

**BREVET DE TECHNICIEN SUPÉRIEUR
BIOANALYSES ET CONTRÔLES**

1^{er} JOUR

Durée de l'épreuve : 3 H30

Épreuve E5 - Unité U52

Techniques de microbiologie

Au cours de l'épreuve, le jury appréciera les qualités d'organisation, le respect des règles d'hygiène et de sécurité en laboratoire.

Pour une bonne réalisation de l'épreuve, une gestion optimale du temps imparti est nécessaire en fonction des temps d'incubation. Le candidat prendra soin de bien lire l'ensemble du sujet avant de commencer les manipulations.

Documents interdits - Calculatrice autorisée

ÉPREUVE E5. UNITÉ U52
Techniques de microbiologie
1^{ER} JOUR

CONTRÔLE DE L'ACTIVITÉ BACTÉRICIDE D'UN
DÉSINFECTANT PAR MÉTHODE DE
DILUTION-NEUTRALISATION.

Le service contrôle-qualité d'une coopérative laitière doit tester l'activité bactéricide du désinfectant employé pour décontaminer les sols dans la salle de fabrication des yaourts. Ce test doit se faire en respectant les conditions définies dans la **norme AFNOR : NF EN 1276**.

Cette norme préconise de contrôler l'activité bactéricide du produit suivant la méthode par dilution-neutralisation, en présence de substance interférente, pour 4 souches différentes :

- | | |
|---------------------------------|------------|
| - <i>Pseudomonas aeruginosa</i> | ATCC 15442 |
| - <i>Escherichia coli</i> | ATCC 10536 |
| - <i>Staphylococcus aureus</i> | ATCC 6538 |
| - <i>Enterococcus hirae</i> | ATCC 10541 |

Substance interférente : résidus de matières organiques issus du lait pouvant gêner l'activité bactéricide du désinfectant.

Avant de tester l'activité du désinfectant sur une souche, un certain nombre de contrôles sont à effectuer :

- contrôler l'identité de la souche de référence fournie (étape 1),
- contrôler la concentration de la suspension calibrée (étape 2),
- tester l'activité du désinfectant sur la souche de référence (étape 3),
- contrôler l'absence d'inhibition du neutralisant sur la souche test (étape 4),
- valider l'action du neutralisant sur le produit désinfectant (étape 5),

1 - Contrôle de l'identité de la souche de référence. (21 points)

1.1 - Matériel et réactifs :

- Culture pure d'une des quatre souches de référence mentionnées ci-dessus, notée « Réf ».
- 1 tube d'eau distillée stérile 10 mL.
- 1 tube à hémolyse.
- Colorants de Gram.
- Disque « oxydase » et peroxyde d'hydrogène.

1.2 - Mode opératoire et compte rendu.

Contrôler l'identité de la souche de référence « Réf » en réalisant une coloration de Gram et un test enzymatique.

Présenter à un examinateur un champ microscopique,
accompagné du compte rendu de l'observation.
Réaliser le test enzymatique en présence d'un examinateur.

Proposer une orientation pour la souche « Réf » et suggérer une micro-galerie et milieux associés permettant de confirmer le genre et l'espèce de cette souche.

La proposition de micro-galerie est à présenter à un examinateur 30 minutes
au moins avant la fin de l'épreuve.

Ensemencer la galerie et les milieux distribués.

2 - Contrôle de la suspension bactérienne d'essai - dénombrement. (27 points)**2.1 - Matériel et réactifs :**

- Suspension pure, notée « Réf ».
- 2 tubes tryptone-sel 10 mL, notés « diluant 10 mL ».
- 1 tube à essai stérile.
- 7 tubes de tryptone-sel 9 mL, notés « diluant 9 mL ».
- 8 pipettes 1 mL et dispositif d'aspiration.
- 1 vortex.
- 3 microcuvettes de spectrophotomètre.
- 1 spectrophotomètre réglé à 600 nm.
- 4 boîtes de Pétri stériles.
- 60 mL de gélose TSA (tryptone Soja Agar) en surfusion en bain thermostaté à 45°C.

2.2 - Mode opératoire.

Une suspension initiale, réalisée en eau physiologique, notée « Réf » est fournie à une concentration proche de $2 \cdot 10^8$ bactéries/mL.

Mesurer la densité optique de cette suspension et calculer sa concentration, en tenant compte des données fournies par le centre d'examen (correspondance $DO_{600 \text{ mm}}$ / concentration bactérienne, limite de linéarité).

