambda_{\text{max}} = 505 \text{ nm}$. Comment déterminer λ_{max} ?

Indiquer la fonction mathématique à représenter $y = f(x)$

- Pour chaque longueur d'onde mesurer l'absorbance.
- Tracer un spectre Absorbance = f (longueur d'onde)
- Déterminer la longueur d'onde pour laquelle l'absorbance est maximale

6.1.2.3. Souvent lors d'un dosage spectrophotométrique, la loi de Beer Lambert est vérifiée

6.1.2.3.1. Relever la phrase du **document 1** qui montre que dans certaines conditions, ce dosage spectrophotométrique suit la loi de BEER LAMBERT

L'intensité de la coloration rose est proportionnelle à la concentration molaire de glucose présente dans l'échantillon.

6.1.2.3.2. Indiquez la loi de BEER LAMBERT (symbole, signification et unité)

Absorbance à une longueur d'onde donnée (sans unité)

= coef linéique molaire ($L \cdot mol^{-1} \cdot cm^{-1}$) x longueur de la cuve (cm) x Concentration molaire (mol/L)

6.1.2.4. Recopier et compléter le tableau suivant

	Glucose mmol/L
Limite inférieure de quantification	0.07
Limite supérieure de quantification sans dilution de l'échantillon	22.2
Intervalle de mesure	22.13

6.1.3. Etude de la concentration en glucose dans le sérum et dans l'urine d'une patiente : Mirabelle

Le **document 4** présente les résultats expérimentaux de dosage du glucose dans le sérum et l'urine de Mirabelle

6.1.3.1. Etude de la concentration en glucose dans les urines d'une patiente

6.1.3.1.1. Déterminer, par le calcul, la concentration molaire de glucose dans l'urine de Mirabelle.

$0.000 \times \text{concentration étalon} / A \text{ étalon} = 0$

6.1.3.1.2. Quelle est la concentration en glucose de l'urine en conditions physiologiques normales ? **nulle**

6.1.3.1.3. Comparer la concentration molaire en glucose dans l'urine de la patiente et la valeur attendue. Conclure.

Urine ne contient pas de glucose, conditions physiologiques normales

6.1.3.2. Etude de la concentration en glucose dans le sérum de Mirabelle

6.1.3.2.1. Etude de la concentration molaire en glucose du sérum de mirabelle

6.1.3.2.1.1. Calculer la concentration molaire du sérum

$0.251 \times 10 / 0.502 = 5 \text{ mmol /L}$

6.1.3.2.1.2. Relever le facteur de conversion sur le **document 1**, justifier ce facteur de conversion.

$C_{\text{glucose dans solution}} \times 10^{-3} \times M_{\text{glucose}} = C \times 0.001 \times 180 = \text{glucose dans la solution}$

6.1.3.2.1.3. Calculer la concentration massique en glucose du sérum en g/L.

$\text{glucose dans la solution} = C \times 0.180 = \text{g/L}$

6.1.3.2.1.4. Comparer le résultat de ce dosage aux valeurs attendues et conclure

Valeur attendue 4,10 à 5,90 mmol/L ou 0.74 à 1.06 g/L

Valeur obtenue comprise dans l'intervalle

Conditions physiologiques normales

6.1.3.3. Une erreur grossière a été réalisée lors d'un précédent dosage. Citer deux sources d'erreurs grossières.

Toutes réponses cohérentes

7. Dosage des protéines sériques

Principe du dosage

En milieu basique, les ions cuivriques Cu^{2+} forment un complexe bleu-violet avec les composés contenant au moins deux groupements voisins du type $-\text{CO}-\text{NH}-$ ou $-\text{CO}-\text{NH}_2$.

Cette coloration se développe en particulier avec le biuret : $\text{NH}_2-\text{CO}-\text{NH}-\text{CO}-\text{NH}_2$ d'où son appellation de méthode du Biuret.

L'intensité de la coloration obtenue est proportionnelle à la concentration en protéines, dans la limite de validité de la loi de Beer Lambert.

7.1. Une gamme d'étalonnage et des essais sont réalisés simultanément

7.1.1. Compléter le tableau de manipulation et de résultats du **document 5**. Justifier par un calcul pour chaque ligne.

Tube	0	1	2	3	4	5	Essai 1	Essai 2
Volume de solution albumine à 40 g/L (mL)	0	0.2	0.4	0.6	0.8	1		
Volume d'eau physiologique qsp 2mL	2	1.8	1.6	1.4	1.2	1		
Sérum dilué au 1/10 ^{ème}							2	2
Concentration massique de solution d'albumine dans le tube g/L	0	4	8	12	16	20		
Réactif de Gornall	Ajouter 8 mL dans chaque tube, homogénéiser et incuber à température ambiante 20 minutes à l'obscurité							
Absorbance lue à 540 nm	0.00	0.151	0,302	0,456	0,604	0,7	0.200	0.220

- $VPE = \text{albumine tube} \cdot VT / \text{albumine mère}$

Tube 1 : $VPE = 4 \cdot 2 / 40 = 0.2 \text{ mL}$

- $Veau = 2 - VPE$

Tube 1 $Veau = 2 - 0.2 = 1.8$

7.1.2. Décrire le protocole de réalisation d'une dilution au $1/10^{\text{ème}}$ de 2 mL de **sérum humain**.

Gants pour ouvrir le tube de sérum, prélever 2 mL à la pipette jaugée, introduire dans fiole jaugée de 20 mL compléter au trait de jauge homogénéiser. Vider dans un bécher et décontaminer le matériel.

7.1.3. Déterminer, à l'aide du **document 6** la zone de validité de la loi de Beer Lambert pour ce dosage.

De 0 à 12

7.1.4. Utiliser la courbe d'étalonnage pour déterminer la concentration massique en protéines du **sérum non dilué** pour les 2 essais.

Droite étalonnage, report visible,

Essai 1 :

Essai 2 :

7.1.5. A l'aide du logigramme du **document 7** et du s_R , exprimer le résultat du dosage des protéines dans le sérum. ($s_r = 2,1 \text{ g/L}$)