Ajuster, si nécessaire, la suspension bactérienne à une concentration comprise entre $1,5 \cdot 10^8$ et $2 \cdot 10^8$ bactéries / mL.

La suspension ainsi préparée est nommée par la suite « suspension d'essai ».

Préparer en tryptone-sel une gamme de dilution de raison 1/10 de la **suspension d'essai** allant jusqu'à 10^{-7} .

Prélever un échantillon de 1,0 mL des dilutions 10^{-6} et 10^{-7} , en double. Transférer chaque échantillon de 1,0 mL dans des boîtes de Pétri distinctes et ajouter 12 mL à 15 mL de gélose TSA en surfusion, refroidie à 45°C.

Incuber les boîtes à 37 °C pendant 24 h.

Effectuer une dilution en présence d'un examinateur**2.3 - Compte rendu.**

Expliquer les différentes étapes de la réalisation de la suspension d'essai (justifier les calculs).

3 - Test de l'activité du désinfectant sur la souche de référence (13 points)**3.1 - Matériel et réactifs :**

- 10 mL de lait écrémé dilué à 10 %, noté « substance interférente ».
- 30 mL de neutralisant en flacon, noté « neutralisant ».
- 20 mL de désinfectant pour le sol à 1,25 fois sa concentration d'utilisation, noté « désinfectant ».
- 1 tube eau stérile 15 mL, noté « eau stérile ».
- 2 tubes à essai stériles.
- 5 pipettes 1 mL et dispositif d'aspiration.
- 2 pipettes 10 mL.
- 1 vortex.
- 1 chronomètre.
- 2 boîtes de Pétri stériles.
- 30 mL de gélose TSA en surfusion en bain thermostaté à 45 °C.

3.2 - Mode opératoire.

Réaliser, au préalable, un organigramme qui sera présenté dans le compte rendu.

Utiliser la **suspension d'essai** préparée en 2.2 (suspension ajustée entre $1,5 \cdot 10^8$ et $2,0 \cdot 10^8$ bactéries par mL).

Dans un tube à essai stérile, placer 1,0 mL de substance interférente, 1,0 mL de suspension d'essai. Homogénéiser et laisser en contact pendant 2 minutes.

À la fin du temps de contact, ajouter 8,0 mL de désinfectant. Déclencher immédiatement le chronomètre, mélanger et laisser en contact pendant 5 minutes.

Juste avant la fin du temps de contact, mélanger, puis transférer ensuite 1,0 mL du mélange dans un tube à essai contenant 8,0 mL de neutralisant et 1 mL d'eau.
Mélanger et laisser au contact pendant 5 minutes.

À la fin du temps de contact, mélanger et prélever en double un échantillon de 1,0 mL du mélange, Transférer chaque échantillon de 1,0 mL dans des boîtes de Pétri distinctes et ajouter 12 à 15 mL de gélose TSA en surfusion refroidie à 45°C.
Incuber les boîtes à 37 °C pendant 24 h.

3.3 - Compte rendu.

Représenter l'organigramme de la manipulation en faisant apparaître les différents réactifs employés, les volumes prélevés ainsi que les temps d'attente.

4 - Contrôle de l'innocuité de la substance neutralisante. (8 points)

4.1 - Matériel et réactifs :

- Neutralisant en flacon noté « **neutralisant** » (déjà utilisé en 3).
- 1 tube eau stérile 5 mL, noté « **eau stérile** ».
- 1 tube à essai stérile.
- 4 pipettes 1 mL et dispositif d'aspiration.
- 2 pipettes 10 mL.
- 1 vortex.
- 1 chronomètre.
- 2 boîtes de Pétri stériles.
- 30 mL de gélose TSA en surfusion en bain-marie à 45 °C.

4.2 - Mode opératoire.

Il est conseillé de réaliser au préalable un organigramme.

On appellera « **suspension bactérienne choisie** » la dilution 10^{-5} de la gamme préparée en 2.2.

Dans un tube à essai stérile, placer 8,0 mL de neutralisant, 1 mL d'eau stérile et 1,0 mL de la « suspension bactérienne choisie ».

Mélanger pendant quelques secondes et laisser agir pendant 5 minutes.

À la fin du temps de contact, mélanger et prélever en double un échantillon de 1,0 mL du mélange, transférer chaque échantillon de 1,0 mL dans des boîtes de Pétri distinctes et ajouter 12 à 15 mL de gélose TSA en surfusion refroidie à 45°C.
Incuber les boîtes à 37°C pendant 24 h.

4.3 - Compte rendu.

Estimer la concentration bactérienne dans la « **suspension bactérienne choisie** ».

5 - Validation de l'action du neutralisant sur le désinfectant. (10 points)

5.1 - Matériel et réactifs :

- Lait écrémé dilué à 10 %, noté « **substance interférente** » (déjà utilisée en 3).
- Neutralisant en flacon, noté « **neutralisant** » (déjà utilisé en 3 et 4).
- Désinfectant pour le sol à 1,25 fois sa concentration d'utilisation, noté « **désinfectant** » (déjà utilisé en 3).
- 1 tube tryptone-sel 10 mL, notés « **diluant 10 mL** ».
- 2 tubes à essai stériles.
- 6 pipettes 1 mL et dispositif d'aspiration.
- 2 pipettes 10 mL.
- 1 vortex.
- 1 chronomètre.
- 2 boîtes de Pétri stériles.
- 30 mL de gélose TSA en surfusion en bain-marie à 45 °C.

5.2 - Mode opératoire.

Il est conseillé de réaliser au préalable un organigramme.

Utiliser la « **suspension bactérienne choisie** », définie en 4.2.

Dans un tube à essai stérile, placer 1,0 mL de substance interférente, 1,0 mL de diluant puis, en déclenchant le chronomètre, ajouter 8,0 mL de désinfectant. Homogénéiser et laisser en contact pendant 5 minutes.

Transférer ensuite 1,0 mL du mélange dans un tube à essai contenant 8,0 mL de neutralisant. Mélanger et laisser au contact pendant 5 minutes.

A la fin de ce temps, ajouter 1,0 mL de la « **suspension bactérienne choisie** ».

Déclencher le chronomètre au début de l'addition et mélanger pendant quelques secondes. Laisser agir 30 minutes.

À la fin du temps de contact, mélanger et prélever en double un échantillon de 1,0 mL du mélange, transférer chaque échantillon de 1,0 mL dans des boîtes de Pétri distinctes et ajouter 12 à 15 mL de gélose TSA en surfusion refroidie à 45°C.

Incuber les boîtes à 37 °C pendant 24 h.

5.3 - Compte rendu.

La norme préconise de tester le produit désinfectant à 1,25 fois sa concentration d'utilisation.

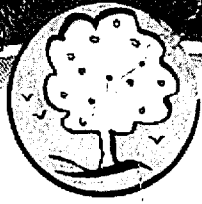
Justifier cette valeur à partir du protocole.

En s'appuyant sur les informations données dans l'annexe 1, déterminer la concentration à laquelle il faut tester le produit (exprimée en %).

ANNEXE 1 :

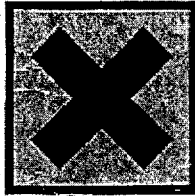
Étiquette du flacon de désinfectant

Le concept PHS
Hébergement



Le Vert Sol

Indications :
Nettoyant, désinfectant, désodorisant
pour sols et surfaces.




Xi - IRRITANT

Mode d'emploi :
Utilisation en dilution à 0,25%, soit une dose de bouchon verseur
(20 ml) pour 8 l d'eau froide ou chaude (< à 60°C).
Appliquer en lavage à plat.

Propriétés microbiologiques :
Conforme aux normes AFNOR et européennes d'efficacité anti-microbienne :
Bactéricide : NF EN 1040, NF T 72-170, NF T 72-190, T 72-300, actif sur BK.
Fongicide : NF EN 1275 (Candida albicans), T 72-300.
Actif sur les virus HIV-1 et Hépatite B.

Précautions d'emploi :
Produit d'usage externe. Ne pas avaler. Irritant pour les yeux et la peau.
Conserver hors de portée des enfants. Eviter le contact avec les yeux
et la peau. En cas de contact avec les yeux, laver immédiatement et
abondamment avec de l'eau et consulter un spécialiste.
Porter des gants appropriés.



PHS HYGIÈNE SERVICE

111, rue du Puit Dixme -
Senia 524 - 94577 ORLY
Tél. : 01 41 76 22 67 - Fax : 01 41 76 22 39
<http://www.phs.fr> - e-mail : info@phs.fr

Hygiène des surfaces